# UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE U.F.R. DE MEDECINE

# DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Biologie Cellulaire

Présenté par

**Rodolphe HAJJ** 

# REGENERATION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE DE SURFACE HUMAIN NORMAL ET MUCOVISCIDOSIQUE ET IDENTIFICATION DES CELLULES PROGENITRICES EPITHELIALES

*Thèse dirigée par :* Mlle le Docteur Christelle CORAUX

Soutenu publiquement le 27 octobre 2006

# **Devant le Jury :**

- M. le Docteur Pascal BARBRY (Sophia Antipolis)
  Mme le Docteur Anne WEBER (Paris)
  M. le Professeur Philippe BIREMBAUT (Reims)
  Mme le Professeur Dominique ISRAEL-BIET (Paris)
  M. le Docteur Richard LE NAOUR (Reims)
  Mlle le Docteur Christelle CORAUX (Reims)
- Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de Thèse

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM 514 à Reims, dirigée par Madame le Docteur Edith Puchelle, Directeur de Recherche INSERM. Je tiens à vous exprimer ma très sincère reconnaissance pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et m'avoir intégré dans votre équipe. Vous m'avez apporté beaucoup de choses pendant les trois années de thèse, sur le plan scientifique, mais également sur le plan humain. Je vous remercie...

Je tiens à exprimer ma gratitude à Mlle le Docteur Christelle Coraux, chercheur INSERM, Reims, qui a dirigé ce travail. Qu'elle soit vivement remerciée pour s'être tant impliquée dans la réalisation de cette thèse.

Je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse qui ont pris la lourde responsabilité de juger ce travail :

Le Dr. Pascal Barbry et le Dr. Anne Weber qui ont accepté la charge de rapporteurs, Le Pr. Philippe Birembaut, Le Dr. Richard Le Naour et Le Pr. Dominique Israel-Biet qui ont accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont fourni les tissus respiratoires sans qui cette étude n'aurait pas pu être réalisée : Pr. J-M. Klossek, Hôpital Jean Bernard (Poitiers, France), Dr. C. Ruaux, Clinique Mutualiste de la Sagesse (Rennes, France), Dr. P. Corlieu, Hôpital Tenon (Paris, France), Dr. C. Belleguic, Hôpital Sud (Rennes, France), Pr. J-M. Triglia, Hôpital des Enfants (Marseille, France), Dr. I. Durieu, Centre Hospitalier Lyon Sud (Lyon, France), Dr. H. Faict, CHR Lisieux (Lisieux, France), Dr. C. Pison, CHU Grenoble (Grenoble, France). La Banque de Tissus pour la Recherche (BTR) est également remerciée pour l'envoi des prélèvements tissulaires au cours de ces années de thèse.

Sans le soutien financier de l'Association Vaincre La Mucoviscidose (AVLM), cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu. J'exprime ma vive gratitude à l'AVLM ainsi qu'à tout son personnel et ses bénévoles qui n'ont jamais arrêté de beaucoup apporter à cette association.

Je remercie Thomas Baranek avec qui nous avons réussi à assurer le fonctionnement du trieur exceptionnel FACSAria : nous avons bien réussi à dominer la machine, n'est-ce pas man ?!

Je remercie les membres de l'Unité 514 qui m'ont aidé ou soutenu au cours de la réalisation de ce travail : Pierre Lesimple (la vie est belle sans stress !), Delphine Gras (ben oui, c'est mignon une thèse !), Kamel Maouche (et le temps passe... et je ne regrette rien... Fonce pour ton futur poste de MCPIPUPHP BIH !), Magali Milliot (qu'elle est belle philosophie ! c'est dommage que seuls les philosophes la maîtrise ! Courage pour l'avenir), Grégoire Le Bras (le réseau est saturé ! lol), Claire Kileztky (mais qui ne va pas arrêter de râler quand tu t'en vas ??!!), Sarah Lingée (tu ne voudras pas nous faire un 360° avec tes yeux ?!), Fériale Toumi (?!), Véronique Laplace (tu m'as trop aidé pendant ces 3 années, thx), Henriette Burlet (alors, on bosse ou on part en vacances ?!), Annie Chaveriat (heureuse ? ah oui, très heureuse !), Anne Dieudonné (tu es très serviable Anne, estce normal ?! Merci), Odile Bajolet (merci pour la bactério), Myriame Polette (merci pour tous tes conseils), Jean-Marie Tournier (t'es très sympa quand tu t'énerves, on aime bien ta moustache, et on t'aime aussi...), Béatrice Nawrocki-Raby (nous avons bien discuté, surtout pendant les repas), Noel Bonnet (tu mérites un prix Noel, euhhh Nobel !), Jean-Marie Zahm (l'homme qui domine la machine !), Philippe Birembaut (c'est bientôt...).

Le grand merci est à toi mon Bichon (Arnaud Bonnomet). Nous avons passé de très bons moments dans le bureau à parler de tout et de n'importe quoi... Nous avons partagé beaucoup de choses... Tu avais également accepté la charge de témoin pour mon mariage, thank you man....à la folie...

J'exprime toute ma reconnaissance et mon respect à vous, mes Parents, sans qui je n'aurais pas pu être ici en France pour compléter le chemin de mes études. Tout, depuis que je suis venu au monde, a été accompli grâce à vous, à votre soutien, à votre courage, et à vos sacrifices. Merci infiniment...

Et toi Claire, si tu crois que tu n'as pas participé à la réalisation de cette thèse, sache maintenant que si ! Tu étais avec mois, à mes côtés, pour me soutenir à tous les niveaux depuis mon DEA à Berck. Ta part était énorme dans la réussite de ma thèse, et je suis sûr qu'elle sera de même pour ma réussite dans la vie. Ta présence compte, et ta tendresse motive... Merci ma Biche !

# SOMMAIRE

1
4
9
12
13
13
14
16
16
16
16
16
16
17
19
21
23
24
24
25
25

B.1.2.1.3. Les jonctions communicantes	
B.1.2.1.4. Les hémidesmosomes	
B.1.2.2. Le liquide de surface	
B.1.2.2.1. Le liquide périciliaire	
B.1.2.2.2. La phase gel	
B.1.2.3. La clairance mucociliaire	
B.1.2.4. La défense immunitaire	
B.1.3. Lésions et régénération de l'épithélium respiratoire	
B.1.3.1. Sources lésionnelles	
B.1.3.1.1. Le stress mécanique	
B.1.3.1.2. Les bactéries	
B.1.3.1.3. L'inflammation	
B.1.3.1.4. Les substances toxiques	
B.1.3.2. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire	
B.1.3.2.1. Modèles de lésion-réparation de l'épithélium respiratoire	
B.1.3.2.1.1. Modèles in vivo	
B.1.3.2.1.2. Modèles in vitro	
B.1.3.2.2. Facteurs impliqués dans la régénération épithéliale	
B.1.3.2.2.1. Composants de la matrice extracellulaire	
B.1.3.2.2.2. Rôle des métalloprotéinases matricielles	41
B.1.3.2.2.3. Rôle des facteurs de croissance	
B.2. La Mucoviscidose	
B.2.1. Historique	
B.2.2. La protéine CFTR	
<b>B.2.2.1.</b> Structure, localisation et fonctions de CFTR	
B.2.2.2. Mutations du gène cftr	
B.2.3. Physiopathologie de la mucoviscidose	
B.2.3.1. Généralités	
B.2.3.2. Modifications du liquide de surface	
B.2.3.2.1. Transports ioniques transépithéliaux	
B.2.3.2.1.1. Modèle isotonique	
B.2.3.2.1.2. Modèle hypotonique	50
B.2.3.2.1.3. Conclusions	50
B.2.3.2.2. Le mucus	
B.2.3.2.2.1. Altération du contenu en lipides et en ADN	
B.2.3.2.2.2. Les mucines	51
B.2.3.3. Infection et inflammation dans la mucoviscidose	53
B.2.3.4. Déséquilibre de certains médiateurs protéiques	53

B.2.3.4.1. L'IL-8	54
B.2.3.4.1.1. L'IL-8 est surexprimée dans la mucoviscidose	54
B.2.3.4.1.2. Action de l'IL-8 sur les métalloprotéinases	54
B.2.3.4.2. Les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs tissulaires	55
B.2.4. Remodelage de l'épithélium mucoviscidosique	56
B.3. Les Cellules Souches	57
B.3.1. Concept	57
<i>B.3.1.1. Définitions</i>	57
B.3.1.2. Les cellules souches embryonnaires (CSE)	58
B.3.1.3. Les cellules souches adultes (CSA)	59
B.3.1.3.1. Généralités	59
B.3.1.3.2. Plasticité des cellules souches adultes	60
B.3.1.3.3. Implication des cellules souches adultes au niveau pulmonaire	61
B.3.2. Les cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire	63
B.3.2.1. Historique	63
B.3.2.2. Cellules candidates au statut souche/progéniteur	64
B.3.2.2.1. L'épithélium trachéo-bronchique	64
B.3.2.2.1.1. Cellules épithéliales fœtales candidates	64
B.3.2.2.1.2. Capacité de prolifération des cellules épithéliales adultes	65
B.3.2.2.1.3. Potentialités des cellules épithéliales adultes purifiées	67
B.3.2.2.2. L'épithélium bronchiolaire	69
B.3.2.2.3. L'épithélium de la jonction broncho-alvéolaire	69
B.3.2.2.4. L'épithélium alvéolaire	70
B.3.2.2.5. Conclusion sur les cellules souches épithéliales respiratoires	71
<b>B.3.2.3.</b> Notion de niche	71
<b>B.3.2.4.</b> Marqueurs potentiels de cellules souches épithéliales	72
<b>B.3.2.5.</b> La « side population » pulmonaire (SP)	73
<b>B.3.3.</b> Thérapie cellulaire de la mucoviscidose	74
B.3.3.1. Généralités	74
<b>B.3.3.2.</b> Traitement par les cellules souches de la moelle osseuse ?	75
B.3.3.3. Questions qui restent posées	75
C. REGENERATION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE DE	
SURFACE NORMAL ET MUCOVISCIDOSIOUE HUMAIN	
	77
	••• / /
C.1. Matériels et Méthodes	77
C.1.1. Tissus respiratoires humains	77
C.1.2. Analyses bactériologiques	77

C.1.3. Dissociation et culture cellulaire	
C.1.4. Xénogreffes humanisées dans la souris nude	
C.1.4.1. Préparation des trachées de rats et des cathéters	
C.1.4.2. Inoculation des cellules épithéliales et xénogreffes trachéales	
C.1.4.3. Récupération des greffons et cryofixation	
C.1.5. Recueil des produits de sécrétion épithéliaux dans les xénogre	ffes . 81
C.1.6. Histologie	81
C.1.6.1. Coupes des greffons cryofixés	
C.1.6.2. Coloration histologique des coupes	
C.1.6.3. Observation des coupes réalisées	82
C.1.7. Immunohistochimie et quantifications cellulaires	82
C.1.7.1. Principe	82
C.1.7.2. Anticorps utilisés	83
C.1.7.3. Mode opératoire	
C.1.7.4. Quantifications cellulaires	85
C.1.8. Analyse de l'expression génique	
C.1.8.1. Extraction des ARN	85
C.1.8.2. Dosage des ARN extraits	85
C.1.8.3. RT-PCR	
C.1.8.3.1. Transcription inverse (RT)	
C.1.8.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	
C.1.8.4. Migration et révélation des produits de la RT-PCR	
C.1.9. Analyse de la sécrétion d'IL-8	
C.1.9.1. Dosage de la concentration en protéines totales	88
C.1.9.2. ELISA	
C.1.10. Analyses des sécrétions de MMP-7 et MMP-9	88
C.1.11. Inhibition des MMPs au cours de la régénération	89
C.1.12. Analyses statistiques	89
C.2. Résultats	90
C.2.1. Etude histologique des épithéliums non-CF et CF	90
C.2.1.1. Dynamique de la régénération épithéliale CF et non-CF	
C.2.1.2. Vitesse de différenciation des épithéliums CF et non-CF	
C.2.1.3. Hauteur des épithéliums régénérés différenciés	
C.2.2. Etudes cellulaires quantitatives	
C.2.2.1. Prolifération cellulaire	
C.2.2.2. Quantification des différents types cellulaires épithéliaux	
C.2.2.2.1. Les cellules basales	
C.2.2.2.2. Les cellules sécrétoires	95

C.2	.2.2.3. Les cellules ciliées
C.2.3.	Marqueurs de différenciation fonctionnelle : ZO-1 et CFTR97
C.2.4.	Expression des gènes codant pour l'IL-8, les MMP-7 et -9 et pour le
	TIMP-1 au cours de la régénération99
<i>C.2.4</i> .	1. Expression de l'IL-8
<i>C.2.4</i> .	2. Expression de la MMP-7100
<i>C.2.4</i> .	3. Expression de la MMP-9101
<i>C.2.4</i> .	4. Expression de TIMP-1 102
C.2.5.	Sécrétion d'IL-8 et des MMP-7 et -9 au cours de la régénération. 103
<i>C.2.5</i> .	1. Sécrétion d'IL-8103
<i>C.2.5</i> .	2. Sécrétion de MMP-7104
<i>C.2.5</i> .	3. Sécrétion de MMP-9105
C.2.6.	Inhibition des MMPs au cours de la régénération106
С.2.6.	1. Inhibition de la MMP-7106
С.2.6.	2. Inhibition de la MMP-9 107
C.3. Dis	cussion
D. IDEN	FIFICATION DES CELLULES PROGENITRICES DE
L'EPI	THELIUM RESPIRATOIRE DE SURFACE HUMAIN
ADUL	TE115
ADUL D.1. Ma	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4.	TE115tériels et Méthodes115Approche expérimentale suivie115Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117Histologie et morphologie cellulaire117Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence1181Les anticorps utilisés1182Marquage immunohistochimique sur coupes1183.Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées »1194.Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension120
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4.	TE115tériels et Méthodes115Approche expérimentale suivie115Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117Histologie et morphologie cellulaire117Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence1181.Les anticorps utilisés1182.Marquage immunohistochimique sur coupes1183.Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées »1194.Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension120Régénération des récepteurs de surface121
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.5. D.1.6.	TE
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.5. D.1.6. D.1.6.	TE       115         tériels et Méthodes       115         Approche expérimentale suivie       115         Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117       115         Histologie et morphologie cellulaire       117         Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence       118         1. Les anticorps utilisés       118         2. Marquage immunohistochimique sur coupes       118         3. Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées »       119         4. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.6. D.1.6. D.1.6.	TE115tériels et Méthodes115Approche expérimentale suivie115Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117Histologie et morphologie cellulaire117Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence1181. Les anticorps utilisés1182. Marquage immunohistochimique sur coupes1183. Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées »1194. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension120Régénération des récepteurs de surface1211. Les anticorps utilisés1212. Analyse de la CK13122
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.5. D.1.6. D.1.6. D.1.6. D.1.6.	TE       115         tériels et Méthodes       115         Approche expérimentale suivie       115         Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117       115         Histologie et morphologie cellulaire       117         Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence       118         1. Les anticorps utilisés       118         2. Marquage immunohistochimique sur coupes       118         3. Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées »       119         4. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121         2. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121         2. Analyse de la CK13       122         3. Tri des cellules épithéliales       122
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.5. D.1.6. D.1.6. D.1.6. D.1.6. D.1.7.	TE       115         tériels et Méthodes       115         Approche expérimentale suivie       115         Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117       115         Histologie et morphologie cellulaire       117         Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence       118         1. Les anticorps utilisés       118         2. Marquage immunohistochimique sur coupes       118         3. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121         2. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121         2. Malyse de la CK13       122         3. Tri des cellules épithéliales       122         Culture cellulaire       123
ADUL D.1. Ma D.1.1. D.1.2. D.1.3. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.4. D.1.5. D.1.6. D.1.6. D.1.6. D.1.6. D.1.7. D.1.8.	TE       115         tériels et Méthodes       115         Approche expérimentale suivie       115         Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales 117         Histologie et morphologie cellulaire.       117         Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence.       118         1. Les anticorps utilisés       118         2. Marquage immunohistochimique sur coupes       118         3. Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées ».       119         4. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121         2. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension       120         Régénération des récepteurs de surface       121         1. Les anticorps utilisés       121         2. Analyse de la CK13       122         3. Tri des cellules épithéliales       122         3. Tri des cellules épithéliales       122         3. Tri des cellules épithéliales       122         3. Tri des cellulaire       123         Xénogreffes trachéales       124

D.1.9.1. Généralités	124
D.1.9.2. Principe	125
D.1.9.3. Mode opératoire	126
D.1.9.3.1. Extraction et dosage des protéines cellulaires	126
D.1.9.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	127
D.1.10. Analyses statistiques	127
D.2. Résultats	128
D.2.1. Discrimination de marqueurs cellulaires épithéliaux	128
D.2.1.1. Marqueurs non utilisables	128
D.2.1.1.1. Lectine Griffonia simplicifolia isolectine B4 (GSI-B4)	128
D.2.1.1.2. L'aquaporine 3 (AQP3)	129
D.2.1.1.3. Le CXCR2	129
D.2.1.1.4. Le CDw137	130
D.2.1.2. Marqueurs potentiellement utilisables	131
D.2.1.2.1. Les sous-unités α6 et β4 des intégrines	131
D.2.1.2.2. Le CD44	133
D.2.1.2.3. La chaîne β2 des récepteurs nicotiniques	134
D.2.1.2.4. Le récepteur IL-4Ra	135
D.2.1.2.5. Le CD166	136
D.2.1.3. Marqueurs retenus	137
D.2.1.3.1. Le facteur tissulaire	137
D.2.1.3.2. Le CD151	138
D.2.1.3.3. Co-localisation du FT et du CD151	140
D.2.2. Cytométrie en flux	140
D.2.2.1. Localisation de la population des cellules basales sur un profil de	
cytométrie en flux	141
D.2.2.2. Tri des cellules épithéliales respiratoires par cytométrie en flux	142
D.2.2.2.1. Histologie des tissus respiratoires dissociés	142
D.2.2.2.2. Tri cellulaire	142
D.2.2.2.2.1. Morphologie des cellules triées	144
D.2.2.2.2.2. Contrôle de la pureté des populations cellulaires triées	145
D.2.3. Fonctionnalité des cellules triées	146
D.2.3.1. In vitro	146
D.2.3.1.1. Cultures des cellules non-triées et triées sur plastique	146
D.2.3.1.2. Cultures des cellules non-triées et triées en interface air-liquide.	146
D.2.3.2. In vivo	147
D.2.4. Caractérisation phénotypique des épithéliums régénérés	148
D.2.4.1. Epithéliums régénérés en culture en interface air-liquide	148

D.2.4.2. Epithéliums régénérés dans les xénogreffes	
D.2.5. Activité de la télomérase dans les cellules triées	152
D.3. Discussion	
E. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	159
E.1. Régénération de l'épithélium respiratoire CF	159
E.2. Cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire normal	160
E.3. Retombées scientifiques	
BIBLIOGRAPHIE	163
ARTICLE 1	
ARTICLE 2	

# **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

## **PUBLICATIONS A COMITE DE LECTURE**

- 20064: Pierre Lesimple, Isabelle van Seuningen, Marie-Pierre Buisine, Marie-Christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffman, <u>Rodolphe Haji</u>, Steve L. Brody, Christelle Coraux, Edith Puchelle. Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliary Differentiation. Am J Respir Cell Mol Biol 2006 (sous presse).
- 2006<sub>3</sub>: <u>Rodolphe Hajj</u>, Thomas Baranek, Richard Le Naour, Pierre Lesimple, Edith Puchelle, Christelle Coraux. Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Human Adult Airway Surface Epithelium. *Stem cells* 2006 (sous presse).
- 2006<sub>2</sub>: <u>Rodolphe Haji</u>, Pierre Lesimple, Béatrice Nawrocki-Raby, Edith Puchelle, Christelle Coraux. Human Airway Surface Epithelial Regeneration is Delayed and Abnormal in Cystic Fibrosis. *J Pathol* 2006 (en révision).
- 2006<sub>1</sub>: Edith Puchelle, Pierre Lesimple, <u>*Rodolphe Haji*</u>, Christelle Coraux. Regeneration of Injured Airway Epithelium. *Ann Pharm Fr* 2006;64:107-13.
- 2005<sub>3</sub>: Christelle Coraux, <u>*Rodolphe Hajj*</u>, Pierre Lesimple, Edith Puchelle. *In vivo* Models of Human Airway Epithelium Repair and Regeneration. *Eur Respir Rev* 2005;14(97):131-6.
- 2005<sub>2</sub>: Christelle Coraux, <u>*Rodolphe Hajj*</u>, Pierre Lesimple, Edith Puchelle. Repair and Regeneration of the Airway Epithelium. *Med Sci (Paris)* 2005;21(12):1063-9.
- 20051: Christelle Coraux, Corinne Martinella-Catusse, Béatrice Nawrocki-Raby, <u>Rodolphe</u> <u>Haji</u>, Heriette Burlet, Sandie Escotte, Véronique Laplace, Philippe Birembaut, Edith Puchelle. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Interleukin-8 During Regeneration of Human Airway Epithelium In Vivo. J Pathol 2005;206(2):160-9.

## **PUBLICATIONS DE RESUMES DANS LE CADRE DE CONGRES**

- 2006<sub>4</sub>: Pierre Lesimple, Marie-Pierre Buisine, Isabelle van Seuningen, Marie-Christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffman, <u>Rodolphe Haji</u>, Christelle Coraux, Edith Puchelle. The Trefoil Factor TFF3 Promotes Human Airway Epithelial Ciliary Differentiation. Proc Am Thorac Soc 2006; 3:A533.
- 2006<sub>3</sub>: <u>Rodolphe Hajj</u>, Pierre Lesimple, Thomas Baranek, Richard Le Naour, Edith Puchelle, Christelle Coraux. Human Adult Airway Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Airway Surface Epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:A556.
- 2006<sub>2</sub>: Pierre Lesimple, Marie-Pierre Buisine, Isabelle van Seuningen, Marie-Christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffman, <u>*Rodolphe Haji*</u>, Christelle Coraux, Edith

Puchelle. The Trefoil Factor TFF3 Promotes Human Airway Epithelial Differentiation. *J Cyst Fibros* 2006; 5(1):S9.

- 2006<sub>1</sub>: <u>Rodolphe haji</u>, Pierre Lesimple, Thomas Baranek, Richard Le Naour, Edith Puchelle, Christelle Coraux. Human Adult Airway Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Airway Surface Epithelium. J Cyst Fibros 2006; 5(1):S10.
- 2005<sub>2</sub>: <u>Rodolphe Haji</u>, Pierre Lesimple, Véronique Laplace, Edith Puchelle, Christelle Coraux. La Régénération de l'Épithélium de Surface Respiratoire est Anormale dans la Mucoviscidose. *Rev Mal Respir* 2005; 22(5):847.
- 2005<sub>1</sub>: <u>Rodolphe Hajj</u>, Pierre Lesimple, Béatrice Nawrocki-Raby, Véronique Laplace, Edith Puchelle, Christelle Coraux. Human Airway Surface Epithelial Regeneration is Abnormal in Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005; 28:235.

## **COMMUNICATIONS ORALES**

- **2006**<sub>4</sub>: Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Human Adult Airway Surface Epithelium. European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), 17 juin 2006, Copenhague, Danemark.
- **2006<sub>3</sub>**: Identification des Cellules Souches/Progénitrices de l'Épithélium Trachéo-Bronchique Humain. Journée des Jeunes Chercheurs de l'IFR53 de Reims, 13 juin 2006, Reims, France.
- 2006<sub>2</sub>: Human Airway Surface Epithelial Regeneration is Delayed and Abnormal in Cystic Fibrosis. European Cystic Fibrosis Society (ECFS), 22 avril 2006, Carvoeiro, Portugal.
- 2006<sub>1</sub>: Identification des Cellules Souches/Progénitrices de l'Épithélium Trachéo-Bronchique Humain. 7<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs de la Mucoviscidose, 6 avril 2006, Paris, France.
   Prix de la meilleure présentation orale.
- 2005<sub>3</sub>: Human Airway Surface Epithelial Regeneration is Abnormal in Cystic Fibrosis. North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), 21 octobre 2005, Baltimore, États Unis.
- **2005<sub>2</sub> :** La Régénération de l'Épithélium de Surface Respiratoire est Anormale Dans La Mucoviscidose. Journée de Recherche Respiratoire (J2R), 14 octobre 2005, Reims, France.
- 2005<sub>1</sub>: Régénération de l'Épithélium Trachéo-Bronchique Humain Mucoviscidosique dans un Modèle de Xénogreffe dans la Souris nude. 6<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs de la Mucoviscidose, 31 mars 2005, Paris, France.

# **COMMUNICATIONS PAR AFFICHES**

- **2006**<sub>5</sub>: Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Human Adult Airway Surface Epithelium. Sera presenté au North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), 3 novembre 2006, Colorado, État Unis.
- **2006**<sub>4</sub> : Les Cellules Basales sont des Progéniteurs de l'Épithélium Respiratoire de Surface Humain Adulte. Journée de Recherche Respiratoire (J2R), 13 octobre 2006, Tours.
- 20063: Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Human Adult Airway Surface Epithelium. European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), 17 juin 2006, Copenhague, Danemark.
   Prix du meilleur poster.
- **2006<sub>2</sub>**: Epithelial Basal Cells are Progenitors of the Human Adult Airway Surface Epithelium. American Thoracic Society (ATS), 23 mai 2006, California, États Unis.
- 20061: Human Airway Surface Epithelial Regeneration is Delayed and Abnormal in Cystic Fibrosis. European Cystic Fibrosis Society (ECFS), 22 avril 2006, Carvoeiro, Portugal.
   Mention pour le meilleur poster.
- **2005<sub>3</sub> :** La Régénération de l'Épithélium de Surface Respiratoire est Anormale Dans La Mucoviscidose. Société de Biologie de Reims (SBR), 26 octobre 2005, Reims.
- 2005<sub>2</sub>: Human Airway Surface Epithelial Regeneration is Abnormal in Cystic Fibrosis. North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), 21 octobre 2005, Baltimore, États Unis.
- **2005**<sub>1</sub>: La Régénération de l'Épithélium de Surface Respiratoire est Anormale Dans La Mucoviscidose. Journée de Recherche Respiratoire (J2R), 14 octobre 2005, Reims.

# LISTE DES ABREVIATIONS

á	Angetröm
A °C	Angstronn Degrá Celsius
	Microgramme
μg um	Micromètre
μΠ μΙ	Microlitre
μL 2D	Deux dimensions
2D A	Area
ABC	ATP-hinding cassette
ADH	Aldéhyde déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALCAM	Activated leucocyte cell adhesion molecule
ALP	Antileucoprotéase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APS	Ammonium persulfate
AOP3	Aquaporine 3
ARNm	Acide ribonucléique messager
BA	Bleu alcian
BAA	Bodipy-aminoacetate
BAAA	Bodipy-aminoacetylaldehyde
BB94	Batimastat
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
Bcrp	Breast cancer-resistant protein
BEBM	Bronchial epithelial basal medium
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BP180	180 KDa bullous pemphigoid antigen
BP230	230 KDa bullous pemphigoid antigen
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BrdU	Bromodésoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
BSI	Banderea simplicifolia isolectin
CaCC	Calcium sensitive chloride channel
CCIO	Clara cell 10 KDa protein
CCR2B	CC representent deux cysteines liees. $R =$ receptor
CCFK	Clare call accustomentation
CD	Cluster of differentiation
CD CF	Custic fibrosis
CETR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CGRP	Calcitonin gene-related pentide
CK	Cytokératine
CLD	Chronic lung disease
$CO_2$	Dioxyde de carbone
CSĂ	Cellule souche adulte
CSE	Cellule souche embryonnaire
CSF	Colony stimulating factor
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSM	Cellule souche mésenchymateuse

CXCR	CXC représent 2 cystéines séparées par 1 acide aminé. R = receptor
DAPI	4',6'-diamino-2-phenylindole
DDR1	Discoidin domain receptor 1
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DPC	Double positive cells
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid,
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENaC	Epithelial sodium channel
EPO	Eosinophil peroxydase
erbB	EGFR
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fox	Forkhead box protein j
FSC	Forward scatter
FT	Facteur tissulaire
g	Gramme
GABAR	Gamma-aminobutyric acid receptor
GAPDH	Glyceraldehyde phosphate deshydrogenase
GATA	GATA binding protein
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GDF	Growth differentiation factor
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte macrophages-colony stimulating factor
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GRP	Gastrin related peptide
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GSI	Griffonia simplicifolia isolectin
Н	Height
h	Heure
$H_2O_2$	Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée
HCl	Acide chloridrique
$HCO_3^-$	Ion bicarbonate
HD1	Hemidesmosomal 500 KDa protein
HEPES	Hydroxyethylpiperazine ethanesulfonate
HFH	Hepatocyte Nuclear Factor 3 / forkhead homologue
HGF	Hepatocyte growth factor
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HNP	Human neutrophil peptide
HOC1	Acide hypochloreux
HSP	Heat shock protein
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
Hz	Hertz
IAL	Interface air-liquide

ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFAP300	300 KDa intermediate filament-associated protein
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
J	Jour
JAM	Junctional adhesion molecule
Kb	Kilobase
KC1	Chlorure de potassium
KDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte growth factor
kit	Kit oncogen
KPL	KPL2 protein
L	Litre
LIFR	Leukemia inhibitor factor receptor
Lin	lineage
LIII	Lipopolysaccharide
	Lipopolysacchande
	Laber-retaining cen
	Lymphocyte I
Lu	Luinere
III M	Melaine (mel/L)
	Molalle (mol/L)
	Miniampere
MAGUK	Memorane-associated guanylate kinase
MAP	Mitogene-activated protein
MAPC	Multipotent adult progenitor cells
MBP	Major basic protein
МСР	Macrophage chemoattractant protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEC	Matrice extracellulaire
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
mL	Millilitre
MM	Masse molaire
mm	Millimètre
MMC	M McElroy clone
mmLB	Millimètre de lame basale
MMP	Matrix metalloproteinase
MnCl <sub>2</sub>	Chlorure de manganese
MPR	Multidrug resistance protein
MT-MMP	Membrane type-MMP
MUC	Mucine
NaCl	Chlorure de sodium
NANOG	NANOG protein
NBD	Nuclear binding protein
ng	Nanogramme
<i>6</i> nm	Nanomètre
NO <sub>2</sub>	Dioxyde d'azote
ns	non significatif
115	non signiniouun

O <sub>3</sub>	Ozone
Oct	Octamer binding protein
OCT	Optimum cutting temperature
ORCC	Outwardly rectifying chloride channel
Р	Population
р	Probabilité
P450	450 KDa protein
Pas	Pascal x seconde
PAS	Periodic shiff acid
nh	Paire de base
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerethrin
PETA	Platelet endothelial tetraspan antigen
PGP	Protein gene product
nH	Potentiel d'hydrogène
PK	Protéine kinase
PMN	Polynucléaire neutronhile
PN	Pneumocyte
ΡΝΔ	Peanut agglutinin
R	Région
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
Ras	Regulated on derivation, normal 1 cent expressed and secreted
REX	Zinc-finger protein-42
RELA	Restriction fragment lenght polymorphism
rnm	Round per minute
RT	Rénétitions en tandem
RT_PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
s s	Seconde
S A	Semaine d'aménorrhée
Sca	Stem cell antigen
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDF	Stromal derived factor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SI PI	Secretory leucoprotesse inhibitor
SNAPE	Soluble N athylmalaimida sansitiva factor attachment protain recentor
SNAKE	Solution N-euryinnaichning -sensitive factor attachment protein receptor
SUA SD	Side population
SP	Surfactant protain
Sr	Surfactant protein Souhaan gana ragulated by cold
	Soybean gene regulated by cold
SSC	Stage specific embryonic entigen
SSEA	Stage-specific emoryonic antigen
SIAI	Signal transducer and activator of transcription
SUE	Stella letated gene
	Serum de veau fietal
Tag	The networks
T aq TDF	Tria Dereta EDTA
IBE	Tits Dolate EDTA Tetraethylmethylenediamine
I EMED	Trafail factor family
1 F F	reion factor family

Transforming growth factor
Thymus cell antigen
Tissue inhibitor of MMP
Tumor necrosis factor
Tumor rejection antigen
Tumor necrosis factor receptor-associated factor
Telomeric repeat amplification protocol
Telomerase substrate
Thyroid transcription factor
Unité
Ulex europeus antigen
Vascular endothelial growth factor
Vasoactive intestinal polypeptide
Volume
Vasoactive intestinal peptide receptor
Versus
Width
Wheat germ agglutinin
Zonula occludens

# LISTE DES FIGURES

#### Partie B : Introduction Générale

- Figure 1. Schéma général de l'appareil respiratoire humain.
- Figure 2. Architecture des voies aériennes.
- Figure 3. Morphologie de l'épithélium de surface des voies aériennes en fonction de l'étage considéré.
- Figure 4. Représentation de la muqueuse et de la sous-muqueuse trachéo-bronchique.
- Figure 5. Morphologie des cellules ciliées et mécanisme du battement ciliaire.
- Figure 6. Morphologie des cellules sécrétoires de l'épithélium de surface.
- Figure 7. Image d'une cellule séreuse.
- Figure 8. Morphologie des cellules neuroendocrines humaines.
- Figure 9. Epithélium bronchiolaire et cellules de Clara.
- Figure 10. Cellules épithéliales alvéolaires.
- Figure 11. Système jonctionnel de l'épithélium respiratoire.
- Figure 12. Schéma montrant la complexité des jonctions serrées.
- Figure 13. Schéma et image d'une jonction adhérente.
- Figure 14. Structure d'un desmosome en microscopie électronique à transmission.
- Figure 15. Schéma de jonctions communicantes.
- Figure 16. Ultrastructure d'un hémidesmosome.
- Figure 17. Structure générale du squelette des mucines.
- Figure 18. Schéma général de la clairance mucociliaire.
- Figure 19. Etapes de régénération de l'épithélium respiratoire humain.
- Figure 20. Structure de la protéine CFTR.
- Figure 21. Action de CFTR sur différents canaux ioniques.
- Figure 22. Différentes classes de mutations du gène cftr.
- Figure 23. Modèles hypotonique et isotonique de transport d'ions.
- Figure 24. Pathogénie de la mucoviscidose. Infection et inflammation.
- Figure 25. Production des MMPs au niveau de la muqueuse respiratoire.
- Figure 26. Remodelage de l'épithélium mucoviscidosique.
- Figure 27. Schéma montrant la plasticité des cellules souches.
- Figure 28. Représentation schématique des niches de cellules souches au niveau de l'épithélium respiratoire

#### Partie C : Régénération de l'épithélium respiratoire normal et mucoviscidosique

Figure 29. Schéma de greffe dans la souris nude.

- Figure 30. Dynamique de régénération épithéliale respiratoire non-CF et CF.
- Figure 31. Degré de différenciation des épithéliums non-CF et CF à J25.
- Figure 32. Hauteur des épithéliums non-CF et CF.
- Figure 33. Prolifération cellulaire au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 34. Quantification des cellules basales.
- Figure 35. Marquage BA/PAS et MUC5AC sur des épithéliums non-CF et CF différenciés.
- Figure 36. Quantification des cellules qui expriment le MUC5AC et le MUC5B.
- Figure 37. Nombre des cellules ciliées dans les épithéliums non-CF et CF.
- **Figure 38.** Différenciation des épithéliums non-CF et CF mise en évidence par ZO-1 et CFTR.
- Figure 39. Expression de l'IL-8 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 40. Expression de la MMP-7 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 41. Expression de la MMP-9 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 42. Expression de TIMP-1 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 43. Profil de sécrétion de l'IL-8 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 44. Sécrétion de la MMP-7 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 45. Sécrétion de la MMP-9 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 46. Inhibition de la MMP-7 au cours de la régénération non-CF et CF.
- Figure 47. Inhibition de la MMP-9 au cours de la régénération non-CF et CF.

#### Partie D : Cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire

- Figure 48. Schéma de culture en interface air-liquide.
- Figure 49. Expression de l'AQP3 par l'épithélium respiratoire humain adulte de surface.
- Figure 50. Expression de CXCR2 par l'épithélium respiratoire humain adulte de surface.
- **Figure 51.** Expression de CDw137 par les cellules épithéliales respiratoires cytospinées après leur dissociation.
- **Figure 52.** Expression des intégrines  $\alpha 6$  et  $\beta 4$  par les cellules épithéliales respiratoires cytospinées après leur dissociation.
- **Figure 53.** Expression des intégrines  $\alpha 6$  et  $\beta 4$  par les cellules épithéliales respiratoires cytospinées après une étape d'adhérence de 24 h.
- Figure 54. Expression de CD44 par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines de surface.
- **Figure 55.** Expression du récepteur  $\beta$ 2-nicotinique par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.
- **Figure 56.** Expression du récepteur IL-4Rα par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.
- Figure 57. Expression de CD166 par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.

- **Figure 58.** Expression du FT par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines de surface.
- **Figure 59.** Expression du CD151 par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.
- Figure 60. Double marquage du FT et du CD151 sur l'épithélium respiratoire humain.
- Figure 61. Localisation de la population des cellules basales par cytométrie en flux.
- Figure 62. Histologie des tissus respiratoires traités à la collagénase de type XIV.
- Figure 63. Tri des cellules épithéliales respiratoires par cytométrie en flux.
- Figure 64. Morphologie des cellules épithéliales respiratoires non-triées et triées.
- Figure 65. Pureté par cytométrie en flux des populations cellulaires épithéliales triées.
- Figure 66. Capacité de prolifération des cellules épithéliales non-triées et triées.
- **Figure 67.** Capacité de régénération d'un épithélium respiratoire mucociliaire *in vitro* à partir des cellules épithéliales respiratoires non-triées et triées.
- Figure 68. Capacité de régénération *in vivo* des cellules épithéliales respiratoires non-triées et triées.
- **Figure 69.** Expression de FT et CD151 sur les épithéliums régénérés en culture en IAL à partir des cellules non-triées et triées.
- Figure 70. Expression des marqueurs de différenciation par les épithéliums régénérés en culture en IAL.
- **Figure 71.** Expression de FT et CD151 sur les épithéliums régénérés en xénogreffes par les cellules non-triées et triées.
- **Figure 72.** Expression des marqueurs de différenciation par les épithéliums régénérés dans les xénogreffes.
- Figure 73. Détection de l'activité de la télomérase dans les cellules épithéliales triées.

# LISTE DES TABLEAUX

# Partie B : Introduction Générale

- Tableau 1. Classification des mucines.
- Tableau 2. Les chimiokines au niveau pulmonaire.
- Tableau 3. Marqueurs de cellules souches embryonnaires.
- Tableau 4. Marqueurs les plus utilisés pour isoler les cellules souches hématopoïétiques.
- Tableau 5. Marqueurs de l'épithélium respiratoire proximal et distal.

## Partie D : Cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire

Tableau 6. Marqueurs testés sur l'épithélium respiratoire de surface humain adulte.

- **Tableau 7.** Quantification des différentes populations cellulaires épithéliales aprèsrégénération en culture en IAL.
- **Tableau 8.** Quantification des différentes populations cellulaires épithéliales après régénération dans les xénogreffes.

# A. PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

# A.1. Généralités

L'appareil respiratoire, qui filtre plus de cinq mille litres d'air ambiant par jour, assure l'apport vital en oxygène et coordonne les échanges gazeux entre le sang et l'air ambiant (hématose) au niveau alvéolaire. Les voies aériennes doivent donc constamment neutraliser puis éliminer les nombreuses bactéries et corps étrangers transportés par l'air inhalé. Pour maintenir son intégrité indispensable aux échanges gazeux alvéolo-capillaires, la muqueuse respiratoire s'est dotée d'un système de clairance et de défense particulièrement adapté et efficace.

Outre les facteurs environnementaux qui agressent les voies aériennes respiratoires, des maladies comme la mucoviscidose peuvent nuire au fonctionnement de l'épithélium respiratoire entraînant des complications qui peuvent aboutir à la mort. Dans la mucoviscidose (CF), l'épithélium respiratoire subit des lésions et des remaniements cellulaires permettant l'installation précoce d'une infection et d'une inflammation qui persistent toute la vie. L'épithélium CF lésé doit constamment régénérer pour restaurer ses fonctions physiologiques de défense, telles que la clairance mucociliaire et la sécrétion de molécules anti-bactériennes.

Le renouvellement cellulaire de l'épithélium respiratoire normal est relativement lent. Dans la CF, ce processus est accéléré à cause des fréquentes lésions induites par les attaques bactériennes suite au dysfonctionnement des échanges ioniques dus à la mutation du canal chlorure CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). L'épithélium doit donc régénérer pour réparer ses lésions, ce qui implique les cellules souches et progénitrices dans ce phénomène.

## A.2. Buts du travail

La régénération de l'épithélium humain CF, ainsi que la comparaison de la régénération CF et non-CF n'ont jamais été étudiées. De plus, dans la littérature, tous les travaux relatifs à l'étude de l'épithélium de surface CF (histologie, quantifications, sécrétions, etc...) ont été effectuées sur des tissus infectés issus d'interventions de transplantations pulmonaires.

Jusqu'à présent, l'identité des cellules souches et progénitrices de l'épithélium de surface proximal adulte humain reste inconnue. Aucun travail n'a été mené chez l'homme pour identifier les cellules épithéliales capables de proliférer et de reconstituer un épithélium mucociliaire mature, alors que les différents travaux effectués chez les animaux restent contradictoires, suggérant que la population des cellules souches/progénitrices réside soit parmi les cellules basales, soit parmi les cellules sécrétoires de surface qui correspondent aux cellules de Clara chez la souris.

Nous avons donc cherché dans ce travail à répondre aux principales questions suivantes :

- En dehors de toute infection bactérienne, la régénération de l'épithélium CF, tant sur le plan histologique que moléculaire, est-elle normale ? Est-elle retardée par rapport à la régénération non-CF ? L'épithélium régénéré différencié CF, est-il remanié et différent de l'épithélium régénéré non-CF ?
- Quelle est la population épithéliale candidate au statut de progéniteur à l'origine des autres populations qui constituent l'épithélium respiratoire de surface non-CF ?

# A.3. Description des différents chapitres du manuscrit

Nous subdiviserons par la suite le manuscrit en quatre grandes parties:

- B. « Introduction Générale » dans laquelle nous décrirons l'appareil respiratoire et son épithélium constitué de différents types cellulaires, les fonctions de défense de ce dernier et sa réparation-régénération après lésion épithéliale. Dans la mesure où notre travail porte sur la comparaison de la régénération de l'épithélium respiratoire CF et non-CF, nous décrirons également la CF, les modifications qui sont associées à cette maladie, l'infection et l'inflammation qui l'accompagnent, ainsi que les principales cytokines et métalloprotéinases qui y sont dérégulées. Nous présenterons aussi quelques approches thérapeutiques de la mucoviscidose. Sachant que nous travaillons aussi sur l'identification des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire, nous terminerons l'introduction en définissant les cellules souches ainsi que leur plasticité, et en abordant les cellules candidates au statut souches/progéniteurs de l'épithélium respiratoire de surface.
- C. « Régénération de l'Epithélium Respiratoire de Surface Normal et Mucoviscidosique Humain» dans laquelle nous décrirons les matériels et les

méthodes associés, ainsi que tous les résultats obtenus sur la régénération de l'épithélium respiratoire CF et sur sa comparaison avec la régénération non-CF, un travail qui a fait l'objet d'un premier article. Nous discuterons les résultats obtenus.

- D. « Identification des Cellules Souches/Progénitrices de l'Epithélium Respiratoire de Surface Humain Adulte » dans laquelle nous décrirons les matériels et les méthodes associés, et nous exposerons en détails tous les résultats relatifs à cette partie. Ce travail a également fait l'objet d'un article. Les résultats obtenus seront discutés à la fin de cette partie.
- E. « Conclusion Générale et Perspectives » dans lesquelles nous dresserons un bilan de ce travail avec ses perspectives potentielles.

# **B. INTRODUCTION GENERALE**

## **B.1.** L'appareil respiratoire

## **B.1.1.** Anatomie de l'appareil respiratoire adulte

#### B.1.1.1. Généralités

Chez les mammifères, le système respiratoire est constitué par les voies extrapulmonaires qui regroupent les fosses nasales, le rhino-pharynx, le larynx, la trachée et les bronches souches, et les voies respiratoires intra-pulmonaires comprenant les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (figure 1).

Les voies aériennes sont formées par des divisions successives, dichotomiques et asymétriques. On dénombre approximativement 23 divisions pour atteindre les alvéoles pulmonaires. La trachée (1<sup>ère</sup> génération) se divise en bronches souches droite et gauche, puis en bronches lobaires et segmentaires (2<sup>ème</sup> à 8<sup>ème</sup> génération) qui à leur tour se divisent pour donner les bronchioles (8<sup>ème</sup> à 14<sup>ème</sup> génération) puis les bronchioles terminales (15<sup>ème</sup> à 19<sup>ème</sup> génération), constituant la fin des voies de conduction de l'air. Enfin, les alvéoles naissent des bronchioles terminales (19<sup>ème</sup> à 23<sup>ème</sup> génération) (figure 2).

#### **B.1.1.2.** Structure histologique de l'épithélium respiratoire

La totalité de l'appareil respiratoire est recouverte par un épithélium dont l'organisation diffère selon les étages considérés (figure 3). Les cellules changent également en fonction de l'étage, où elles auront chacune ses propriétés spécifiques (Breeze *et al.*, 1977).

#### B.1.1.2.1. L'épithélium trachéo-bronchique

Depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles, l'épithélium respiratoire comprend un épithélium de surface, en contact avec l'air inhalé, et un épithélium glandulaire, situé dans la sous-muqueuse respiratoire et relié à la lumière des voies aériennes par des canaux collecteurs renfermant l'épithélium canalaire. Les glandes sous-muqueuses sont constituées de 4 parties principales : un canal ciliaire, des canaux collecteurs, des tubules et acini muqueux, et des acini séreux (Meyrick *et al.*, 1969 ; Pastor *et al.*, 1994). L'épithélium trachéo-bronchique de

surface est dit pseudostratifié car, bien que les noyaux des cellules présentent un aspect stratifié, elles sont toutes en contact avec la lame basale, qu'elles atteignent ou non la surface des voies aériennes (McDowell *et al.*, 1978) (figure 4). Quant aux glandes, leur nombre est estimé à 4000 dans la trachée adulte humaine (Tos *et al.*, 1966). Chez l'homme, l'épithélium trachéo-bronchique est composé de plusieurs types cellulaires, tous ancrés à la membrane basale, et parmi lesquelles : les cellules ciliées, les cellules sécrétoires de surface et glandulaires, les cellules intermédiaires, les cellules basales, les cellules canalaires, les cellules séreuses, les cellules myoépithéliales et les cellules neuroendocrines.

#### B.1.1.2.1.1. Les cellules ciliées

Les cellules ciliées sont les plus nombreuses de l'épithélium de surface (figure 5A) et reposent sur une membrane basale de 40 à 60 nm d'épaisseur. Ce sont des cellules prismatiques à grand noyau situé à la partie basale de la cellule. Leur pôle apical est riche en mitochondries qui apportent l'énergie nécessaire aux battements ciliaires. Le pôle apical des cellules ciliées est recouvert par 200 à 300 cils environ (Rhodin *et al.*, 1966), et par de nombreuses microvillosités situées entre les cils. La densité et la longueur des cils varient selon le niveau du tractus respiratoire : ils sont plus longs dans la trachée (5-7  $\mu$ m) que dans les bronches (3-4  $\mu$ m) (Greenwood *et al.*, 1972), et leur diamètre moyen est de 0,25  $\mu$ m environ. *Ex vivo*, la fréquence de battement des cils de l'épithélium respiratoire est comprise entre 10 et 15 Hz (Zahm *et al.*, 1990), et est plus élevée dans les bronches proximales que dans les bronches distales (Rutland *et al.*, 1982). Le battement ciliaire est coordonné, polarisé, dissymétrique et situé dans un plan déterminé (Sleigh *et al.*, 1981) (figure 5B, C ; d'après (Sleigh *et al.*, 1988)). C'est la synchronisation de tous les battements ciliaires qui contribue activement au déplacement du mucus respiratoire vers le pharynx.

Bien que la transdifférenciation des cellules ciliées a récemment été proposée (Park *et al.*, 2006), elles ont toujours été considérées différenciées de façon définitive, c'est-à-dire incapables de se diviser pour proliférer (Kauffman *et al.*, 1980 ; McDowell *et al.*, 1983). Elles ne sont pas attachées à la lame basale par des hémidesmosomes, mais grâce à des desmosomes qui les lient aux cellules basales (Shebani *et al.*, 2005). Outre leur rôle dans le transport du mucus, elles ont également un rôle dans le transport d'eau et d'ions à travers la muqueuse respiratoire (Nadel *et al.*, 1985), ainsi que dans la sécrétion de macromolécules (Varsano *et al.*, 1987). De plus, les cellules ciliées bien différenciées expriment sur leurs membranes apicales la protéine CFTR (Puchelle *et al.*, 1992) impliquée dans la sécrétion d'ions chlorures dans le liquide de surface, et dont la mutation provoque la maladie de la mucoviscidose que nous détaillerons dans la partie B.2.

#### B.1.1.2.1.2. Les cellules sécrétoires

Appelées aussi cellules caliciformes au niveau de l'épithélium de surface en raison de leur morphologie en forme de vase (figure 6A, B), les cellules sécrétoires sont retrouvées dans l'épithélium de surface et glandulaire depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles. Dans la trachée humaine, leur nombre est estimé à 6000-7000 cellules/mm<sup>2</sup> (Ellefsen et al., 1972), et diminue dans la partie distale de l'épithélium de surface. Elles sont dispersées entre les cellules ciliées par rapport auxquelles elles sont environ cinq fois moins nombreuses (Breeze et al., 1977; McDowell et al., 1983), et avec lesquelles elles forment une population nommée « cylindrique ». Le temps de leur renouvellement est estimé à 45 jours (Rogers et al., 2003). Leur noyau est basal, entouré par la plupart des organites cellulaires, et leur cytoplasme contient des granules sécrétoires peu denses aux électrons principalement localisés dans leur pôle apical (figure 6C). Ces granules renferment essentiellement des mucines (développées dans la partie B.1.2.2.2.2), composant important du mucus respiratoire dans lequel elles sont excrétées (Verdugo et al., 1990). Les cellules sécrétoires différenciées expriment spécifiquement les cytokératines (CK) 7, 8 et 18 (Broers et al., 1989). Outre leur fonction principale de sécrétion des mucines, les cellules sécrétoires produisent aussi des protéines à activité anti-bactérienne telles que les IgA sécrétoires (Goodman et al., 1981), la peroxydase (Christensen et al., 1981; Christensen et al., 1982), etc... En réponse aux agressions environnementales, telles que fumée de cigarette, gaz irritants, produits bactériens, etc..., ces cellules peuvent remplacer les cellules ciliées provoquant ainsi une hyperplasie de cellules sécrétoires (Rogers et al., 1994 ; Rogers et al., 2003), et sont capables donc de se diviser in situ (Ayers et al., 1988) (partie développée dans B.3.2.2.). Les cellules hyperplasiques sont maintenues intactes au niveau de l'épithélium grâce à des molécules anti-apoptotiques comme la Bcl-2 (Tesfaigzi et al., 2000).

#### B.1.1.2.1.3. Les cellules intermédiaires ou parabasales

Ce sont des cellules fusiformes qui n'atteignent pas la surface de l'épithélium. Elles constituent des éléments de transition en cours de différenciation en cellules ciliées ou sécrétoires (Donnelly *et al.*, 1982). Leurs noyaux sont plus haut que ceux des cellules basales, et en microscopie électronique à transmission, elles ressemblent à ces dernières (Breeze *et al.*, 1977 ; Mercer *et al.*, 1994). En microscopie optique, les cellules intermédiaires ont été définies comme étant des cellules qui ne présentent pas morphologiquement des caractéristiques ciliées, neuroendocrines ou sécrétoires (Donnelly *et al.*, 1982 ; Breuer *et al.*, 1990). Les cellules intermédiaires représentent 7% des cellules de l'épithélium de surface, et

constituent 33% des cellules proliférantes au niveau des voies aériennes de conduction (Boers *et al.*, 1998).

## B.1.1.2.1.4. Les cellules basales

Au cours du développement fœtal, les cellules basales sont les dernières cellules différenciées mises en évidence au niveau des voies aériennes proximales (Plopper et al., 1986). L'analyse de l'expression de marqueurs phénotypiques des cellules épithéliales au cours du développement de la trachée de rat a confirmé l'apparition tardive des cellules basales (Randell et al., 1993). Chez l'adulte, ce sont des cellules de petites tailles, triangulaires (figure 4), dont le rapport nucléo-cytoplasmique est très important, qui sont situées dans la partie la plus basale de l'épithélium respiratoire de surface au contact de la lame basale. Elles sont plus nombreuses au niveau proximal de l'épithélium respiratoire où elles représentent 30% environ de la population épithéliale et occupent 90% de la lame basale (Mercer et al., 1994), avec un nombre compris entre 90 et 120 cellules/mm de lame basale (Shebani et al., 2005). Elles sont de moins en moins nombreuses au niveau distal (Baldwin et al., 1994) où elles représentent 2 à 10% environ de la population dans les segments bronchiolaires inférieurs à 0,5 mm (Boers et al., 1998). Leur nombre est fortement corrélé à la hauteur de l'épithélium de surface et est proportionnel à celui des cellules cylindriques (Evans et al., 1989; Evans et al., 1990; Evans et al., 1991; Evans et al., 1992). Les cellules basales sont ancrées à la lame basale par des jonctions stables situées à leur pôle basal (les hémidesmosomes décrits par la suite), et sont attachées aux autres cellules épithéliales par des desmosomes (Baldwin et al., 1994) qui jouent un rôle primordial dans l'attachement des cellules cylindriques à la lame basale (Shebani et al., 2005). Elles expriment spécifiquement la CK5 (Daniely et al., 2004), 13 (Dupuit et al., 1995b), 14 (Dupuit et al., 2000) et 17 (Nakajima et al., 1998) et sont également impliquées dans la régénération des cellules ciliées et sécrétoires de l'épithélium de surface (partie développée dans B.3.2.2.). L'index de prolifération des cellules basales représente 51% environ des cellules proliférantes de l'épithélium respiratoire humain adulte (Boers et al., 1998), témoignant ainsi de l'importance de l'implication de ces cellules dans le maintien des différentes populations cellulaires de l'épithélium respiratoire.

Outre leur rôle dans l'ancrage de l'épithélium respiratoire à la lame basale *via* les hémidesmosomes et les desmosomes, les diverses fonctions des cellules basales restent toujours à établir (Evans *et al.*, 2001). Cependant, l'expression de certaines molécules membranaires ou cytoplasmiques leurs confèreraient certains rôles hypothétiques.

L'expression de p63 (homologue du p53, protéine antitumorale) dans les cellules basales uniquement a suggéré un rôle progéniteur de ces cellules, puisque le p63 est exprimé au niveau des cellules souches/progénitrices des différentes cellules épithéliales, notamment épidermiques (Pellegrini *et al.*, 2001), ainsi qu'un rôle indispensable à leur développement et leur apparition puisque les souris p63-/- ont un épithélium formé uniquement de cellules ciliées et sécrétoires (Daniely *et al.*, 2004). L'expression de p63 au niveau de la couche des cellules basales indiquerait également que les carcinomes épidermoïdes pulmonaires seraient préférablement originaires de ces cellules.

L'expression de la Bcl-2 au niveau des cellules basales de l'épithélium respiratoire normal (Pezzella *et al.*, 1993) pourrait témoigner de l'importance de ces cellules dans la survie et le maintien de la population des cellules épithéliales.

L'expression des messagers de la superoxyde dismutase (un antiradical libre) dans les cellules basales (Su *et al.*, 1997), ainsi que des molécules membranaires comme le MRP (multidrug resistance protein ; canal qui transporte les dérivés du glutathion) (Su *et al.*, 1997), mettrait en relief le rôle de ces cellules dans la défense de l'épithélium respiratoire contre les divers oxydants. De plus, l'expression de protéines comme le TRAF-4 (protéine associée aux récepteurs des cytokines pro-inflammatoires de la famille TNF), et le CDw137 (un récepteur du TNF), exclusivement dans les cellules basales épithéliales (Boussaud *et al.*, 1998) renforcerait l'idée de la contribution de ces cellules à la défense épithéliale.

L'expression membranaire de certains canaux à eau comme les aquaporines au niveau des cellules basales (Kreda *et al.*, 2001) impliquerait ces cellules dans les phénomènes d'échanges ioniques et de transport d'eau, modulant ainsi la composition du mucus respiratoire. La présence du CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique qui est capable de retenir une très grande quantité d'eau) sur les cellules basales (Peroni *et al.*, 1996) confèrerait à ces dernières un rôle important dans le maintien de l'état hydraté de l'espace intercellulaire où se déroule une grande partie des transports d'eau et d'ions. De plus, l'implication du CD44 dans le phénomène de la migration cellulaire (Koochekpour *et al.*, 1995) souligne le rôle des cellules basales dans la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire.

Le DDR1 (discoidin domain receptor 1) a montré son expression sur les cellules basales de l'épithélium respiratoire (Sakamoto *et al.*, 2001). En effet, ce récepteur du collagène IV est indispensable à l'agrégation de la moisissure jaune, et possède un domaine homologue au facteur V de coagulation sanguine. Ainsi, à part la forte interaction qui pourrait exister entre ce récepteur et le collagène IV de la lame basale pour maintenir l'attachement de l'épithélium respiratoire à la matrice extracellulaire, le DDR1 pourrait également jouer un rôle dans l'adhérence intercellulaire favorisant la stabilité de l'épithélium respiratoire, en particulier la couche des cellules basales. En outre, il a été récemment montré que le DDR1 provoque une augmentation de l'inflammation chez la souris dans laquelle on a induit une fibrose par la bléomycine. En effet, les souris DDR1-/- ont montré une absence de l'inflammation (Avivi-Green *et al.*, 2006), et les souris chez lesquelles les auteurs ont bloqué les DDR1 ont montré une atténuation de cette inflammation provoquée (Matsuyama *et al.*, 2006). Ces résultats

mettent en évidence la contribution des cellules basales au processus inflammatoire se déroulant au niveau de l'épithélium respiratoire dans certaines maladies comme la CF.

Les cellules basales expriment également le VPAC2 (Groneberg *et al.*, 2001), un récepteur du VIP (vasoactive intestinal polypeptide) impliqué dans la dilatation des vaisseaux sanguins. De plus, le VIP a montré son rôle très important dans la modulation de la réponse inflammatoire, et a suggéré son implication dans la protection du tissu respiratoire vis-à-vis des dommages induits par l'inflammation. Aussi, le VIP a également montré son rôle dans la migration, la prolifération, et la production de cytokines par les cellules inflammatoires (Bellinger *et al.*, 1996). Tout ceci suggère l'implication des cellules basales dans la protection de l'épithélium respiratoire de surface ainsi que dans les phénomènes de prolifération et de migration, cette dernière fonction étant auparavant suggérée dans notre laboratoire en montrant que les cellules basales en migration exprimaient la vimentine (Buisson *et al.*, 1996a). En plus du récepteur VPAC2, les cellules basales expriment également des récepteurs de types nicotiniques qui pourraient eux aussi jouer un rôle dans la migration des cellules basales (Tournier *et al.*, 2006).

Une des molécules exprimées au niveau des cellules basales est la connexine 43 qui marque les jonctions communicantes (Brezillon *et al.*, 1997b). La présence de ce type de jonctions témoigne de l'activité des cellules basales dans la communication cellulaire, soulignant ainsi un rôle fonctionnellement important de ces cellules sur le plan physiologique. De plus, les connexines ont montré leur implication dans la prolifération cellulaire puisqu'elles seraient des potentielles cibles antitumorales (Mesnil *et al.*, 2004), appuyant ainsi sur le rôle proliférateur des cellules basales épithéliales respiratoires.

Le rôle précis des cellules basales, ainsi que celui suggéré auparavant en ce qui concerne leur pouvoir souche/progéniteur, leur implication dans l'inflammation et dans l'adhérence cellulaire, etc. (Evans *et al.*, 2001), reste toujours à explorer.

## B.1.1.2.1.5. Les cellules canalaires

Ce sont les cellules des canaux glandulaires de l'épithélium trachéo-bronchique (figure 4), qui sont en continuité avec les cellules de l'épithélium de surface. L'épithélium canalaire est cilié pour la grande majorité des cellules, permettant la propulsion des sécrétions glandulaires vers le liquide de surface. C'est au niveau de ces canaux glandulaires qu'une niche de cellules souches de l'épithélium trachéo-bronchique a été suggérée (Borthwick *et al.*, 2001).

#### B.1.1.2.1.6. Les cellules séreuses

Les cellules séreuses (signifiant des cellules qui contiennent des protéines de type sérique) ont été décrites dans l'épithélium de surface des rats, des chats, des jeunes hamsters et des fœtus humains (Jeffery *et al.*, 1997), ainsi que dans l'épithélium de souris (Pack *et al.*, 1980). Elles ont également été décrites au niveau des petites bronches et bronchioles chez l'homme (Rogers *et al.*, 1993), mais ne sont exprimées que de façon transitoire lors du développement embryonnaire (Gaillard *et al.*, 1994). Au niveau glandulaire, elles sont plus nombreuses et ressemblent morphologiquement aux cellules séreuses de l'épithélium de surface. A l'inverse des cellules sécrétoires, leur cytoplasme contient des granules denses aux électrons de diamètre allant de 300 à 1800 nm (figure 7) (Meyrick *et al.*, 1970). Ces granules renferment des protéines telles que le lysozyme (Hinnrasky *et al.*, 1990), la transferrine (Bowes *et al.*, 1981), l'antileucoprotéase (Franken *et al.*, 1980), etc... Les cellules séreuses sécrètent également des mucines neutres sulfatées (Lamb *et al.*, 1970), et des substances non muqueuses, probablement des lipides, comme l'a montré l'étude de Spicer *et al.* en 1980 (Spicer *et al.*, 1980).

#### B.1.1.2.1.7. Les cellules myoépithéliales

Présentes au pourtour des acini glandulaires formés par les cellules séreuses et muqueuses, les cellules myoépithéliales de forme allongée sont positionnées à la base de l'épithélium glandulaire en contact avec la lame basale. Elles expriment la cytokératine 14 qui est caractéristique des cellules épithéliales basales, et l' $\alpha$ -actine caractéristique des fibres musculaires lisses. Elles entourent les glandes, et en se contractant, elles favorisent l'expulsion des sécrétions glandulaires depuis les tubes collecteurs vers la lumière des voies aériennes par la pression qu'elles exercent sur les glandes. Une étude récente a montré que les tackinines sécrétées par les terminaisons nerveuses, et surtout par les cellules inflammatoires au niveau glandulaire, favorisent la contraction glandulaire *via* la neurokinine 1, récepteur de la substance P situé sur la membrane des cellules myoépithéliales (Springer *et al.*, 2005), ce qui favorise le cheminement des sécrétions glandulaires vers le liquide de surface et souligne le rôle de l'inflammation dans l'hypersécrétion du mucus dans la mucoviscidose.

#### B.1.1.2.1.8. Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines, ou cellules à denses granules, ou cellules de Kultchitsky, ou cellules de Feyrter, ont été identifiées dans l'épithélium respiratoire de surface par microscopie optique. Ces cellules ont longuement été considérées comme étant d'origine ectodermique, dérivées de la crête neurale ; cependant, il a clairement été montré qu'elles proviennent de l'endoderme du bourgeon pharyngien et représentent donc une sous population de cellules épithéliales (Warburton et al., 1998). Elles sont distribuées de façon éparse le long de l'épithélium des voies aériennes (Adriaensen et al., 1993 ; Johnson et al., 1997), mais se regroupent particulièrement au niveau bronchiolaire où elles forment des corps neuroépithéliaux. Elles ont une forme pyramidale ou triangulaire proche de celle des cellules basales, et sont toutes au contact de la lame basale. Elles peuvent être distinguées par le profil de leurs molécules biologiquement actives comme la sérotonine, la calcitonine, le CGRP (calcitonin gene-related peptide), la chromogranine A, la GRP (gastrin related peptide) et la bombésine, cette dernière étant impliquée dans le tonus vasculaire et musculaire bronchique, ainsi que dans la sécrétion du mucus et de l'activité ciliaire (Wharton et al., 1978 ; Polak et al., 1993). Ces peptides largués par les cellules neuroendocrines jouent un rôle déterminant dans le développement fœtal et dans la morphogenèse branchée (Sunday et al., 1990 ; Li et al., 1994). Chez l'homme, une étude très récente montre que les cellules neuroendocrines ont une forme en bouteille de hauteur moyenne de 50 µm, leur corps cellulaire se situant au niveau basal en contact avec la lame basale avec un prolongement du cytoplasme qui atteint la surface de l'épithélium respiratoire (figure 8) (Weichselbaum et al., 2005). En outre, les cellules neuroendocrines ont été suggérées comme intervenant dans la réparation de l'épithélium lésé, et ont donc le statut de potentielles cellules souches/progénitrices au niveau bronchiolaire (Reynolds et al., 2000a).

## B.1.1.2.2. L'épithélium bronchiolaire

L'épithélium bronchiolaire se situe vers la périphérie au niveau des bronchioles. Il est cylindrique, dépourvu de cellules caliciformes, les cellules ciliées sont moins hautes, et les cellules basales sont beaucoup moins nombreuses. On distingue également un autre type cellulaire, les cellules de Clara ou cellules en dôme présentant un pôle apical faisant saillie dans la lumière bronchiolaire caractérisé par la présence de quelques microvillosités irrégulières et de grains de sécrétion de 300-600 nm de diamètre (figure 9) (Singh *et al.*, 1997).

Les cellules de Clara ou cellules bronchiolaires non-ciliées sont des cellules de forme ovale chez l'homme, mais irrégulière chez les autres espèces (Plopper *et al.*, 1983). Leur cytoplasme est riche en glycogène et contient un réticulum endoplasmique lisse chez la plupart des animaux, mais ces deux derniers sont rares voire absents chez l'homme (Plopper *et al.*, 1980). Elles sont également riches en P450 qui est l'enzyme responsable de la détoxification de certaines molécules, les xénobiotiques (Widdicombe *et al.*, 1982 ; Castell *et al.*, 2005). Les cellules de Clara sécrètent principalement la protéine CC10 (Clara Cell 10

Kda) ou CCSP (Clara Cell Secretory Protein) (Singh *et al.*, 1988) qui joue un rôle antiinflammatoire (Singh *et al.*, 2000 ; Watson *et al.*, 2001 ; Miller *et al.*, 2006) en étant un potentiel inhibiteur de la phospholipase A2 (Mantile *et al.*, 1993). En effet, des souris déficientes en CC10 sont sensibles aux gaz inhalés et présentent des altérations cellulaires par rapport aux souris contrôles (Stripp *et al.*, 2000). Les cellules de Clara sécrètent aussi l'antileucoprotéase (de Water *et al.*, 1986 ; Willems *et al.*, 1988) et les protéines A et B du surfactant alvéolaire, et sont connues pour leur capacité d'échange ionique (Van Scott *et al.*, 1987). En outre, elles se comportent comme des cellules souches au niveau de l'épithélium bronchiolaire : elles assurent son autorenouvellement, et en cas de lésion sont capables de proliférer pour remplacer les cellules ciliées (Emura *et al.*, 1997) (partie développée dans B.3.2.2.).

### B.1.1.2.3. L'épithélium alvéolaire

Les cellules épithéliales alvéolaires sont de 2 types : les cellules épithéliales de type I ou pneumocytes I (PNI), et les cellules épithéliales de type II ou pneumocytes II (PNII) (figure 10). Les alvéoles sont recouvertes par une fine pellicule constituant le surfactant contenant 85-90% de lipides, 10% de protéines et 2% de carbohydrates. Les principales protéines du surfactant sont SP-A et SP-D qui sont hydrosolubles, SP-B et SP-C qui sont hydrophobiques et spécifiques du poumon (SP pour surfactant protein). La fonction majeure du surfactant est le maintien de la diminution de la tension de surface afin d'empêcher le collapsus de l'alvéole, cette fonction étant principalement assurée par les polypeptides SP-B et SP-C (Johansson *et al.*, 1994). Le surfactant joue également un rôle dans la défense immunitaire du poumon *via* certains de ses composants qui peuvent stimuler la phagocytose et la capacité de dégradation et de migration des macrophages alvéolaires (O'Neill *et al.*, 1984; Hoffman *et al.*, 1987).

#### B.1.1.2.3.1. Les pneumocytes I

Bien que les PNI couvrent 95% de la surface alvéolaire environ (5100  $\mu$ m<sup>2</sup> environ), ils ne représentent que 37% de la population épithéliale à cause de leur forme allongée. Ils ont un volume moyen de 1800  $\mu$ m<sup>3</sup> (Crapo *et al.*, 1982) et possèdent peu d'organelles intracellulaires témoignant de leur activité métabolique peu intense (Mercurio *et al.*, 1976). L'extrême finesse de leur compartiment cytoplasmique (0,1 à 0,3  $\mu$ m d'épaisseur) permet d'expliquer le rôle vraisemblablement majeur joué par ces cellules dans les échanges gazeux, ce d'autant que par endroits le contact entre les cellules endothéliales et les PNI semble pratiquement direct. Des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines membranaires des PNI ont été mis au point pour leur isolement et leur distinction des PNII (Dobbs *et al.*, 1988). Les PNI sont des cellules différenciées de façon définitive, incapables de se diviser pour proliférer (Weibel *et al.*, 1971).

### B.1.1.2.3.2. Les pneumocytes II

Les PNII occupent 5% de la surface alvéolaire et constituent 63% de la population épithéliale, avec un volume moyen qui vaut la moitié de celui du PNI (750 μm<sup>3</sup> environ) (Crapo et al., 1982; Fehrenbach et al., 1995). Ils sont typiquement retrouvés dans les coins des septa alvéolaires et sont partiellement recouverts par des expansions cytoplasmiques des PNI auxquelles ils sont liés par des jonctions intercellulaires (Castranova et al., 1988). Ce sont des cellules métaboliquement très actives comme en témoigne la richesse du cytoplasme en mitochondries et en réticulum endoplasmique rugueux. Elles sont caractérisées par la présence de corps lamellaires correspondant à la forme de stockage intracellulaire du surfactant pulmonaire (Wright et al., 1987). Les corps lamellaires, au nombre de 150 par cellule environ (Young et al., 1981), sont situés préférentiellement à proximité du pôle apical, occupent 10% environ du volume cellulaire (Fehrenbach et al., 1995) et sont sécrétés par exocytose à la surface de l'alvéole : à ce niveau, leur structure est modifiée et donne naissance aux figures myéliniques tubulaires (Williams et al., 1977). La principale fonction des PNII est la synthèse et la libération intra-alvéolaire du surfactant. Il semblerait que les PNII soient proches des cellules de Clara tant sur le plan immunocytochimique (Balis et al., 1985 ; Walker et al., 1986; Williams et al., 1988) qu'enzymatique (Devereux et al., 1981) ou sécrétoire, puisque ces 2 types cellulaires déchargent leurs granules en réponse aux agonistes bêta-adrénergiques (Massaro et al., 1981). En outre, les PNII constituent les cellules souches de l'épithélium alvéolaire, assurant son autorenouvellement toutes les 4-5 semaines environ (SPENCER et al., 1962) et celui des PNI, et proliférant en cas de lésions (Smith et al., 1981) (partie développée dans B.3.2.2.).

### B.1.2. Fonctions de défense de l'épithélium respiratoire

Pour remplir son rôle dans les échanges gazeux, le poumon est un organe ouvert sur le milieu environnant et, de ce fait, exposé aux agressions extérieures et à de nombreux agents pathogènes. Etant donné la fréquence et la diversité des agents toxiques et infectieux qui entrent en contact avec l'épithélium respiratoire, celui-ci s'est doté d'un système de défense constitué des jonctions intercellulaires, du liquide de surface qui le couvre, ainsi que par la réponse immunitaire associée.

### B.1.2.1. Intégrité de l'épithélium respiratoire

La cohésion de l'épithélium de surface est assurée par la présence de jonctions intercellulaires qui constituent une barrière physique imperméable vis-à-vis des aéro-contaminants et des bactéries. Les diverses cellules constituant l'épithélium de surface sont ancrées à la lame basale par les hémidesmosomes et fixées les unes aux autres par plusieurs types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage et les jonctions communicantes (figure 11).

### B.1.2.1.1. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées ou « tight junctions » sont situées au niveau de la partie apicale du pôle baso-latéral des cellules épithéliales de surface. Leur rôle est de cimenter l'épithélium en empêchant de façon sélective le passage de molécules à travers la voie paracellulaire (FARQUHAR et al., 1963 ; Madara et al., 1987). Elles constituent ainsi la première ligne de défense contre les agressions de l'environnement extérieur. En formant des pores qui limitent le passage des molécules dont le rayon est supérieur à 15 Å (Madara et al., 1985), elles jouent un rôle crucial dans le transport vectoriel tel que l'absorption et la sécrétion des liquides et des solutés comme les ions chlorures et sodium (Godfrey et al., 1992). Les membranes de deux cellules adjacentes fusionnent le long des crêtes jonctionnelles formées par des protéines transmembranaires, l'occludine, claudine et JAM (junctional adhesion molecule) (Furuse et al., 1993 ; Balda et al., 2000). La présence d'occludine corrélée à une résistance transépithéliale importante suggère qu'elle est impliquée dans la fonction de barrière des jonctions serrées (Wong et al., 1997). Plusieurs protéines cytoplasmiques de la famille MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) associées aux jonctions serrées ont été identifiées : zonula occludens (ZO)-1 (Stevenson et al., 1986 ; Anderson et al., 1988), ZO-2 (Gumbiner et al., 1991), ZO-3 (Gonzalez-Mariscal et al., 2000), et la cinguline (Citi et al., 1988) principalement. Elles interagissent avec l'occludine, les claudines et le cytosquelette d'actine permettant la stabilisation du complexe à la membrane plasmique (figure 12). La détection immunohistochimique de ZO-1 constitue un des marqueurs de polarité de l'épithélium respiratoire de surface.

## B.1.2.1.2. Les jonctions d'ancrage

On en distingue deux types : les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions adhérentes, ou jonctions intermédiaires, forment une ceinture appelée *zonula adherens* située
sur la membrane baso-latérale juste en dessous des jonctions serrées. La cadhérine-E (E pour épithéliale) représente la principale molécule transmembranaire des jonctions adhérentes, créant des interactions homotypiques calcium-dépendantes entre cellules voisines. Les cadhérines sont associées à une plaque cytoplasmique comportant des molécules de caténines (figure 13) qui vont interagir avec le cytosquelette d'actine directement ou *via* des protéines intermédiaires telles que la vinculine, l' $\alpha$ -actinine et ZO-1 (Imamura *et al.*, 1999), leur rôle essentiel étant de transmettre la modification de la forme provoquée par la contraction des filaments d'actine (Perez-Moreno *et al.*, 2003).

Les desmosomes, ou *macula adherens*, situés le long de la membrane baso-latérale sous les jonctions adhérentes, assurent la cohésion de l'épithélium en présentant une morphologie caractéristique de boutons de pression (figure 14). Toutes les cellules de l'épithélium de surface sont ancrées par l'intermédiaire de ces jonctions. Les desmosomes sont constitués d'un domaine membranaire composé de molécules de desmocollines et desmogléines (un type particulier de cadhérines). La plaque cytoplasmique est formée de molécules de plakoglobines et de desmoplakines (Green *et al.*, 2000), et est reliée aux filaments intermédiaires de cytokératines (Garrod *et al.*, 1996) assurant ainsi une continuité du cytosquelette à travers l'épithélium de surface. De plus, les desmosomes permettent la formation de réseaux intracellulaires de cytokératines contribuant au maintien de la morphologie cellulaire.

# B.1.2.1.3. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes, ou « gap junctions », sont des canaux qui permettent la communication intercellulaire (figure 15) (Falk *et al.*, 2000b). Elles sont formées de deux sous-unités multimériques appelées connexons disposés dans la membrane pour former un pore avec un diamètre large permettant le transport de molécules de tailles inférieures à 1200 Da. Chaque connexon est composé de six sous-unités protéiques appelées connexines (Falk *et al.*, 2000a). Les connexons sont généralement maintenus fermés, mais lorsqu'ils sont couplés à un autre connexon leur faisant face, ils s'ouvrent, permettant ainsi la communication cellulaire. Ils peuvent également s'ouvrir de façon spontanée en réponse à des agonistes tels que les ions Ca<sup>2+</sup> et H<sup>+</sup> permettant le passage de molécules et d'ions d'une cellule à une autre, comme les messagers secondaires, les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc), l'inositol triphosphate et les molécules anti-mitotiques transmises pour indiquer l'arrêt de prolifération cellulaire suite à une inhibition de contact ; ils sont donc essentiels à une activité cellulaire bien coordonnée (Ahmad *et al.*, 2001 ; Valiunas *et al.*, 2001). En outre, les jonctions communicantes ont été décrites comme étant acteurs principaux dans différents processus physiologiques et morphogénétiques *via* leurs connexines (Willecke *et al.*, 2002), ces

dernières étant considérées actuellement comme potentielles cibles anti-tumorales (Mesnil *et al.*, 2004).

## B.1.2.1.4. Les hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont des complexes multiprotéiques de 0,1 à 0,5  $\mu$ m de diamètre qui permettent l'attachement des cellules épithéliales à la lame basale sous-jacente, et assurent la connexion entre les éléments du cytosquelette cellulaire et la matrice extracellulaire (Garrod *et al.*, 1993 ; Green *et al.*, 1996) permettant ainsi la stabilité de l'épithélium respiratoire. Ils ont été décrits au niveau des cellules basales épithéliales (Nakajima *et al.*, 1998) et non pas au niveau des cellules ciliées et sécrétoires de l'épithélium respiratoire (Shebani *et al.*, 2005).

Les hémidesmosomes sont formés d'une plaque intracellulaire dense aux électrons appelée plaque interne sur laquelle convergent les filaments de cytokératines (Jones *et al.*, 1994), et d'une plaque cytoplasmique qui forme un épaississement de la membrane plasmique (figure 16) (Borradori *et al.*, 1996). Leurs composants protéiques ont pu être déterminés par l'étude d'une famille de maladies auto-immunes ou génétiques de la peau : les pemphigoïdes bulleuses et les épidermolyses bulleuses. La plaque cytoplasmique des hémidesmosomes est constituée de la protéine BP230, la plectine, IFAP300 et HD1 (Moll *et al.*, 1998). Dans cette plaque, nous trouvons un des constituants majeurs de ces jonctions, l'intégrine  $\alpha_6\beta_4$  (Stepp *et al.*, 1990 ; Lee *et al.*, 1992) qui a la particularité de se lier aux filaments intermédiaires de cytokératines. C'est le récepteur cellulaire de la laminine 5 et assure l'intégrité des hémidesmosomes (Spinardi *et al.*, 1995). Nous trouvons également dans la plaque cytoplasmique la BP180 ou collagène XVII (Giudice *et al.*, 1992). Parmi les composants des hémidesmosomes se trouve aussi la tétraspanine CD151 que nous exposerons plus en détail dans les résultats de la partie C.2.

# B.1.2.2. Le liquide de surface

L'épithélium respiratoire est recouvert depuis les voies aériennes supérieures jusqu'aux bronchioles terminales par un film de liquide visqueux dont l'épaisseur *in vivo* est de 7 µm en moyenne chez l'homme au niveau des bronches (Jayaraman *et al.*, 2001). Ce film est composé de 95% d'eau et d'ions, 1% de protéines et de lipides et de 4% de macromolécules de type mucines. Le liquide de surface constitue un véritable tapis roulant permettant de piéger en permanence des bactéries et de les entraîner des petites bronches jusqu'au pharynx où elles seront dégluties, grâce aux mouvements ciliaires synchronisés dans une couche liquidienne périciliaire revêtue d'une couche de mucus viscoélastique. Les alvéoles ne sont pas directement épurées par la clairance mucociliaire, mais par les

macrophages alvéolaires qui peuvent ensuite migrer jusqu'à l'épithélium cilié des bronchioles terminales pour être éliminés avec les sécrétions bronchiques (Pavia *et al.*, 1991).

# B.1.2.2.1. Le liquide périciliaire

La couche périciliaire ou phase sol est constituée d'un fluide aqueux, dont l'épaisseur est légèrement inférieure à la longueur des cils étirés en présence de mucus. L'origine de ce liquide est secondaire aux mouvements ioniques transépithéliaux tels que la sécrétion de Cl<sup>-</sup> et l'absorption de Na<sup>+</sup> (Smith *et al.*, 1993), qui sont minutieusement ajustées pour contribuer à la régulation du volume de la couche périciliaire ; en effet, l'épaisseur de cette couche, et donc sa composition ionique, sont essentielles pour l'efficacité du transport mucociliaire (Tarran *et al.*, 2004). Une épaisseur exagérée de la couche périciliaire supprime le couplage entre les cils et la couche de mucus qui le recouvre (Sleigh *et al.*, 1981). A l'inverse, une quantité insuffisante de liquide gêne le battement des cils englués dans le mucus.

Le liquide périciliaire contient également plusieurs protéines solubles, la plupart provenant des cellules séreuses des glandes sous-muqueuses (Kaliner *et al.*, 1991), une autre partie provenant des cellules muqueuses. Ces protéines, par leurs activités antibactériennes, antiprotéasiques ou antioxydantes, participent activement à la protection des voies respiratoires (Bals *et al.*, 2004).

Plusieurs de ces molécules ont été mises en évidence au niveau de l'épithélium respiratoire (Ganz *et al.*, 2002). Le lysozyme, une protéine basique de 14 KDa, présente une activité enzymatique permettant de dégrader les peptidoglycanes qui constituent la charpente des parois bactériennes.

La transferrine, une glycoprotéine de 80 KDa, a une très forte affinité pour les atomes de fer indispensables au cycle respiratoire de la bactérie, et est très abondante dans les granules des neutrophiles et sécrétée par les cellules épithéliales séreuses (Bowes *et al.*, 1981).

L'antileucoprotéase, ou SLPI pour « secretory leucoprotease inhibitor », est une protéine non glycosylée de 12 KDa sécrétée par les cellules épithéliales séreuses (Franken *et al.*, 1980 ; Lee *et al.*, 1993) ainsi que par les cellules de Clara (Willems *et al.*, 1989).

L'al-antitrypsine, inhibiteur de protéases, est une protéine de 53 KDa, d'origine hépatique, capable d'inhiber l'élastase.

Les défensines, peptides amphiphiles de 3 à 5 KDa, sont divisées en 2 catégories, les  $\alpha$ défensines produites par les polynucléaires neutrophiles (Lehrer *et al.*, 1993) et les  $\beta$ défensines produites par les cellules épithéliales respiratoires (Zhao *et al.*, 1996 ; Singh *et al.*, 1998 ; Bals *et al.*, 1998).

Les antioxydants, tels que le glutathion, la superoxyde dismutase et la catalase, sont présents dans le liquide périciliaire afin de lutter contre les radicaux libres (Cantin *et al.*, 1987 ; Cantin

et al., 1990) largués par les cellules inflammatoires ou par les agents chimiques ou pharmacologiques.

Enfin, les cathélicidines, membres d'une grande famille de peptides anti-bactériens, ont une structure N-terminale conservée et un domaine C-terminal hautement variable (Zanetti *et al.*, 1995). Leur surexpression dans un modèle de xénogreffe bronchique dans la souris permet le rétablissement de l'activité anti-bactérienne du liquide de surface CF (Bals *et al.*, 1999).

### B.1.2.2.2. La phase gel

La phase gel ou mucus est essentiel pour le transport des particules grâce au battement ciliaire. Le film de mucus est plus épais au niveau des grosses voies aériennes par rapport aux plus petites, en raison de la présence des glandes muqueuses et de l'impaction des particules inhalées qui stimulent sa sécrétion.

Le mucus possède des propriétés rhéologiques et de surface qui conditionnent l'épuration des voies aériennes. La viscoélasticité du mucus respiratoire permet sa propulsion par les cils (King et al., 1987). L'élasticité semble le paramètre le mieux corrélé à l'efficacité du transport mucociliaire (Puchelle et al., 1980 ; Puchelle et al., 1987). Une viscoélasticité intermédiaire comprise entre 5 et 20 Pa.s et un temps de relaxation de l'ordre de 40 s représentent le profil viscoélastique favorable au transport du mucus par l'activité ciliaire. La propriété du mucus de former des fils, ou filance, intervient également dans son écoulement, une filance élevée (>30 mm) étant généralement associée à une vitesse élevée du transport du mucus (Puchelle et al., 1983). Les propriétés de surface du mucus, adhésivité et mouillabilité (capacité à s'étaler sur la muqueuse), jouent également un rôle dans l'épuration des sécrétions. Une faible adhésivité et une bonne mouillabilité facilitent le transport mucociliaire (Zahm et al., 1989). L'influence des caractéristiques physiques du mucus sur le transport mucociliaire a été également démontrée in vivo chez le sujet sain, les variations des propriétés mécaniques du mucus nasal recueilli in situ expliquant les variations de clairance mucociliaire nasale (Liote et al., 1989). La viscosité du mucus influence également la fréquence de battement ciliaire, soulignant l'interdépendance étroite entre les propriétés rhéologiques du mucus, la fréquence mucociliaire, et la clairance des voies aériennes (Puchelle et al., 1987).

Comme le liquide périciliaire, le mucus contient des composants qui lui confèrent, d'une part ses propriétés physiques, et d'autre part sa capacité de défense contre les agents atmosphériques, notamment les bactéries : il s'agit des mucines.

Les mucines (MUC) bronchiques humaines sont des glycoprotéines filamenteuses de haut poids moléculaire (250 à 20000 KDa sous forme polymérique) très riches en sucres, synthétisées par les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et par les cellules muqueuses des glandes sous-muqueuses. Elles sont porteuses de milliers de chaînes O-

glycanniques et capables de former un réseau macromoléculaire par l'établissement de ponts disulfures (Lamblin *et al.*, 1991a ; Gum, Jr. *et al.*, 1992), et sont responsables en grande partie des propriétés rhéologiques (élasticité, viscosité, filance, adhérence) du mucus. Les travaux effectués sur les mucines ont montré des constantes structurales au niveau de leur squelette : richesse en chaînes O-glycanniques, richesse en proline, thréonine, sérine (20% à 55% de la composition en acides aminés formant des répétitions en tandem ou RT), présence de vastes domaines glycosylés résistant à la protéolyse et enfin, existence de courtes régions « nues » libérées par protéolyse (figure 17) (Porchet *et al.*, 2004). Les mucines présentent soit un caractère acide, en raison de la présence de résidus d'acide sialique (sialomucines), ou de groupes sulfates (sulfomucines) situés aux extrémités des chaînes oligosaccharidiques, soit un caractère neutre (fucomucines) (Lamblin *et al.*, 1991a).

Jusqu'à présent, plus de 20 mucines humaines et murines sont regroupées dans les données de GenBank, mais leur classification reste toujours discutée (Rose *et al.*, 2006). La classification actuelle repose sur les gènes codant les mucines (tableau 1, d'après (Porchet *et al.*, 2004 ; Rose *et al.*, 2006)). On distingue dans ce cas 2 familles qui s'individualisent clairement (mucines sécrétées et mucines membranaires), la 3<sup>ème</sup> famille étant celle des mucines à classification très discutée (Dekker *et al.*, 2002).

Les mucines sont très difficiles à étudier, à isoler et à purifier à cause de leur complexité structurale et de leur taille (Rose *et al.*, 1989 ; Dekker *et al.*, 2002). De plus, la comparaison de leur niveau de sécrétion n'est pas simple à cause de la faible solubilité du mucus, et à cause de la détermination de la meilleure méthode (poids, volume, ou protéine) de normalisation du niveau sécrété de mucines (Rose *et al.*, 1989). La détection des ARNm des mucines est actuellement possible grâce à des sondes spécifiques des domaines RT, ces derniers étant spécifiques à chaque mucine (Audie *et al.*, 1993 ; Reid *et al.*, 1997 ; Buisine *et al.*, 1999). De plus, des anticorps dirigés contre les régions RT de certaines mucines ont été synthétisés (voir tableau 1) pour leur détection par des méthodes immunocytochimiques. Cependant, ces anticorps ne détectent que rarement ces mucines en ELISA et Western blot, ceci à cause des nombreuses O-glycosilations qui masquent les épitopes reconnus par les anticorps (Rose *et al.*, 2006).

Un certain nombre de mucines sont identifiées au niveau de l'épithélium respiratoire comme le montre le tableau 1, mais 3 seulement sont sécrétées dans le mucus respiratoire du sujet normal *in vivo* : MUC5AC et MUC5B sécrétées en majorité (Thornton *et al.*, 1996 ; Hovenberg *et al.*, 1996a ; Hovenberg *et al.*, 1996b ; Thornton *et al.*, 1997 ; Ordonez *et al.*, 2001), ainsi que MUC2 qui est minoritaire (Hovenberg *et al.*, 1996b) malgré son niveau d'expression augmenté *in vitro* en réponse à des médiateurs inflammatoires présents dans les sécrétions muqueuses des patients atteints de maladies chroniques, ce qui pourrait être le reflet de son faible degré de solubilité (Axelsson *et al.*, 1998). De plus, les souris déficientes en *muc2* présentent des anomalies d'architecture de l'épithélium du colon avec disparition des cellules caliciformes et réduction du volume du mucus, ce qui conduit au développement

d'adénomes (Velcich *et al.*, 2002) et souligne l'importance de l'impact de cette mucine sécrétée sur la constitution du mucus. *In vitro*, la sécrétion de MUC5B est 10 fois plus élevée que celle de MUC5AC, ce qui est en accord avec le niveau d'expression des ARNm de MUC5B qui est également plus élevé (Bernacki *et al.*, 1999 ; Holmen *et al.*, 2004).

Le réseau macromoléculaire formé par les mucines ne joue pas uniquement un rôle passif de piège pour les bactéries mais participe activement à la neutralisation des bactéries. En effet, grâce à une très grande diversité des oligosaccharides des chaînes glycaniques des mucines, le mucus respiratoire possède une multitude de sites d'adhérence pour les différents germes inhalés. Les adhésines bactériennes adhèrent sélectivement aux différents résidus saccharidiques des mucines, et plus particulièrement aux mucines sialylées et aux mucines neutres (Vishwanath *et al.*, 1985 ; Ramphal *et al.*, 1991 ; Lamblin *et al.*, 1991a ; Lamblin *et al.*, 1991b ; Lamblin *et al.*, 1991c). Les bactéries sont ainsi retenues au niveau du mucus avant qu'elles ne puissent entrer en contact avec l'épithélium de surface (Scharfman *et al.*, 1996b).

Les mucines sécrétées dans le mucus respiratoire peuvent servir aussi de marqueurs de différenciation puisqu'elles sont absentes avant la différenciation définitive de l'épithélium respiratoire (Lesimple P. *et al.*, 2006). Un marquage immunohistochimique des cellules sécrétoires met en évidence les mucines sécrétées de façon majoritaire au niveau des voies aériennes de conduction telles que MUC5AC et MUC5B (Martinez-Anton *et al.*, 2006). Cependant, au cours de la dédifférenciation de l'épithélium respiratoire de surface suite à un carcinome épidermoïde, l'épithélium perd l'expression de ces mucines qui deviennent indétectables par immunohistochimie (Lopez-Ferrer *et al.*, 2001). Notons que les mucines membranaires sont également utilisées comme marqueurs de différenciation des cellules épithéliales respiratoires *in vitro* (Wasano *et al.*, 1988).

#### B.1.2.3. La clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est considérée comme étant le premier mécanisme inné de défense au niveau des voies aériennes (Wanner *et al.*, 1996 ; Knowles *et al.*, 2002). Elle est composée d'un système coordonné de transport d'eau et d'ions, de sécrétions de mucines et d'une activité ciliaire synchronisée, qui contribuent tous à son déroulement physiologique normal (figure 18) (Randell *et al.*, 2006). Un certain nombre de techniques ont été utilisées pour montrer que les particules déposées sur la surface des épithéliums des voies aériennes sont épurées pendant une courte durée (Olivier *et al.*, 1996). Une des techniques consiste à mesurer le temps d'élimination de particules radioactives, par des détecteurs externes, déposées le long de l'arbre trachéo-bronchique (Bennett *et al.*, 1996). Les résultats de clairance mucociliaire dépendent de la vitesse du transport mucociliaire, mais aussi du site de dépôt de la particule (Gerrard *et al.*, 1986). Ils dépendent également de l'interaction entre les

cils et le mucus qui les recouvre. Au cours des battements ciliaires, le cil pénètre avec une très grande vitesse, de l'ordre de 800  $\mu$ m/s, à l'intérieur de la phase gel ou mucus. Comme décrit dans la figure 5 de la partie B.1.1.2.1.1., le battement ciliaire est polarisé, dissymétrique et situé dans un plan déterminé. Il comprend une phase efficace, rapide, pendant laquelle le cil érigé entre en contact avec le mucus par son extrémité, et le propulse vers l'avant. Le cil entre ensuite en phase de repos, en se repliant le long de la surface cellulaire dans la direction de l'écoulement du mucus. Puis, il revient à sa position de départ en se déroulant près de la surface cellulaire dans la couche liquidienne périciliaire (Sleigh *et al.*, 1988). Ce cycle de battement permet le déplacement unidirectionnel du film de mucus. Les cils battent les uns après les autres en formant des vagues, ou ondes métachrones à la surface de l'épithélium respiratoire. Ces ondes se propagent en arrière et obliquement par rapport à la direction du mucus (Sleigh *et al.*, 1981). La clairance est d'autant plus rapide si la particule est déposée au niveau des voies aériennes proximales.

Il faut également souligner que les voies aériennes possèdent un autre système d'épuration du mucus qui est la clairance par la toux (Pavia *et al.*, 1987). Cette dernière est indépendante des battements ciliaires, mais dépend de plusieurs variables du liquide de surface (King *et al.*, 1989), notamment le liquide périciliaire qui apparaît comme étant le plus important contributeur à son efficacité (Zahm *et al.*, 1989). En effet, la fonction de lubrification assurée par la phase sol facilite le déplacement du mucus le long des voies aériennes suite à la toux.

La clairance bactérienne des voies aériennes périphériques peut nécessiter un temps allant jusqu'à six heures. Puisque le nombre de bactéries peut doubler en 20 minutes, de larges colonies bactériennes peuvent être formées pendant 6 heures de clairance. Cependant, les substances antimicrobiennes présentent dans le liquide de surface (Ganz *et al.*, 2002) inhibent la croissance bactérienne. En fait, des bactéries qui ont été ajoutées dans un liquide de surface non dilué, ont été tuées, après trois à six heures, par les facteurs antimicrobiens endogènes, parmi lesquels, la lactoferrine, le lysozyme et l'ALP ; les défensines étant présentes en très faibles quantités (Cole *et al.*, 1999).

La clairance mucociliaire peut être altérée par l'agression aiguë ou chronique de la muqueuse respiratoire par des agents toxiques, infectieux ou allergéniques, ainsi que dans de nombreuses affections héréditaires ou acquises. Dans la mucoviscidose par exemple (partie B.2.), le transport mucociliaire trachéal est ralenti (Yeates *et al.*, 1976). Les mesures effectuées chez les adultes ne permettent cependant pas de savoir si les altérations mucociliaires sont en relation directe avec l'anomalie génétique, ou secondaires à l'infection chronique, celle-ci jouant un rôle déterminant puisque la viscosité des sécrétions n'est anormale qu'en période infectieuse (Puchelle *et al.*, 1985). Les anomalies du transport ionique transépithélial et la déshydratation des sécrétions peuvent également expliquer le ralentissement de la clairance mucociliaire (Mortensen *et al.*, 1993 ; Matsui *et al.*, 2005).

## B.1.2.4. La défense immunitaire

Lorsque les différentes barrières non immunologiques (jonctions intercellulaires, liquide de surface, clairance mucociliaire) sont déficientes ou dépassées, les antigènes peuvent stimuler le système immunitaire cellulaire ou humoral. Il est actuellement admis que les cellules épithéliales, en plus de leur rôle mécanique, participent activement à la régulation et la propagation de la réponse immunitaire à l'étage bronchique.

Différents types cellulaires du système immunitaire sont présents au niveau respiratoire pour répondre à une quelconque agression. Les cellules de Langerhans et les lymphocytes T (LT) et B sont les principaux acteurs présents au niveau de l'épithélium respiratoire. Les macrophages sont également présents dans la lumière et la sous-muqueuse des voies aériennes, mais en nombre nettement inférieur à celui du compartiment alvéolaire. Finalement, les polynucléaires neutrophiles (PMN), qui constituent la grande majorité des leucocytes circulants, sont retrouvés en nombre réduit dans l'arbre trachéo-bronchique du sujet sain non fumeur. Cependant, les PMN peuvent affluer rapidement et massivement vers la lumière du tractus respiratoire suite à la sécrétion de facteurs solubles chimiotactiques qui font migrer les cellules suivant un gradient de concentration (Sibille *et al.*, 1993). Parmi les facteurs principaux, il faut retenir l'interleukine-8 (IL-8).

A part les cellules immunitaires présentes dans l'arbre trachéo-bronchique, des molécules de l'immunité humorale y sont également présentes. Parmi ces molécules, citons les immunoglobulines dont les principales classes présentes dans la lumière trachéobronchique sont les IgA, les IgG et dans une moindre mesure les IgM. Les IgE, quant à elles, sont retrouvées en quantités négligeables chez le sujet sain.

Les tachykinines, telles que la substance P et la neurokinine A, sont des neuropeptides qui semblent jouer un rôle important au niveau de l'appareil respiratoire. Leurs fonctions seraient de contribuer à certains réflexes, tels que celui de la toux après inhalation de corps étranger, et de participer à certains effets biologiques comme la bronchoconstriction, la vasodilatation, l'extravasion de protéines, le recrutement de cellules inflammatoires notamment les PMN, la sécrétion du mucus,... (Maggi *et al.*, 1993).

Enfin, les cytokines, dont la famille comporte aujourd'hui plusieurs centaines de molécules incluant les interleukines (ce terme fut défini en 1979 pour désigner des molécules permettant la communication entre les leucocytes), les interférons (désignés sous ce terme du fait de leur capacité d'action antivirale sur des cellules infectées : phénomène « d'interférence » virale), les "colony stimulating factors" (CSF, facteurs de croissance hématopoïétiques), et divers immunomodulateurs ou facteurs de croissance (TNF, TGF, PDGF...), sont présentes sous forme soluble dans la lumière des voies aériennes de conduction jusqu'aux alvéoles (tableau

2, d'après (De Boer *et al.*, 2002)), mais aussi dans la muqueuse où elles se lient aux composants matriciels. Bien que d'abord décrites comme produites par les LT et les monocytes activés (lymphokines et monokines), les cytokines peuvent aussi être sécrétées par les mastocytes et les granulocytes, par les fibroblastes, les cellules musculaires, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales respiratoires (Holtzman *et al.*, 1998), et possèdent la faculté d'activer et de promouvoir la migration des leucocytes. Les cellules épithéliales respiratoires sont capables de produire des cytokines proinflammatoires telles que IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , et d'autres cytokines comme l'IL-10, RANTES, MCP-1, eotaxine, GM-CSF, G-CSF, TGF- $\beta$ , EGF et PDGF. Cette expression est régulée par des interactions directes (récepteurs, molécules d'adhérence) et indirectes (facteurs solubles) avec les cellules immunitaires, mais également avec les agents pathogènes (Takizawa *et al.*, 1998).

# B.1.3. Lésions et régénération de l'épithélium respiratoire

## **B.1.3.1.** Sources lésionnelles

Malgré la présence d'un large dispositif de protection, la muqueuse respiratoire est fréquemment agressée par diverses substances présentes dans l'atmosphère, ou libérées par les cellules inflammatoires *in vivo*. L'épithélium respiratoire est également très sensible aux molécules libérées par les bactéries lors d'une infection, ainsi qu'au stress mécanique.

# B.1.3.1.1. Le stress mécanique

Les sondes endobronchiques utilisées au cours de bronchoscopies, d'intubation trachéal ou de trachéotomie provoquent une desquamation plus ou moins importante de l'épithélium respiratoire (Streitz, Jr. *et al.*, 1991). Ainsi, la lame basale mise à nu, exposant certains récepteurs comme les laminines et les fibronectines, peut alors être la cible privilégiée de microorganismes.

# B.1.3.1.2. Les bactéries

Dans le cas d'une altération de la clairance mucociliaire comme dans la mucoviscidose, les bactéries retenues dans le mucus respiratoire sécrètent des toxines qui altèrent la structure de l'épithélium de surface (Suter *et al.*, 1994) en induisant la desquamation plus ou moins importante des cellules épithéliales, en particulier les cellules ciliées, suite à la rupture des jonctions serrées (Lewis *et al.*, 1995).

## B.1.3.1.3. L'inflammation

Certains défauts génétiques se traduisent par des lésions de l'épithélium respiratoire. Le syndrome de dysknésie ciliaire se traduit par des infections purulentes chroniques (Boucher *et al.*, 1988b). Les épithéliums des patients mucoviscidosiques sont également caractérisés par un remaniement suite à des lésions multiples, ainsi qu'à des infections et une inflammation chronique (Heijerman *et al.*, 2005).

Les cellules inflammatoires libèrent des oxydants, des protéases et des cytokines destinées à éliminer l'agent étranger. Cependant, ces médiateurs de l'inflammation sont eux-mêmes très agressifs vis-à-vis de l'épithélium respiratoire. En effet, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe la prolifération cellulaire et la fréquence des battements ciliaires (Kobayashi et al., 1992). Par ailleurs, HOCl et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmentent la perméabilité paracellulaire de l'épithélium de surface en altérant les jonctions serrées (Yamaya et al., 1995 ; Guo et al., 1996). De plus, le TNF-a, l'IFN-y, l'élastase du PMN, la cathépsine G et les défensines sécrétées par les cellules inflammatoires sont également responsables d'une augmentation de la perméabilité épithéliale (Heck et al., 1990 ; Adams et al., 1993 ; Nygaard et al., 1993 ; Li et al., 1995 ; Peterson et al., 1995). Certaines protéines cationiques libérées lors de la dégranulation des éosinophiles, en particulier le MBP (major basic protein) et l'EPO (eosinophil peroxydase), provoquent également des lésions de l'épithélium en induisant l'exfoliation des cellules épithéliales trachéales in vitro ainsi que l'inhibition des battements ciliaires (Motojima et al., 1989). De la même façon, les lésions provoquées par l'inhalation de liquide gastrique associée au développement du syndrome de détresse respiratoire de l'adulte sont essentiellement dues à la libération d'IL-8 par les PMN massivement recrutés (Folkesson et al., 1995).

Par ailleurs, un certain nombre de maladies respiratoires aiguës ou chroniques sont caractérisées par une inflammation de l'épithélium respiratoire dont la conséquence est la libération de grandes quantités d'oxydants dans le milieu, qui se traduit par un déséquilibre entre oxydants et antioxydants. Ainsi, les poumons des sujets fumeurs sont caractérisés par une inflammation chronique associée à une proportion plus importante de PMN et une libération plus importante d'oxydants par les macrophages alvéolaires par rapport à des sujets non fumeurs. De plus, l'activité enzymatique de l' $\alpha$ 1-antitrypsine oxydée diminue. L'élastase du PMN est donc plus active et l'action délétère des PMN se trouve renforcée (Crystal *et al.*, 1991).

#### B.1.3.1.4. Les substances toxiques

Les polluants atmosphériques représentent la cause majeure de l'augmentation de mortalité. Le NO<sub>2</sub>, l'O<sub>3</sub>, le CO<sub>2</sub> et la fumée de cigarette sont les principaux polluants. Du fait

de leur faible solubilité, ces molécules sont peu absorbées par la muqueuse respiratoire. En revanche, ce sont des molécules très réactives qui, une fois en contact avec l'épithélium respiratoire, génèrent des radicaux libres qui dégradent cet épithélium. La fumée de cigarette est composée de plus de 3000 molécules différentes dont un grand nombre, parmi lesquelles l'acétaldéhyde, le formaldéhyde, sont des substances toxiques et oxydantes. Dans chaque bouffée de cigarette sont libérées 10<sup>17</sup> molécules oxydantes dont 10<sup>14</sup> sont des radicaux libres de l'oxygène (Church *et al.*, 1985).

Bien que les radicaux libres aient une durée de vie très courte, certains atteignent l'épithélium respiratoire. Les principales cibles de ces molécules sont les cellules ciliées, les cellules caliciformes et les jonctions intercellulaires. Ainsi, il a été montré que l'exposition à la fumée de cigarette ou à certains extraits provoque le détachement de cellules épithéliales de surface, une inhibition de la prolifération cellulaire, une perte des cils, une hypertrophie des glandes sous-muqueuses et une métaplasie malpighienne. Par ailleurs, la perméabilité épithéliale est significativement augmentée, généralement par rupture progressive des jonctions serrées et parfois aussi par altération du transport ionique (Simani *et al.*, 1974 ; Boucher *et al.*, 1980 ; Hulbert *et al.*, 1981).

# **B.1.3.2.** Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire

Malgré un système de défense performant, l'épithélium respiratoire des voies aériennes, en contact constant avec l'environnement, subit des lésions fréquentes et doit totalement régénérer pour restaurer ses fonctions de défense. De nombreux modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* permettent, à l'heure actuelle, d'appréhender plus ou moins fidèlement ce phénomène. Ces modèles permettent aussi l'étude de l'influence de différents facteurs sur la régénération de l'épithélium respiratoire.

## B.1.3.2.1. Modèles de lésion-réparation de l'épithélium respiratoire

## B.1.3.2.1.1. Modèles in vivo

De nombreux modèles animaux ont été développés afin d'analyser la réponse de l'épithélium bronchique à différentes sources lésionnelles. *In vivo*, la régénération de l'épithélium trachéal après une lésion mécanique met en jeu l'étalement des cellules bordant la lésion, la migration des cellules basales pour recouvrir la zone dénudée, le ré-établissement des jonctions serrées, l'établissement d'une métaplasie malpighienne puis la prolifération active avec une hyperplasie des cellules basales et muqueuses suivie d'une différenciation progressive des cellules muqueuses en cellules pré-ciliées (phénotype cellulaire mixte

présentant les caractéristiques de cellules ciliées et de cellules muqueuses) aboutissant à la reconstitution d'un épithélium pseudostratifié cilié dans un délai de quelques jours à quelques semaines selon l'importance de la lésion (McDowell *et al.*, 1979). Les rats (Horiba *et al.*, 1994) et les cochons d'inde (Erjefalt *et al.*, 1994) ont été également utilisés pour étudier le processus de régénération épithéliale *in vivo*.

Plus récemment, ont été développés des modèles chimériques de reconstruction de l'épithélium respiratoire, dans des souris xénotolérantes. Le modèle de xénogreffe dans la souris SCID a permis de montrer que des cellules indifférenciées de trachée fœtale humaine pouvaient reformer un épithélium respiratoire mature et différencié (Delplanque et al., 2000). Un autre modèle, la souris nude, initialement décrit par Engelhardt et al. (Engelhardt et al., 1992) a été également développé pour le suivi de la régénération épithéliale au cours du temps (Dupuit et al., 2000 ; Escotte et al., 2004). La souris nude n'a pas de thymus et est donc incapable de générer des LT. De ce fait, elle est incapable de participer à des réponses immunes comme la formation d'anticorps qui requiert la présence de cellules CD4+, ainsi que toutes les réponses immunitaires qui impliquent les LT. Le modèle de xénogreffe trachéobronchique dans la souris nude est une technique qui permet d'obtenir un épithélium respiratoire humain pseudostratifié mucociliaire, dans des conditions physiologiques très proches de l'in vivo humain. Dans ce modèle, seul l'épithélium est humain, le reste des cellules mésenchymateuses et sanguines provenant de la souris nude. Il consiste en l'implantation en sous-cutanée chez la souris d'une trachée de rat qui a été dénudée de son propre épithélium par des cycles de congélation/décongélation, dans laquelle des cellules épithéliales humaines provenant de la dissociation enzymatique de polypes nasaux ou de bronches ont été ensemencées. Ce modèle de trachée reconstituée « ouverte », similaire à une trachée humaine, mime la dynamique des évènements mis en jeu lors de la régénération et présente l'avantage de permettre de recueillir de manière itérative le liquide de sécrétion, d'analyser son contenu et d'étudier la modulation de l'expression des molécules matricielles, des facteurs de croissance et des cytokines au cours de la régénération épithéliale. Nous avons observé que les cellules épithéliales respiratoires de surface humaines, ensemencées dans la trachée de rat dénudée, adhèrent à la lame basale, s'étalent et migrent pour recoloniser la matrice hôte, prolifèrent pour former un épithélium présentant une métaplasie malpighienne (plusieurs couches de cellules épithéliales aplaties), puis progressivement adoptent un phénotype différencié donnant naissance à un épithélium de surface pseudostratifié mature (Coraux et al., 2005b) (figure 19) associé à des structures glandulaires (Engelhardt et al., 1995; Dupuit et al., 2000).

## B.1.3.2.1.2. Modèles in vitro

De nombreux modèles de lésion-réparation *in vitro* de l'épithélium respiratoire utilisant généralement des cellules épithéliales humaines en culture primaire ou des lignées cellulaires ont été décrits (Herard *et al.*, 1996b ; Dorscheid *et al.*, 2001). Suite à une lésion chimique ou mécanique du tapis cellulaire, les cellules vont initier la réparation de la lésion par une série d'événements incluant, dans un ordre chronologique, l'étalement et la migration sur la matrice extracellulaire dénudée des cellules bordant la zone lésée. Puis une prolifération cellulaire est observée avec un pic d'activité mitotique qui culmine généralement 48 h après la lésion et concerne les cellules dans la zone de réparation (Zahm *et al.*, 1997b). Bien que la zone lésée soit ré-épithélialisée, l'établissement de la jonctionalité et de l'étanchéité épithéliale n'est restaurée qu'après plusieurs jours (Herard *et al.*, 1996b).

La régénération complète de l'épithélium avec différenciation de l'ensemble des phénotypes cellulaires ne peut être obtenue sur des modèles *in vitro* de culture en 2 dimensions qu'en conditions de culture à l'interface air-liquide. Les cellules sont cultivées sur un support poreux avec le milieu de culture mis au point à l'origine par Lechner *et al.* (Lechner *et al.*, 1985) et présent à la partie basale des cellules. L'avantage de cette technique est d'induire la différenciation épithéliale (Gray *et al.*, 1996 ; Tournier *et al.*, 1998 ; Davidson *et al.*, 2000 ; Fulcher *et al.*, 2005). Ceci suggère que les cellules épithéliales sont capables, dans ces conditions de culture, de générer des facteurs susceptibles de favoriser leur différenciation. Un des intérêts de ce modèle est de pouvoir apprécier l'effet de certains facteurs pharmacologiques ajoutés à la partie basale des cellules, remplaçant donc les molécules présentes dans la matrice extracellulaire *in vivo* (Booth *et al.*, 2001 ; Bebok *et al.*, 2002 ; Gray *et al.*, 2004).

Des modèles de régénération en 3 dimensions permettent également, à partir de cellules épithéliales dissociées, de reconstituer un épithélium respiratoire de surface polarisé et différencié, caractérisé par une sécrétion de chlore stimulable par les agents pharmacologiques qui augmentent la concentration d'AMPc et l'activité intracellulaire du calcium. L'intérêt majeur de ces structures épithéliales (sphéroïdes) est lié à leur capacité de maintenir leur différenciation pendant plusieurs mois (Castillon *et al.*, 2002).

Récemment, une nouvelle approche permettant l'obtention d'épithélium respiratoire de voies aériennes en culture *in vitro* a été décrite à partir des cellules souches embryonnaires (CSE). Ces CSE, isolées de la masse cellulaire interne du blastocyste pré-implantatoire, ont la caractéristique d'être pluripotentes, c'est-à-dire de générer tous les types cellulaires constituant l'organisme, et de proliférer à l'infini lorsqu'elles sont maintenues dans un état indifférencié. Au niveau de l'épithélium respiratoire, il a été décrit que la différenciation des CSE murines pouvait être orientée vers l'obtention de pneumocytes de type II (Ali *et al.*, 2002) et, plus récemment, des travaux du laboratoire ont démontré que des CSE murines

étaient capables de se différencier en cellules épithéliales de voies aériennes et de reconstituer un épithélium respiratoire complet et fonctionnel, parfaitement identique à l'épithélium respiratoire trachéal murin et présentant des cellules de Clara mais aussi des cellules basales et ciliées (Coraux *et al.*, 2005c).

# B.1.3.2.2. Facteurs impliqués dans la régénération épithéliale

Les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la régénération de l'épithélium respiratoire sont multiples et interagissent étroitement. Les principaux mécanismes étudiés concernent la réparation de la lésion plutôt que la régénération qui implique la différenciation et la polarisation de l'épithélium. Au cours de la phase initiale d'étalement et de migration cellulaire, interviennent de façon majeure les composants de la matrice extracellulaire (MEC) et les récepteurs de type intégrines, les protéines vésiculaires telles que la cellubrévine, ainsi que les métalloprotéinases matricielles (MMPs), leurs inhibiteurs, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance, dont le rôle spécifique dans la redifférenciation et la reconstitution complète de l'épithélium respiratoire a été peu décrit.

## B.1.3.2.2.1. Composants de la matrice extracellulaire

Les composants de la MEC jouent un rôle clé dans la réépithélialisation de l'épithélium respiratoire. Au cours de la migration, les cellules épithéliales adhèrent de façon transitoire à une matrice provisoire qui va subir des modifications dynamiques. La fibronectine et les principaux composants de la membrane basale, comme la laminine et le collagène de type IV, vont alors être utilisés comme support matriciel par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires tels que les intégrines. La polymérisation active de la fibronectine, déposée à l'interface matrice/cellule au cours de la réparation, favorise la migration cellulaire ; parallèlement, l'intégrine  $\alpha 5$ , l'un de ses récepteurs, est hyperexprimée (Herard *et* al., 1996a). L'utilisation d'anticorps a montré que si les intégrines  $\beta$ 1 sont nécessaires à la migration rapide des cellules épithéliales respiratoires sur le collagène IV et sur les laminines 1 et 2, les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  sont directement impliquées dans la migration cellulaire sur le collagène IV (White et al., 1999). Les intégrines ayant fixé leur ligand sont capables d'activer la protéine tyrosine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) qui, par l'intermédiaire d'un complexe formé avec les kinases de la famille Src, les protéines Grb2 et CCrk, va déclencher une réorganisation du cytosquelette d'actine et l'activation de la voie Ras-MAP kinase. De plus, il a été récemment démontré que la cellubrévine, récepteur vésiculaire endosomal d'attachement appartenant à la famille des SNAREs, intervient dans la migration cellulaire en modulant l'adhérence cellulaire médiée par les intégrines (Proux-Gillardeaux et *al.*, 2005). Il est à noter que, hormis les protéines de la MEC, le cartilage peut influencer la régénération des cellules épithéliales respiratoires en modulant leur prolifération et leur différenciation. Hicks *et al.* ont mis en évidence qu'en présence de cartilage, les cellules épithéliales ne s'étalaient pas et exprimaient des taux réduits de TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ , molécules régulatrices de la migration et de la prolifération épithéliale (Hicks, Jr. *et al.*, 1999).

## B.1.3.2.2.2. Rôle des métalloprotéinases matricielles

## • Les métalloprotéinases et leur inhibiteurs tissulaires : Généralités

Les MMPs sont des protéases dépendantes du zinc qui interviennent dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Nelson *et al.*, 2000). Classiquement, elles sont classées en 5 groupes en fonction de leur spécificité de substrats et de leur structure. On distingue les collagénases qui regroupent la MMP-1, -8 et -13, les stomélysines qui regroupent la MMP-7 (ou matrilysine), -3, -10, -11 et -26, les gélatinases qui regroupent la MMP-2, -9 (ou gélatinase B), -12, -19, -20 et -23, et les MMPs de type membranaire (MT-MMPs) qui regroupent la MMP-14, -15, -16, -17, -24 et -25.

La MMP-7 est la plus petite des MMPs. Elle est capable de dégrader les protéoglycanes, la laminine, la fibronectine, la vitronectine, la gélatine, le collagène IV, l'élastine, l'entactine et la ténascine. Elle est exprimée dans les épithéliums de l'endomètre, les adénocarcinomes du colon et de l'estomac, et les carcinomes du foie. Elle est également exprimée par les cellules basales en migration dans la réparation de l'épithélium de cornée (Lu *et al.*, 1999). Dans les souris déficientes en MMP-7, la tumorigénicité de l'intestin est supprimée (Wilson *et al.*, 1997). Finalement, la MMP-7 augmente la prolifération cellulaire de la lignée MDCK, effet qui est inhibé par l'inhibiteur de MMPs BB94 (Harrell *et al.*, 2005).

La MMP-9 est capable de dégrader les mêmes substrats que la MMP-7, et en plus les collagènes V et XIV, et le BP180. Elle régule aussi l'activité de cytokines et d'hormones puisqu'elle clive l'IL-1 $\beta$  et la substance P (Backstrom *et al.*, 1995 ; Ito *et al.*, 1996). Un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines modifie l'expression de la MMP-9 dans beaucoup de types cellulaires, comme le TGF- $\beta$ , l'EGF, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, le TNF- $\alpha$ ... (Vu *et al.*, 1998). Elle joue également un rôle important dans divers processus comme la nidation, le développement osseux, l'inflammation, la réparation épithéliale, l'arthrite, la maladie d'Alzheimer et l'invasion tumorale. Les souris déficientes en MMP-9 sont résistantes aux pemphigoïdes bulleuses expérimentales (Liu *et al.*, 1998).

L'activité des MMPs est étroitement régulée par leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMPs (Tissue Inhibitor of MMPs). Les TIMPs sont identifiées sous 4 formes, TIMP-1, -2, -3, et -4 (Visse *et al.*, 2003). TIMP-1 est une glycoprotéine de 28,5 KDa qui est capable de former des complexes non-covalents avec les pro-MMP-7 et -9 pour inhiber leurs activités (Ravanti *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2000). Le TIMP-1 joue un rôle dans le développement osseux, dans l'inhibition de l'angiogénèse, il influence l'activité des facteurs de croissance et intervient dans les changements de morphologie cellulaire. Certains facteurs de croissance sont capables de stimuler l'expression de TIMP-1 comme l'IL-1 $\beta$ , le TGF- $\beta$  et les rétinoïdes (Gomez *et al.*, 1997). TIMP-1 est exprimé dans l'os où il y a une activité érythropoïétique (Gudmundsson *et al.*, 1996), ainsi que dans le cœur et les ovaires. Il peut stimuler ou inhiber la prolifération de nombreuses lignées cellulaires (Hayakawa *et al.*, 1992).

# • Les métalloprotéinases dans la régénération épithéliale

Au cours des phénomènes d'étalement et de migration qui surviennent immédiatement après une lésion de l'épithélium respiratoire, les cellules épithéliales entrent en contact avec les molécules de la MEC au travers de points focaux et de contacts primordiaux transitoires qui permettent leur ancrage et leur traction à partir de la MEC. A ce stade, interviennent les MMPs qui vont éliminer les molécules partiellement dénaturées et remodeler la matrice néosynthétisée. Au cours de la réépithélialisation de l'épithélium respiratoire lésé, il a été montré que la MMP-9 est surexprimée et s'accumule dans les cellules migratoires tandis que son blocage inhibe leur migration (Buisson et al., 1996b; Legrand et al., 1999). Les MMP-3 et -11 sont exprimées par ces mêmes cellules caractérisées par un phénotype épithéliomésenchymateux. La MMP-3 étant essentiellement produite in vivo par les cellules mésenchymateuses, sa présence avec la vimentine dans les cellules épithéliales respiratoires migratoires réparant une lésion peut être considérée comme le reflet d'une transition épithélio-mésenchymateuse, indispensable à la réépithélialisation de la barrière épithéliale (Buisson et al., 1996a). Une dérégulation de cette transition, dans le cas de cellules cancéreuses par exemple, peut entraîner l'invasion des tissus par les cellules pathologiques et la formation de tumeurs secondaires (Polette et al., 1998). La MMP-7 peut également influencer la réépithélialisation respiratoire. Des observations in vivo et in vitro ont montré que la matrilysine, exprimée constitutivement par les cellules de l'épithélium respiratoire des voies aériennes, est surexprimée par les cellules migratoires et que la réépithélialisation de l'épithélium trachéal est bloquée chez des souris déficientes en matrilysine (Dunsmore et al., 1998). C'est en clivant l'ectodomaine de la cadhérine E que la MMP-7 induirait la réparation des lésions épithéliales (McGuire et al., 2003). La MMP-7 pourrait donc intervenir à la fois dans la réparation et la défense de l'épithélium respiratoire (Parks et al., 2001), ainsi que dans son remodelage (Atkinson et al., 2003). Quelques rares données suggèrent que les MMPs pourraient influencer la régénération de l'épithélium respiratoire, en dehors de la phase de migration cellulaire. En effet, il a été rapporté que les MMP-9 et -2 sécrétées par les cellules du cartilage trachéal pourraient inhiber l'attachement et la prolifération des cellules épithéliales, entraînant des anomalies de réépithélialisation (Sigurdson et al., 2003). Les MMPs pourraient également faciliter le relargage de facteurs de croissance comme le VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- $\beta$  ou bFGF (basic fibroblast growth factor)

accumulés au niveau des protéoglycanes ou intervenir en clivant des récepteurs de facteurs de croissance. Enfin, nous avons récemment démontré que les MMP-7 et -9 modulent la différenciation des cellules épithéliales au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes dans le modèle de xénogreffe humanisée dans la souris nude. L'expression et la sécrétion de ces MMPs augmentent au cours des différentes étapes de la régénération, ces MMPs étant localisées à la surface de l'épithélium parfaitement différencié. L'incubation, au cours de la régénération, des cellules épithéliales avec des inhibiteurs de ces MMPs entraîne des remaniements de l'épithélium se traduisant par un défaut de différenciation mucociliaire dans un épithélium présentant une métaplasie malpighienne avec des zones de métaplasie des cellules basales (Coraux *et al.*, 2005b).

## B.1.3.2.2.3. Rôle des facteurs de croissance

De nombreux facteurs de croissance ont été décrits dans la littérature comme étant capables d'accélérer la réparation des lésions de l'épithélium bronchique, principalement en modulant la migration et la prolifération cellulaire. Ces facteurs de croissance sont principalement sécrétés par les cellules présentes dans le mésenchyme mais peuvent également être produits par les cellules de l'épithélium respiratoire.

L'activation du récepteur EGFR par différents ligands joue un rôle majeur. En effet, l'EGF accélère la réparation des lésions épithéliales en modulant la migration cellulaire, un inhibiteur de la voie EGFR tyrosine kinase entraînant un blocage de la réépithélialisation (White *et al.*, 1999 ; Puddicombe *et al.*, 2000). De plus, Barrow *et al.* ont suggéré que l'EGF et le PDGF favorisent la régénération de l'épithélium respiratoire en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales respiratoires (Barrow *et al.*, 1993). Le HGF (hepatocyte growth factor), le KGF (keratinocyte growth factor) et les IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  régulent la migration cellulaire mais peuvent également avoir une action mitogénique (Waters *et al.*, 1999 ; Zahm *et al.*, 2000 ; Hicks, Jr. *et al.*, 2003).

Il a été démontré que la lésion induit la production de la protéine MCP-1 par les cellules épithéliales respiratoires, qui en se liant à son récepteur CCR2B, va favoriser la réparation de la lésion (Lundien *et al.*, 2002). Des peptides trifoliés (TFF), en particulier TFF2, peuvent également, *via* la voie d'activation de la protéine kinase C et de ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase), agir en synergie avec l'EGF dans la réparation de l'épithélium respiratoire (Chwieralski *et al.*, 2004). Enfin, l'héréguline- $\alpha$ , en raison de sa liaison avec les récepteurs erbB2-4, favorise la réépithélialisation de lésion de l'épithélium respiratoire (Vermeer *et al.*, 2003).

Les facteurs de croissance, comme l'insuline ou l'HGF, interviennent en activant la synthèse de la matrice extracellulaire, comme l'IL-8 en stimulant l'expression des MMPs ou comme l'IL-13 en favorisant la sécrétion d'autres facteurs de croissance motogènes et

mitogènes. L'augmentation de l'expression de ces facteurs de croissance par les cellules épithéliales respiratoires lésées faciliterait la réépithélialisation par un mécanisme de réparation autocrine.

Le rôle spécifique des facteurs de croissance dans la différenciation des cellules épithéliales respiratoires et la régénération complète de l'épithélium des voies aériennes est encore mal connu. Les travaux de Shen et al. suggèrent que l'HGF pourrait, non seulement moduler la migration et la prolifération des cellules épithéliales respiratoires, mais également favoriser la différenciation ciliée et la fonction de sécrétion de chlore, probablement via l'activation de son récepteur c-met (Shen et al., 1997). Par ailleurs, l'EGF, la toxine cholérique et l'IL-13 seraient des inhibiteurs de la différenciation ciliée alors que l'EGF, comme l'IL-4, l'IL-9, l'IL-13 et l'élastase du neutrophile seraient de puissants inducteurs de la différenciation des cellules mucosécrétrices (Clark et al., 1995 ; Laoukili et al., 2001 ; Burgel et al., 2004). On sait également que les défensines du neutrophile comme l'HNP1-3, peuvent moduler la régénération de l'épithélium respiratoire lésé, non seulement en modulant la migration et la prolifération cellulaire par la voie d'activation MAP kinase / ERK1/2, mais aussi en induisant la différenciation des cellules à mucus (Aarbiou et al., 2004). Il est maintenant clairement admis que l'acide rétinoïque est essentiel pour la différenciation mucociliaire (Gray et al., 1996), qui est optimale en conditions de culture à l'interface airliquide, la culture en immersion des cellules épithéliales respiratoires induisant une réduction drastique du pourcentage de cellules différenciées.

La différenciation des cellules ciliées et le maintien de cet état de différenciation sont particulièrement régulés par le facteur de transcription Foxj1, encore nommé HFH-4, membre de la famille winged-helix/forkhead. Foxj1 est détecté dans les cellules épithéliales avant l'apparition des premiers cils puis est localisé dans les cellules exprimant la tubuline  $\beta$ 4 (Blatt *et al.*, 1999), la délétion du gène codant Foxj1 entraînant une absence de cils dans l'épithélium respiratoire. Le gène KPL2 semble également jouer un rôle majeur dans la différenciation des cellules ciliées (Ostrowski *et al.*, 1999). A l'inverse, les facteurs de transcription HNF-3 $\alpha$  et HNF-3 $\beta$  (hepatocyte nuclear factor) semblent être impliqués dans la différenciation des cellules sécrétrices, en régulant l'expression de gènes codant les protéines exprimées par les cellules de Clara (Bingle *et al.*, 1993), de même que le facteur de transcription Foxa2 dont la délétion entraîne une hyperplasie des cellules mucosécrétrices et une hypersécrétion de mucines.

## **B.2.** La Mucoviscidose

## **B.2.1.** Historique

La mucoviscidose a été reconnue en 1938 par Dr. Dorothy Andersen quand des autopsies sur des enfants mal nourris ont révélé des obstructions des canaux glandulaires pancréatiques par le mucus. Le terme « mucoviscidosis » a été employé en 1944 pour permettre de différencier cette maladie, caractérisée par des sécrétions de mucus abondant et anormalement épais, des différents désordres pancréatiques connus et englobés dans la définition de la fibrose kistique. Elle a donc été appelée « fibrose kystique du pancréas » qui signifie « cystic fibrosis » (CF) en anglais. En 1946, on a identifié que la CF se transmet selon le mode autosomique récessif. En 1949 à New York, le pédiatre Paul di Sant' Agnese a remarqué que la majorité des enfants CF étaient prostrés pendant la période de canicule, ce qui a fait l'objet d'une remarquable attention. Il a ensuite suggéré que leur sueur était anormale, et a démontré plus tard que le taux de sodium et de chlorure y était 5 fois plus élevé et persistait même après la canicule (Davis et al., 2006). En 1983, le test de sueur a été validé par Paul Quinton pour dépister la maladie de la CF (Quinton et al., 1983). En même temps, l'équipe de Richard Boucher a montré que l'hyperabsorption de sodium constituait le défaut principal de CF au niveau des voies aériennes (Knowles et al., 1983). En 1985, la comparaison des génomes de familles de malades suivant la méthode RFLP (restriction fragment length polymorphism) a permis d'identifier une zone de 30 Mb contenant le gène impliqué dans la mucoviscidose (Tsui et al., 1985). Puis, en 1989, le gène cftr, qui code pour un canal chlorure AMPc-dependant (Bear et al., 1992) de faible conductance et dont la mutation entraîne la maladie, a été découvert (Rommens et al., 1989; Riordan et al., 1989; Kerem et al., 1989) et son identité a été vérifiée en utilisant des cellules qui dérivent des canaux sudoripares. Actuellement, l'espérance de vie des patients atteints de la mucoviscidose dépasse les 30 ans, alors qu'elle était de l'ordre de 6 mois en 1938. Cependant, on ne dispose pas à l'heure actuelle de traitements efficaces pour ralentir la destruction des tissus pulmonaires et pancréatiques.

#### **B.2.2.** La protéine CFTR

Le gène *cftr* est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31-3) (Tsui *et al.*, 1985). Son clonage a été décrit en 1989. Il est composé de 27 exons pour 230 Kb qui sont transcrits en un ARNm de 6,5 Kb (4,5 Kb codant). Ce dernier code une protéine de 1480 acides aminés, la protéine CFTR.

## **B.2.2.1.** Structure, localisation et fonctions de CFTR

La protéine CFTR, qui présente de fortes homologies avec les membres de la famille ABC (ATP-binding cassette) (Dean *et al.*, 1995), est constituée de cinq domaines : 2 segments peptidiques composés chacun de 6 domaines transmembranaires, un domaine R contenant des sites de phosphorylation pour les PKA et PKC, et 2 domaines NBD (nucleotide binging domain) de liaison à l'ATP (Rosenberg *et al.*, 2004) (figure 20, d'après (Ackerman *et al.*, 1997)). La localisation de CFTR dans les cellules épithéliales requiert la glycosylation de la protéine.

La protéine CFTR est détectée à la membrane apicale des épithéliums exocrines (Crawford *et al.*, 1991). En l'absence de jonctions serrées, les cellules perdent leur polarité ; CFTR est alors retenue au niveau du réseau trans-golgien (Morris *et al.*, 1994). En effet, sa localisation dans la membrane apicale des cellules épithéliales dépend directement de la polarité cellulaire. Au niveau des voies aériennes, CFTR est déjà présent à 7 semaines de gestation au niveau cytoplasmique (Gaillard *et al.*, 1994). Cette expression s'intensifie durant les stades ultérieurs du développement fœtal, atteignant vers le milieu de la gestation un niveau supérieur à celui détecté dans le poumon adulte (Trezise *et al.*, 1993). En fin de gestation, la protéine adopte une localisation apicale au niveau des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire (Puchelle *et al.*, 1992). D'autre part, CFTR a été localisé et testé fonctionnellement à la surface des LT (Yoshimura *et al.*, 1991 ; Krauss *et al.*, 1992).

Depuis le clonage du gène codant la protéine CFTR, plusieurs fonctions lui ont été attribuées, la principale étant son activité de canal chlorure. En effet, sa structure montre qu'elle peut avoir une fonction de canal ionique et/ou de transporteur actif. Par reconstitution de la protéine CFTR dans une bicouche lipidique, Bear *et al.* ont montré qu'elle présente une activité canal chlorure de faible conductance (Bear *et al.*, 1992), pouvant être stimulée par l'AMPc et régulée par la PKA. A l'état basal, CFTR est inactif (Sheppard *et al.*, 1994). Son activation et son maintien à l'état actif s'effectuent *via* la phosphorylation de résidus situés dans le domaine R par la PKA, et par la fixation et l'hydrolyse d'ATP au niveau des domaines NBD (Akabas *et al.*, 2000). Dans ce cas, CFTR devient perméable laissant passer les ions Cl<sup>-</sup>. Après sa phosphorylation, CFTR est désactivé par des phosphatases (Gadsby *et al.*, 1999) et devient imperméable.

La protéine CFTR régule également l'activité d'autres canaux ioniques de la cellule épithéliale (figure 21). Elle stimule *via* l'ATP le canal chlorure de forte conductance ORCC (pour outwardly rectifying chloride channel) (Schwiebert *et al.*, 1995), inhibe le canal ENaC (pour epithelial sodium channel) sensible à l'amiloride (Stutts *et al.*, 1995 ; Ismailov *et al.*, 1996) qui a une plus grande probabilité d'ouverture chez les patients CF par rapport à des

sujets normaux, et module les canaux potassium (Loussouarn *et al.*, 1996). CFTR régulerait aussi le pH intravésiculaire (Barasch *et al.*, 1991) et pourrait jouer un rôle dans les processus de recyclage des membranes cellulaires et l'exocytose (Bradbury *et al.*, 1992). Ces deux dernières hypothèses sont toutefois remises en cause par les travaux de Gibson *et al.* (Gibson *et al.*, 2000). Cependant, Song *et al.* viennent récemment de démontrer que les sécrétions des glandes sous-muqueuses sont acides à un stade précoce de la CF (Song *et al.*, 2006). En effet, CFTR sert également de canal à ions bicarbonates (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) qui vont tamponner les ions H<sup>+</sup> sécrétés à la partie apicale dans le liquide de surface, ce qui est défectueux dans la CF (Coakley *et al.*, 2001 ; Coakley *et al.*, 2003 ; Perez-Vilar *et al.*, 2004), d'où la diminution du pH.

Enfin, des expériences menées sur des lignées humaines et murines et dans un modèle de souris nouveau-née ont suggéré la capacité du premier domaine extracellulaire de CFTR à servir de récepteur à *Salmonella typhi* (Pier *et al.*, 1998) et à *P. aeruginosa* (Pier *et al.*, 1997). De manière contradictoire, une autre étude a montré que l'adhérence de *P. aeruginosa* à des cellules épithéliales isolées de patients CF diminue après expression de CFTR normal dans ces cellules (Davies *et al.*, 1997). D'autres travaux ont montré que le LPS de *P. aeruginosa* était reconnu par CFTR et permettait d'activer les défenses cellulaires altérées chez les patients CF (Schroeder *et al.*, 2002).

## B.2.2.2. Mutations du gène cftr

Depuis la découverte du gène codant CFTR, à la date du 28/09/2006, 1523 mutations du gène *cftr* ont été recensées (<u>http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html</u>). La plupart sont des mutations ponctuelles qui impliquent seulement quelques nucléotides. Dans l'ensemble, 40% sont des mutations faux-sens, 18% des mutations non-sens, 18% des mutations qui altèrent des codons essentiels pour l'épissage, 22% des mutations modifient le cadre de lecture, les 2% restant correspondent à des mutations localisées dans le promoteur ou à des délétions dans le cadre de lecture. Les mutations sont classées en 6 groupes correspondant aux dysfonctionnements moléculaires observés (figure 22) :

- Les mutations de classe 1 sont de type codon stop, non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture aboutissant à un messager tronqué, la plupart du temps sans synthèse de protéine. Environ 50% des mutations du canal CFTR affectent la synthèse de l'ARNm.
- Les mutations de classe 2 touchent l'étape de biosynthèse. La protéine reste localisée dans le cytoplasme et est dégradée. Très peu de protéines fonctionnelles arrivent à la membrane apicale des épithéliums. La mutation ΔF508 est incluse dans cette classe. C'est la mutation la plus répandue au monde (70% des cas) et correspond à la délétion de 3 nucléotides (CTT) entraînant la perte d'une phénylalanine en position 508.

- Les mutations de classe 3 touchent l'activation et la régulation de CFTR membranaire. Il s'agit d'un défaut d'activation du canal qui conduit à une conductance très réduite des ions Cl<sup>-</sup>.
- Les mutations de classe 4 touchent également la fonction du canal CFTR. Elles affectent la conductance et les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal. Le flux ionique ou la probabilité d'ouverture du canal sont cependant diminués.
- Les mutations de classe 5 incluent des mutations dans le promoteur et des mutations qui modifient l'épissage alternatif ou provoquent une synthèse de la protéine inefficace.
- Les mutations de classe 6 correspondent à des mutations qui affectent la régulation des autres canaux par CFTR.

# **B.2.3.** Physiopathologie de la mucoviscidose

#### B.2.3.1. Généralités

La CF est la maladie génétique la plus fréquente dans les populations d'origine Caucasienne (Bobadilla *et al.*, 2002). La fréquence de la maladie varie entre 1/2000 et 1/3000 (Zielenski *et al.*, 1995), et environ 1 personne sur 50 est porteuse du gène muté. En France, on estime le nombre de patients atteints à 5000-6000 dont 18% ont plus de 18 ans.

La CF atteint essentiellement les tissus épithéliaux exocrines tels que le tissu respiratoire, le pancréas, le foie, l'intestin, les vas déférents et les glandes sudoripares. Bien que l'expression de CFTR soit diminuée, l'affection pulmonaire n'apparaît qu'après la naissance, alors que d'autres organes tels que le pancréas ou le foie peuvent être déjà atteints au stade fœtal. L'atteinte respiratoire semble dépendre de plusieurs facteurs qui se surajoutent au défaut de CFTR dans les cellules épithéliales (Soferman et al., 2006). Le génotype des patients ne paraît pas directement corrélé à l'importance de l'atteinte pulmonaire (Parad et al., 1999). Celle-ci constitue pourtant la principale cause de morbidité et de mortalité des patients CF. A un stade précoce de la maladie, chez les fœtus CF, l'histologie de l'épithélium de surface CF ainsi que le nombre de cellules caliciformes sont identiques aux contrôles non-CF (Hubeau et al., 2001b). A un stade avancé de la maladie, la CF se caractérise par une obstruction bronchique due à l'accumulation du mucus (Simel et al., 1984), ainsi que par un défaut de clairance mucociliaire (Yeates et al., 1976 ; Mortensen et al., 1993 ; Bennett et al., 1996 ; Matsui et al., 2005) et une déplétion du liquide périciliaire (Matsui et al., 1998) causée par une hyperabsorption de sodium (Boucher et al., 1988a). Une susceptibilité accrue à l'infection par différents pathogènes comme P. aeruginosa (Zar et al., 1995), une inflammation et une infection (Heijerman et al., 2005) chronique au niveau de la muqueuse

respiratoire constituent également les manifestations majeures qui caractérisent l'atteinte pulmonaire.

#### **B.2.3.2.** Modifications du liquide de surface

Des études réalisées chez l'animal et chez l'homme ont montré que le transport du mucus, au niveau des voies aériennes de conduction, était susceptible d'être diminué dans les pathologies d'hypersécrétion bronchique rencontrée dans la CF (Puchelle *et al.*, 1985 ; Shak *et al.*, 1990). De plus, une étude récente vient de montrer que les propriétés antibactériennes du liquide du surface sont également diminuées dans la CF (Moraes *et al.*, 2006). Plusieurs questions peuvent être posées à ce sujet : les échanges ioniques, ainsi que la composition du mucus, sont-ils à l'origine de ces altérations ?

#### B.2.3.2.1. Transports ioniques transépithéliaux

Le transport ionique à travers l'épithélium de surface engendre des gradients osmotiques locaux qui modulent les transferts de liquide entre la muqueuse et la lumière bronchique. Ces transports d'ions et d'eau déterminent le volume et la composition du liquide de surface des voies aériennes suivant 2 principes possibles : le modèle hypotonique et le modèle isotonique ou classique (figure 23, d'après (Wine *et al.*, 1999)). Dans la CF, le débat concerne la réduction du volume du liquide périciliaire ou une modification de sa composition électrolytique, en NaCl notamment (Wine *et al.*, 1999).

#### B.2.3.2.1.1. Modèle isotonique

Dans le modèle isotonique (figure 23b), on considère que l'épithélium des voies aériennes est perméable à l'eau. Dans un épithélium normal, l'absorption active de sodium (absorption de sel et d'eau) et la sécrétion active de chlore par le canal CFTR (opposée à l'absorption de sel et d'eau) s'équilibrent mutuellement (Boucher *et al.*, 1994a ; Boucher *et al.*, 1994b). Dans la CF, une dérégulation de ces échanges, à la fois directement (sécrétion de chlore), mais aussi en influençant les autres canaux aqueux (comme l'aquaporine 3) (Schreiber *et al.*, 1999) et ioniques. Les canaux ENaC sensibles à l'amiloride ne seraient en l'occurrence plus inhibés. Dans ce modèle, on assiste donc à une hyperabsorption de sodium et d'eau au niveau de l'épithélium CF, entraînant une déshydratation du liquide de surface bronchique et un défaut de clairance mucociliaire favorisant l'obstruction et l'infection de voies aériennes (Zahm *et al.*, 1997a).

#### B.2.3.2.1.2. Modèle hypotonique

Dans le modèle hypotonique (figure 23a), on considère que l'épithélium des voies aériennes est imperméable à l'eau. Dans un épithélium normal, l'absorption active de sodium suit le même principe décrit précédemment. Par contre, l'absorption passive de chlore se ferait uniquement par l'intermédiaire des canaux chlore CFTR et des canaux chlore ORCC dont la régulation dépend de CFTR. Cette absorption de NaCl non accompagnée d'une absorption proportionnelle d'eau rendrait donc le liquide de surface hypotonique. Dans la CF, l'épithélium serait imperméable au chlore du fait de l'absence de canaux CFTR et d'activation des canaux ORCC, d'où une augmentation de la concentration de sels dans le liquide de surface (Guggino *et al.*, 1999). Ce dernier contenant plusieurs types de molécules à activité antimicrobienne, une hypersalinité diminue leur efficacité et favorise le phénomène d'infection (Smith *et al.*, 1996). De plus, comme il a été suggéré que le transport des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> s'effectue également *via* le canal CFTR (Kozlova *et al.*, 2006a), la mutation de ce dernier dans la CF pourrait aboutir à la dérégulation du pH du liquide de surface (Coakley *et al.*, 2003) et donc à la diminution de son activité antibactérienne (Ballard *et al.*, 1999).

#### B.2.3.2.1.3. Conclusions

Les deux modèles s'opposent donc quant à la perméabilité à l'eau et ses conséquences sur les échanges ioniques. Différents travaux basés sur l'analyse de la composition ionique du liquide de surface normal et CF sont contradictoires. Certains ne mettent pas en évidence une différence de composition ionique du liquide de surface entre CF et non-CF et sont en faveur du modèle isotonique (Knowles et al., 1997 ; Baconnais et al., 1999 ; Verkman et al., 2001 ; Zahm et al., 2001 ; Tarran et al., 2001). Selon certains auteurs, la diminution de l'hydratation du liquide de surface ainsi que celle de la clairance mucociliaire sont responsable de l'inflammation et de l'infection qui caractérisent la maladie. L'hypothèse du liquide de surface isotonique va également de pair avec les observations de Zahm et al. dans les souris CF (Zahm et al., 1997a). D'autres études montrent que la concentration de sels est plus élevée dans le liquide de surface CF, et sont en faveur du modèle hypotonique (Smith et al., 1996 ; Goldman et al., 1997; Vanthanouvong et al., 2006; Kozlova et al., 2006a; Kozlova et al., 2006b). De plus, Baconnais et al. ont récemment montré que les granules sécrétoires sont déshydratés dans les cellules CF et qu'ils ont un contenu ionique supérieur à ceux des cellules normales suggérant une hyposécrétion d'eau et une augmentation de la viscosité du liquide de surface CF (Baconnais et al., 2005). Le modèle hypotonique, bien que séduisant, repose sur un nombre limité d'arguments expérimentaux ; l'hypothèse d'une imperméabilité à l'eau de l'épithélium bronchique est difficile à admettre (Knowles et al., 1997 ; Matsui et al., 1998 ;

Matsui *et al.*, 2000). Enfin, les échanges ioniques joueraient un rôle prépondérant dans la qualité du mucus. L'inhibition des transports de chlore et de bicarbonate induit la formation d'un mucus « CF-like » dans le poumon de porc non-CF (Trout *et al.*, 2003). De plus, la diminution de la concentration de sodium favorise la liaison du calcium aux mucines au niveau du tube digestif (Kuver *et al.*, 2004).

B.2.3.2.2. Le mucus

#### B.2.3.2.2.1. Altération du contenu en lipides et en ADN

Les lipides constituent 3 à 5% des sécrétions bronchiques et contribuent au transport mucociliaire ainsi qu'aux fonctions de défenses contre les bactéries. Girod *et al.* ont rapporté une augmentation des phospholipides totaux dans les sécrétions CF par rapport aux sécrétions des sujets normaux (Girod *et al.*, 1992). Ils ont également montré que les phospholipides sécrétés dans la CF sont plutôt ceux qui contribuent à la rigidité du mucus. Généralement, une hyperviscosité du mucus est associée à une concentration élevée en lipides neutres et en glycosphingolipides (Galabert *et al.*, 1987). L'origine de l'altération des phospholipides dans la CF pourrait être due à l'acidification intracellulaire défectueuse qui agirait négativement sur leur synthèse. De plus, les enzymes bactériennes telles que les phospholipides actifs de la surface cellulaire des cellules épithéliales (Puchelle *et al.*, 2002).

Outre les phospholipides, l'ADN présent dans le mucus CF infecté et qui est produit par les bactéries et les cellules inflammatoires présentes sur le site pourrait adhérer aux protéines, mucines et lipides et induire une augmentation de la viscosité du mucus entraînant des défauts de transport mucociliaire (partie B.1.2.3.). Zahm *et al.* ont montré que le clivage de l'ADN par la dornase  $\alpha$  induit la libération de phospholipides dans la phase sol (Zahm *et al.*, 1998). La DNase recombinante améliore les propriétés du mucus séquestré, ainsi que le transport mucociliaire et la clairance par la toux.

#### *B.2.3.2.2.2. Les mucines*

Comme décrit dans la partie *B.1.2.2.2.*, les mucines sécrétées qui sont responsables de propriétés visco-élastique du mucus sont MUC5AC et MUC5B sécrétées en majorité, et MUC2 sécrétée minoritairement. MUC5AC est principalement sécrétée par les cellules caliciformes (Davies *et al.*, 2002) alors que MUC5B est principalement sécrétée par les glandes sous-muqueuses (Groneberg *et al.*, 2002). Cependant, plusieurs études ont montré

que MUC5B est également sécrétée par les cellules caliciformes (Wickstrom *et al.*, 1998 ; Jackson *et al.*, 2001 ; Groneberg *et al.*, 2003).

Dans la CF, MUC5AC et MUC5B ont également été décrites comme étant les 2 mucines sécrétées en majorité (Davies *et al.*, 1999 ; Kirkham *et al.*, 2002). L'expression de MUC5AC est augmentée dans les glandes sous-muqueuses de patients CF (Dohrman *et al.*, 1998), alors que l'expression de cette mucine est normalement absente au niveau glandulaire (Audie *et al.*, 1993 ; Reid *et al.*, 1997). Par contre, la localisation et la distribution de MUC5AC et MUC5B n'est pas différente entre les épithéliums CF et non-CF (Groneberg *et al.*, 2002).

Une hyperplasie (hyperprolifération) des cellules sécrétoires a été décrite dans la CF, cependant, rares sont les études quantitatives qui le prouvent. Une seule étude a procédé à la quantification du pourcentage des cellules positives au MUC5AC *in situ* (Martinez-Anton *et al.*, 2006), le MUC5AC étant un marqueur de toutes les cellules caliciformes (Groneberg *et al.*, 2002), mais aucune étude n'a quantifié à l'heure actuelle le nombre de cellules MUC5AC-positives à un stade précoce de la maladie, c'est-à-dire lorsque l'infection n'est pas encore installée. Quant à la quantification des mucines dans les liquides de surface CF et non-CF, les résultats restent toujours contradictoires (Rose *et al.*, 2006).

Plusieurs études rapportent une altération de la glycosylation des mucines dans la CF. Glick *et al.* ont montré des changements dans les profils de fucosylation des glycoprotéines de cellules CF, corrélés à une modification de fucosyltransférases (Glick *et al.*, 2001). Une augmentation de la glycosylation des protéines de la lumière intestinale des souris cftr-/(Mailleau *et al.*, 2001) ainsi qu'une augmentation de la fucosylation des mucines dans l'intestin de souris cftr-/-, avec une augmentation de la transcription d'une fucosyltransférase (Thomsson *et al.*, 2002) ont été décrites. Xia *et al.* ont signalé une altération de l'O-glycosylation et de la sulfatation des mucines de voies aériennes CF (Xia *et al.*, 2005). D'autre part, plusieurs études n'ont mis en évidence aucun changement de la structure des mucines dans la CF. Les profils de migration de MUC5AC et MUC5B sont semblables pour les expectorations de patients CF et non-CF (Kirkham *et al.*, 2002). De plus, la glycosylation de MUC5AC et MUC5B n'est pas modifiée dans les sécrétions des glandes de la sousmuqueuse chez les patients CF (Schulz *et al.*, 2005), et la composition en carbohydrates est similaire chez les sujets CF et non-CF (Holmen *et al.*, 2004). L'altération de la glycosylation des mucines CF et non-CF n'est donc toujours pas clairement définie.

Les modifications physico-chimiques des mucines favoriseraient donc des infections bactériennes puisqu'il a été montré que les mucines constituent également des récepteurs bactériens servant à les neutraliser.

#### **B.2.3.3.** Infection et inflammation dans la mucoviscidose

L'affection pulmonaire, caractérisée par une infection et une inflammation est la principale cause de mortalité et de morbidité chez les patients CF (Heijerman *et al.*, 2005). Cependant, le fait que l'infection soit la cause ou la conséquence de l'inflammation reste encore mal défini (Dakin *et al.*, 2002). Bien qu'il existe une controverse (Armstrong *et al.*, 1995 ; Rosenfeld *et al.*, 2001 ; Armstrong *et al.*, 2005), il apparaîtrait que l'inflammation précède l'infection (Khan *et al.*, 1995 ; Konstan *et al.*, 1997 ; Tabary *et al.*, 1998 ; Tirouvanziam *et al.*, 2000 ; Hubeau *et al.*, 2001a ; Hubeau *et al.*, 2001b) (figure 24). Une étude récente effectuée chez la souris a montré que la surexpression des canaux ENaC entraîne une réabsorption du liquide de surface aboutissant à un phénotype CF-like. Cette surexpression est accompagnée d'un recrutement de neutrophiles et d'une augmentation des sécrétions des protéines inflammatoires (MIP-2 et analogues murins de l'IL-8) en dehors de toute infection, supportant l'hypothèse que l'inflammation pourrait être due à un défaut de régulation du transport ionique avant toute infection (Mall *et al.*, 2004).

Néanmoins, une conclusion tranchante reste toujours difficile à proposer sur ce sujet, puisque des études récentes viennent de montrer l'existence dans des expectorations CF de plusieurs nouvelles espèces bactériennes actives, jamais décrites dans cette maladie, qui n'ont été détectables que par des techniques poussées de la biologie moléculaire (Rogers *et al.*, 2004 ; Rogers *et al.*, 2005), et qui pourraient ainsi révéler de sérieux artéfacts expérimentaux dans les études réalisées auparavant (Machen *et al.*, 2006). Cependant, ces études ont été effectuées sur des expectorations CF uniquement sans contrôles non-CF, ce qui n'exclut pas une éventuelle contamination des échantillons recueillis par la flore oropharyngée.

#### **B.2.3.4.** Déséquilibre de certains médiateurs protéiques

Dans la CF, nombreuses sont les modifications qui ont été décrites, tant sur le plan physiologique que sur le plan cellulaire et moléculaire. Un travail récent vient de mettre en évidence une dégradation de plusieurs protéines ainsi qu'une dérégulation d'autres protéines (Sloane *et al.*, 2005). Nous nous intéresserons dans ce travail à l'IL-8 et à quelques MMPs, particulièrement les MMP-7 et -9 qui sont exprimées et sécrétées par les cellules épithéliales de surface, et leur inhibiteur tissulaire TIMP-1 (Coraux *et al.*, 2005).

B.2.3.4.1. L'IL-8

#### B.2.3.4.1.1. L'IL-8 est surexprimée dans la mucoviscidose

L'IL-8, découverte en 1987 est un membre de la famille des chimiokines, ensemble de cytokines impliquées dans le recrutement des cellules immunes sur le site inflammatoire par chimiotactisme. C'est la cytokine la plus chimioattractive des PMN dans les poumons. La CF est caractérisée par un déséquilibre cytokinique (Hubeau et al., 2004). L'IL-8 est la cytokine pro-inflammatoire la plus étudiée dans la CF, et est aussi utilisée comme un marqueur d'inflammation. L'augmentation de l'IL-8 dans le lavage bronchoalvéolaire de patients CF a été observée pour la première fois en 1992 (McElvaney et al., 1992). Ensuite, une série d'études (Machen et al., 2006) a montré un taux élevé de cette cytokine dans la CF (Dean et al., 1993; Richman-Eisenstat et al., 1993; Francoeur et al., 1995; Salva et al., 1996 ; Noah et al., 1997; Kammouni et al., 1997; Tabary et al., 1998; Muhlebach et al., 1999; Bonfield et al., 1999; Tirouvanziam et al., 2000; Escotte et al., 2002; Bergoin et al., 2002; Augarten et al., 2004; Ordonez et al., 2004; Muhlebach et al., 2004; Zaman et al., 2004; Schmitt-Grohe et al., 2005 ; Xiao et al., 2005 ; Bodini et al., 2005 ; Sloane et al., 2005 ; Claeys et al., 2005 ; Carrabino et al., 2006 ; Chan et al., 2006 ; Mrugacz et al., 2006). Quelques études contradictoires ne montrent pas de différence significative du taux de l'IL-8 entre CF et non-CF (Scheid et al., 2001 ; Becker et al., 2004 ; Reiniger et al., 2005 ; Wiszniewski et al., 2006), ou même un taux sécrété par les cellules CF inférieur à celui des cellules non-CF (Massengale et al., 1999). Cependant, le nombre de ces études reste largement inférieur à celui des études qui montrent une augmentation de l'IL-8 dans la CF, in vitro et in vivo. Nous avons récemment montré que l'expression et la sécrétion de l'IL-8 sont élevées quand la régénération de l'épithélium respiratoire non-CF est à ses premiers stades, en dehors de toute infection, et baissent ensuite au cours de la régénération épithéliale (Coraux et al., 2005b). Aucune étude ne met en évidence à l'heure actuelle le profil d'expression et de sécrétion de cette cytokine au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire CF.

#### B.2.3.4.1.2. Action de l'IL-8 sur les métalloprotéinases

Outre son rôle pro-inflammatoire, l'IL-8 est impliquée dans la régulation des MMPs. Il a été démontré que l'IL-8 augmente l'activité de la MMP-9 et le potentiel invasif des cellules stromales endométriales en culture (Mulayim *et al.*, 2004), que l'incubation des cellules endothéliales avec l'IL-8 entraîne la sur-expression de la MMP–9 régulant l'angiogénèse (Li *et al.*, 2003), et que l'addition d'IL-8 à une culture de cellules de carcinome des voies orales augmente l'expression de la MMP-7 favorisant leur potentiel invasive (Watanabe *et al.*, 2002). De plus, le blocage de l'IL-8 par un anticorps bloquant dans des lignées cellulaires de

carcinome de haute/faible tumorigénicité et métastatique ou pas, inhibe l'activité, l'expression et même la transcription des MMP-2 et -9, ainsi que le potentiel invasif de ces lignées dans un modèle de xénogreffe (Mian *et al.*, 2003). Chez les singes, l'injection d'IL-8 par voie systémique entraîne l'augmentation de la MMP-9 dans la circulation sanguine (Fibbe *et al.*, 1999). Nous avons proposé en 2005 que l'IL-8 régule l'expression et la sécrétion des MMP-7 et -9 qui augmentent au cours de la régénération non-CF (Coraux *et al.*, 2005b). Dans la rhinosinusite chronique, il a été suggéré que l'IL-8 et la MMP-8 sont associées dans leur mode d'action *in vivo* (Kostamo *et al.*, 2005). L'action de l'IL-8 sur la régénération de l'épithélium CF et sur les MMPs reste inconnue au niveau des voies aériennes.

## B.2.3.4.2. Les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs tissulaires

Comme nous l'avons déjà décrit dans la partie B.1.3.2.2.2., les MMPs jouent un rôle très important dans la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire, comme le confirme les expériences d'inhibitions de quelques MMPs au cours de la régénération de l'épithélium non-CF (Coraux *et al.*, 2005b). MMP-7 et MMP-9 sont exprimées par les cellules cylindriques épithéliales (Dunsmore *et al.*, 1998 ; Coraux *et al.*, 2005b) et aux environs ce ces cellules (figure 25). La balance entre les MMPs et leur inhibiteur TIMP-1 semble être essentielle pour assurer une homéostasie parfaite.

Le taux de MMP-9 et de TIMP-1 a été trouvé élevé dans certaines maladies inflammatoires comme l'asthme et la BPCO (Cataldo et al., 2000 ; Demedts et al., 2005), ainsi que dans la fibrose idiopathique pulmonaire (Beeh et al., 2003), alors que les enfants qui manifestaient la maladie chronique du poumon (CLD) avaient moins de TIMP-1 que les enfants non-CLD (Ekekezie et al., 2004). La quantité de MMP-9, inversement à TIMP-1, augmente pendant l'aggravation de la maladie chez les patients souffrants de la BPCO (Mercer et al., 2005). De plus, il a été montré que le taux de MMP-9 est élevé chez les patients emphysémateux (Finlay et al., 1997). Dans la CF, les études relatives aux MMPs et TIMPs sont très rares. Delacourt et al. ont montré que la MMP-9 est élevée dans les expectorations des patients CF par rapport aux sujets normaux non-CF, avec un déséquilibre marqué entre cette MMP et TIMP-1 (Delacourt et al., 1995). Ratjen et al. ont mis en évidence les mêmes observations que Delacourt et al. montrant également, en plus de l'augmentation de la MMP-9 dans les expectorations des patients CF, une augmentation de la quantité de TIMP-1 (Ratjen et al., 2002). Sagel et al. confirment plus tard les travaux de Ratjen et al. montrant une augmentation de ces 2 protéines chez les sujets CF (Sagel et al., 2005). La MMP-7, cependant, n'a été recherchée que dans une seule étude décrivant que son expression ainsi que sa production sont plus marquées sur les sections de tissus CF par rapport aux contrôles non-CF (Dunsmore et al., 1998). Toutes ces études comparent les quantités exprimées ou sécrétées de MMP-9 et TIMP-1 entre les sécrétions bronchiques de patients CF et non-CF, mais n'évoquent pas la sécrétion de MMP-7 dans la CF. A l'heure actuelle, le profil d'expression et de sécrétion de ces MMPs, ainsi que du TIMP-1 au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire CF de surface n'a pas été étudié.

# B.2.4. Remodelage de l'épithélium mucoviscidosique

En plus des manifestations décrites dans le paragraphe B.2.3.1, et à un stade avancé de la maladie, la CF est caractérisée par des lésions épithéliales (Chmiel *et al.*, 2003) et un remaniement (figure 26) qui se traduit par une métaplasie malpighienne (Konradova *et al.*, 1982), une hyperprolifération cellulaire (Leigh *et al.*, 1995), une hyperplasie des cellules basales et sécrétoires (Voynow *et al.*, 2005), ainsi que par une augmentation de la hauteur de l'épithélium (Voynow *et al.*, 2005) et par une hypersécrétion de mucus (Hauber *et al.*, 2004). Cependant, l'association de ces remaniements à l'infection et/ou à l'inflammation ou à un processus anormal de régénération après lésion épithéliale reste encore mal définie. De plus, aucune donnée bibliographique ne compare la vitesse de régénération et de différenciation CF à celui non-CF.

Dans les conditions normales, chez les sujets sains, la protéine CFTR est exprimée au pôle apical des cellules ciliées de l'épithélium bronchique (Puchelle et al., 1992 ; Dupuit et al., 1995a ; Dupuit et al., 2000). Au cours des remaniements de l'épithélium non-CF, une expression variable de CFTR est observée : son expression est plus faible au niveau apical des cellules ciliées ou se limite uniquement au niveau cytoplasmique des cellules superficielles remaniées (Brezillon et al., 1995). Dans la CF, il a également été montré que l'expression de CFTR est variable, et qu'elle est fonction du degré d'inflammation de l'épithélium. Les anomalies de l'expression et de la distribution de CFTR dans les voies aériennes sont non seulement liées à la mutation du gène, mais aussi à l'inflammation importante dans la CF (Dupuit et al., 1995b). Dans la souris transgénique cftr-/-, Zham et al. ont observé qu'il existe, avant toute infection, une diminution de la clairance mucociliaire associée à une hypersécrétion de mucus et une augmentation du nombre de cellules inflammatoires dans le chorion. L'observation en microscopie électronique à transmission de coupes réalisées au niveau de la trachée de souris normale montre la présence de cellules de Clara, d'aspect cuboïdal et contenant des granules sécrétoires. Au niveau des trachées de souris cftr-/-, les auteurs montrent la présence de cellules de Clara, plus riches en granules sécrétoires, ainsi qu'un film de mucus plus épais au niveau de la surface de l'épithélium respiratoire (Zahm et al., 1997a), mettant en évidence un remaniement cellulaire avant toute infection.

# **B.3.** Les Cellules Souches

## B.3.1. Concept

#### B.3.1.1. Définitions

Une cellule souche est par définition une cellule indifférenciée qui est capable de se diviser indéfiniment pour s'autorenouveler (Smith *et al.*, 2006) afin de maintenir son pool. Les cellules souches sont également capables de maintenir le pool de leur descendance et d'assurer l'homéostasie tissulaire. Elles produisent des cellules spécialisées qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifique du tissu. Ce processus dit de différenciation est en théorie irréversible. La cellule souche n'exprime aucune spécialisation et c'est pour cette raison qu'on l'appelle « indifférenciée » (Lajtha *et al.*, 1979 ; Fuchs *et al.*, 2000 ; Slack *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2001 ; Loeffler *et al.*, 2002).

Une cellule souche se divise symétriquement pour donner 2 cellules souches filles identiques, ou asymétriquement pour donner naissance à une cellule souche et une autre cellule appelée cellule progénitrice. Cette dernière sera engagée dans une ou plusieurs voies de différenciation. Elle donnera naissance à d'autres cellules progénitrices qui à leur tour vont se différencier et se spécialiser dans un tissu donné. Les cellules progénitrices ou « cellules d'amplification transitoire » sont normalement très actives physiologiquement. Elles prolifèrent activement mais de façon limitée (soumises à la limite de Hayflick (Shay *et al.*, 2000), c'est-à-dire 50 à 70 doublements de population) et participent à la réparation tissulaire après lésion. Ces cellules pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques pour pallier un déficit transitoire d'un organe ou d'un tissu (comme la production de cellules sanguines par exemple). En temps normal, une cellule progénitrice est engagée définitivement et ne peut pas s'autorenouveler (Smith *et al.*, 2006). Cependant, cette notion n'est toujours pas clairement définie. Pour cette raison, nous définirons une cellule progénitrice dans notre travail comme étant une cellule engagée qui peut s'autorenouveler de façon limité, et qui perd cette capacité au cours de sa progression dans la différenciation (Neuringer *et al.*, 2004).

Selon son type, une cellule souche a la possibilité de produire ou pas différents tissus de l'organisme. On les classe en « totipotentes », c'est-à-dire capables de produire un individu entier ; « pluripotentes », capables de produire tous les tissus de l'organisme mais pas un individu entier ; « multipotentes » capables de produire plusieurs types cellulaires.

#### **B.3.1.2.** Les cellules souches embryonnaires (CSE)

Après la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde, le zygote formé commence ses quelques premières divisions pour donner les premières cellules souches totipotentes (stade morula). La division cellulaire se poursuit jusqu'au stade blastula (40 cellules environ) où on assiste à la formation d'un blastocyste formé d'un trophectoderme (enveloppe de la sphère cellulaire formée) et d'une masse cellulaire interne qui constitue le pool de CSE ou pluripotentes. Ce sont ces cellules qui ont la capacité de générer tous les tissus de l'organisme c'est-à-dire les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), mais pas un individu entier.

Les CSE ont été pour la première fois isolées de blastocystes de souris en 1981. Les auteurs les ont cultivés *in vitro* suivant des conditions de cultures particulières (Evans *et al.*, 1981). Ensuite, ces cellules ont été injectées chez la souris et ont induit la formation de tératocarcinomes (Martin *et al.*, 1981). En 1995 et 1996, des CSE ont été isolées de la masse interne du blastocyste de singe (Thomson *et al.*, 1995) et de ouistiti (Thomson *et al.*, 1996) et maintenues en culture. Les CSE humaines ont été isolées en 1998. Elles ont maintenu leur caractère diploïde au cours des passages et ont également conservé une considérable activité de télomérase (Thomson *et al.*, 1998).

Les CSE sont capables de se diviser sur de très longues périodes, plus de deux ans en culture avec plus de 300 doublements de population (Odorico *et al.*, 2001), et symétriquement sans se différencier *in vitro*, tout en conservant un caryotype normal (Amit *et al.*, 2000 ; Shamblott *et al.*, 2001). De plus, *in vitro*, ces cellules ont montré leur capacité à former une multitude de types cellulaires, prouvant ainsi leur pluripotence (Reubinoff *et al.*, 2000 ; Amit *et al.*, 2000 ; Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000) (http://stemcells.nih.gov/info/scireport/ chapter3.asp). Une des caractéristiques très importante des CSE, surtout humaines, est le critère immunogénique de ces cellules. En effet, les CSE humaines sont très peu immunogènes, comme le montre une étude récente (Drukker *et al.*, 2006). Les auteurs montrent que la réponse immunitaire des souris greffées avec ces cellules souches indifférenciées ou bien différenciées, est négligeable.

Comme d'autres types de cellules souches, les CSE possèdent leurs propres marqueurs, intracellulaires ou de surface. Le tableau 3 présente quelques marqueurs exprimés par ces cellules.

#### **B.3.1.3.** Les cellules souches adultes (CSA)

#### B.3.1.3.1. Généralités

Une cellule souche tissulaire somatique assure l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu, en remplaçant les cellules mortes, naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu. Elle remplit cette fonction, d'une part en se multipliant à l'identique, d'autre part en se différenciant, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer

Les CSA sont rares (0,1 à 0,15 pour mille dans la moelle osseuse (Weissman *et al.*, 2000)) et n'expriment aucun marqueur de surface spécifique, c'est-à-dire un marqueur qui se trouve seulement sur la cellule souche et non pas sur sa descendance ou sur un autre type de cellule souche qui dérive d'un autre organe. Une des caractéristiques des CSA est leur capacité à retenir le marquage BrdU ou bromodésoxyuridine (Whikehart *et al.*, 2005), puisqu'en théorie, elles se divisent lentement. Elles partagent aussi certains antigènes (qui ne leur sont pas spécifiques) comme le montre le tableau 4 pour les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont, de loin, les plus étudiées. Cependant, les études concernant ces marqueurs ne sont pas toutes homogènes. L'expression du CD34 par exemple pourrait en fait changer avec le temps, et son expression pourrait être liée à un phénomène de cycle cellulaire au sein des CSH (Mercer *et al.*, 2005).

Les marqueurs de cellules souches adultes identifiées dans les différents organes sont listés sur le site suivant : <u>http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixE.asp</u>.

D'autres méthodes d'isolement et d'identification des cellules souches consistent à incuber les cellules avec le Hoechst 33342. En effet, une population de cellules souches est capable d'exclure ce colorant vital ; on les appelle les « side population » (SP) (Goodell *et al.*, 1996). Ces cellules expulsent le colorant grâce à l'expression de transporteurs de la famille ABC, notamment le produit du gène *Bcrp1*, ou ABCG2 chez l'homme, qui pourrait représenter un marqueur commun de cellules souches (Zhou *et al.*, 2001). Cependant, des observations récentes indiquent que les SP ne seraient pas forcément enrichies en cellules souches (Alison *et al.*, 2006b).

Un certain nombre de marqueurs est également connu au niveau des lignages endodermique, mésodermique et ectodermique (Young *et al.*, 2004).

Les CSA ont été identifiées dans différents organes, telles que les CSH (Robin *et al.*, 1999), les cellules souches neurales (Gage *et al.*, 2000 ; Pagano *et al.*, 2000), épidermiques (Rochat *et al.*, 1994), intestinales (Booth *et al.*, 2000), osseuses (Bianco *et al.*, 2000 ; Jiang *et al.*, 2002), pancréatiques (Ramiya *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2001), hépato-biliaires (Yang *et al.*, 2002), musculaires lisses, musculaires squelettiques (Renault *et al.*, 2000), cardiaques (Leri *et al.*, 2005), de la cornée (cellules limbiques) (Meller *et al.*, 2002), des glandes

mammaires (Dontu *et al.*, 2003), des glandes salivaires (Okumura *et al.*, 2003), des tendons (Salingcarnboriboon *et al.*, 2003), de la membrane synoviale (De Bari *et al.*, 2001), du cartilage (Robinson *et al.*, 2001), du thymus (Bennett *et al.*, 2002), de la pulpe dentaire (Gronthos *et al.*, 2000), du tissu adipeux (Zuk *et al.*, 2001) et amniotiques (Okawa *et al.*, 2001; Prusa *et al.*, 2003). Soulignons que les cellules souches du sang, de la peau et de l'intestin fonctionnent en permanence pour renouveler régulièrement l'ensemble des cellules. Hormis celles de l'intestin, elles sont déjà, pour beaucoup, utilisées avec succès en thérapeutique.

#### B.3.1.3.2. Plasticité des cellules souches adultes

En 1999, une publication remettait en cause les certitudes des scientifiques sur les cellules souches : des cellules d'une neurosphère produisaient des cellules sanguines fonctionnelles lorsqu'elles étaient injectées par voie intra-veineuse dans une souris irradiée (Bjornson et al., 1999). C'était le « brain to blood » mettant au grand jour une possible transgression des dogmes selon lesquels une cellule souche nichée dans un tissu donné n'engendre que les cellules souches spécialisées de ce tissu, et ne peut pas adopter dans sa descendance le destin de 2 feuillets embryonnaires différents. Depuis 17 ans, on sait que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) côtoient les CSH dans la moelle osseuse et, depuis 1997, on suggère la participation de cellules de la moelle osseuse à de nombreux tissus, cellules gliales dans le cerveau (Eglitis et al., 1997; Azizi et al., 1998), mais aussi cellules musculaires (Ferrari et al., 1998 ; Gussoni et al., 1999). Mais il semble que l'article de Bjornson et al. ait joué le rôle de catalyseur entre 1999 et 2002, inaugurant une série de descriptions inattendues : marrow to liver (Petersen et al., 1999 ; Lagasse et al., 2000 ; LaBarge et al., 2002), marrow to muscle (Theise et al., 2000), muscle to blood (Jackson et al., 1999 ; Seale et al., 2000), et blood to brain (Mezey et al., 2000 ; Brazelton et al., 2000). Un nouveau concept, celui de la « plasticité » ou de la « transdifférenciation » (figure 27), était alors avancé qui ouvrait de fantastiques perspectives thérapeutiques : des tissus d'accès facile pourraient être en fait des réservoirs de cellules souches réparatrices de plusieurs tissus, d'utilisation physiologique aisée.

Quelques années après, il convient d'être très prudent, voire circonspect, car toutes ces données proviennent de travaux réalisés chez l'animal, et peu d'entre eux ont été reproduits chez l'homme. De plus, dans les expériences rapportées ci-dessus, on ignore encore si plusieurs cellules souches distinctes co-existent, ou si une seule cellule souche pourrait se « différencier » pour produire diverses cellules spécialisées. On peut même considérer que la transdifférenciation ou la plasticité est difficile à appliquer à la notion des populations cellulaires hétérogènes ; en effet, tout tissu contient de multiples types cellulaires ; ainsi la moelle osseuse contient au moins 3 types connus de cellules souches : hématopoïétiques, mésenchymateuses et MAPC (multipotent adult progenitor cells) (Jiang *et al.*, 2002). De plus,

puisqu'elle est très vascularisée, on peut y trouver des cellules qui y circulent transitoirement bien que n'y résidant pas, comme par exemple les cellules ovales hépatiques dont la présence est décrite dans la moelle (Ying *et al.*, 2002).

La plasticité des cellules souches est un sujet très émergeant. Nombreux sont les travaux à l'heure actuelle qui mettent en évidence ce phénomène (même s'il existe des études qui le contredisent (Wagers *et al.*, 2002 ; Aliotta *et al.*, 2005)) concernant les cellules souches provenant de la moelle osseuse, par différentes méthodes, notamment par le marquage du chromosome Y du donneur dans le receveur qui est souvent dans ce cas du sexe opposé (Herzog *et al.*, 2003 ; Spyridonidis *et al.*, 2004), ou par d'autres méthodes de biologie moléculaire et immunocytochimiques (Anjos-Afonso *et al.*, 2004 ; Schoeberlein *et al.*, 2005 ; Francois *et al.*, 2006). De plus, des cellules souches qui proviennent d'autres organes, tels que le cerveau, ont montré leur plasticité pour donner des cellules d'origine hématopoïétiques (Wagers *et al.*, 2004).

Cependant, un autre phénomène a été rapporté : la « fusion cellulaire ». En effet, la cellule souche greffée va fusionner chez le receveur avec une autre cellule somatique formant une seule entité, alors que la transdifférenciation décrite ci-dessus consiste en la transformation de la cellule souche greffée en une autre cellule d'un autre type. Dans la littérature, la fusion cellulaire est de plus en plus mise en évidence dans différents organes quand des cellules souches qui proviennent de la moelle osseuse sont injectées chez le receveur (Wagers *et al.*, 2004 ; Rizvi *et al.*, 2006 ; Alison *et al.*, 2006a). Cependant, les études restent prudentes sur ce sujet ; certains suggèrent que ce phénomène est responsable de la transdifférenciation cellulaire, alors que d'autres montrent le contraire (Alison *et al.*, 2004). Néanmoins, ce phénomène est bénéfique dans certains cas et n'abouti pas à la formation de tumeurs, comme c'est le cas avec les CSE (Quesenberry *et al.*, 2005).

## B.3.1.3.3. Implication des cellules souches adultes au niveau pulmonaire

Au cours de ces dernières années, les CSA ont fait l'objet d'un large spectre d'essais, tant sur le plan expérimental fondamental que sur le plan clinique. Diverses études ont montré que des cellules extérieures aux poumons, comme les cellules souches de la moelle osseuse, sont capables de migrer vers les poumons et de se transformer en cellules épithéliales pulmonaires. Ce concept a évolué à partir de quelques études qui ont pu reconstituer la lignée hématopoïétique chez des souris ayant subi l'ablation de la moelle osseuse (Krause *et al.*, 2001), ou bien des études qui ont introduit des préparations de CSM dans la circulation veineuse des animaux (Kotton *et al.*, 2001). Ces derniers travaux qui ont mis en évidence la reconstitution d'un certain pourcentage de l'épithélium pulmonaire à partir des cellules greffées n'ont pu être reproduits de façon efficace (Neuringer *et al.*, 2004 ; Aliotta *et al.*, 2005 ; Kannan S. *et al.*, 2006 ; Neuringer *et al.*, 2006). Pour certains auteurs, ce processus est

inefficace (Loi *et al.*, 2006), et d'autres suggèrent que c'est un artéfact expérimental (Chang *et al.*, 2005 ; Kotton *et al.*, 2005). Il a même été suggéré récemment que le recrutement des cellules souches circulantes de la moelle osseuse est directement proportionnel au degré de lésion de l'épithélium respiratoire, sans montrer, cependant, un pourcentage de chimérisme supérieur à 0,2% au niveau alvéolaire (Herzog *et al.*, 2006). Malgré cela, il existe quelques preuves dans la littérature que les cellules souches de la moelle osseuse contribuent au compartiment mésenchymateux des poumons, mais les conséquences pourraient être soit bénéfiques (Ortiz *et al.*, 2003 ; Yamada *et al.*, 2004), soit nuisibles (Hashimoto *et al.*, 2004 ; Phillips *et al.*, 2004), selon le type et le nombre des cellules greffées chez le receveur.

L'application de cellules souches en thérapie cellulaire de la réparation des épithéliums respiratoires est une technique potentiellement très intéressante dans de nombreuses pathologies comme la mucoviscidose, le syndrome de détresse respiratoire, l'emphysème pulmonaire, etc.

Le poumon représente pour cette technique l'avantage d'un accès direct par les voies respiratoires permettant l'instillation de cellules souches au niveau des voies aériennes. Cependant, cette voie d'administration se heurte à d'autres problèmes techniques comme les complications de la ventilation mécanique parfois utilisée. De plus, si l'administration des cellules souches est techniquement possible au niveau pulmonaire, les cellules souches tendent à se greffer localement uniquement dans le cadre d'une agression pulmonaire. Ainsi, après instillation dans le poumon sain, les cellules souches quittent rapidement le poumon dès le 3<sup>ème</sup> jour pour migrer dans la rate et le foie (Serikov VB. *et al.*, 2006). Enfin, les mécanismes potentiels d'action sont multiples et incomplètement établis : action directe par greffe locale et différenciation cellulaire en cellules pulmonaires résidentes, indirecte par sécrétion de facteurs (cytokines, chimiokines...) ou encore par augmentation du recrutement de cellules souches endogènes circulantes.

De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour pallier à ce problème de thérapie cellulaire au niveau respiratoire : comment les cellules souches sont-elles maintenues dans leur niche et quels sont les facteurs susceptibles de réguler leur différenciation ? Qu'elle est l'impact d'un changement de l'équilibre cytokinique et en facteurs de croissances, dans un poumon pathologique, sur les cellules souches et leurs progéniteurs ? Quelles sont les opportunités qui existent pour la génération et l'expansion de cellules autologues pour la transplantation ? Il est nécessaire de développer et d'optimiser des méthodes pour l'isolement, la purification, l'expansion *in vitro* et la validation *in vivo* des cellules souches/progénitrices pulmonaires.
#### **B.3.2.** Les cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire

#### B.3.2.1. Historique

L'existence de cellules en division au sein de l'épithélium respiratoire a été suggérée dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Drasch et Bonckendahl (1880). Les auteurs rapportent que la production des cellules ciliées et caliciformes se fait à partir des cellules basales via un type de cellules intermédiaires (Otto et al., 1997). Dès 1959, Rhodin suggère le renouvellement régulier de la bordure épithéliale proximale et propose ensuite la couche basale comme source de progéniteurs pour les cellules ciliées et sécrétoires (Rhodin et al., 1966). Ensuite, Blenkinsopp (Blenkinsopp et al., 1967) et Bindreiter (Bindreiter et al., 1968) proposent un modèle de différenciation linéaire dans lequel la cellule basale se divise asymétriquement pour donner une cellule fille basale et une autre cylindrique, capable alors de se re-diviser en 2 cellules différenciées cylindriques, l'une étant ensuite exfoliée dans la lumière des voies aériennes. Le premier concept de cellule souche au niveau pulmonaire est apparu en 1978. Il a été suggéré, chez le hamster, un modèle de renouvellement cellulaire à 3 compartiments : le 1<sup>er</sup> comprend les cellules basales conservant à long terme le marquage par la thymidine tritiée. Ces cellules « de réserve » seraient capables de s'autorenouveler et de proliférer afin de générer le 2<sup>nd</sup> compartiment. Celui-ci se compose de cellules sécrétoires, ayant en partie conservé une capacité de division limitée mais aussi acquis un phénotype différencié. Enfin, le 3<sup>ème</sup> compartiment regroupe les cellules totalement différenciées. Depuis, le renouvellement de l'épithélium respiratoire proximal a été clairement établi (Bowden et al., 1983).

L'épithélium respiratoire, en temps normal, est agressé en permanence par les facteurs de l'environnement, tels que la pollution, les poussières, les bactéries... Il est donc lésé et doit régénérer. De plus, dans de nombreuses pathologies respiratoires comme l'asthme, la bronchiolite oblitérante, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la CF, l'épithélium respiratoire de surface est sévèrement lésé et doit donc régénérer pour restaurer ses fonctions de défense. Ce processus de régénération implique les cellules souches et/ou progénitrices.

Malgré le faible taux de renouvellement de l'épithélium respiratoire (la plupart des cellules sont en phase G0 du cycle cellulaire et le nombre de cellules en division est très faible, inférieur à 1% (Boers *et al.*, 1998)), un certain nombre de données suggère la présence des cellules souches/progénitrices au sein de cet épithélium qui sont activées après sa lésion. En effet, quand des cellules épithéliales respiratoires de rat (Terzaghi *et al.*, 1980), de lapin (Hook *et al.*, 1987 ; Brody *et al.*, 1987), humaines fœtales matures ou immatures (Delplanque *et al.*, 2000) et humaines adultes provenant de la dissociation enzymatique de polypes nasaux ou de bronches (Klein-Szanto *et al.*, 1982 ; Engelhardt *et al.*, 1992 ; Engelhardt *et al.*, 1995 ; Dupuit *et al.*, 2000), sont ensemencées dans une trachée de rat qui a été dénudée de son

propre épithélium et greffée dans la souris nude ou SCID, un épithélium pseudostratifié mucociliaire mature est régénéré avec des structures glandulaires. De plus, le suivi du lignage cellulaire (les cellules épithéliales respiratoires sont transduites par des virus exprimant le gène marqueur LacZ, et puis ensemencées dans les trachées de rats qui sont par la suite greffées dans la souris nude) dans ce modèle de xénogreffe a permis la mise en évidence de clones composés des différents types cellulaires épithéliaux exprimant le LacZ (Engelhardt *et al.*, 1991 ; Engelhardt *et al.*, 1995 ; Zepeda *et al.*, 1995). La composition cellulaire des clones exprimant les gènes marqueurs dans l'épithélium reconstitué a suggéré l'hétérogénéité du compartiment progéniteur et proposé une hiérarchie dans cette sous-population. De plus, cette analyse a mis en évidence la participation de plusieurs progéniteurs localisés dans l'épithélium de surface à la formation des structures glandulaires (Engelhardt *et al.*, 1995).

Ces diverses données suggèrent la présence, au sein de l'épithélium respiratoire de surface, d'une population cellulaire candidate au statut souche ou progéniteur, responsable de son maintien tout le long de la vie, et répondant aux agressions par une division cellulaire permettant de reconstituer un épithélium différencié fonctionnel.

## B.3.2.2. Cellules candidates au statut souche/progéniteur

A l'heure actuelle, les données de la littérature concernant l'identité des cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire restent floues. Le poumon reste parmi les quelques organes pour lequel les souches/progénitrices restent non-identifiées.

#### B.3.2.2.1. L'épithélium trachéo-bronchique

#### B.3.2.2.1.1. Cellules épithéliales fœtales candidates

Au cours du développement, la différenciation de l'épithélium de surface va commencer à partir de la 11<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA) où les cellules ciliées vont commencer à apparaître et vont représenter 50 à 60% des cellules cylindriques à la fin de cette phase (Gaillard *et al.*, 1989). Les cellules sécrétoires vont également apparaître une semaine après les cellules ciliées (BUCHER *et al.*, 1961). Quant aux cellules basales, elles sont les dernières cellules différenciées mises en évidence au niveau des voies aériennes proximales (Plopper *et al.*, 1986). Au fur et à mesure du développement, le nombre des cellules ciliées va augmenter, alors que celui des cellules sécrétoires diminue. Après la 36<sup>ème</sup> SA, l'épithélium est complètement différencié et ressemble à celui de l'adulte.

Pendant le développement, chez le hamster, il a été montré que la prolifération des cellules basales était précédée par une intense division des cellules sécrétoires (McDowell *et al.*, 1985

; Otani *et al.*, 1986). Selon ces auteurs, la prolifération des cellules sécrétoires serait à l'origine de la production d'autres cellules sécrétoires et des cellules ciliées, alors que les cellules basales ne se diviseraient que pour assurer le maintien de leur sous-population.

Récemment en 2005, les cellules fœtales basales humaines positives à l'aquaporine 3 (AQP3) ont été triées pour les séparer des cellules cylindriques (ciliées et sécrétoires) AQP3-. Ces cellules triées ont été ensemencées dans des trachées de rats dénudées de leur propre épithélium et greffées dans la souris SCID. Après 4 semaines de greffe, il a été constaté que les 2 populations triées ont permis la reconstitution d'un épithélium différencié, et conclu que des progéniteurs existent parmi les cellules basales et les cellules cylindriques (Avril-Delplanque *et al.*, 2005). C'était la première étude décrivant une régénération épithéliale respiratoire à partir de cellules humaines, mais fœtales.

#### B.3.2.2.1.2. Capacité de prolifération des cellules épithéliales adultes

Parmi les 3 types cellulaires décrits au niveau de l'épithélium respiratoire adulte, les cellules basales et sécrétoires sont connues comme étant des cellules capables de proliférer *in vitro* et *in vivo* (Otto *et al.*, 1997 ; Otto *et al.*, 2002), alors que les cellules ciliées sont considérées complètement différenciées, c'est-à-dire incapables de se diviser (Mason *et al.*, 1997). Cependant, les cellules ciliées ont révélé une capacité de division totalement inattendue dans des conditions expérimentales très particulières (Rutten *et al.*, 1988). De plus, elles ont récemment montré leur capacité de transdifférenciation dans un modèle de lésion épithéliale chez la souris (Park *et al.*, 2006).

Les 1<sup>ères</sup> études chez le rat ont montré une incorporation de thymidine tritiée par la majorité des cellules basales et quelques cellules sécrétoires (Blenkinsopp *et al.*, 1967 ; Bishop *et al.*, 2004). Les auteurs mettent en évidence une diminution de la fréquence de marquage des cellules basales et une augmentation de celle des autres types cellulaires est observée. Lane *et al.* ont ensuite montré que les cellules basales accumulent la thymidine tritiée aux sites de lésions mécaniques (Lane *et al.*, 1974), puis Gordon *et al.* ont mis en évidence que seules les cellules basales qui restent intactes, après la lésion de l'épithélium et l'exfoliation des cellules ciliées et sécrétoires, prolifèrent pour assurer la restauration de l'épithélium respiratoire (Gordon *et al.*, 1977). Peu après, l'équipe de Trump a décrit dans l'épithélium respiratoire proximal humain l'existence d'un type cellulaire « indifférencié ». Ces cellules appelées « small mucous granule cells » sont rares, de type sécrétoire, et il est proposé qu'elles représentent un type cellulaire transitoire capable de générer l'ensemble des lignages cellulaires (Emura *et al.*, 1997). Cependant, cette théorie n'a pas été suivie avec attention par la communauté scientifique.

Depuis 1980, une série de publication a eu lieu sur le fait que les cellules basales et/ou sécrétoires sont capables de se diviser. Donnelly *et al.* ont proposé que la division d'une

cellule basale, suivie de celle d'une cellule intermédiaire entraîne la production des cellules ciliées et sécrétoires (Donnelly et al., 1982). Les études de cinétique cellulaire ont montré un indice de prolifération 2 fois plus important dans les cellules sécrétoires que dans les cellules basales (Keenan et al., 1982a; Keenan et al., 1982b; Keenan et al., 1982c). Chang et al. ont mis en évidence que les cellules basales et sécrétoires participent à l'établissement de la culture primaire de cellules épithéliales trachéales de rat (Chang et al., 1985). Après blessure par le NO<sub>2</sub> de l'épithélium bronchique de rat, la thymidine tritiée est incorporée par les cellules basales et les cellules sécrétoires. Cependant, seules les cellules sécrétoires prolifèrent, et les auteurs leur attribuent le rôle de progéniteurs (Evans et al., 1986). Chez le hamster, il est suggéré que la production des cellules ciliées et sécrétoires passerait par la prolifération des cellules basales, celles-ci jouant le rôle de cellules progénitrices, et les cellules sécrétoires ne seraient capables de proliférer que de façon transitoire (Breuer et al., 1990). Une étude complémentaire a montré l'hétérogénéité de la population des cellules sécrétoires et a établi la relation entre le contenu en granules sécrétoires et l'intensité de prolifération de ces cellules. En effet, les cellules contenant le plus grand nombre de granules possèderaient un très faible potentiel de prolifération (Breuer et al., 1993). La dénudation de l'épithélium respiratoire chez le cochon d'inde et chez l'homme à l'aide d'une glue, permettant d'éliminer spécifiquement les cellules cylindriques, a montré que les cellules basales intactes ont pu réparer la barrière épithéliale (Erjefalt et al., 1997). Chez l'homme, une étude immunohistochimique par l'antigène Ki-67, associé à la prolifération cellulaire, a révélé que la majorité des cellules proliférantes appartenait à la population des cellules basales et intermédiaires, renforçant la possibilité du rôle progéniteur des cellules basales (Boers et al., 1998).

Plus récemment, Hong *et al.* ont étudié le potentiel clonogénique et réparateur des cellules basales intactes en procédant au traitement de souris bitransgéniques, exprimant la gène LacZ sous le contrôle du promoteur de la CK14 (marqueur des cellules basales), par du naphtalène qui détruit les cellules de Clara trachéales et bronchiques *in vivo*. Pendant la phase de réparation, ils ont constaté que ce sont les cellules basales, exprimant la CK14, qui prolifèrent et se différencient pour reconstituer l'épithélium respiratoire lésé. Les auteurs ont donc attribué un rôle progéniteur aux cellules basales de l'épithélium respiratoire de souris (Hong *et al.*, 2004a ; Hong *et al.*, 2004b). Enfin, une étude publiée en 2005, comparant la prolifération cellulaire entre l'épithélium CF et non-CF humain avec le Ki-67, a mis en évidence que cette prolifération s'effectue au niveau de la couche basale de l'épithélium respiratoire. Les auteurs ont donc attribué un rôle progifieration s'effectue au niveau de la couche basales dans la CF (Voynow *et al.*, 2005). Ceci met encore une fois en valeur la capacité des cellules basales à proliférer au sein de l'épithélium respiratoire de surface.

#### B.3.2.2.1.3. Potentialités des cellules épithéliales adultes purifiées

Plusieurs techniques ont été développées pour isoler et séparer les cellules qui constituent l'épithélium respiratoire adulte. Les potentiels de prolifération et de régénération ont alors pu être testés *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de xénogreffe.

L'élutriation est la 1<sup>ère</sup> méthode employée pour séparer les différentes populations épithéliales, permettant l'enrichissement en cellules basales, sécrétoires et ciliées, chez le lapin par exemple (Chilton *et al.*, 1981). Elle a permis également l'isolement et l'enrichissement en cellules de Clara de lapin (Devereux *et al.*, 1980). Elle consiste à centrifuger les cellules selon un gradient de densité ; ainsi les cellules les plus lourdes se trouvent en dessous des plus légères. Suivant cette méthode, des cellules de lapin ont été isolées et enrichies en cellules basales et sécrétoires (Inayama *et al.*, 1988 ; Inayama *et al.*, 1989 ; Nettesheim *et al.*, 1990). Quand les cellules séparées sont ensemencées dans des trachées dénudées et greffées dans les souris, elles sont capables de reconstituer un épithélium différencié mucociliaire après 4 semaines de greffe. Les auteurs ont donc suggéré que les cellules basales possèdent le potentiel souche. Cependant, quand les cellules séparées, basales et ciliées, ont été ensemencées *in vitro*, leurs potentiels clonogéniques étaient équivalents, de 0,8 à 6%.

La 2<sup>ème</sup> méthode utilisée est le tri magnétique grâce à des résidus glycosylés présents à la surface des cellules basales et sécrétoires, reconnus par la lectine *Griffonia simplicifolia* isolectine B4 (GSI-B4) qui marque les cellules basales, et par la lectine *Ulex europeus* qui marque les cellules sécrétoires (Ford *et al.*, 1992b). Les auteurs ont ensemencé les cellules triées de lapin sur une membrane intestinale retournée et ont montré que les cellules basales. Ces dernières étaient donc favorites pour le statut cellules souches de l'épithélium respiratoire.

La 3<sup>ème</sup> méthode la plus fréquemment utilisée est la cytométrie en flux qui consiste à séparer les différentes populations cellulaires d'un échantillon donné suivant le critère de la taille et de la granularité. Elle permet également de séparer des cellules marquées par un fluorochrome particulier des cellules non marquées.

La cytométrie en flux a été utilisée en premier lieu par Aitken *et al.* pour séparer les cellules basales, sécrétoires et ciliées de lapin selon leur critère morphologique de taille et de granularité (Aitken *et al.*, 1991). Les auteurs ont obtenu un pourcentage de 97% de cellules basales, 94% de cellules sécrétoires et 90% de cellules ciliées, avec une viabilité de 90% pour ces différentes cellules. De la même façon, chez le rat, des suspensions cellulaires de cellules basales et sécrétoires ont été purifiées, et les auteurs ont montré que les cellules sécrétoires ont un potentiel de prolifération plus élevé que les cellules basales *in vitro* (Johnson *et al.*, 1990b). Toujours chez le rat, dans le modèle de xénogreffe, des populations purifiées de

cellules basales et sécrétoires ont été ensemencées dans des trachées de rats dénudées. Les cellules sécrétoires ont permis la régénération d'un épithélium formé de cellules basales, ciliées et sécrétoires, alors que la population de cellules basales a entraîné la reconstitution d'un épithélium formé uniquement de cellules basales et ciliées (Johnson et al., 1990a). Les auteurs concluent donc au statut progéniteur des cellules sécrétoires qui montrent un potentiel de différenciation supérieur à celui des cellules basales. En 1991, la séparation des populations cellulaires GSI-B4+ et GSI-B4- (cellules ciliées et sécrétoires) de rat et leur ensemencement dans des xénogreffes a montré que ces populations positives et négatives étaient capables de reconstituer un épithélium mucociliaire in vivo, avec un degré clonogénique plus faible observé pour les cellules GSI-B4- (Randell et al., 1991). Un an plus tard, en utilisant la même méthode de séparation cellulaire chez le rat, Ford et al. ont constaté que les cellules basales étaient les progéniteurs des autres types cellulaires in vitro (Ford et al., 1992a). Ensuite, en 1994, Liu et al. ont procédé de la même façon et ont trouvé que les 2 populations de cellules basales et sécrétoires de rat sont capables de reconstituer un épithélium mature dans le modèle de xénogreffe (Liu et al., 1994), ce qui rend les 3 derniers résultats obtenus par les différentes équipes difficiles à expliquer. Halbert et al. ont plus tard trié les cellules basales et sécrétoires de lapin et transduit ces dernières in vitro par un vecteur viral portant le gène codant pour le LacZ. L'efficacité de la transduction a été identique pour les 2 populations cellulaires. Ils ont ensuite effectué des cultures organotypiques avec ces 2 populations cellulaires et constaté que les cellules basales et sécrétoires transduites régénèrent un épithélium pseudostratifié mucociliaire, contenant des clones de cellules exprimant le transgène. Les 2 populations contiennent donc des progéniteurs de l'épithélium respiratoire de surface pouvant être transduits (Halbert et al., 1996).

Le tri de cellules humaines, provenant de polypes nasaux, a été effectué en 1997 (Hicks, Jr. *et al.*, 1997). Les auteurs ont utilisé la GSI-B4 pour effectuer la séparation des cellules basales des cellules cylindriques par cytométrie en flux. Ils ont pu obtenir une pureté de 80% de cellules basales, qui est relativement faible. Ils ont ensuite ensemencé les cellules basales triées sur des membranes recouvertes de collagène I et ont observé que les cellules ont proliféré et sont devenues confluentes au bout de 7 jours. Cependant, aucune évaluation *in vivo* de leurs potentialités n'a été effectuée. Même *in vitro*, il n'y a pas d'indication sur la capacité de ces cellules à reconstituer un épithélium respiratoire mature à l'interface air-liquide.

Plus récemment, en 2004, Schoch *et al.* ont créé une souris transgénique dans laquelle les cellules basales expriment la GFP, puisque l'expression de cette dernière a été guidée par le promoteur de la CK5, un marqueur spécifique des cellules basales. Les auteurs ont ensuite isolé les cellules épithéliales respiratoires de la souris par digestion enzymatique pour procéder à la séparation des cellules GFP+ et GFP- par cytométrie en flux. Une fois les deux populations ensemencées *in vitro*, les cellules GFP+ ont formé 4,5 fois plus de colonies que les cellules GFP-, et ont 12 fois plus la capacité de générer de larges colonies. Ces résultats

ont amené les auteurs à conclure que le pouvoir progéniteur des cellules épithéliales respiratoires de souris réside dans les cellules basales (Schoch *et al.*, 2004).

#### B.3.2.2.2. L'épithélium bronchiolaire

A l'homéostasie, la prolifération cellulaire de l'épithélium bronchiolaire est très faible (<1%) et est observée au niveau des cellules de Clara (Boers *et al.*, 1999). Lors d'une blessure chimique au NO<sub>2</sub>, les cellules de Clara entrent en prolifération et reconstituent l'épithélium bronchiolaire formé de cellules ciliées et de cellules de Clara (Evans *et al.*, 1976 ; Evans *et al.*, 1978). Les cellules de Clara isolées du lapin par élutriation, et ensemencées en xénogreffes, entraînent la reconstitution d'un épithélium bronchiolaire mature (Hook *et al.*, 1987 ; Brody *et al.*, 1987). De plus, suite à un traitement au naphtalène, une variété de cellules de Clara résistantes à ce composé est capable de proliférer pour réparer l'épithélium bronchiolaire (Reynolds *et al.*, 2000a ; Hong *et al.*, 2001). Les auteurs attribuent donc à ces cellules de Clara résistantes au naphtalène un rôle de cellules souches, et indiquent également que ces cellules ont été proposées comme étant des cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire (Reynolds *et al.*, 2000b), mais d'autres travaux ont montré qu'elles prolifèrent pour former une hyperplasie (Peake *et al.*, 2000) sans pouvoir reconstituer un épithélium mature (Hong *et al.*, 2001).

Aucune preuve à l'heure actuelle ne supporte le fait que les cellules neuroendocrines se comportent comme des cellules souches. Borthwick *et al.* ont également exclu la possibilité que les cellules neuroendocrines soient des cellules souches puisque les cellules épithéliales respiratoires de souris qui retiennent le BrdU sont négatives au CGRP (voir la partie B.3.2.4. ci-dessous) (Borthwick *et al.*, 2001).

Enfin, une étude menée en 2004 par l'équipe de Barry Stripp montre que l'ablation des cellules de Clara avec le naphtalène entraîne une augmentation significative du nombre des cellules inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires, et un dysfonctionnement alvéolaire, soulignant l'importance des cellules de Clara dans le maintien de l'intégrité et du fonctionnement de l'épithélium respiratoire distal (Reynolds *et al.*, 2004).

## B.3.2.2.3. L'épithélium de la jonction broncho-alvéolaire

Chez l'adulte, la protéine SP-A est sécrétée à la fois par les cellules de Clara et les PNII (Phelps *et al.*, 1991). De plus, Il semblerait que les PNII soient proches des cellules de Clara tant sur le plan immunocytochimique (Balis *et al.*, 1985 ; Walker *et al.*, 1986 ; Williams *et al.*, 1988) qu'enzymatique (Devereux *et al.*, 1981). Chez la souris, l'existence aux

bifurcations des bronchioles de cellules précurseurs immatures exprimant à la fois les protéines CC10 et SP-B et en prolifération a été montrée (Giudice et al., 1992 ; Reynolds et al., 2000a), ces cellules étant localisées chez le hamster et le lapin a proximité des cellules neuroendocrines (Hoyt, Jr. et al., 1993; McDowell et al., 1994a; McDowell et al., 1994b). En 2002, Giangrego et al. ont pu identifier une population de cellules résistantes au naphtalène, positives au CC10 et négatives aux marqueurs de cellules neuroendocrines, capables de proliférer et de retenir la thymidine tritiée au niveau de l'épithélium lésé de la jonction broncho-alvéolaire (Giangreco et al., 2002). Plus récemment, en 2005, Kim et al. ont montré par leur travaux réalisés chez la souris qu'il existe des cellules doublement positives au CC10 et au SP-C, de phénotype CD34<sup>+</sup> Sca1<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup>, qui sont capables de proliférer in vitro, de former des colonies à partir d'une seule cellule et peuvent subir plusieurs passages. Ces cellules avaient aussi le potentiel souche in vitro, c'est-à-dire capables de générer d'autres types cellulaires, notamment cellules de Clara et alvéolaires. Les auteurs ont suggéré également que ces cellules seraient à l'origine des carcinomes pulmonaires suite aux expériences d'initiation de tumeurs effectuées in vivo chez la souris (Kim et al., 2005). Ainsi, les cellules souches de l'épithélium broncho-alvéolaire, qui seraient peut être également impliquées dans la régénération bronchiolaire et alvéolaire, sont plus clairement identifiées.

## B.3.2.2.4. L'épithélium alvéolaire

La première indication que les PNII sont les cellules souches de l'épithélium alvéolaire a été proposée il a 50 ans environ quand ces cellules ont montré leur capacité de prolifération après une lésion (MACKLIN et al., 1954). Kapanci et al. étaient les 1<sup>ers</sup> à décrire que les PNII sont les cellules souches de l'épithélium alvéolaire, et ce en détruisant les PNI avec l'O2 montrant qu'elles dérivent des PNII (Kapanci et al., 1969). A partir de 1970, les travaux montrant une prolifération des PNII après des lésions induites par différents agents étaient de plus en plus nombreuses, suggérant que ces cellules sont impliquées dans le processus de réparation alvéolaire (Uhal et al., 1997). A titre d'exemple, Evans et al. ont montré la transformation des PNII en PNI dans le poumon traité au NO<sub>2</sub> par un marquage à la thymidine tritiée (Evans et al., 1973 ; Evans et al., 1975). Un travail similaire a également renforcé cette suggestion (Adamson et al., 1974). Quand les PNII sont cultivés in vitro, ils perdent leur forme cuboïde, deviennent aplatis et expriment des marqueurs spécifiques des PNI. Cependant, bien que les PNI apparaissent différenciés in vivo, ils sont capables de réexprimer des marqueurs de PNII quand ces derniers sont différenciés en PNI in vitro (Bishop et al., 2004). Shannon et al. ont également montré ce processus de réversibilité du phénotype des PNI en PNII in vitro (Shannon et al., 1992), ainsi que Danto et al. (Danto et al., 1995). Plus récemment, en 2003, une étude a montré qu'il existe une sous population de

PNII qui est capable de proliférer et qui exprime une haute activité de la télomérase (marqueur de cellules progénitrices, voir résultats dans la partie D, ainsi que la discussion qui leurs correspond) (Reddy *et al.*, 2004). En 2004, une autre étude a mis en évidence des cellules qui retiennent le BrdU au niveau de l'épithélium alvéolaire sans cependant préciser la nature de ces cellules (Cegielski *et al.*, 2004). L'existence des cellules souches/progénitrices au niveau alvéolaire était toujours orientée vers les PNII qui ont montré leur différentes capacités de prolifération ainsi que de transdifférenciation.

#### B.3.2.2.5. Conclusion sur les cellules souches épithéliales respiratoires

Comme nous pouvons le constater, plusieurs travaux ont été effectués pour essayer de comprendre et d'identifier les cellules souches/progénitrices épithéliales qui sont capables de se diviser pour donner naissance aux autres types cellulaires respiratoires. Au niveau distal de l'épithélium respiratoire, les résultats de recherches sur les cellules souches/progénitrices sont bien avancés. En effet, l'existence des cellules souches/progénitrices à ce niveau est désormais acquise. Quant à l'épithélium respiratoire proximal adulte, les résultats restent toujours contradictoires, malgré le fait que la majorité des travaux pointes du doigt les cellules basales comme étant les cellules progénitrices épithéliales. De plus, tous les travaux ont été effectués à ce niveau chez l'animal (hamster, lapin, rat, souris...), surtout chez la souris qui possède un épithélium différent de celui de l'homme (présence de cellules de Clara au niveau proximal à la place des cellules sécrétoires). L'extrapolation à l'espèce humaine des études réalisées chez les animaux apparaît limitée et peu fiable. Une seule étude effectuée chez l'humain concerne les cellules épithéliales fœtales (Avril-Delplanque *et al.*, 2005). Ainsi, l'identité des cellules souches/progénitrices au niveau proximal reste toujours mal définie, surtout chez l'homme.

### B.3.2.3. Notion de niche

Basés sur les preuves qui indiquent la présence de niches de cellules souches, qui retiennent le BrdU (les LRC pour label retaining cells), au niveau d'autres organes comme l'intestin, la moelle osseuse et le follicule pileux, Borthwick *et al.* (Borthwick *et al.*, 2001) ont procédé à l'endommagement de l'épithélium respiratoire de souris avec le SO<sub>2</sub> pendant une durée de 4 semaines. En même temps, les auteurs injectaient le BrdU toutes les 48 heures pendant la période de lésion-réparation. Ils ont ensuite effectué une immunohistochimie sur les trachées de ces souris, récupérées après 3, 6, 21 et 95 jours, contre le BrdU, la CK14, la CK18 (marqueur des cellules cylindriques), la GSI-B4 et le CGRP (marqueur des cellules neuroendocrines). Les auteurs ont constaté que 60% des LRC se trouvent au niveau des

canaux glandulaires, alors qu'au niveau de l'épithélium de surface, 20% des LRC se trouvent dans la population des cellules basales et 14% dans la population des cellules cylindriques. Ils ont également constaté que les LRC, au niveau de l'épithélium distal où les glandes sont absentes, sont surtout localisées à la jonction cartilage-intercartilage, et que ces cellules sont négatives au CGRP, donc ne sont pas des cellules neuroendocrines. A ce niveau, 70 à 80% des LRC sont des cellules basales, alors que 20% environ sont des cellules cylindriques.

Les auteurs ont ensuite procédé à la dénudation de l'épithélium de surface par digestion enzymatique tout en préservant les cellules canalaires et glandulaires, ceci en se basant sur le fait que les LRC qui se trouvent au niveau des canaux glandulaires pourraient reconstituer un nouvel épithélium de surface. Ils ont constaté, après 28 jours, que les glandes ont augmenté de taille, ainsi que la présence d'espaces mésenchymateux recouverts d'un épithélium qui ressemble à l'épithélium de surface.

En vu de ces résultats, Borthwick *et al.* ont émis l'hypothèse que les cellules souches de l'épithélium respiratoire sont localisées dans des niches spécifiques, telles que les canaux glandulaires, où elles forment une réserve qui pourrait servir à la réparation de l'épithélium de surface en cas de lésion importante. Cette hypothèse a été ensuite reprise par John Engelhardt qui s'appuie sur le fait que les cellules souches de l'épithélium respiratoire résident dans une niche située au niveau des canaux glandulaires, ainsi qu'au niveau cartilage-intercartilage, chez la souris (figure 28) (Engelhardt *et al.*, 2001). Il faut bien noter que le travail de Borthwick *et al.* n'a jamais été reproduit ultérieurement. Dans leur publication, les auteurs ne montrent pas que les cellules canalaires peuvent migrer pour reconstituer un épithélium de surface mature. C'est à l'intérieur du chorion, près des glandes sous-muqueuses, qu'ils ont observé la formation d'un épithélium « ressemblant » à l'épithélium de surface de souris. Des expériences de ce genre restent à reproduire avec plus de précisions et de détails permettant de mettre en évidence une éventuelle niche au niveau des canaux glandulaires.

## **B.3.2.4.** Marqueurs potentiels de cellules souches épithéliales

Les cellules épithéliales respiratoires de surface expriment plusieurs marqueurs cytoplasmiques ou de surface qui sont, soit spécifiques à plusieurs populations cellulaires épithéliales, soit à un seul type cellulaire.

L'identification de marqueurs de surface spécifiques à une population cellulaire donnée permettrait la séparation entre cette population et les autres qui constituent l'épithélium de surface, et ce par cytométrie en flux. Ceci pourrait être d'un intérêt majeur pour étudier la capacité des cellules séparées à régénérer et à reconstituer un épithélium mucociliaire mature identique à celui qu'on retrouve *in vivo*. Cependant, il n'existe pas pour le moment des marqueurs fiables utilisables pour séparer les différentes populations épithéliales au niveau proximal. Il existe des marqueurs qui sont spécifiques à chaque population cellulaire, mais qui sont cytoplasmiques, ou bien utilisables chez la souris et non pas chez l'homme, ou même qui disparaissent de la surface cellulaire lors de l'isolement des cellules épithéliales à partir de tissus respiratoires par digestion enzymatique. Le tableau 5 regroupe ces marqueurs de cellules basales ou sécrétoires de l'épithélium respiratoire adulte, qui ne sont pas utilisables à l'heure actuelle pour séparer les différentes populations cellulaires, d'où la nécessité d'une mise au point d'autres marqueurs de surface résistants aux enzymes de dissociation cellulaire, et qui marquent uniquement une des population de l'épithélium bronchique. Des marqueurs éventuels au niveau de l'épithélium distal sont également cités dans de tableau 5.

## **B.3.2.5.** La « side population » pulmonaire (SP)

Comme les cellules souches adultes décrites dans la partie B.3.1.3.1., il existe au niveau pulmonaire des cellules (à partir d'une préparation de cellules de poumon total) capables d'exclure le Hoechst *via* des transporteurs de type Bcrp1 pour constituer la SP pulmonaire. La SP a été définie dans plusieurs organes : la moelle osseuse, le muscle squelettique, les glandes mammaires, les testicules, la rétine, la peau, le cœur, le cerveau et le foie, et leurs potentialités ont également été décrites (Challen *et al.*, 2006).

La SP pulmonaire est un sujet très récent. Quelques publications seulement décrivent cette population et la caractérisent avec des marqueurs de surface, ainsi que par sa capacité de participer à la formation d'autres tissus, comme son potentiel à former des colonies lymphohématopoïétiques par exemple (Asakura *et al.*, 2002 ; Abe *et al.*, 2004 ; Majka *et al.*, 2005). Deux populations phénotypiquement différentes ont été isolées à partir de la SP pulmonaire : la 1<sup>ère</sup> qui est à 70% CD45<sup>+</sup> a le phénotype Sca-1<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> GATA2, PU.1 ; la 2<sup>ème</sup> qui est à 30% CD45<sup>-</sup> a le phénotype Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> CK18<sup>+</sup> CK23<sup>+</sup>, les parties proximales et distales pulmonaires exprimant ces marqueurs de façon similaire (Summer *et al.*, 2003 ; Summer *et al.*, 2004). Une autre étude a décrit que la population CD45<sup>-</sup> de la SP avait le phénotype Sca-1<sup>+</sup> (Giangreco *et al.*, 2004).

La SP de poumon fœtal a également été caractérisée et a montré que la capacité de cellules souches hématopoïétiques de cette population réside dans la sous-population  $CD45^+$ , alors que l'autre sous-population  $CD45^-$  se composait de précurseurs de cellules musculaires lisses et endothéliales (Summer *et al.*, 2005). Une autre étude récente vient de publier le profil des gènes les plus exprimés dans les populations  $CD45^+$  et  $CD45^-$  dans le poumon fœtal au cours du développement (Liang *et al.*, 2005).

Malgré ces avancées dans la caractérisation de la SP pulmonaire, la nature des cellules isolées n'est pas identifiée et reste encore discutable. Il reste à déterminer si les cellules isolées par cette technique sont d'origine épithéliale, mésenchymateuse, sanguine ou autre. De plus, il n'y a à l'heure actuelle aucune étude effectuée sur des poumons humains, la souris

étant le seul animal étudié dans ce domaine, d'où la nécessité d'avoir dans un 1<sup>er</sup> temps des résultats provenant de l'homme puisque les marqueurs entre les 2 espèces pourraient être différents, comme est le cas pour les cellules souches hématopoïétiques.

# B.3.3. Thérapie cellulaire de la mucoviscidose

## B.3.3.1. Généralités

Plusieurs approches de thérapie génique ont été abordées et tentées dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* (Lee *et al.*, 2005b) pour traiter diverses maladies comme la CF. Cependant, beaucoup de difficultés et de barrières (tel que le choix du vecteur de transduction par exemple) empêchent à l'heure actuelle le succès de ces méthodes. Pour cette raison, la possibilité de remplacer, par thérapie cellulaire, la cellule CF par une cellule saine, non-CF, apparaît une idée très attirante. L'un des principaux exemples d'application de la thérapie cellulaire est la transplantation allogénique de moelle osseuse. Cette technique a en effet depuis longtemps été utilisée comme traitement pour des patients atteints de leucémie ou autres maladies du système hématopoïétique.

Par leurs capacités d'autorenouvellement et de régénération, les cellules souches constitueraient un outil prometteur pour l'approche de la thérapie cellulaire (Schwartz et al., 2003 ; Chiu et al., 2003 ; Kassem et al., 2006). Mais qu'en est il de l'utilisation des cellules souches dans la thérapie de la mucoviscidose ? Actuellement, la nature des cellules souches pulmonaires est toujours un mystère. Il est donc impossible pour le moment d'envisager une thérapie cellulaire de l'épithélium respiratoire à base de cellules souches qui proviennent des poumons. D'un autre côté, les cellules souches de la moelle osseuse, en particulier les cellules souches hématopoïétiques (CSH), servent déjà à la thérapie de certaines maladies comme les leucémies et les les héréditaires le lymphomes, anémies et cancer (http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter5.asp). De plus, les cellules souches de la moelle osseuse ont montré un certain degré de plasticité, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier en d'autres types cellulaires et se trouver dans différents organes comme le cerveau, le foie, le cœur et les poumons après leur injection intra-veineuse ou intramédullaire. Cependant, des études contradictoires remettent en question le potentiel de ces cellules à repeupler les organes cités avec un pourcentage significativement acceptable et un ciblage adéquat. De plus, les données cliniques disponibles à l'heure actuelle sur ce sujet sont très rares, la majorité des travaux étant effectuée chez les animaux (Behfar et al., 2005 ; Davies et al., 2006).

#### **B.3.3.2.** Traitement par les cellules souches de la moelle osseuse ?

Les essais expérimentaux d'utilisation des cellules souches dans des modèles animaux CF sont contradictoires (Conese et al., 2006). En 2006, Loi et al. ont procédé à l'injection de cellules souches mésenchymateuses (CSM), provenant de souris mâles, dans des femelles cftr-/- traitées au naphtalène (pour la destruction de leur épithélium respiratoire), par voie intra-veineuse. Ils ont observé que les CSM ont migré vers l'épithélium respiratoire de la souris receveuse induisant l'expression de la protéine CFTR. Cependant, le nombre de cellules recrutées vers les poumons, participant à la réparation de l'épithélium respiratoire, est infime (0,025%), et parmi ce nombre, le pourcentage des cellules qui expriment CFTR est de l'ordre de 0.01%. Les auteurs ont conclu que le nombre de cellules chimériques observées est très faible, d'où la limitation de la reconstitution de l'épithélium CF par les cellules souches d'origine médullaires (Loi et al., 2006). Les travaux de Wang et al. se sont avérés encourageant. Des CSM humaines ont été isolées de volontaires sains, transfectées par la GFP et puis mixées et cultivées avec des cellules épithéliales respiratoires à l'interface air-liquide. Ils ont observé que 10% des CSM ont été induites in vitro à se différencier et à acquérir un phénotype épithélial, comme le prouve l'expression de l'occludine marqueur de la jonctionalité épithéliale. De plus, les auteurs ont procédé à l'isolement et à la correction, par transfection virale, de CSM provenant de patients CF. Ils ont mélangé les CSM CF corrigées avec des cellules épithéliales respiratoires CF et cultivé le tout à l'interface air-liquide. Ils ont observé que le courant chlore a été partiellement rétabli (Wang et al., 2005a). Très récemment, deux études viennent de montrer que la transplantation de CSM, provenant de souris normales cftr+/+, dans des souris cftr-/- adultes (Bruscia et al., 2006) ou des souris cftr-/- juste après leur naissance (âgées de 1 jour) (Conese et al., 2006) qui ont été totalement irradiées, entraîne le rétablissement partiel de l'activité du canal CFTR au niveau pulmonaire et intestinal. Cependant, le pourcentage de CSM identifiées au niveau pulmonaire et gastrointestinal était très bas dans ces 2 études (0,0001% et 0,02%). Toutes les études qui montrent un chimérisme cellulaire au niveau pulmonaire montrent également un pourcentage très faible (<1%) de cellules qui ont migré de la moelle osseuse ou du sang vers les pour participer à la reconstitution de l'épithélium respiratoire CF.

#### B.3.3.3. Questions qui restent posées

Plusieurs questions se posent avant que la thérapie cellulaire soit envisagée pour le traitement de la CF : quelle cellule souche faut-il utiliser, les CSMO ou les cellules souches pulmonaires ? Comment les cellules souches migrent vers les poumons ? Comment les cellules souches peuvent être administrées, par voie intra-veineuse ou localement ? Quel est

l'effet de l'âge du patient ? Quel est l'effet à long terme en ce qui concerne la tumorigénicité et le vieillissement de cellules souches modifiées génétiquement ? Est-ce un traitement sûr ?

# C. REGENERATION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE DE SURFACE NORMAL ET MUCOVISCIDOSIQUE HUMAIN ADULTE

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la CF se caractérise à un stade avancé de la maladie par une infection et une inflammation qui se traduisent par des lésions et par un remodelage de l'épithélium respiratoire de surface. Cependant, les causes de ce remodelage et leur éventuelle association avec l'infection et/ou l'inflammation, ou avec un processus anormal de régénération épithéliale dû à l'anomalie génique de CFTR restent à déterminer.

Dans cette partie, nous avons comparé la régénération de l'épithélium CF à celle de l'épithélium non-CF pour déterminer s'il existe des anomalies phénotypiques cellulaires et moléculaires au cours de cette régénération. Dans ce but, nous avons utilisé le modèle de xénogreffe trachéale humanisée dans la souris nude, qui mime la dynamique de la régénération d'un épithélium normal lésé, en dehors de tout contexte infectieux.

# C.1. Matériels et Méthodes

# C.1.1. Tissus respiratoires humains

L'utilisation d'échantillons biologiques humains est autorisée par l'article L1245-2 de la loi de bioéthique 94-654.

Les tissus respiratoires (polypes nasaux) ont été obtenus par polypectomie nasale de 7 patients CF, de génotypes  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 (n=3),  $\Delta$ F508/G542X (n=2),  $\Delta$ F508/E92K (n=1),  $\Delta$ F508/547delA (n=1), et 7 sujets non-CF. Les patients ne manifestaient aucun autre signe clinique à l'heure de l'intervention. Les prélèvements ont été immédiatement transférés au laboratoire dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, Royaume Uni) tamponné par 25 mM d'HEPES (Gibco BRL) et supplémenté en antibiotiques (pénicilline 200 U/mL et streptomycine 200 µg/mL; Gibco BRL), puis lavés plusieurs fois au RPMI préalablement refroidi à 4°C.

# C.1.2. Analyses bactériologiques

Les analyses bactériologiques ont été réalisées dans notre laboratoire. Après avoir reçu les tissus respiratoires CF et non-CF, les milieux de transport des polypes ont été analysés par

ensemencement de 200  $\mu$ L sur des géloses au tripticase de soja (bioMérieux, Paris, France) qui ont été incubées à 37°C pendant 24-48 h. Quand une contamination bactérienne a été constatée, les expériences sur les polypes contaminés ont été suspendues.

### C.1.3. Dissociation et culture cellulaire

Les cellules épithéliales respiratoires ont été dissociées des polypes CF et non-CF en incubant ces derniers pendant 1 nuit à 4°C dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en antibiotiques (pénicilline 200 U/mL et streptomycine 200  $\mu$ g/mL) et contenant 0,1% de collagénase de type XIV de *Streptomyces griseus* (ou Pronase E) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Les cellules épithéliales ont été récupérées après agitation des morceaux de tissus dans du milieu RPMI froid et propre, centrifugation à 200 g pendant 5 min, et lavage 2 fois au RPMI. Après centrifugation, les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez.

Les cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF ont été ensemencées dans des flacons de cultures de 75 cm<sup>2</sup> (Nunclone, Nunc, Danemark) à la densité de  $2x10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, et cultivées jusqu'à confluence dans le milieu de prolifération Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / Ham F-12 (Gibco BRL) (3/1; vol/vol) supplémenté en 0,87 µM d'insuline bovine, 65 nM de transferrine humaine, 1,6 nM d'EGF recombinant humain, 1,38 μM d'hydrocortisone, 30 nM d'acétate de rétinyl, 9,7 μM de 3,3',5-triiodo-L-thyronine, 2,7 µM d'épinéphrine, 35 µg/mL d'extrait pituitaire bovin, 5 µM d'éthanolamine, 5 µM d'Ophosphoryléthanolamine, 30 nM de sélénite de sodium, 1 nM de chlorure de manganèse tetrahydraté, 0,5 µM de métasilicate de sodium déshydraté, 1 nM de molybdate d'ammonium tetrahydraté, 5 nM de vanadate d'ammonium, 1 nM de sulfate de nickel hexahydraté, 0,5 nM de chlorure d'étain dihydraté (Sigma Aldrich), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Pour améliorer l'adhérence cellulaire, 10% du sérum de veau fœtal (SVF; Gibco BRL) ont été ajoutés pendant les premières 24 h. Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide, et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Quand les cellules sont devenues confluentes, elles ont été rincées au PBS stérile (Gibco BRL) puis incubées avec une solution de trypsin/EDTA (Gibco BRL) à 37°C pendant 5-10 min pour détacher les cellules. L'action de la trypsine a été ensuite stoppée par ajout de milieu de prolifération contenant 10% de SVF. Les cellules ont été lavées en PBS, centrifugées et comptées.

## C.1.4. Xénogreffes humanisées dans la souris nude

L'usage des animaux de laboratoire est autorisé par la direction des services vétérinaires (Agrément N° A 51-454-5).

# C.1.4.1. Préparation des trachées de rats et des cathéters

Des trachées de rats Wistar adultes (pesant entre 220 et 250g) (Charles Rivers, Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France) ont été prélevées stérilement par dissection sous une hotte à flux laminaire. Après lavage et nettoyage des trachées avec du sérum physiologique (Centravet, Gondreville, France), elles ont été dénudées de leur propre épithélium par 2 cycles de congélations à -80 C et de décongélations. Les trachées ont été ensuite montées stérilement sur un système de cathéters qui a été préparé selon le schéma ci-dessous :



La trachée de rat dénudée, montée avec des fils de sutures aux cathéters (bout de flèche), sert de matrice extracellulaire pour les cellules épithéliales respiratoires humaines CF et non-CF.

# C.1.4.2. Inoculation des cellules épithéliales et xénogreffes trachéales

Au moment de l'utilisation, du PBS stérile a été injecté dans les trachées pour éliminer toutes les cellules épithéliales respiratoires du rat. Les cellules épithéliales CF et non-CF, suspendues à la densité de  $1 \times 10^6$  cellules/80 µL dans le milieu de prolifération (supplémenté avec 10% de SVF), ont été inoculées dans les trachées de rats dénudées avec une seringue équipée d'une aiguille 21G insérée dans le cathéter. Pour les trachées contrôles, du milieu seul ne contenant pas de cellules épithéliales a été inoculé dans les trachées. L'ensemble cathéters-trachées a été ensuite greffé sous la peau du flanc de souris nude âgées de 7 semaines, après avoir anesthésié ces dernières par une injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (40 mg/Kg) (Centravet) (figure 29). Les souris ont été hébergées dans des conditions stériles. L'intérieur des xénogreffes a été lavé 2 fois par semaine avec du DMEM / Ham F-12 sans sérum supplémenté en 200 U/mL de pénicilline, 200 µg/mL de streptomycine, 50 µg/mL gentamicine, 2,5 µg/mL d'amphotéricine et 420 U/mL de colimycine pour éliminer les débris cellulaires accumulés dans leur lumière.



#### Figure 29. Schéma de greffe dans la souris nude.

Les cellules sont ensemencées dans les trachées de rats qui ont été dénudées de leur épithélium et greffées dans la souris nude.

## C.1.4.3. Récupération des greffons et cryofixation

Les animaux ont été sacrifiés après 4, 13, 25 et 35 jours de greffe par injection intrapéritonéale d'une overdose de pentobarbital de sodium, et les greffons ont été prélevés. La moitié de chaque greffon a été immergée dans un cryoprotecteur, l'O.C.T (optimum cutting temperature) (Tissue-Tek, Zoeterwoude, Pays Bas), et cryofixée dans les vapeurs d'azote liquide. Les blocs sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour une étude histologique et immunohistochimique des tissus. L'autre moitié de chaque greffon récupéré a été conservée à -80°C pour l'extraction des ARN totaux.

# C.1.5. Recueil des produits de sécrétion épithéliaux dans les xénogreffes

Après 4, 13, 25 et 35 jours de greffe, les xénogreffes ont été lavées avec du DMEM / Ham F-12 sans sérum et sans antibiotiques. 80  $\mu$ L de ce même milieu ont été inoculés dans la lumière de chaque trachée. Après une incubation de 4 h, chaque milieu inoculé a été séparément récupéré et conservé à -80°C pour les analyses ultérieures par ELISA et zymographie. Les milieux récupérés ont été classés en fonction du stade histologique de l'épithélium de chaque greffon (voir ci-dessous).

## C.1.6. Histologie

#### C.1.6.1. Coupes des greffons cryofixés

Les greffons cryofixés sont entièrement coupés à l'aide d'un cryostat (Leica Microsystems, Nussloch, Allemagne), afin de préparer des coupes tissulaires pour l'étude histologique et immunohistochimique des épithéliums. Des coupes de 5  $\mu$ m sont réalisées et recueillies sur des lames tannées par une solution aqueuse de gélatine à 0,5% (p/v) (Prolabo, Paris, France) contenant 0,4% (p/v) d'alun de chrome (KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Fluka, Buchs, Allemagne). Les lames sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

#### C.1.6.2. Coloration histologique des coupes

Afin d'observer l'histologie des tissus régénérés, les cryocoupes sont décongelées à température ambiante et colorées grâce au Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit (Shandon, Cergy Pontoise, France) permettant d'effectuer une coloration rapide et stable à

l'hématoxyline-éosine. Les lames sont montées dans de l'Eukitt (O. Kindler, Freiburg, Allemagne) et séchées à température ambiante.

Afin d'observer les cellules sécrétoires épithéliales, une coloration bleu alcian / PAS a été réalisée. Les cryocoupes décongelées sont incubées dans une solution de bleu alcian. Les coupes sont lavées à l'eau et traitées à l'acide périodique et au réactif de Schiff. Enfin, les coupes sont lavées à l'eau, colorées avec l'hématoxyline, incubées dans un bain de xylène et montées en Eukitt pour leur observation.

## C.1.6.3. Observation des coupes réalisées

L'histologie des épithéliums CF et non-CF a été analysée au cours de leur régénération aux jours 4, 13, 25 et 35 dans le but de classer les coupes en fonction du stade histologique observé. Chaque stade histologique correspond à un phénotype bien déterminé de l'épithélium respiratoire, qui a été préalablement décrit par notre équipe (Dupuit *et al.*, 2000) (voir figure 19 dans l'introduction). Le stade I se caractérise par une adhérence et une migration de cellules épithéliales aplaties ; le stade II se caractérise par une prolifération de cellules cuboïdes qui sont recouvertes par une couche superficielle de cellules aplaties ; le stade III se caractérise par une étape de pseudostratification dans laquelle l'épithélium est constitué d'une couche de cellules basales, au-dessus desquelles se trouvent les cellules cylindriques qui n'ont pas encore acquis de cils ou de granules sécrétoires, les deux couches étant en contact avec la lame basale ; le stade IV se caractérise par une différenciation cellulaire et l'apparition de cellules basales, ciliées et sécrétoires. Toutes les analyses immunohistochimiques et moléculaires ont été effectuées à ces différents stades.

La différenciation de l'épithélium respiratoire non-CF commençant généralement après 25 jours de greffe, ce point a été choisi pour analyser la différence éventuelle de la vitesse de différenciation entre les épithéliums CF et non-CF.

Un minimum de 40 coupes a été analysé par greffon sous un microscope optique (Axiophot ; Zeiss, Oberkochen, Allemagne). La hauteur de l'épithélium a été déterminée au stade IV, en réalisant 6 mesures par coupe, à l'aide du logiciel Visilog 5 (Noesis, Courtaboeuf, France).

## C.1.7. Immunohistochimie et quantifications cellulaires

## C.1.7.1. Principe

L'identification de différents marqueurs cellulaires a été réalisée par une technique d'immunofluorescence indirecte utilisant le système amplificateur biotine-streptavidine. Tout

d'abord, nous utilisons un anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée, et qui va se fixer spécifiquement sur son antigène. Cet anticorps primaire va être à son tour reconnu par un anticorps secondaire associé à la biotine qui va reconnaître spécifiquement les immunoglobulines de l'espèce animale ayant fourni les anticorps primaires, formant ainsi un complexe anticorps primaire-anticorps secondaire biotinylé. Ce complexe sera révélé grâce à la streptavidine associée à un fluorochrome. L'émission de fluorescence est détectée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Axiophot ; Zeiss), en utilisant des longueurs d'ondes bleues (488 nm) ou verte (594 nm) pour l'excitation du fluorochrome.

## C.1.7.2. Anticorps utilisés

Les anticorps utilisés ont été : l'anti-CK13 monoclonal de souris (1/1000; clone KS-1A3; Sigma Aldrich) pour la détection des cellules basales, l'anti-β-tubuline monoclonal de souris (1/50; Amersham, Buckinghamshire, Royaume Uni) pour la détection des cellules ciliées, l'anti-MUC5AC (1/100; clone CLH2; Novocastra, Newcastle, Royaume Uni) et l'anti-MUC5B (1/100; fourni par Dr M-C. Copin, INSERM U560, Lille, France) monoclonaux de souris pour la détection des cellules sécrétoires. La prolifération cellulaire a été analysée avec l'anti-Ki-67 monoclonal de souris (1/10; clone MIB-1; DakoCytomation, Carpentaria, Etats-Unis).

L'intégrité de l'épithélium respiratoire a été mise en évidence par l'anti-ZO-1 monoclonal de souris (1/20 ; clone ZO1-1A12 ; Zymed Laboratories, San Francisco, Etats-Unis).

La protéine CFTR a été mise en évidence par l'anti-CFTR monoclonal de souris (1/20 ; clone 24-1 ; R&D Systems, Minneapolis, Etats-Unis).

L'anticorps secondaire biotinylé utilisé a été un anti-IgG de souris fabriqué chez la chèvre (1/50, Amersham). La révélation de la biotine a été faite grâce au complexe streptavidine-Alexa Fluor 488 ou 594 (1/100 ; Molecular Probes; Eugene, Etat Unis).

## C.1.7.3. Mode opératoire

Les lames ont été décongelées et séchées à température ambiante. Les étapes du marquage cellulaire par immunofluorescence, réalisées à température ambiante, ont été les suivantes :

Etape	Solution	Durée
Fixation et perméabilisation à -20°C	Acétone	10 min
Rinçage	PBS	10 min
Blocage des sites non spécifiques de reconnaissance des anticorps	PBS-BSA (albumine bovine sérique) 3%	15-30 min
Anticorps primaire	PBS-BSA 1%	60 min
Rinçage	PBS	30 min
Anticorps secondaire biotinylé	PBS-BSA 1%	60 min
Rinçage	PBS	30 min
Streptavidine-Alexa 488 ou 594	PBS-BSA 1%	30 min
Rinçage	PBS	30 min
Contre-coloration des noyaux	Hématoxyline de Harris	10 s
Rinçage	Eau déionisée	quelques s
Rinçage	PBS	15 min
Montage des lamelles	Aquapolymount	-

Le contrôle négatif des expériences est réalisé en omettant l'anticorps primaire, remplacé par du PBS/BSA 1%, et en utilisant des IgG non-immuns de souris (Sigma Aldrich).

Les lames ont ensuite été montées sous lamelle grâce au liquide de montage anti-fading Aquapolymount (Polysciences, Warrington, Etats Unis).

Les lames marquées ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière, et l'acquisition des images a été par la suite réalisée à l'aide d'une caméra montée sur un microscope Axiophot et du logiciel CoolSNAP (Roper Scientific, Evry, France).

Pour la co-détection de MUC5AC et MUC5B, exprimées par les cellules sécrétoires, les coupes ont été tout d'abord marquées avec l'anti-MUC5B suivant la procédure décrite cidessus en révélant cet anticorps avec l'Alexa 488, puis, après une étape de lavage avec le PBS, les coupes ont été incubées avec des fragments Fab (H+L) d'un anticorps anti-souris (1/50; Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, Etats Unis) pendant 30 min pour bloquer les sites libres des anticorps primaires de souris. Les coupes ont ensuite été lavées au PBS pendant 15 min et exposées à de la streptavidine (1/100; DakoCytomation) pendant 30 min pour bloquer les out bloquer les sites libres des biotines du premier marquage réalisé. Enfin, les coupes ont été marquées avec l'anti-MUC5AC suivant la procédure décrite précédemment, avec une révélation à l'Alexa 594.

## C.1.7.4. Quantifications cellulaires

Les marquages de la CK13, de MUC5AC et 5B, de la  $\beta$ -tubuline, de ZO1 et de CFTR ont été réalisés au stade IV de différenciation terminale de la régénération CF et non-CF. la prolifération cellulaire par détection immunohistochimique de Ki-67 a été réalisée tout au long de la régénération des épithéliums CF et non-CF, c'est-à-dire aux stades I, II, III et IV.

La quantification des cellules positives, pour la CK13, le MUC5AC et 5B et la  $\beta$ tubuline, a été effectuée sur un minimum de 40 coupes étudiées sur des lames sélectionnées au hasard. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules positives par millimètre de lame basale (mmLB).

# C.1.8. Analyse de l'expression génique

L'analyse de l'expression des gènes codant pour l'IL-8, la MMP-7, la MMP-9 et le TIMP-1 dans les greffons CF et non-CF a été effectuée par RT-PCR. La GAPDH a servi de gène contrôle.

#### C.1.8.1. Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits avec le kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, Etats Unis) selon le protocole du fabriquant. Les greffons ont été broyés et homogénéisés à l'aide d'un pilon en présence d'un tampon de lyse cellulaire dénaturant. Les ARN sont ensuite isolés sur colonne de filtre de fibres de verre en présence de sels chaotropiques. Après lavages, les ARN sont élués et recueillis dans de l'eau dépourvue de RNAse.

#### C.1.8.2. Dosage des ARN extraits

Le dosage des ARN a été effectué par fluorimétrie utilisant le kit RiboGreen RNA Quantitation (Molecular Probes). La fluorescence est mesurée à 535 nm sur un spectrofluorimètre lecteur de microplaques Xénius (Safas, MC, Monaco). La concentration en ARN de chaque échantillon est déterminée grâce à une gamme étalon. La gamme ainsi que les échantillons sont dosés en duplicats. Les ARN ont ensuite été dilués à la concentration de 4 ng/ $\mu$ L dans de l'eau désionisée autoclavée, puis aliquotés par 10 ng et congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

# C.1.8.3. RT-PCR

La RT-PCR a été réalisée en utilisant le kit GeneAmp Thermostable RNA PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, Etats Unis), dans lequel l'enzyme thermostable joue le rôle de transcriptase inverse et de Tag polymérase.

5 paires d'amorces (Eurogentec, Seraing, Belgique), spécifiques des ARN messagers humains recherchés dans notre étude, ont été utilisées :

Gène	Amplicon	Primers
GAPDH	193 pb	sens 5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTA-3' antisens 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGAT-3'
IL-8	222 pb	sens 5'- GCCAAGGAGTGCTAAAGAACTTAG -3' antisens 5'- GAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC -3'
MMP-7	102 pb	sens 5'- CCCCCTGCATTTCAGGAA -3 antisens 5'- TCCTGGCCCATCAAATGG -3'
MMP-9	248 pb	sens 5'- CGAGACCTGAGAACCAATCTCA -3' antisens 5'- CTTGAGGTCGCCCTCAAAGGT -3'
TIMP-1	143 pb	sens 5'-CATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGAT-3' antisens 5'-GTCATCTTGATCTCATAACGCTGG-3'

# C.1.8.3.1. Transcription inverse (RT)

La RT est réalisée à partir de 10 ng d'ARN, en présence de l'amorce antisens de chaque gène et à 70°C pendant 15 min dans le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A l'issue, le thermocycleur fait descendre la température à 4°C afin de conserver les ADNc néosynthétisés.

# C.1.8.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est réalisée sur l'ensemble des ADNc néosynthétisés, en présence de l'amorce sens de chaque gène. Chaque tube va alors subir des cycles de PCR selon le schéma suivant (où Tm représente la température d'hybridation des amorces) :



Pour chaque paire d'amorces, nous avons déterminé le nombre de cycles optimal afin de rester dans la phase d'amplification exponentielle, et d'éviter d'atteindre le niveau de saturation. Les propriétés des amorces utilisées sont résumées dans le tableau suivant :

Amorce	Dénaturation (x)	Annealing (Tm)/(y)	Elongation (z)	Nombre de cycles
GAPDH	94°C / 15 s	64°C / 20s	72°C / 10 s	25
IL-8	94°C / 15 s	62°C / 20s	72°C / 10 s	25
MMP-7	94°C / 20 s	60°C / 30s	72°C / 30 s	31
MMP-9	94°C / 15 s	62°C / 20s	72°C / 10 s	31
TIMP-1	94°C / 15 s	64°C / 20s	72°C / 10 s	35

## C.1.8.4. Migration et révélation des produits de la RT-PCR

Les produits de la RT-PCR ont été séparés sur un gel d'acrylamide à 10,4% en présence de bleu de dépôt 6X constitué de 0,125% de xylène-cyanol et de 10% de Ficoll (Sigma Aldrich) dans l'eau ultrapure. La migration est effectuée à l'aide du générateur Power Pac 1000 (Biorad) à 200 Volts. Les gels sont alors incubés pendant 5 min à température ambiante dans une solution de TBE 1X contenant 0,01% de SybrGold (Molecular Probes), colorant fluorescent des acides nucléiques. Les bandes sont ensuite révélées grâce à l'imageur LAS-1000 (Fuji, Courbevoie, France).

La quantification des produits de RT-PCR est réalisée par densitométrie grâce au logiciel Aïda Tutorial 2D (Raytest, Courbevoie, France). Les valeurs obtenues (unité arbitraire densitométrique) pour les produits de RT-PCR sont normalisées aux valeurs obtenues pour le gène de ménage GAPDH.

Les contrôles négatifs ont été réalisés en extrayant les ARN des greffons inoculés avec du milieu seul sans cellules.

### C.1.9. Analyse de la sécrétion d'IL-8

#### C.1.9.1. Dosage de la concentration en protéines totales

Les échantillons de liquides recueillis des lumières des xénogreffes, à J4, J13, J25 et J35, ont été décongelés sur la glace et centrifugés à 12000 g. Les surnageants sont recueillis et la concentration en protéines totales a été dosée avec le kit BC Uptima Assay kit (Interchim, Montluçon, France) qui repose sur la méthode du Biuret. La DO est mesurée à 562 nm sur le lecteur de microplaque Xenius (Safas). La concentration en protéines totales des surnageants de xénogreffe est déterminée grâce à la gamme étalon. Les valeurs sont exprimées en ng de protéines totales /  $\mu$ L. La gamme, ainsi que les échantillons, ont été dosés en duplicats.

### C.1.9.2. ELISA

La technique ELISA est une méthode immunoenzymatique quantitative qui permet de doser des protéines dans des liquides biologiques. Les protéines sont capturées grâce à des anticorps spécifiques immobilisés au fond des plaques 96 puits et vont être reconnues par un second anticorps spécifique couplé à la biotine. Ce complexe va lier un ligand constitué de streptavidine couplée à une enzyme, la peroxydase, qui va être révélée par addition d'un chromogène pour donner un produit coloré qui sera dosé.

Le dosage de l'IL-8 dans les surnageants CF et non-CF a été effectué avec le kit Quantikine de l'IL-8 humaine (R&D Systems). La DO est mesurée à 450 nm sur le lecteur de microplaque Xenius et la quantité de protéines est déterminée à partir de la mesure de la DO rapportée à la gamme étalon. Les résultats du dosage sont exprimés en pg d'IL-8 / mg de protéines totales.

#### C.1.10. Analyses des sécrétions de MMP-7 et MMP-9

Les échantillons de liquides recueillis des lumières des xénogreffes à J4, J13, J25 et J35 ont également été utilisés pour doser la MMP-7 et la MMP-9 par zymographie pendant la régénération des épithéliums CF et non-CF.

La zymographie est une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permettant de mettre en évidence une activité protéolytique dans les échantillons étudiés, grâce à la présence de substrats spécifiques présents dans le gel. Cette technique permet ici une étude qualitative et semi-quantitative des formes latentes et actives de MMPs présentes dans nos surnageants de xénogreffes. Le substrat de la MMP-7 est la caséine et celui le MMP-9 est la gélatine.

1,2 μg et 20 μg de protéines totales, dans du tampon Laemmli 5X (BioRad), pour la détection de la MMP-9 et MMP-7 respectivement, sont séparées par électrophorèse à 4°C à 40 mA. Les gels sont lavés deux fois 30 min dans un bain de triton X-100 à 2% à température ambiante. Les gels sont ensuite incubés une nuit à 37°C dans une solution de Tris 50 mM pH 7,6, CaCl<sub>2</sub> 5 mM et triton X-100 0,1% afin d'activer les MMPs présentes dans nos échantillons. Les gels sont alors colorés 30 min dans un bain de bleu de Coomassie R250 (Sigma Aldrich) contenant 10% d'acide acétique et 20% de méthanol avant d'être décolorés dans un bain d'acide acétique (10%) et de méthanol (40%). Enfin, les gels sont incubés dans le tampon de conservation contenant 5% de glycérol et 10% d'acide acétique. La présence de MMP-7 et MMP-9 est visualisée par l'apparition de bandes claires sur fond bleu indiquant la protéolyse du substrat utilisé.

Les bandes protéolytiques observées sont acquises sur le LAS-1000 puis quantifiées par densitométrie (en valeurs arbitraires) sur le logiciel Aïda.

## C.1.11. Inhibition des MMPs au cours de la régénération

L'inhibition des MMP-7 et -9 pendant la régénération des épithéliums CF et non-CF a été réalisée grâce à des inhibiteurs chimiques (MMP Inhibitor III pour la MMP-7 et MMP Inhibitor II pour la MMP-9 ; Calbiochem, La Jolla, Etats Unis). Pour inhiber ces MMPs, les inhibiteurs ont été utilisés à la concentration recommandée par le fournisseur, c'est-à-dire à 100 nM et 2.7 nM respectivement.

Les inhibiteurs ont été ajoutés à 3 suspensions cellulaires CF ( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 n=2; M152V/3120 + 1G>A n=1) et 3 suspensions non-CF (1x10<sup>6</sup> cellules / 80 µL de milieu de prolifération). Les cellules ont été ensuite ensemencées dans les trachées de rats dénudées qui ont été greffées dans les souris nude. Les xénogreffes ont été lavées 2 fois par semaine avec du milieu DMEM / F-12 sans sérum contenant les inhibiteurs. Les xénogreffes contrôles ont été réalisées en ensemençant des suspensions cellulaires CF et non-CF sans inhibiteurs.

Les greffons ont été récupérés après 35 jours de greffe et cryofixés. Après coloration à l'hématoxyline-éosine, l'histologie des tissus a été observée au microscope afin d'analyser l'effet de l'inhibition des MMP-7 et MMP-9 au cours de la régénération.

## C.1.12. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Le test non-paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé pour les analyses statistiques. Le test de  $\chi^2$  a été utilisé pour comparer le degré de différenciation des épithéliums CF et non-CF. Une différence significative a été définie pour  $p \le 0,05$ .

# C.2. Résultats

Nos analyses ont montré que les cellules épithéliales CF ont régénéré de la même manière dans les xénogreffes, quelque soit leur génotype. De plus, toutes les quantifications cellulaires effectuées, ainsi que les profils d'expression des messagers étudiés et de l'IL-8 étaient similaires quelque soit la mutation CF.

# C.2.1. Etude histologique des épithéliums non-CF et CF

# C.2.1.1. Dynamique de la régénération épithéliale CF et non-CF

Dans un premier temps, nous avons comparé la dynamique de régénération de l'épithélium CF à celle de l'épithélium non-CF (figure 30).



Figure 30. Dynamique de régénération épithéliale respiratoire non-CF et CF. Lu = lumière ; m = mésenchyme ; Barres =  $50 \mu m$ .

La régénération CF s'est déroulée suivant les 4 stades histologiques décrits pour la régénération non-CF (Dupuit *et al.*, 2000) : un 1<sup>er</sup> stade d'adhérence et de migration cellulaire

(stade I); un  $2^{eme}$  stade de prolifération cellulaire (stade II); un  $3^{eme}$  stade de pseudostratification (stade III); un  $4^{eme}$  stade de différenciation épithéliale (stade IV).

Dans les greffons non-CF et CF, les cellules épithéliales respiratoires humaines ont adhéré et migré après 4 jours de greffe pour former une monocouche de cellules aplaties nondifférenciées qui ont recouvert la trachée de rat dénudée (figure 30A, E) (stade I). A J13, la majorité de la trachée de rat était recouverte par des épithéliums non-CF (figure 30B) et CF (figure 30F) non-différenciés formés de plusieurs couches de cellules épithéliales recouvertes par une couche superficielle de cellules malpighiennes (stade II). Cependant, un épithélium non-différencié pseudostratifié a été observé par endroits dans les greffons non-CF (figure 30B') (stade III). A J25, l'épithélium non-CF est devenu complètement différencié histologiquement (figure 30C), formé de cellules basales, ciliées et sécrétoires (stade IV), alors que l'épithélium CF est soit au stade II (figure 30G) soit au stade III (figure 30G'). A J35, l'épithélium non-CF est différencié (figure 30D) et ressemble à celui observé à J25, et l'épithélium CF (figure 30H) est devenu à son tour complètement différencié (stade IV).

## C.2.1.2. Vitesse de différenciation des épithéliums CF et non-CF

Dans le but de déterminer s'il existe une différence au niveau de la vitesse de différenciation des épithéliums CF et non-CF, nous avons analysé les greffons CF et non-CF après 25 jours de greffe (figure 31). Nous avons mis en évidence que 80% des greffons non-CF présentent un épithélium pseudostratifié différencié mucociliaire composé de cellules basales, ciliées et sécrétoires, alors que seulement 18,7% des greffons CF correspondent à un stade histologique de différenciation correspondant au stade IV, le reste des greffons correspondant aux stades II et III. L'analyse statistique a montré une différence significative (p = 0,03) entre les résultats observés. Ainsi, l'épithélium CF présente un retard de régénération par rapport à l'épithélium non-CF qui atteint plus rapidement le stade de différenciation.



Figure 31. Degré de différenciation des épithéliums non-CF et CF à J25. Barres = 50 μm.

## C.2.1.3. Hauteur des épithéliums régénérés différenciés

Nous avons mesuré la hauteur des épithéliums CF et non-CF au stade IV et nous avons observé que la hauteur de l'épithélium différencié CF est significativement (p = 0,03) plus importante (46,7 ± 8,9 µm) que celle de l'épithélium différencié non-CF (34,7 ± 4,8 µm) (figure 32).





Figure 32. Hauteur des épithéliums non-CF et CF.

La mesure de la hauteur des épithéliums CF et non-CF après 35 jours de greffe a montré que l'épithélium CF est 1,4 fois plus haut que l'épithélium non-CF. Barres =  $50 \mu m$ .

# C.2.2. Etudes cellulaires quantitatives

### C.2.2.1. Prolifération cellulaire

A un stade avancé de la maladie, la CF est caractérisée par une hyperprolifération cellulaire au sein de l'épithélium respiratoire de surface. Nous avons donc quantifié la prolifération cellulaire au cours de la régénération épithéliale CF et non-CF aux stades I, II, III et IV, par détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67 qui marque le noyau des cellules en division (figure 33). Au stade I, aucun marquage de prolifération cellulaire n'est observé dans les greffons CF et non-CF. Cependant, au stade II la prolifération est maximale dans les greffons CF et non-CF (Stade I/stade II : p = 0,01 et 0,04 respectivement) et le nombre de cellules proliférantes est 3,6 fois plus élevé (p = 0,02) dans les épithéliums CF (90,7 ± 26,3 cellules/mmLB) par rapport aux épithéliums non-CF (25,2 ± 3,3 cellules/mmLB) (figure 33A, A', C). Au stade III, la prolifération CF et non-CF est significativement moins importante qu'au stade II (stade II/stade III : p = 0,01 et 0,04 respectivement). Aucune différence significative de prolifération cellulaire n'a été observée entre les épithéliums CF et

non-CF  $(3,2 \pm 0,5 \text{ vs. } 1,9 \pm 0,7 \text{ cellules/mmLB respectivement})$  à ce stade. Au stade IV, le nombre de cellules CF et non-CF positives au Ki-67 est significativement plus faible que celui observé au stade III (stade III/stade IV : p = 0,01 et 0,05 respectivement). A ce stade, aucune différence significative de prolifération cellulaire n'a été observée entre les épithéliums CF et non-CF (0,7 ± 0,7 vs. 0,5 ± 0,2 cellules/mmLB respectivement) (figure 33B, B', C). L'épithélium CF manifeste donc une hyperprolifération cellulaire observée précocement pendant sa régénération.



Figure 33. Prolifération cellulaire au cours de la régénération non-CF et CF.

A et A' représentent la détection immunohistochimique de Ki-67 au stade II non-CF et CF respectivement. B et B' correspondent au stade IV non-CF et CF respectivement. C représente le graphe de l'évolution du nombre de cellules positives au Ki-67 au cours de la régénération. Barres =  $25 \,\mu m$ .

Il est à noter que la prolifération cellulaire est observée au stade II au niveau des cellules proches de la lame basale (figure 33A, A'), qui correspondent au stade IV à des cellules basales (figure 33B, B').

# C.2.2.2. Quantification des différents types cellulaires épithéliaux

Nous avons quantifié, au stade IV, les différents types cellulaires constituant les épithéliums CF et non-CF.

#### C.2.2.2.1. Les cellules basales

Dans la mesure où une hyperplasie des cellules basales est fréquemment décrite dans la CF, nous avons quantifié le nombre de ces cellules dans les épithéliums différenciés CF et non-CF au stade IV, en utilisant un anticorps dirigé contre la CK13 spécifique de ces cellules (figure 34A, B). Le nombre des cellules basales est significativement (p = 0,002) plus important (1,7 fois) dans les greffons CF (147,3 ± 23,7 cellules/mmLB) par rapport aux greffons non-CF (88,6 ± 5,2 cellules/mmLB) (figure 34C).



Figure 34. Quantification des cellules basales.

A et B représentent un marquage de cellules basales au stade IV. C montre le nombre plus élevé de cellules basales dans les greffons CF. \*p < 0.05. Barres = 50  $\mu$ m.

# C.2.2.2.2. Les cellules sécrétoires

La littérature décrit généralement une hyperplasie des cellules sécrétoires comme caractéristique de la CF. Dans notre étude, nous avons utilisé l'anticorps anti-MUC5AC pour quantifier le nombre des cellules sécrétoires dans les épithéliums CF et non-CF. En effet, MUC5AC a été décrit comme étant exprimé par toutes les cellules sécrétoires (Groneberg *et al.*, 2002). Pour confirmer ceci, nous avons réalisé un marquage Bleu Alcian/PAS (BA/PAS), spécifique de toutes les cellules sécrétoires, et un marquage MUC5AC sur les coupes sériées de xénogreffes CF et non-CF. Nous avons pu observer que le marquage MUC5AC correspond à toutes les cellules sécrétoires dans les greffons CF et non-CF (figure 35).



Figure 35. Marquage BA/PAS et MUC5AC sur des épithéliums non-CF et CF différenciés.

A, B : coloration AB/PAS. C, D : immunodétection de MUC5AC. Barre =  $50 \mu m$ .

Après quantification des cellules MUC5AC et MUC5B-positives (figure 36A, B), nous avons observé que le nombre de cellules sécrétoires n'est pas différent dans les greffons CF et non-CF ( $31 \pm 5,7$  vs.  $21,7 \pm 12,4$  cellules/mmLB respectivement) (figure 36C). Aucune hyperplasie des cellules sécrétoires n'est donc mise en évidence.

En ce qui concerne les cellules positives au MUC5B, seule une sous-population des cellules sécrétoires exprime cette mucine dans les greffons CF et non-CF (figure 36A, B). De plus,

après quantification, il apparaît que le nombre des cellules MUC5B-positives est 3,2 fois moins important (p = 0,009) dans les épithéliums CF que dans les épithéliums non-CF (4,7 ± 2,1 vs.15,1 ± 3,4 cellules/mmLB respectivement) (figure 36D).



Figure 36. Quantification des cellules qui expriment le MUC5AC et le MUC5B.

A et B représentent un double marquage des cellules MUC5AC-positives en jaune et MUC5B-positives en rouge (co-localisation en orange). Quantification des cellules MUC5AC-positives (C) et MUC5B-positives (D). \*p < 0.05. Barre = 50 µm.

C.2.2.2.3. Les cellules ciliées

Nous avons quantifié le nombre de cellules ciliées grâce à un marquage de la  $\beta$ tubuline (figure 37A, B) et observé que leur nombre n'est pas différent dans les épithéliums régénérés différenciés CF et non-CF (104,7 ± 6,2 vs. 120,8 ± 20,1 cellules/mmLB respectivement) (figure 37C). Il faut également noter la forme allongée des cellules ciliées CF par rapport aux cellules non-CF.



Figure 37. Nombre des cellules ciliées dans les épithéliums non-CF et CF.

# C.2.3. Marqueurs de différenciation fonctionnelle : ZO-1 et CFTR

Pour confirmer la différenciation histologique des greffons observés après 35 jours de greffe, nous avons étudié 2 marqueurs de différenciation fonctionnelle épithéliale : ZO-1 et CFTR.

ZO-1 est une protéine associée aux jonctions serrées qui se trouve uniquement au niveau des épithéliums différenciés (Dupuit *et al.*, 2000). La présence des jonctions serrées est en outre un indicateur de l'intégrité de la barrière épithéliale qui joue un rôle très important dans la défense de l'épithélium. ZO-1 est présent au niveau du pôle apical des épithéliums non-CF et CF (figure 38A, A').

A (non-CF) et B (CF) représentent l'immunodétection de la  $\beta$ -tubuline. C : quantification des cellules  $\beta$ -tubuline-positives. Barre = 50  $\mu$ m.

La protéine CFTR est généralement exprimée sur la membrane apicale des cellules ciliées non-CF. Son expression à ce niveau est théoriquement absente dans les épithéliums CF du fait des mutations qui empêchent sa présence sur la membrane plasmique. Cependant, nos analyses de sa localisation, par immunohistochimie, ont montré qu'elle est exprimée au pôle apical de tous les épithéliums régénérés différenciés non-CF et CF au stade IV (figure 38B, B'), quelque soit le génotype dépisté.





A (non-CF) et A' (CF) montrent le marquage ZO-1 qui forme une ceinture autour des cellules épithéliales au niveau apical. Toutes les cellules ciliées non-CF (B) et CF (B') sont marquées par le CFTR. Barre =  $25 \mu m$ .
# C.2.4. Expression des gènes codant pour l'IL-8, les MMP-7 et -9 et pour le TIMP-1 au cours de la régénération

Nous avons analysé l'expression de l'IL-8, des MMP-7 et -9 ainsi que l'expression de leur inhibiteur tissulaire TIMP-1 afin de comparer leur profil d'expression au cours de la régénération des épithéliums CF et non-CF. L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire généralement décrite comme surexprimée dans les épithéliums différenciés CF (Escotte *et al.*, 2003). Les MMPs ont montré leur implication dans la régénération de l'épithélium non-CF (Coraux *et al.*, 2005b), mais n'ont jamais été étudié pendant la régénération de l'épithélium respiratoire CF.

L'analyse de l'expression de ces gènes au cours de la régénération CF et non-CF, aux stades I, II, III et IV, a été effectuée par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques des ARNm humains. Les valeurs densitométriques des bandes de transcrits d'IL-8, MMP-7, -9 et TIMP-1 obtenues ont été normalisées à celles du gène de ménage GAPDH. Dans tous les résultats qui suivent, aucune expression de ces transcrits n'a été observée dans les trachées inoculées avec le milieu de culture seul, sans cellules épithéliales.

# C.2.4.1. Expression de l'IL-8



Les transcrits d'IL-8 ont été détectés à la taille attendue de 222 pb (figure 39A).

Figure 39. Expression de l'IL-8 au cours de la régénération non-CF et CF.

La figure 39B montre l'expression relative de l'IL-8 au cours de la régénération CF et non-CF. Le niveau d'ARNm d'IL-8 est significativement plus élevé dans les épithéliums CF que dans les épithéliums non-CF : 10,5 fois au stade I (p = 0,01), 22,5 fois au stade II (p = 0,004), 48,5 fois au stade III (p = 0,005) et 10,8 fois au stade IV (p = 0,005).

Pendant la régénération non-CF et CF, l'expression d'IL-8 a progressivement diminué. Dans les greffons non-CF, l'IL-8 a diminué 7,5 fois (p = 0,04) au stade III par rapport au stade I, puis, son expression a augmenté au stade IV par comparaison au stade III (p = 0,04), sans toutefois une différence significative entre les stades I et IV. Dans les greffons CF, son expression a diminué progressivement jusqu'à 2,8 fois au stade IV par rapport au stade I (p = 0,001) (stade I/stade II : p = 0,002 ; stade III/stade IV : p = 0,004).

Ainsi, l'expression de l'IL-8 est accrue dans les épithéliums CF et est dérégulée pendant la régénération de l'épithélium respiratoire CF.

#### C.2.4.2. Expression de la MMP-7

Les transcrits de MMP-7 ont été détectés à la taille attendue de 102 pb (figure 40A).



Figure 40. Expression de la MMP-7 au cours de la régénération non-CF et CF.

La figure 40B montre l'expression relative de la MMP-7 au cours de la régénération CF et non-CF. Le niveau d'ARNm de la MMP-7 est 3,1 fois et 2,6 fois plus élevé aux stades I

(p = 0.03) et II (p = 0.005), respectivement, pendant la régénération CF par rapport à la régénération non-CF.

Au cours de la régénération épithéliale non-CF, l'expression de la MMP-7 a significativement augmenté de 4 fois au stade IV par rapport au stade I (p = 0,03), alors que son expression n'a pas significativement changé pendant la régénération de l'épithélium CF.

Ainsi, l'expression de MMP-7 est précocement dérégulée pendant la régénération CF.

#### C.2.4.3. Expression de la MMP-9



Les transcrits de MMP-9 ont été détectés à la taille attendue de 248 pb (figure 41A).

Figure 41. Expression de la MMP-9 au cours de la régénération non-CF et CF.

La figure 41B montre l'expression relative de la MMP-9 au cours de la régénération CF et non-CF. Le niveau d'ARNm de la MMP-9 est 1,7 fois plus élevé au stade I (p = 0,05), 2 fois plus élevé au stade II (p = 0,006), 4,7 fois plus élevé au stade III (p = 0,005), mais 4 fois plus bas au stade IV (p = 0,0001) dans l'épithélium CF que dans l'épithélium non-CF au cours de la régénération.

Pendant la régénération non-CF, l'expression de la MMP-9 n'a pas changé au cours des trois premiers stades, mais a significativement augmenté de 3 fois (p = 0.03) et de 6,2 fois (p =

0,02) au stade IV par rapport au stade I et au stade III respectivement. A l'inverse, au cours de la régénération CF, son expression a augmenté de 1,7 fois au stade II par rapport au stade I (p = 0,0009), puis a diminué progressivement de 3,6 fois au stade IV par rapport au stade II (p = 0,0009) (stade II/stade III : p = 0,01 ; stade III/stade IV : p = 0,002).

Ainsi, l'expression de la MMP-9 est complètement dérégulée à tous les stades de la régénération CF.

#### C.2.4.4. Expression de TIMP-1



Les transcrits de TIMP-1 ont été détectés à la taille attendue de 222 pb (figure 42A).

Figure 42. Expression de TIMP-1 au cours de la régénération non-CF et CF.

La figure 42B montre l'expression relative du TIMP-1 au cours de la régénération CF et non-CF. Comme l'IL-8, le niveau d'ARNm de TIMP-1 est significativement plus élevé au cours de la régénération CF que la régénération non-CF : 5 fois au stade I (p = 0,01), 20,5 fois au stade II (p = 0,002), 19,5 fois au stade III (p = 0,005) et 7,6 fois au stade IV (p = 0,005). Pendant la régénération non-CF, l'expression de TIMP-1 est constante, alors que pendant la régénération CF, son expression a significativement augmenté de 2,8 fois au stade II (p = 0,0009), puis a diminué progressivement jusqu'à 2 fois au stade IV par rapport au stade II (p = 0,0001) (stade II/stade III : p = 0,002 ; stade III/stade IV : p = 0,009).

Ainsi, l'expression de TIMP-1 est également dérégulée au cours de la régénération CF avec une surexpression à tous les stades.

# C.2.5. Sécrétion d'IL-8 et des MMP-7 et -9 au cours de la régénération

Après avoir analysé l'expression des ARNm correspondants à l'IL-8, la MMP-7 et la MMP-9, nous avons analysé le profil de sécrétion protéique de ces facteurs dans les surnageants recueillis aux stades I, II, III et IV de la régénération CF et non-CF.

#### C.2.5.1. Sécrétion d'IL-8

Les sécrétions d'IL-8 humaine au cours de la régénération CF et non-CF ont été quantifiées par dosage ELISA (figure 43).

Le niveau de sécrétion d'IL-8 est 2,6 fois plus élevé au stade I (p = 0,05) et 6,6 fois plus élevé au stade III (p = 0,02) dans les surnageants CF que dans les surnageants non-CF. Pendant la régénération non-CF, la quantité d'IL-8 a significativement diminué de 2,2 fois au stade II (p = 0,04), pour rester ensuite constante à un bas niveau pendant les 3 derniers stades. Au cours de la régénération CF, la sécrétion d'IL-8 n'a pas changé durant les trois premiers stades, mais a diminué de 3,6 fois (p = 0,02) et 3,7 fois (p = 0,03) au stade IV par rapport aux stades III et I respectivement. Ainsi, les sécrétions d'IL-8 sont dérégulées au cours de la régénération CF où elles sont accrues, surtout pendant les trois premiers stades.



Figure 43. Profil de sécrétion de l'IL-8 au cours de la régénération non-CF et CF.

# C.2.5.2. Sécrétion de MMP-7

La sécrétion de MMP-7 au cours de la régénération CF et non-CF a été analysée par zymographie sur gel de caséine. Deux bandes apparaissent sur le gel, l'une à 28 KDa qui correspond à la forme latente, et l'autre à 19 KDa qui correspond à la forme active de la MMP-7 (figure 44A).



Figure 44. Sécrétion de la MMP-7 au cours de la régénération non-CF et CF.

Le graphe de la figure 44B montre la sécrétion relative de la MMP-7 au cours de la régénération CF et non-CF. Le niveau de sécrétion de la MMP-7 est 2,9 fois moins élevé au stade I (p = 0,04), mais 6,2 fois plus élevé au stade II (p = 0,04) dans les surnageants CF que dans les surnageants non-CF.

Pendant la régénération non-CF, après une baisse non significative entre le stade I et le stade II, la sécrétion de MMP-7 a significativement augmenté de 3,1 fois au stade III par rapport au stade I (p = 0,04), pour rester par la suite constante. Au cours de la régénération CF, la quantité de MMP-7 a augmenté de façon significative : 11,4 fois au stade III par rapport au stade I (p = 0,04) (stade I/stade II : p = 0,03 ; stade II/stade III : p = 0,03). La MMP-7 sécrétée

est restée ensuite constante entre le stade III et le stade IV de la régénération CF. Ainsi, le profil de sécrétion de la MMP-7 est lui aussi dérégulé au cours de la régénération CF.

#### C.2.5.3. Sécrétion de MMP-9

La sécrétion de MMP-9 au cours de la régénération CF et non-CF a été analysée par zymographie sur gel de gélatine. Deux bandes apparaissent sur le gel, l'une à 92 KDa qui correspond à la forme latente, et l'autre à 84 KDa qui correspond à la forme active de la MMP-9 (figure 45A).



Figure 45. Sécrétion de la MMP-9 au cours de la régénération non-CF et CF.

Le graphe de la figure 45B montre la sécrétion relative de la MMP-9 au cours de la régénération CF et non-CF. Le niveau de sécrétion de MMP-9, dans les surnageants des greffons CF, est 2 fois plus élevé au stade I (p = 0,03), 3,7 fois plus élevé au stade II (p = 0,02), 1,8 fois plus élevé au stade III (p = 0,04), mais 4,8 fois moins élevé au stade IV (p = 0,05) que dans les surnageants non-CF.

Pendant la régénération non-CF, la MMP-9 sécrétée a progressivement augmenté jusqu'à 3,7 fois au stade IV par rapport au stade I (p = 0,04) (stade III/stade III : p = 0,04; stade III/stade IV : p = 0,04). Par contre, la sécrétion de MMP-9 dans les greffons CF a significativement augmenté de 2,2 fois au stade II par rapport au stade I (p = 0,01), puis a progressivement diminué jusqu'à 5,7 fois au stade IV par comparaison au stade II (p = 0,02) (stade III/stade IV : p = 0,04).

Ainsi, la MMP-9 sécrétée est dérégulée au cours de la régénération épithéliale CF.

# C.2.6. Inhibition des MMPs au cours de la régénération

L'inhibition des MMPs a été effectuée à l'aide d'inhibiteurs chimiques qui bloquent les MMPs sécrétées dans les surnageants des xénogreffes. L'inhibition des MMP-7 et -9 au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire non-CF a été étudiée au laboratoire (Coraux *et al.*, 2005b), et nous avons montré que ces 2 MMPs sont directement impliquées dans le processus de régénération de l'épithélium normal. Afin de déterminer leur implication au cours de la régénération CF, nous avons procédé à leur inhibition pendant toute la période de greffe, c'est-à-dire de J0 jusqu'à J35.

#### C.2.6.1. Inhibition de la MMP-7

Les greffons CF et non-CF ayant été traités avec l'inhibiteur de la MMP-7, ainsi que les greffons contrôles ont été prélevés à J35 et cryofixés pour une analyse histologique de l'épithélium après une coloration hématoxyline-éosine.

Dans les xénogreffes contrôles non-CF et CF, un épithélium pseudostratifié mature a été observé, composé de cellules basales, ciliées et sécrétoires (figure 46A, A'). L'inhibition de la MMP-7 dans les greffons non-CF a entraîné la génération d'un épithélium hyperplasique (des cellules basales) caractérisé par l'absence de la distribution classique des 3 types cellulaires de l'épithélium respiratoire (figure 46B). De même, l'inhibition de la MMP-7 au cours de la régénération CF a entraîné la génération d'un épithélium hyperplasique (des cellules basales), et un défaut de différenciation mucociliaire (figure 46B').

Ainsi, comme lors de la régénération non-CF, la MMP-7 semble être impliquée dans la régénération de l'épithélium respiratoire CF.

Contrôle sans inhibiteurInhibiteur MMP7Non-CFImage: Sector Sec

Figure 46. Inhibition de la MMP-7 au cours de la régénération non-CF et CF.

Comme le montrent les images B et B', l'inhibition de la MMP-7 dans les greffons non-CF et CF entraîne une hyperplasie cellulaire et un défaut de différenciation mucociliaire. Barre =  $50 \mu m$ .

#### C.2.6.2. Inhibition de la MMP-9

Comme pour la MMP-7, les greffons CF et non-CF ayant été traités avec l'inhibiteur de la MMP-9, ainsi que les greffons contrôles ont été prélevés à J35 et cryofixés pour une analyse histologique de l'épithélium après une coloration hématoxyline-éosine.

Dans les greffons contrôles non-CF et CF, un épithélium pseudostratifié mucociliaire a été observé (figure 47A, A'). Dans les greffons non-CF, l'inhibition de la MMP-9 a généré un épithélium hyperplasique présentant un défaut de différenciation mucociliaire (figure 47B). Cependant, l'inhibition de la MMP-9 au cours de la régénération CF a entraîné la reconstitution d'un épithélium très fin, composé principalement d'une monocouche de cellules de phénotype sécrétoire (figure 47B').

Ainsi, la MMP-9 est directement impliquée dans la régénération de l'épithélium respiratoire CF comme le montre cette expérience d'inhibition.



#### Figure 47. Inhibition de la MMP-9 au cours de la régénération non-CF et CF.

Les images B et B' montrent que l'inhibition de la MMP-9 se manifeste par la régénération d'un épithélium remodelé indifférencié présentant une seule assise de cellules sécrétoires (flèches) dans les greffons CF. Barre =  $50 \mu m$ .

# C.3. Discussion

Dans cette première partie, nous avons comparé le processus de régénération de l'épithélium respiratoire CF et non-CF, dans le but de déterminer si le remodelage observé dans l'épithélium respiratoire des patients CF est dû à un processus anormal de régénération après lésion épithéliale, et ce, indépendamment de toute composante infectieuse. Nous avons montré, dans un modèle de xénogreffe humanisée dans la souris nude, en dehors de toute infection, que la régénération de l'épithélium respiratoire CF est retardée par rapport à celle de l'épithélium non-CF, et est caractérisée par la restauration d'un épithélium CF remanié. Nous avons également montré que la régénération épithéliale CF est accompagnée d'une altération de l'expression et de la sécrétion de quelques médiateurs, notamment l'IL-8, la MMP-7, la MMP-9 et leur inhibiteur tissulaire TIMP-1.

Plusieurs études in vivo ont montré que la régénération de l'épithélium respiratoire de surface était caractérisée par une première étape d'adhérence et de migration cellulaire, suivie par une étape de prolifération et stratification cellulaire, une pseudostratification de l'épithélium, et une étape finale de différenciation épithéliale (McDowell et al., 1979 ; Dupuit et al., 2000). Cependant, la dynamique de régénération de l'épithélium respiratoire CF, ainsi que sa comparaison à celle de l'épithélium non-CF n'a jamais été établie auparavant. Nos données montrent que la régénération et la différenciation complète de l'épithélium CF sont retardées. Nous avons également observé une hyperprolifération cellulaire au stade II de la régénération CF concomitante avec une surexpression et une sécrétion accrue de l'IL-8, des MMPs et du TIMP-1. Outre son activité pro-inflammatoire, l'IL-8 a été impliquée dans la stimulation de la prolifération, de la migration, et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines (Maheshwari et al., 2002), ainsi que dans la prolifération des kératinocytes humains et dans la cicatrisation de la peau (Rennekampff et al., 2000). L'IL-8 a également montré son effet activateur de la prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale (Li et al., 2002). De plus, il a été montré que le blocage de l'IL-8 inhibe ses effets pro-migratoires sur les cellules épithéliales du colon humain (Wilson et al., 1999), et entraîne l'inhibition de la prolifération des cellules stromales de l'endomètre humain (Iba *et al.*, 2004). De la même façon, la MMP-7 et le TIMP-1 ont montré leur implication dans la stimulation de la prolifération des cellules épithéliales de la lignée MDCK et d'autres variétés de cellules humaines (lymphoblastes, cellules endothéliales de l'artère pulmonaire, cellules de lymphome de Burkitt, cellules de l'hépatome, fibroblastes gingivaux, cellules épidermiques) (Hayakawa et al., 1992 ; Harrell et al., 2005). Ces données et nos résultats suggèrent que l'IL-8, les MMPs et le TIMP-1 stimulent la prolifération cellulaire au stade II de la régénération de l'épithélium CF, entraînant probablement le retard de différenciation observé. Deux conséquences pourraient résulter du retard de régénération chez les patients CF : d'une part, l'épithélium CF ne restaurerait pas assez rapidement ses fonctions de défenses comme la clairance mucociliaire et la sécrétion de molécules antibactériennes après lésion épithéliale ; d'autre part, la susceptibilité de l'épithélium à une infection bactérienne serait accrue. En effet, il a été démontré dans notre laboratoire que, durant sa réparation, l'épithélium respiratoire expose des récepteurs de type asialo ganglioside M1 et intégrine  $\alpha 5\beta1$  qui seront reconnus par certaines bactéries pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Hæmophilus influenzae* (Plotkowski *et al.*, 1996 ; de Bentzmann *et al.*, 1996a ; de Bentzmann *et al.*, 1996b ; Roger *et al.*, 1999). Ces bactéries vont produire également des toxines qui vont augmenter la perméabilité de l'épithélium de surface (Azghani *et al.*, 1996 ; Virkola *et al.*, 1996). Ainsi, plus la régénération de l'épithélium respiratoire est lente, plus sa susceptibilité à l'infection bactérienne est accrue.

Dans notre étude, l'épithélium CF différencié dans le modèle de xénogreffe est plus haut que l'épithélium non-CF différencié. Dans la littérature, les données relatives à la hauteur de l'épithélium respiratoire de surface humain sont rares. Il a été montré que la hauteur de l'épithélium humain n'était pas différente entre les patients asthmatiques et les sujets sains (Shebani et al., 2005), alors qu'elle était plus importante après une infection par le virus de l'influenza (Soderberg et al., 1990). Nos résultats sont en accord avec ceux de Voynow *et al.* qui ont décrit que, dans les tissus respiratoires inflammatoires et infectés CF obtenus après une transplantation pulmonaire, la hauteur de l'épithélium respiratoire CF était deux fois supérieure à celle de l'épithélium non-CF (Voynow et al., 2005). De plus, Tiddens et al. ont montré une augmentation de la hauteur de l'épithélium CF par rapport à l'épithélium des patients atteints de broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) (Tiddens et al., 2000). Ces deux derniers résultats suggèrent l'implication de l'infection et/ou l'inflammation dans l'augmentation de la hauteur de l'épithélium respiratoire. Dans notre cas, le processus de régénération de l'épithélium respiratoire CF s'est déroulé en l'absence de toute infection, mettant en valeur le rôle de l'inflammation, et donc la potentielle contribution de l'IL-8 dans ce processus.

Néanmoins, les conséquences de l'augmentation de la hauteur de l'épithélium CF restent inconnues. Cette modification morphologique, affecte-t-elle les fonctions de l'épithélium telles que la clairance mucociliaire et la sécrétion de peptides antimicrobiens ?

L'hyperprolifération cellulaire et l'hyperplasie des cellules basales sont généralement associées à la pathologie de la CF (Leigh *et al.*, 1995 ; Brezillon *et al.*, 1997a ; Voynow *et al.*, 2005), ainsi qu'à d'autres maladies inflammatoires (Polosukhin *et al.*, 2001 ; Chilosi *et al.*, 2002). Dans nos expériences, l'hyperprolifération cellulaire des cellules épithéliales dans les greffons CF observée au stade II est en accord avec les données de Voynow *et al.* qui ont montré que, à un stade avancé de la maladie, l'index de prolifération cellulaire dans l'épithélium CF était cinq fois plus important que celui de l'épithélium non-CF (Voynow *et*  *al.*, 2005). Cependant, nos résultats montrent que l'hyperprolifération cellulaire observée au stade II de la régénération CF est devenue non significative dans les épithéliums différenciés au stade IV. Ces résultats suggèrent que l'hyperplasie des cellules basales observée au stade IV pourrait être une conséquence directe de l'hyperprolifération observée précocement au stade II. La différence non-significative de la prolifération cellulaire entre les épithéliums CF et non-CF au stade IV serait probablement due à l'environnement non infectieux dans notre modèle de xénogreffe.

Outre notre hypothèse de l'implication de la dérégulation de l'IL-8 et des MMPs dans le remodelage de l'épithélium respiratoire au cours de la régénération CF, nous ne devons pas exclure l'impact de la mutation de CFTR dans ce phénomène. En effet, il a été montré que les cellules épithéliales intestinales de souris déficientes en CFTR ont une capacité de migration et de prolifération qui est accrue par rapport aux cellules des souris normales (Gallagher *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de CFTR pourrait avoir comme conséquences une augmentation (Larson *et al.*, 2000) ou une diminution (Ye *et al.*, 2001) de la prolifération de cellules épithéliales respiratoires. Il restera donc à déterminer si la correction de CFTR, dans notre modèle de xénogreffe, pourrait empêcher l'hyperprolifération cellulaire ainsi que le retard de différenciation qui sont observés pendant le processus de régénération de l'épithélium CF.

Pour la réalisation du présent travail, nous avons utilisé sept prélèvements CF présentant des mutations qui appartiennent aux classes I (G542X), II ( $\Delta$ F508) et IV (E92K, 547delA). En théorie, CFTR ne doit pas être localisé à la membrane plasmique apicale des cellules ciliées quand sa mutation appartient aux classes I et II. Cependant, nous avons pu retrouver l'expression de CFTR au niveau apical de tous les épithéliums CF régénérés, quelque soit le génotype. Ces résultats sont en parfait accord avec des travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire, dans lesquels il a été montré que CFTR est exprimé à la surface de tous les épithéliums CF étudiés lorsque ceux-ci sont parfaitement polarisés et différenciés (Dupuit *et al.*, 1995b ; Kalin *et al.*, 1999). Cependant, il est à noter que la présence de CFTR à la surface des épithéliums CF n'implique pas nécessairement sa fonctionnalité, notamment sa capacité de sécréter les ions CI<sup>-</sup>. Des études ultérieures de la fonctionnalité des épithéliums CF régénérés devront être réalisées.

Nous avons montré que le nombre de cellules sécrétoires, analysé par un marquage MUC5AC dans les greffons non infectés, n'est pas différent dans les épithéliums régénérés CF et non-CF. De plus, le nombre de cellules sécrétoires qui expriment le MUC5B est plus faible dans les greffons CF par rapport aux greffons non-CF. Le nombre de cellules sécrétoires a été décrit comme étant accru dans quelques maladies inflammatoires comme l'asthme, où MUC5B est sous-exprimé (Ordonez *et al.*, 2001). De façon similaire, une hyperplasie des cellules sécrétoires associée à une augmentation du niveau d'expression du

MUC5AC a été observée chez les patients atteints de BPCO en comparaison de sujets sains (Ma et al., 2005). En ce qui concerne la CF, nos résultats semblent en contradiction avec d'autres études de la littérature, puisque l'hypersécrétion associée à une hyperplasie des cellules sécrétoires a été longtemps considérée comme étant la première cause des complications survenants dans la CF. En effet, plusieurs études non quantitatives ont décrit une hyperplasie des cellules sécrétoires de l'épithélium CF in situ (Bedrossian et al., 1976 ; Hauber et al., 2004). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés par Danel et al. dans des brossages nasaux (Danel et al., 1996), et par Voynow et al. sur des coupes d'épithéliums respiratoires (Voynow et al., 2005), tous les deux ne montrant pas de différence significative entre le nombre de cellules sécrétoires dans les épithéliums CF et non-CF. De plus, il a été récemment montré que le nombre de cellules exprimant le MUC5AC était identique dans les épithéliums des polypes nasaux CF et non-CF, alors que le nombre de cellules positives au MUC5B était moins important dans les épithéliums CF (Martinez-Anton et al., 2006). Il existe également une controverse concernant l'expression et la sécrétion des mucines 5AC et 5B chez les sujets CF et non-CF. Bien qu'une diminution de l'expression de MUC5AC a été décrite dans les cellules nasales non inflammatoires de patients CF (Voynow et al., 1998), aucune différence significative du niveau de sécrétion de cette mucine dans les mucus CF et non-CF n'a été rapportée, hormis un taux élevé de MUC5B de faible poids moléculaire observé dans les mucus CF (Kirkham et al., 2002). MUC5AC et MUC5B ont également été trouvées à très faibles concentrations dans les mucus CF par rapport aux non-CF (Henke *et al.*, 2004). D'après toutes ces données contradictoires, il est important de noter que tous les tissus obtenus dans les études citées ci-dessus, pour la quantification des cellules sécrétoires et des différentes mucines, proviennent de patients CF infectés et inflammés à différents stades de la maladie, compromettant donc la comparaison avec les tissus provenant de sujets sains. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec d'autres (Danel et al., 1996 ; Hubeau et al., 2001b ; Voynow et al., 2005 ; Martinez-Anton et al., 2006), et plus particulièrement avec ceux de Sturgess et Imrie (Sturgess et al., 1982) qui ont montré que le nombre de cellules sécrétoires n'était pas modifié dans les épithéliums respiratoires de fœtus CF non infectés. Ceci suggère que l'hyperplasie des cellules sécrétoires n'est pas systématique à un stade précoce de la maladie, et qu'elle apparaît plus tardivement quand l'infection et l'inflammation sont installées.

Nous avons montré que la cytokine pro-inflammatoire IL-8 est surexprimée pendant tout le processus de régénération CF. L'IL-8 a été largement décrite comme étant accrue dans la CF (Machen *et al.*, 2006), ce qui conforte nos résultats et suggère l'implication de cette cytokine dans la régénération, ainsi que son rôle dans la régulation des MMPs.

Pendant les premiers stades de la régénération de l'épithélium respiratoire humain de surface CF, MMP-7, MMP-9 et TIMP-1 sont surexprimés suggérant leur implication dans la migration, la prolifération, et la pseudostratification de l'épithélium. Le rôle des MMP-7 et -9

dans le contrôle de la migration des cellules épithéliales, après lésion et remodelage de l'épithélium respiratoire, a été démontré (Buisson et al., 1996b ; Dunsmore et al., 1998 ; Legrand et al., 1999 ; Parks et al., 2001 ; Atkinson et al., 2003). De plus, les taux significativement élevés des MMPs et de TIMP-1 au stade II de la régénération CF suggèrent fortement leur implication dans l'hyperprolifération observée à ce stade, puisque l'activité mitogénique de la MMP-7 et de TIMP-1 a été précédemment décrite (Hayakawa et al., 1992 ; Ritter et al., 1999 ; Harrell et al., 2005). Plus particulièrement, l'expression de la MMP-7 reste élevée à la fin de la régénération CF au stade IV, avec un taux similaire à celui observé au stade IV non-CF, alors que l'expression de la MMP-9 diminue à la fin de la régénération CF pour devenir inférieure à celle observée au stade IV non-CF. Nous avons récemment montré dans le modèle de xénogreffe trachéale que les MMPs jouent un rôle déterminant dans la régénération de l'épithélium respiratoire non-CF puisque leur inhibition a entraîné un remodelage de l'épithélium et une absence de la différenciation mucociliaire (Coraux et al., 2005b). Nous montrons également ici l'implication de ces MMPs dans la régénération de l'épithélium respiratoire CF. Les conséquences de l'inhibition de la MMP-7 sont identiques dans les greffons CF et non-CF, ce qui est probablement lié à un niveau d'expression identique de cette MMP à la fin de la régénération CF et non-CF. Cependant, lorsque nous inhibons la MMP-9, un épithélium très fin est régénéré dans les greffons CF, différent de celui obtenu dans les greffons non-CF. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence du niveau d'expression de la MMP-9 au cours de la régénération CF et non-CF, et principalement au cours de la dernière étape de différenciation. En effet, la concentration en inhibiteur utilisée a été la même dans les greffons CF et non-CF, et similaire tout au long de la régénération. Il est probable que, pour tenter de ramener les concentration en MMP-9 dans les greffons CF au niveau des concentrations observées dans les greffons non-CF et ainsi tenter de restaurer la régénération d'un épithélium non remanié, la concentration en inhibiteur doit être modulée de façon fine au cours des trois premières étapes de la régénération et que l'utilisation de MMP-9 exogène remplace l'inhibiteur au cours de la dernière étape de différenciation cellulaire. Cette approche est actuellement difficile à mettre en œuvre techniquement mais permettrait de démontrer sans ambiguïté, le rôle de la dérégulation de la MMP-9 dans la génération d'un épithélium remanié dans la CF. Néanmoins, nos résultats suggèrent que la MMP-9 joue un rôle majeur dans la différenciation de l'épithélium respiratoire de surface CF. En tenant compte de sa chute entre les stades II et IV, ainsi que de son taux d'expression et de sécrétion très bas au stade IV, la sous-expression de la MMP-9 pourrait être responsable du retard de la régénération de l'épithélium CF.

Concernant le TIMP-1, nous avons montré sa surexpression dans les épithéliums CF par rapport aux non-CF pendant la régénération épithéliale, avec un profil d'expression très proche de celui de la MMP-9, suggérant leur association durant ce phénomène. Lee *et al.* ont récemment montré que les souris déficientes en TIMP-1 sont plus résistantes aux infections cornéennes par *P. aeruginosa*, et qu'elles éliminent plus rapidement les infections par rapport

aux souris normales. De plus, ils ont montré que la MMP-9 est nécessaire à la résistance de ces souris contre l'infection bactérienne (Lee *et al.*, 2005a). A la lumière de ces résultats, nous suggérons que l'expression élevée de TIMP-1, associée à la faible expression de la MMP-9 dans les épithéliums CF bien différenciés pourraient rendre l'épithélium CF plus sensible aux infections de *P. aeruginosa*, très fréquentes dans la CF.

En conclusion, notre étude met en évidence qu'en l'absence de toute infection, la régénération de l'épithélium respiratoire CF est retardée et anormale, entraînant ainsi la reconstitution d'un épithélium remanié. Ceci suggère que le remodelage observé dans les épithéliums CF humains n'est pas seulement dû à l'environnement infectieux lié à la maladie, mais aussi à un processus anormal de régénération épithéliale. Nos résultats suggèrent enfin que le processus anormal de régénération pourrait être au moins en partie la conséquence d'un déséquilibre de l'expression des MMPs, TIMP-1 et de l'IL-8 par les cellules épithéliales respiratoires humaines CF au cours de ce phénomène.

# D. IDENTIFICATION DES CELLULES PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE DE SURFACE HUMAIN ADULTE

Dans la CF, l'épithélium respiratoire est souvent lésé et doit régénérer pour restaurer toutes ses fonctions. La nature des cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire de surface humain adulte reste toujours inconnue, malgré les avancées effectuées dans ce domaine jusqu'à présent chez l'animal, notamment la souris.

Dans la partie qui va suivre, nous avons isolé, à partir des cellules épithéliales respiratoires humaines adultes, par la méthode de tri cellulaire par cytométrie en flux, des populations cellulaires constituant cet épithélium et en particulier les cellules basales, afin de mettre en évidence la capacité de cette population à proliférer et à reconstituer un épithélium pseudostratifié mucociliaire mature, identique à l'épithélium présent *in vivo*.

# D.1. Matériels et Méthodes

# D.1.1. Approche expérimentale suivie

Le but de notre étude était d'identifier les cellules progénitrices à l'origine de la différenciation de tous les types cellulaires de l'épithélium respiratoire humain de surface. Il a donc fallu séparer les différentes populations épithéliales constituant l'épithélium respiratoire de surface humain, c'est-à-dire les cellules basales, ciliées et sécrétoires, afin de procéder aux tests fonctionnels permettant de mettre en évidence leur capacité progénitrice éventuelle.

Il était donc indispensable dans un premier temps d'identifier un ou plusieurs marqueurs membranaires spécifiques de l'une des deux populations de cellules basales ou sécrétoires présentes dans l'épithélium de surface, les cellules ciliées étant considérées comme incapables de proliférer et donc de régénérer l'épithélium. Une fois ce ou ces marqueurs identifiés, il a fallu séparer les populations épithéliales par tri cellulaire par cytométrie en flux afin de procéder aux tests fonctionnels *in vivo* et *in vitro* de ces cellules isolées.

Le schéma général de notre étude a été :



Une 1<sup>ère</sup> étape consiste à effectuer un marquage immunohistochimique sur coupes tissulaires pour analyser l'expression d'un marqueur membranaire déterminé au niveau des cellules de l'épithélium respiratoire humain de surface. Si le marquage est négatif, une optimisation des conditions de marquage peut être effectuée, et si cette dernière reste infructueuse, le marqueur est abandonné. Après avoir identifié un marqueur au niveau tissulaire, l'étape suivante (2) consiste à effectuer le même marquage sur des cellules qui ont été dissociées et cytospinées sur lames tannées. Cette étape est nécessaire pour vérifier que l'antigène du marqueur identifié n'a pas été digéré lors de la dissociation enzymatique du tissu respiratoire, car dans ce cas, nous ne pourrions pas l'utiliser pour le tri cellulaire. Si l'antigène est perdu, une étape de régénération du récepteur de surface cellulaire est tentée. Si le marquage reste négatif le marqueur est abandonné. Si le marquage est positif sur les cellules cytospinées, une validation

de ce marquage est nécessaire pour s'assurer que la positivité observée se situe au niveau d'une seule population cellulaire épithéliale (étape 3). Cette validation est souvent effectuée par la réalisation d'un double marquage, le 1<sup>er</sup> marquage utilisant le marqueur identifié, le 2<sup>ème</sup> utilisant un marqueur intracellulaire spécifique de l'une des populations épithéliales, tel que la CK13 qui marque spécifiquement les cellules basales. Après la validation du marquage, une  $4^{ème}$  étape consiste à tester le marquage sur des cellules dissociées, mais en suspension dans une solution déterminée afin de vérifier l'accessibilité de l'anticorps utilisé à son épitope sur des cellules vivantes qui n'ont pas subit de fixation cellulaire préalable. Enfin, si ce dernier marquage est positif, et après une 5<sup>ème</sup> étape de vérification du marquage identique à la 3<sup>ème</sup>, l'étape de tri cellulaire (6) pourrait être abordée pour procéder à la séparation des cellules de l'épithélium respiratoire préalable à l'étude de leur capacité proliférative, de leur capacité à générer un épithélium mucociliaire *in vitro* dans le modèle de culture en interface air-liquide (IAL) et *in vivo* dans le modèle de xénogreffe, et de leur expression de la télomérase.

# D.1.2. Tissus respiratoires humains et isolement des cellules épithéliales

Les tissus respiratoires (polypes nasaux) ont été obtenus par polypectomie nasale de patients qui ne manifestaient aucun autre signe clinique connu à l'heure de l'intervention. Les prélèvements ont été immédiatement transférés au laboratoire dans le milieu RPMI 1640 tamponné par 25 mM d'HEPES et supplémenté en antibiotiques, puis lavés plusieurs fois avec du RPMI préalablement refroidi à 4°C.

Un morceau de chaque polype a été immergé dans l'O.C.T., cryofixé dans les vapeurs d'azote liquide et conservé à -80°C pour une étude histologique et immunohistochimique de l'épithélium.

Les cellules épithéliales respiratoires ont été dissociées des polypes nasaux puis comptées avec une cellule de Malassez selon le protocole décrit dans le paragraphe C.1.1. Ces cellules ont été utilisées pour l'étude immunocytochimique des marqueurs cellulaires après cytospin et des marqueurs cellulaires en suspension, et pour le tri cellulaire en cytométrie en flux.

# D.1.3. Histologie et morphologie cellulaire

Une portion des polypes nasaux, des membranes de cultures en IAL et des xénogreffes ont été cryofixés dans l'O.C.T. et conservés à -80°C. Des coupes de 5 µm ont été réalisées et déposées sur des lames tannées. Ces coupes ont été, soit colorées avec le kit Rapid Chrome à l'hématoxyline-éosine pour leur étude histologique, soit conservées à -20°C pour leur étude immunohistochimique.

Les images des cultures cellulaires sur plastique avant et après le tri par cytométrie en flux ont été réalisées sur le microscope optique Nikon (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France) avec le logiciel Visilog 5 (Noesis). Les images des coupes de tissus respiratoires et de xénogreffes ont été réalisées sur le microscope Axiophot (Zeiss) avec le logiciel CoolSNAP (Roper Scientific).

# D.1.4. Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence

#### D.1.4.1. Les anticorps utilisés

Les anticorps utilisés pour notre étude ont été : la *Griffonia simplicifolia* isolectine B<sub>4</sub> couplée à la FITC (GSI-B4, 4 µg/mL) et l'anti-CD44 monoclonal de souris (IgG, clone A3D8, 1/100) sont de Sigma Aldrich. L'anti-AQP3 polyclonal de lapin (1/100) provient de chez Euromedex (Souffelweyersheim, France). L'anti- $\beta$ -tubuline humaine monoclonal de souris (IgG2b, clone KMX-1, 1/15000) est de chez Chemicon (Temecula, Etat Unis). L'anti-CD166 (IgG1 $\kappa$ , clone 105902, 1/10) couplé à la biotine, et l'anti-CXCR4 (IgG, clone 44716.111, 1/20) monoclonaux de souris proviennent de R&D Systems. L'anti- $\beta$ 2-nicotinique (IgG, clone C-20, 1/50), l'anti-CDw137 polyclonal de chèvre, ainsi que l'anti-IL-4R $\alpha$  (IgG, clone N-17, 1/75) et l'anti-CXCR2 (IgG, clone C-19, 1/20) polyclonaux de lapin proviennent de chez Santa Cruz Biotechnologies. L'anti- $\alpha$ 6 intégrine monoclonal de rat (IgG, clone G0H3, 1/100) provient de chez Immunotech (Marseille, France). L'anti- $\beta$ 4 intégrine monoclonal de souris (IgG, clone 3E1, 1/500) est de chez Gibco BRL.

Les anti-souris, anti-lapin et anti-rat fabriqués chez la chèvre, et l'anti-chèvre fabriqué chez l'âne, couplés à l'Alexa Fluor 488 et à l'Alexa Fluor 594 (IgG H+L, 1/200) proviennent de Molecular Probes. Les IgG1k non-immunes biotinylées de souris (clone MOPC-21, 1/20), proviennent de BD Biosciences (San Diego, Etat Unis). Le DAPI (200 ng/mL) provient de Sigma Aldrich.

Les autres anticorps utilisés ont déjà été cités dans matériels et méthodes de la partie précédente (C.1.7.2.).

## D.1.4.2. Marquage immunohistochimique sur coupes

Les coupes de tissus respiratoires, de membranes de cultures en IAL et de xénogreffes sont fixées à l'acétone pendant 10 min à -20°C. La suite de la procédure, résumée dans le tableau ci-dessous, se déroule à température ambiante :

Etape	Solution	Durée
Rinçage	PBS	15 min
Blocage des sites non spécifiques	PBS-BSA 3%	15-30 min
Anticorps primaire	PBS-BSA 1%	60 min
Rinçage	PBS	30 min
Anticorps secondaire couplé Alexa	PBS-BSA 1%	60 min
Rinçage	PBS	30 min
DAPI	PBS	10 min
Rinçage	PBS	15 min
Contre-coloration des noyaux	Hématoxyline de Harris	5 s
Rinçage	PBS	15 min
Montage des lamelles	Aquapolymount	-

Dans le cas des doubles marquages, les coupes ont été tout d'abord marquées avec l'anticorps primaire suivant la procédure décrite ci-dessus en révélant cet anticorps avec l'Alexa 488, puis, après une étape de lavage avec le PBS, les coupes ont été incubées avec des fragments Fab (H+L) d'un anticorps anti-souris (1/50 ; Jackson Immunoresearch) pendant 30 min pour bloquer les sites libres des anticorps primaires de souris. Après un lavage au PBS, les coupes ont été marquées avec un autre anticorps primaire suivant la procédure décrite précédemment, en révélant à l'Alexa 594. La fluorescence verte, rouge et bleue est observée avec un microscope à fluorescence Axiophot Z1 (Zeiss) et les images sont prises avec le logiciel AxioVision 4.5 (Zeiss).

Les contrôles négatifs ont été effectués en incubant les coupes avec les IgG non-immunes appropriées à la place de l'anticorps primaire.

La quantification des cellules positives est réalisée en comptant ces dernières sur une longueur bien déterminée de lame basale (ou de membrane pour les cultures en IAL), et exprimée en nombre de cellules positives par mm de membrane ou mmLB.

Les mêmes cellules comptées sont également exprimées en pourcentage de cellules positives par rapport au nombre de cellules totales constituant l'épithélium respiratoire.

#### D.1.4.3. Marquage immunocytochimique sur cellules « cytospinées »

Des cellules épithéliales sont cytospinées sur des lames tannées à l'aide du Cytospin 2 (Shandon) à la densité de  $6x10^4$  cellules / lame, cette méthode consistant à déposer par centrifugation des cellules à une vitesse bien définie (800 rpm pendant 10 min) sur une lame tannée. Les lames sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les lames des

cellules épithéliales cytospinées sont fixées à l'acétone à -20°C pendant 10 min, puis lavées au PBS pendant 15 min et incubées en PBS-BSA 3% pendant 30 min. Les cellules sont ensuite exposées à l'anticorps primaire dilué dans le PBS-BSA 1% pendant 1 h. Après un lavage au PBS pendant 30 min, les lames sont incubées dans l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 ou 594 dilué dans le PBS-BSA 1% pendant 1 h. Après lavage au PBS pendant 30 min, les cellules sont contre-colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 10 s, lavées au PBS pendant 15 min et montées avec le liquide de montage (Aquapolymount) pour l'observation de la fluorescence.

Pour la réalisation d'un double marquage, les lames sont incubées avec l'anticorps primaire révélé par l'anticorps secondaire couplé à l'une des Alexa, comme décrit ci-dessus. Ensuite, si les anticorps primaires utilisés proviennent de la même espèce, notamment de la souris, les cellules sont incubées avec les fragments Fab (H+L) anti-souris (la dilution sera la même que celle de l'anticorps primaire) pour bloquer les sites libres des anticorps primaires. Puis, après un lavage au PBS pendant 15 min, la même procédure décrite ci-dessus est reprise avec le second anticorps primaire, et l'anticorps secondaire ajouté sera couplé à l'autre Alexa. Les lames sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline et montées pour leur observation au microscope en fluorescence (Axiophot).

Dans les 2 cas, les IgG non-immunes appropriées sont utilisées pour réaliser les contrôles négatifs, selon la même démarche expérimentale.

Pour les quantifications cellulaires, le nombre de cellules positives pour le marqueur sélectionné est compté et exprimé en pourcentage du nombre total de cellules se trouvant sur la lame.

# D.1.4.4. Marquage immunocytochimique sur cellules en suspension

Les cellules en suspension (1 à  $2x10^6$ ) ont été obtenues après la dissociation des cellules épithéliales du polype nasal. Les cellules sont incubées en présence de PBS-BSA 3% pendant 30 min à 4°C, en agitant légèrement le tube de temps à l'autre. Les cellules sont centrifugées et suspendues dans du PBS-BSA 1% contenant l'anticorps primaire pendant 25 min à 4°C, avec agitation. Les cellules sont de nouveau centrifugées et lavées en PBS, centrifugées et resuspendues dans du PBS-BSA 1% contenant l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 pendant 25 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en PBS et resuspendues dans du PBS à une concentration de  $5x10^5$  cellules/mL, puis cytospinées sur des lames tannées. Les cellules sont alors fixées et perméabilisées avec l'éthanol 70%, leurs noyaux contre-colorés avec l'hématoxyline de Harris et enfin les lames sont montées avec le liquide de montage Aquapolymount pour leur observation au microscope.

Les IgG non-immunes appropriées sont utilisées selon la même démarche pour réaliser le contrôle négatif de l'expérience.

# D.1.5. Régénération des récepteurs de surface

Dans le cas où l'antigénicité d'un marqueur d'intérêt serait perdue après dissociation enzymatique d'un tissu, des essais de régénération de ce marqueur à la membrane plasmique sont réalisés comme suit. Des cellules dissociées des polypes nasaux sont ensemencées dans un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> dans le milieu de prolifération décrit dans la partie C.1., pendant 1 nuit à 37°C. Les cellules sont alors lavées avec du PBS stérile (sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>) plusieurs fois et incubées avec 5 mM d'EDTA (chélateur des ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>) (Sigma Aldrich) dilué dans du PBS, afin de les décrocher du fond du flacon de culture. Une fois détachées, les cellules sont lavées en PBS et cytospinées sur des lames tannées, avant marquage immunocytochimique.

# D.1.6. Cytométrie en flux

Les cellules épithéliales dissociées et comptées sont tamisées sur des tamis en nylon de 70  $\mu$ m (BD Biosciences), puis lavées en PBS sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> contenant 2 mM d'EDTA (PBS-EDTA). Les cellules sont ensuite centrifugées et suspendues dans du PBS-EDTA contenant 5% de BSA pendant 30 min à 4°C afin de saturer les sites non spécifiques de reconnaissance des anticorps.

#### D.1.6.1. Les anticorps utilisés

Les anticorps utilisés pour notre étude ont été : l'anti-facteur tissulaire humain (FT) monoclonal de souris purifié, ou couplé à la FITC (IgG1, 1/75 et 3  $\mu$ L/10<sup>6</sup> cellules respectivement) proviennent de American Diagnostica (Stamford, Etat Unis). L'anti-CD151 humain monoclonal de souris purifié, ou couplé à la PE (IgG1 $\kappa$ , clone 14A2.H1, 1/50 et 6  $\mu$ L/10<sup>6</sup> cellules respectivement), ainsi que l'isotype contrôle IgG1 non-immun de souris couplé à la PE (clone MOPC-21, 6  $\mu$ L/10<sup>6</sup> cellules) proviennent de BD Biosciences.

L'anti-souris polyclonal de chèvre couplé à la FITC (F(ab')<sub>2</sub>, 1:500) et l'isotype contrôle IgG1 non-immun de souris (clone DAK-GO1, 1/500) sont de chez DakoCytomation. L'isotype contrôle IgG1 non-immun de souris (3  $\mu$ L/10<sup>6</sup> cellules) est de chez Jackson Immunoresearch.

#### D.1.6.2. Analyse de la CK13

Après l'incubation des cellules avec le PBS-EDTA-BSA pendant 30 min, 2x10<sup>6</sup> cellules sont incubées avec 0,1% de saponine (Sigma Aldrich) diluée en PBS pendant 10 min à 4°C, afin de les perméabiliser. Les cellules sont ensuite lavées au PBS-EDTA et incubées avec l'anti-CK13 pendant 25 min à 4°C, puis avec l'anti-souris-FITC pendant 25 min à 4°C. Les IgG1 non-immuns de souris ont été utilisées comme isotype contrôle. Les cellules sont lavées 2 fois en PBS, suspendues dans du PBS-EDTA et analysées sur le FACSCalibur (BD Biosciences) afin de distinguer la population des cellules basales de celle des cellules cylindriques ciliées et sécrétoires.

#### D.1.6.3. Tri des cellules épithéliales

 $22,5 \pm 5,8 \times 10^6$  cellules en moyenne ont été utilisées dans chaque expérience. Les cellules ont été incubées en PBS-BSA-EDTA pendant 30 min puis incubées avec l'anti-CD151-PE et l'anti-FT-FITC, dilués dans le PBS-EDTA, pendant 20 min à 4°C. Les IgG $\kappa$ -PE et IgG1-FITC, dilués dans le PBS-EDTA, ont été utilisés comme isotypes contrôles. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec les PBS-EDTA et resuspendues dans la même solution. A ce moment, le DAPI a été ajouté aux cellules pour marquer les cellules dont l'intégrité cellulaire est altérée, et donc les cellules mortes.

Le tri cellulaire a été effectué sur le trieur FACSAria (BD Biosciences) équipé de 3 lasers, bleu, rouge et violet. Les cellules mortes ont été exclues de la population des cellules basales et de celle des cellules cylindriques en dressant un graphique DAPI-A vs. FSC-A (voir les résultats pour les graphiques). Les agrégats et les doublets cellulaires ont été exclus de la population des cellules basales par des graphiques SSC-W vs. SSC-H et FSC-W vs. FSC-H. Finalement, la population positive de cellules basales (CD151+/FT+) et la population négative de cellules cylindriques (CD151-/FT-) ont été sélectionnées et triées à la vitesse de 5000 événements / s (30 MHz de fréquence) en utilisant une option appelée « mask » réglée à 16 16 0 (option qui améliore le rendement et la pureté des cellules triées). Après le tri, les cellules ont été réanalysées dans le cytomètre pour vérifier leur pureté ainsi que leur viabilité.

Les cellules contrôles « non triées » subissent les mêmes traitements (lavages, incubation en PBS-BSA-EDTA, ...) à l'exception de l'incubation avec les anticorps et le passage dans le cytomètre. Une partie de ces cellules est incubée avec le DAPI et analysée par cytométrie en flux afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire de la population contrôle.

 $1x10^5$  cellules triées ont été cytospinées sur des lames tannées afin de vérifier leur pureté par immunocytochimie grâce à des marqueurs spécifiques aux cellules basales comme la CK13, et aux cellules sécrétoires comme le MUC5AC.

# **D.1.7.** Culture cellulaire

Les cellules contrôles non triées, ainsi que les cellules triées CD151+/FT+ et CD151-/FT- ont été ensemencées sur plastique (cultures 2D) dans des plaques 6 puits (BD Biosciences) à la densité de  $1,5x10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans le milieu de prolifération décrit dans la partie C.1. du manuscrit, pour évaluer la prolifération cellulaire.

Afin de déterminer la capacité de différenciation cellulaire in vitro des cellules triées, nous avons utilisé le modèle de culture en IAL (figure 48). Les cellules contrôles et triées ont été ensemencées à la densité de  $1.5 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> sur des membranes poreuses (0,4 µm de taille de pore) en polyester (Transwell) de 12 mm de diamètre (Corning Inc., New York, Etats Unis) recouvertes de collagène de type IV (Sigma Aldrich), et cultivées jusqu'à confluence dans le milieu de prolifération. Ce milieu a été ensuite éliminé définitivement du compartiment supérieur et remplacé dans le compartiment inférieur par le milieu BEBM (Cambrex Bio Science, Walkersville, Etats Unis) / DMEM high glucose (Gibco BRL) (1/1 vol/vol) supplémenté en 0,5 ng/mL d'EGF, 5 µg/mL d'insuline, 0,5 µg/mL d'hydrocortisone, 10 µg/mL de transferrine, 0.5 µg/mL d'épinéphrine, 6,5 µg/mL de triiodothyronine, 0,13 mg/mL d'extrait pituitaire bovin (Cambrex), 1,5 µg/mL de BSA, 0,1 µM d'acide rétinoique (Sigma Aldrich), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules sont alors en contact avec l'air au niveau de leur pôle apical, et en contact avec le milieu de culture au niveau de leur pôle basal, ce qui représente donc une culture en IAL. Toutes les cultures sont réalisées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cultures en IAL ont été récupérées après environ 25 à 35 jours de culture. Les membranes ont été cryofixées dans l'O.C.T afin de procéder aux études histologiques et immunohistochimiques des épithéliums régénérés.

Six tissus respiratoires humains ont été utilisés pour la réalisation de l'étude de la prolifération cellulaire des populations cellulaires triées et non triées, et 3 tissus pour les cultures en IAL.



Figure 48. Schéma de culture en interface air-liquide.

# D.1.8. Xénogreffes trachéales

Les xénogreffes ont été préparées selon la procédure décrite dans la partie C.1. Les cellules contrôles non triées, ainsi que les populations cellulaires triées ont été ensemencées à la densité de  $5 \times 10^5$  cellules / 80 µL dans le milieu de prolifération dans les trachées de rats dénudées qui ont été greffées sous la peau de souris nude. Les souris ont été sacrifiées après 35 jours, et les greffons ont été prélevés et cryofixés dans l'O.C.T. afin de procéder aux études histologiques et immunohistochimiques des épithéliums régénérés.

Trois tissus respiratoires humains ont été utilisés pour la réalisation des xénogreffes trachéales à partir de cellules triées et non triées.

# D.1.9. Détection de l'activité de la télomérase

#### D.1.9.1. Généralités

Les télomères sont formés par un complexe d'ADN (répétitions 5'-TTAGGG-3') et de protéines, et protègent les extrémités des chromosomes des cellules eucaryotes des fusions, réarrangements et translocations. L'ADN télomérique est synthétisé spécifiquement par la télomérase, une ribonucléoprotéine constituée d'un ARN et de plusieurs sous-unités protéiques dont une transcriptase inverse, appelée hTERT (human telomerase reverse transcriptase) chez l'humain, capable d'ajouter des répétitions (TTAGG)<sub>n</sub> à l'extrémité 3' des chromosomes tout en utilisant son propre ARN comme amorce (Blackburn *et al.*, 1992 ; Forsyth *et al.*, 2002).

Il est actuellement connu que les cellules souches et progénitrices expriment un certain nombre de marqueurs membranaires et cytoplasmiques qui leurs sont spécifiques, et qui les distinguent des autres types cellulaires de l'organisme. Chez l'humain, l'activité de la télomérase est faiblement détectée dans les cellules souches quiescentes, mais hautement active dans les cellules à activité proliférative importante, notamment les cellules progénitrices. Au contraire, la majorité des cellules somatiques sont télomérase négatives (Forsyth *et al.*, 2002). Par conséquent, les télomères de la majorité des cellules différenciées raccourcissent à chaque division cellulaire et ce phénomène est probablement une cause de la sénescence cellulaire. Ainsi, une détection de l'activité de la télomérase dans une population cellulaire quelconque constituerait un signe de présence de cellules progénitrices (Umemoto *et al.*, 2006).

# D.1.9.2. Principe

Dans notre expérience, si les cellules contiennent une télomérase active, cette dernière va se fixer sur une extrémité GTT d'une amorce TS (telomerase substrate) et va ajouter des répétitions GGTTAG. L'allongement de plusieurs fragments TS se produit en même temps ; le nombre de répétitions ajoutées est variable. Les fragments synthétisés diffèreront en taille de 6 bp.



Après cette première étape de rallongement du fragment TS, une autre amorce, le CXext, viendra se fixer à l'extrémité 3' du fragment rallongé pour synthétiser le brin complémentaire.



Le double brin formé va servir de matrice pour l'amplification par PCR des fragments allongés, les amorces de cette PCR étant les oligos TS et CXext en excès dans le milieu. Une échelle de bandes sera formée après révélation des produits de PCR, la différence de taille des fragments TS allongés étant de 6 pb.



L'amplification d'un fragment d'ADN servant de contrôle interne (le TSNT) est réalisée en parallèle. Ce contrôle de l'expérience permet également de vérifier l'absence d'inhibiteurs de Taq polymérase dans les extraits cellulaires étudiés. L'amorce NT va synthétiser le brin complémentaire de ce fragment et le double brin formé va servir de matrice pour la PCR utilisant les oligos TS et NT en excès dans le milieu.



#### D.1.9.3. Mode opératoire



Une partie des cellules triées positives et négatives est centrifugée et les culots cellulaires sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les culots cellulaires sont décongelés sur la glace. Le tampon de lyse CHAPS 1X servant à l'extraction des protéines est ajouté à chaque culot à raison de 50  $\mu$ L pour 1x10<sup>6</sup> cellules épithéliales. Il est constitué de 1% de CHAPS, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM d'EGTA, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM de benzamidine, 10% de glycérol et 5 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma Aldrich). Après une incubation d'1 h sur la glace, les tubes sont centrifugés à 12000 *g* pendant 20 min à 4°C et les surnageants sont transférés dans des tubes propres, et stockés à -80°C.

Pour le dosage protéique, les surnageants contenant les extraits des cellules triées positives et négatives sont décongelés sur la glace. Le dosage est effectué avec le kit Quick Start BioRad Assay (Biorad) selon le protocole du fournisseur. L'absorbance est mesurée sur le lecteur de microplaque Xenius à 595 nm, et les résultats sont exprimés en µg de protéines / mL. Les surnageants sont ensuite stockés à -80°C.

D.1.9.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est effectuée sur les extraits protéiques des cellules triées, sur les extraits protéiques d'un contrôle positif présentant une activité de la télomérase, et sur des contrôles négatifs.

Les amorces utilisées (Eurogentec) sont les suivantes :

TS: 5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-3' (MM = 5523,67 g/moL). CXext: 5'-GTG-CCC-TTA-CCC-TTA-CCC-TTA-CCC-TAA-3' (MM = 8066,32 g/moL). NT: 5'-ATC-GCT-TCT-CGG-CCT-TTT-3' (MM = 5407,57 g/moL). TSNT: 5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-AAA-AGG-CCG-AGA-AGC-GAT-3' (MM = 11176,38 g/moL).

La PCR est réalisée à partir de 800 ng d'extraits protéiques (dans 5  $\mu$ L d'eau) des cellules triées, 200 ng de protéines extraites de la lignée A549 utilisées comme contrôle positif, et de 5  $\mu$ L d'eau en tant que contrôle négatif.

Les tubes sont incubés dans le thermocycleur pendant 20 min à 30°C, puis subissent les cycles suivants :



A la fin de la PCR, les produits amplifiés sont séparés sur gel de polyacrilamide à 12%. Les bandes sont ensuite révélées sur le LAS-1000 après l'incubation des gels avec le SybrGold.

#### **D.1.10.** Analyses statistiques

Les résultats des quantifications cellulaires effectuées sont exprimés en moyenne ±écart type. Le test non-paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé pour les analyses statistiques. Une différence significative a été définie pour  $p \le 0.05$ .

# D.2. Résultats

# D.2.1. Discrimination de marqueurs cellulaires épithéliaux

Les marqueurs que nous avons testés ont été sélectionnés selon les données de la littérature en ce qui concerne l'épithélium respiratoire ou d'autres épithéliums.

En fonction de notre étude de discrimination des marqueurs cellulaires membranaires en immunohistochimie et immunocytochimie sur cellules cytospinées et sur cellules en suspension, les marqueurs testés ont été classés en trois catégories : marqueurs qui s'avèrent être non utilisables pour le tri des populations cellulaires car ils ne sont pas spécifiques d'une population cellulaire précise ou non exprimés, les marqueurs potentiellement utilisables car spécifiques d'une population cellulaire mais dont l'expression disparaît après dissociation enzymatique des tissus ou n'est pas détectable sur cellules en suspension, et enfin les marqueurs qui ont été retenus pour notre étude car spécifiques d'une population cellulaire, et dont l'antigénicité persiste après dissociation enzymatique des tissus et qui sont détectables sur cellules en suspension (tableau 6).

Marqueurs non	Marqueurs potentiellement	Marqueurs
utilisables	utilisables	retenus
GSI-B4	Sous unités intégrines α6 et β4	Facteur tissulaire
Aquaporine 3	CD44	CD151
CDw137	Récepteur β2-nicotinique	
CXCR2	IL-4Rα	
	CD166	

Tableau 6. Marqueurs testés sur l'épithélium respiratoire de surface humain adulte.

#### D.2.1.1. Marqueurs non utilisables

D.2.1.1.1. Lectine Griffonia simplicifolia isolectine B4 (GSI-B4)

Dans un premier temps, nous avons testé la GSI-B4 qui est une lectine bien connue comme marqueur de toutes les cellules basales chez la souris (Shimizu *et al.*, 1991). De plus, il a été décrit que cette lectine marque les cellules basales humaines de sujets de groupe sanguin B (Bals *et al.*, 1997). Malheureusement, la GSI-B4 n'a pas été détectée au niveau de l'épithélium respiratoire humain de surface de polypes nasaux de 3 patients différents utilisés dans le cadre de notre étude.

# D.2.1.1.2. L'aquaporine 3 (AQP3)

Dans la littérature, l'AQP3, un canal à eau, a été décrit comme étant spécifique (Nielsen *et al.*, 1997 ; Sato *et al.*, 2004) ou non-spécifique (Maeda *et al.*, 2005) des cellules basales de rat. Cependant chez l'humain, le marquage de l'épithélium respiratoire humain de surface a montré des résultats contradictoires. Kreda *et al.* l'ont mise en évidence au niveau des cellules basales (Kreda *et al.*, 2001), alors que Tsang *et al.* ont montré son expression sur toutes les cellules épithéliales (Tsang *et al.*, 2003). En 2005, nous avons montré que ce canal à eau est localisé au niveau des cellules basales fœtales humaines (Avril-Delplanque *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'AQP3 a été détectée au niveau des cellules épithéliales humaines adultes des polypes nasaux de 6 patients différents étudiés (figure 49).



Figure 49. Expression de l'AQP3 par l'épithélium respiratoire humain adulte de surface.

Toutes les cellules basales et cylindriques expriment l'AQP3 au niveau de leur membrane péricellulaire. Barre =  $50 \mu m$ .

# D.2.1.1.3. Le CXCR2

Le CXCR2 est, avec le CXCR1, un des récepteurs de l'IL-8. Il est exprimé principalement par les neutrophiles puisque l'IL-8 est l'agent chimiotactique le plus puissant vis-à-vis de ces cellules sanguines. Il n'existe à l'heure actuelle aucune publication qui décrit la distribution de l'expression du CXCR2 au niveau de l'épithélium respiratoire. Etant donné que l'IL-8 est sécrétée par l'épithélium de surface humain, comme nous l'avons décrit dans la partie C.1., nous avons procédé au marquage de CXCR2 sur des coupes de tissu épithélial respiratoire humain. Nous avons observé que toutes les cellules de l'épithélium respiratoire de polypes nasaux de 3 patients différents exprimaient le CXCR2 (figure 50).



Figure 50. Expression de CXCR2 par l'épithélium respiratoire humain adulte de surface.

Toutes les cellules, basales et cylindriques sont marquées. Barre =  $25 \ \mu m$ .

# D.2.1.1.4. Le CDw137

Les CDw137, ou 4-1BB chez la souris, appartient à la famille des récepteurs des « tumor necrosis factor ». Il a été décrit par Boussaud *et al.* comme exprimé de façon spécifique sur les cellules basales de l'épithélium respiratoire humain (Boussaud *et al.*, 1998). Cependant, dans notre étude nous n'avons pas pu mettre en évidence ce marqueur au niveau épithélial sur des coupes tissulaires de polypes nasaux issus de 3 patients différents. Cependant, sur des cellules épithéliales respiratoires cytospinées, le CDw137 marque une partie des cellules cylindriques, mais pas les cellules basales (figure 51).



#### Figure 51. Expression de CDw137 par les cellules épithéliales respiratoires isolées.

A droite, un double marquage effectué avec le CDw137 (en vert) et la CK13, marqueur spécifique des cellules basales (en rouge). Le CDw137 ne marque donc pas dans nos conditions expérimentales les cellules basales, mais se trouve localisé sur les cellules cylindriques (flèche). Grossissement = x250.

# D.2.1.2. Marqueurs potentiellement utilisables

Les marqueurs potentiellement utilisables marquent spécifiquement une population donnée de l'épithélium respiratoire de surface, mais sont sensibles à la digestion enzymatique ou présentent des problèmes d'accessibilité de l'anticorps à son épitope.

# D.2.1.2.1. Les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 4$ des intégrines

Comme décrit dans la partie B.1.2.1.4., ces 2 sous-unités forment l'intégrine  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 qui fait partie des hémidesmosomes se trouvant uniquement au niveau des cellules basales pour assurer l'ancrage d'épithéliums comme l'épiderme à la lame basale. Les sous-unités  $\alpha$ 6 et  $\beta$ 4 ont été décrites par notre laboratoire comme étant exprimées spécifiquement par les cellules basales épithéliales respiratoires (Coraux *et al.*, 1998). Cependant, après la dissociation enzymatique des tissus respiratoires humains, ces marqueurs montrent une expression très réduite au niveau de seulement une petite partie des cellules basales (figure 52). Cette réduction est due très probablement à la digestion des récepteurs par l'enzyme de dissociation.





A droite, un double marquage de l' $\alpha$ 6 (A) ou de la  $\beta$ 4 (B) (vert) et de la CK13 (rouge) a été réalisé. Quelques cellules basales seulement expriment ces 2 sous-unités après la dissociation enzymatique. Grossissement = x500.

Une expérience visant à rétablir l'expression de ces récepteurs sur la membrane plasmique des cellules basales a été réalisée sur les cellules isolées à partir de polypes nasaux issus de 4 patients différents. Les cellules isolées des tissus respiratoires ont été ensemencées sur plastique et incubées pendant 24 h à 37°C afin de permettre la régénération des récepteurs digérés. Les cellules ont été détachées à l'EDTA, un chélateur des ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> indispensables à l'adhérence cellulaire. Il apparaît alors qu'une plus grande partie des cellules basales, comme le confirme le marquage CK13, expriment les sous-unités d'intégrines  $\alpha 6$  et  $\beta 4$  (figure 53). Cependant, nous avons choisi de ne pas utiliser ce genre de cellules pour le tri cellulaire pour plusieurs raisons. Premièrement, nous avons observé qu'il existe des cellules marquées positivement pour  $\alpha 6$  et  $\beta 4$ , mais qui ne sont pas positives pour la CK13 (figure 53), ce qui signifierait qu'il y a eu des remaniements au niveau du cytosquelette cellulaire. Deuxièmement, après l'étape de régénération membranaire, nous avons remarqué que le nombre de cellules recueillies devient insuffisant pour procéder au tri cellulaire.



# Figure 53. Expression des intégrines α6 et β4 par les cellules épithéliales respiratoires cytospinées après une étape d'adhérence de 24 h.

A droite, un double marquage  $\alpha 6$  (A) ou  $\beta 4$  (B) (vert) et CK13 (rouge) a été réalisé. Notons la présence de cellules qui sont positives pour l'un de ces récepteurs mais négatives pour la CK13 (flèches). Grossissement = x250.

# D.2.1.2.2. Le CD44

Le CD44 est le récepteur de l'acide hyaluronique exprimé sur une variété de cellules de l'organisme (Mackay *et al.*, 1994), particulièrement sur les cellules basales de l'épithélium respiratoire de surface humain adulte (Peroni *et al.*, 1996). Nous avons pu mettre en évidence son expression au niveau des cellules basales des polypes nasaux issus de 4 patients différents (figure 54A). Cependant, comme les sous-unités  $\alpha$ 6 et  $\beta$ 4, le CD44 disparaît partiellement après la digestion enzymatique des tissus respiratoires (figures 54B). La même expérience de régénération des antigènes de surface du CD44 par adhérence cellulaire a été réalisée sur des cellules issues des polypes nasaux de 7 patients différents. Nous avons pu observer la régénération d'une partie des antigènes CD44 (figure 54C), mais, pour les raisons exposées au paragraphe précédent, nous n'avons pas retenu ce marqueur.



# Figure 54. Expression de CD44 par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines de surface.

A : le CD44 marque les cellules basales. B : après dissociation des cellules épithéliales, le CD44 (vert) disparaît de la surface des cellules basales, quelques cellules seulement restent marquées (flèche). C : le CD44 (vert) réapparaît sur les cellules basales comme le confirme la présence de la CK13 (rouge). Cependant, certaines cellules CD44-positives ne sont pas CK13-positives (flèche). Barre = 50  $\mu$ m. Grossissement de B = x500, de C =x250.

# D.2.1.2.3. La chaîne $\beta$ 2 des récepteurs nicotiniques

Le récepteur  $\beta$ 2-nicotinique est l'un des récepteurs cellulaires membranaires de l'acétylcholine, intervenant dans la contraction musculaire, ainsi que dans des phénomènes comme la migration cellulaire et la réparation de l'épithélium respiratoire dans lequel il est exprimé sur les cellules basales de façon spécifique (Tournier *et al.*, 2006), comme nous avons pu le vérifier sur les polypes nasaux de 2 patients différents (figure 55A). Un marquage sur cellules cytospinées issues de 4 patients différents révèle également sa localisation spécifique sur les cellules basales (figure 55B), montrant sa résistance à la digestion enzymatique effectuée après la dissociation cellulaire. Malheureusement, un marquage effectué sur des cellules vivantes en suspension issues de 4 patients ne montre aucune positivité de ce récepteur sur les cellules basales. Ceci est dû à un problème d'accessibilité de l'anticorps à son épitope, puisque après avoir réalisé un marquage sur des cellules en suspension fixées à l'éthanol 70%, le marquage membranaire est retrouvé.



# Figure 55. Expression du récepteur β2-nicotinique par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.

A droite, le récepteur (vert) montre sa positivité sur les cellules basales de l'épithélium respiratoire (A) et sur les cellules basales isolées cytospinées (B) exprimant la CK13 (rouge), les cellules cylindriques n'étant pas marquées (flèches). Barre =  $50 \mu m$ . grossissement = x250.
## D.2.1.2.4. Le récepteur IL-4Ra

L'IL-4R $\alpha$  est l'une des sous-unités qui constituent le récepteur de l'IL-13 et de l'IL-4. Il est exprimé sur une variété de cellules, particulièrement sur les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire humain (Akaiwa *et al.*, 2001). Nous avons pu détecter son expression au niveau des cellules basales de l'épithélium respiratoire dans 42% des échantillons tissulaires de 7 patients différents, ainsi qu'au niveau des cellules ciliées comme décrit préalablement (Akaiwa *et al.*, 2001) (figure 56A). Le marquage sur cellules cytospinées issues de 4 patients différents a permis la détection de ce marqueur sur les cellules basales de façon spécifique, mais pas au niveau des cellules ciliées (figure 56B). Comme le récepteur  $\beta$ 2nicotinique, nous n'avons pas détecté la présence du récepteur IL-4R $\alpha$  sur cellules vivantes en suspension, mais bien sur des cellules en suspension fixées à l'éthanol.



## Figure 56. Expression du récepteur IL-4Ra par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.

L'épithélium respiratoire voit ses cellules basales exprimer ce marqueur (A). Isolées, les cellules basales sont également marquées par l'IL-4R $\alpha$  (vert). Toutes les cellules marquées coexpriment la CK13 (rouge), les cellules cylindriques n'étant pas marquées (flèches) (B). Barre = 50  $\mu$ m. Grossissement = x500.

## D.2.1.2.5. Le CD166

B

Le CD166 ou ALCAM pour « activated leucocyte cell adhesion molecule» est une molécule qui appartient à la famille des immunoglobulines, mise en jeu au cours du développement des systèmes hématopoïétique et nerveux (Uchida *et al.*, 1997), et impliquée dans la migration, le développement et la progression tumorale (Jezierska *et al.*, 2006). Son expression a été montrée au niveau des cellules souches hématopoïétiques précoces, ainsi que les cellules stromales de la moelle osseuse (Cortes *et al.*, 1999). Au niveau de l'épithélium respiratoire, nous avons récemment mis ce marqueur en évidence sur la membrane plasmique latérale des cellules cylindriques de l'épithélium respiratoire humain fœtal (Avril-Delplanque *et al.*, 2005) (figure 57A). Cependant, il s'est avéré après dissociation des polypes nasaux issus de 5 patients différents qu'il n'est pas résistant à l'enzyme protéolytique (figure 57B).





Figure 57. Expression de CD166 par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.

A : le CD166 est localisé au niveau membranaire des cellules cylindriques. B : le CD166 en vert est digéré après la dissociation enzymatique et reste exprimé sur quelques cellules (flèche) non basales CK13-positives en rouges. Barre =  $50 \mu m$ . Grossissement = x500.

### D.2.1.3. Marqueurs retenus

Finalement, nous avons identifié deux marqueurs remplissant tous les critères indispensables à une utilisation pour un tri cellulaire par cytométrie en flux. Ces marqueurs sont le facteur tissulaire (FT) et le CD151, spécifiquement exprimés par les cellules basales.

D.2.1.3.1. Le facteur tissulaire

Le FT ou CD142 est le récepteur membranaire du facteur VII/VIIa de la coagulation. Il est identifié en faibles concentrations dans le plasma, et est exprimé sur une variété de types cellulaires comme les monocytes stimulés par le LPS (Mattsson *et al.*, 2004), et dans plusieurs tissus extravasculaires (Wilcox *et al.*, 1989 ; Rao *et al.*, 1998 ; Forster *et al.*, 2006). Dans les voies aériennes, le facteur tissulaire a été décrit sur la surface des cellules basales adultes humaines de surface (Imokawa *et al.*, 1997).

Nous avons pu observer l'expression de ce marqueur au niveau de l'épithélium respiratoire de surface de polypes nasaux de 7 patients différents. Le marquage du FT se situe spécifiquement au niveau de la membrane plasmique péricellulaire des cellules basales, comme le confirme un double marquage avec la CK13 (figure 58A).

Quand les cellules épithéliales sont dissociées des tissus respiratoires et cytospinées, l'expression du FT persiste sur toutes les cellules basales, comme le confirme le double marquage avec la CK13 (figure 58B).

De plus, le marquage effectué sur cellules vivantes en suspension a montré la présence du FT sur les cellules basales positives à la CK13 (figure 58C).



Figure 58. Expression du FT par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.

Le marquage en vert correspond au FT, et en rouge à la CK13. A : le FT est spécifique aux cellules basales puisqu'il est colocalisé parfaitement avec la CK13. B et C : le marquage du FT ne disparaît pas sur cellules cytospinées après dissociation, ou cytospinées après marquage en suspension respectivement. Les cellules cylindriques ne sont pas marquées (flèches). Coloration des noyaux en bleu par le DAPI (A). Lu = lumière, m = mésenchyme. Barre =  $25 \mu m$ . Grossissement = x500.

## D.2.1.3.2. Le CD151

Le CD151, appelé aussi PETA-3 pour « platelet endothelial tetraspan antigen-3 » (Fitter *et al.*, 1995), appartient à la famille des tétraspanines qui sont des glycoprotéines de surface de 200 à 300 acides aminés (Rubinsstein *et al.*, 2006). Il constitue le composant majeur des pré-hémidesmosomes et joue un rôle important dans la formation et la stabilité des hémidesmosomes (Sterk *et al.*, 2000), en interagissant principalement avec les intégrines, notamment l' $\alpha$ 6 $\beta$ 4 (Sterk *et al.*, 2002). Le CD151 est exprimé par une grande variété de types

cellulaires (Ashman *et al.*, 1991), parmi lesquels les cellules des voies aériennes (Sincock *et al.*, 1997).

Dans notre étude, sur les polypes nasaux de 3 patients différents, un marquage dirigé contre le CD151 a montré qu'il est spécifiquement exprimé sur la membrane plasmique des cellules basales épithéliales respiratoires humaines adultes, la spécificité étant vérifiée avec un co-marquage avec la CK13 (figure 59A). Comme le FT, le CD151 est toujours exprimé par les cellules basales CK13-positives quand ces dernières sont isolées à partir des tissus respiratoires par digestion enzymatique (figure 59B).

Finalement, après marquage sur cellules en suspension, les cellules basales CK13-positives vivantes expriment ce marqueur sur leur membrane plasmique péricellulaire (figure 59C).



Figure 59. Expression du CD151 par l'épithélium et les cellules épithéliales respiratoires humaines.

Le CD151 est en vert, et la CK13 en rouge. Comme le FT, le CD151 marque bien les cellules basales CK13-positives dans l'épithélium respiratoire de surface humain (A), lorsqu'elles sont isolées (B) et lorsqu'elles sont en suspension (C). Noyaux en bleu par le DAPI (A). Lu = lumière, m = mésenchyme. Barre =  $25 \mu m$ . Grossissement = x500.

### D.2.1.3.3. Co-localisation du FT et du CD151

Après avoir effectué les marquages du FT et du CD151 sur tissus et sur cellules isolées, nous avons réalisé un double marquage avec ces 2 marqueurs sur l'épithélium respiratoire de surface des polypes nasaux de 3 patients différents afin de voir s'ils sont bien colocalisés. Comme attendu, nous avons trouvé que le FT et le CD151 sont parfaitement colocalisés au niveau de toutes les cellules basales épithéliales (figure 60).



Figure 60. Double marquage du FT et du CD151 sur l'épithélium respiratoire humain.

En vert le CD151 et en rouge le FT. Ces 2 marqueurs colocalisent sur toutes les cellules basales de l'épithélium respiratoire. Les noyaux sont colorés en bleu par le DAPI. Lu = lumière, m = mésenchyme. Barre =  $25 \mu m$ .

## D.2.2. Cytométrie en flux

Avant de procéder au tri cellulaire, nous avons étudié le profil des cellules épithéliales respiratoires humaines par cytométrie en flux afin de localiser les différentes populations cellulaires qui constituent l'épithélium respiratoire.

# D.2.2.1. Localisation de la population des cellules basales sur un profil de cytométrie en flux

Les cellules épithéliales respiratoires ont été dissociées des polypes nasaux et tamisées. Ensuite, elles ont été marquées par l'anticorps anti-CK13 pour identifier les cellules basales en suspension. Après analyse en cytométrie en flux, la distribution de la population des cellules épithéliales dans un graphe FSC vs. SSC suggère que les cellules basales sont localisées dans R1, et ce, d'après leur aspect physique (taille/granulométrie) (figure 61A). L'analyse de la CK13 confirme ces observations puisque la population positive se trouve dans R1 (figure 61C) et non pas dans R2 (figure 61E). Ainsi, les cellules qui se trouvent dans R1 sont les cellules basales, et celles dans R2 sont les cellules cylindriques sécrétoires et ciliées.



Figure 61. Localisation de la population des cellules basales par cytométrie en flux.

L'anticorps anti-CK13 a été révélé par la FITC. L'isotype contrôle dans (B) a été réglé sur R1 et dans (D) sur R2. Les cellules basales sont de petites tailles et largement moins complexes que les cellules cylindriques. FSC = forward scatter (définit la taille cellulaire), SSC = side scatter (définit la complexité cellulaire).

La localisation précise de la population des cellules basales sur un profil de cytométrie en flux nous a permis par la suite de procéder au tri des cellules grâce aux marqueurs identifiés, le FT et le CD151.

## D.2.2.2. Tri des cellules épithéliales respiratoires par cytométrie en flux

## D.2.2.2.1. Histologie des tissus respiratoires dissociés

Pour chaque tri cellulaire, nous avons voulu nous assurer que les cellules isolées des tissus respiratoires proviennent de l'épithélium de surface uniquement, et non pas des cellules canalaires et glandulaires sous-muqueuses. En effet, comme nous l'avons abordé dans le paragraphe B.3.2.3., les cellules des canaux glandulaires pourraient constituer une niche de cellules souches. Nous avons réalisé des coupes de tissus respiratoires qui ont été traités avec l'enzyme protéolytique pour dissocier les cellules. Des coupes sériées ont montré que les cellules des structures glandulaires sont intactes (figure 62A), ainsi que les cellules canalaires (figure 62B).



Figure 62. Histologie des tissus respiratoires traités à la collagénase de type XIV.

Quand les tissus respiratoires sont traités à la collagénase, la lame basale (flèches) se retrouve dénudée, sans cellules épithéliales de surface. Par contre, les cellules glandulaires (A) et canalaires (B) restent intactes. Barre =  $100 \mu m$ .

## D.2.2.2.2. Tri cellulaire

Les cellules épithéliales dissociées ont été tamisées et doublement marquées avec les anticorps anti-FT et anti-CD151. Une série de graphes de cytométrie en flux a servi pour le tri des cellules épithéliales respiratoires basales et cylindriques (figure 63).



#### Figure 63. Tri des cellules épithéliales respiratoires par cytométrie en flux.

Les isotypes contrôles (IgG non-immunes) ont été réglés sur P1 (cellules basales) et P6 (cellules cylindriques). Les cellules mortes ont été éliminées des cellules basales dans P2 (créée à partir de P1), les doublets éliminés dans P3 et P4 (créées à partir de P2 et P3 respectivement), et les cellules positives aux marqueurs sélectionnés ont été circonscrites et triées dans P5. La même démarche a été suivie pour les cellules cylindriques (cellules mortes éliminées dans P7 créée sur P6, et cellules négatives sélectionnées et triées dans P8). Les agrégats n'ont pas été éliminés des cellules cylindriques à cause de l'importante complexité de cette population.

Après avoir réglé les photomultiplicateurs du cytomètre sur la position des isotypes contrôles (IgG non-immunes couplées à la FITC et à la PE) dans la figure ci-dessus, les cellules basales et cylindriques ont été circonscrites dans un graphe SSC-A vs. FSC-A (où A = area ou surface, c'est-à-dire la somme de l'intensité de fluorescence et du temps de passage de la cellule devant le laser). Les cellules mortes ont été éliminées des 2 populations cellulaires dans des graphes DAPI-A vs. FSC-A. Ensuite, les doublets et les agrégats cellulaires ont été éliminés de la population des cellules basales uniquement dans les graphes SSC-W vs. SSC-H et FSC-W vs. FSC-H (où w = width, c'est-à-dire le temps de passage de la cellule devant le laser, et H = height, c'est-à-dire l'intensité de la fluorescence émise par la cellule ; H+W = A). Finalement, les cellules positives au FT et au CD151 dans la population des cellules basales, ainsi que les cellules négatives pour ces marqueurs dans la population des cellules cylindriques ont été circonscrites dans des graphes PE-A vs. FITC-A.

Le nombre de cellules triées à partir des polypes issus de 9 patients différents a été de  $5.4 \pm 1.9 \text{ x}10^6$  cellules basales CD151+/FT+, et  $1.1 \pm 0.6 \text{ x}10^6$  cellules cylindriques CD151-/FT-, et leurs pourcentages par rapport à la population d'origine issue des polypes de  $25 \pm 9\%$ et  $4,8 \pm 3,1\%$  respectivement.

La ré-analyse des cellules triées par le DAPI a montré une viabilité cellulaire de  $99,2 \pm 0,4\%$ pour les cellules basales, et  $98.9 \pm 0.6\%$  pour les cellules cylindriques.

#### D.2.2.2.2.1. Morphologie des cellules triées

Une partie des cellules triées CD151+/FT+ et CD151-/FT- a été cytospinée sur des lames tannées. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline de Harris et observées au microscope optique (figure 64).

Cellules CD151+/FT+

Cellules non-triées Cellules CD151-/FT-

#### Figure 64. Morphologie des cellules épithéliales respiratoires non-triées et triées.

Les cellules basales CD151+/FT+ sont de petite taille avec un rapport nucléocytoplasmique très élevé. Les cellules cylindriques CD151-/FT- contiennent les cellules ciliées bien visibles grâce à leurs cils (flèches), et les cellules sécrétoires (têtes de flèches). Grossissement = x250.



La ré-analyse par cytométrie en flux des cellules triées a montré une pureté de 99,5  $\pm$  0,3% des cellules basales CD151+/FT+, et de 97,9  $\pm$  0,7% des cellules cylindriques CD151-/FT- (figure 65).



Figure 65. Pureté par cytométrie en flux des populations cellulaires épithéliales triées.

De plus, une seconde vérification de la pureté des cellules triées a été réalisée en immunocytochimie. Pour cela, nous avons cytospiné une partie des cellules triées, positives et négatives, sur des lames tannées. Les marqueurs CK13 des cellules basales, et MUC5AC des cellules sécrétoires ont été utilisés pour identifier les cellules contaminantes dans les 2 populations cellulaires triées.

La détection immunocytochimique de MUC5AC dans les cellules basales CD151+/FT+ triées a révélé l'existence de  $0,04 \pm 0,03\%$  de cellules sécrétoires contaminantes. Selon cette étude immunocytochimique, la population triée positive CD151+/FT+ est pure à 99,96%, ce qui est en accord avec la pureté obtenue par cytométrie en flux. La détection de la CK13 dans les cellules CD151-/FT- a montré que  $1,2 \pm 0,2\%$  des cellules sont des cellules basales contaminant la population des cellules cylindriques, ce qui est également en accord avec les résultats de l'analyse cytométrique effectuée.

En plus de la pureté, nous avons quantifié le pourcentage des cellules sécrétoires et ciliées dans la population CD151-/FT- de cellules cylindriques, et ce, à l'aide du MUC5AC

Les populations triées sont réapparues dans leurs fenêtres de tri d'origines. Notons quand même la redistribution cellulaire des cellules épithéliales qui est tout à fait normale.

pour les cellules sécrétoires, et morphologiquement pour les cellules ciliées. Nous avons trouvé que  $23,5 \pm 6,1\%$  des cellules cylindriques totales sont des cellules sécrétoires, et  $60,5 \pm 5,8\%$  sont des cellules ciliées.

## D.2.3. Fonctionnalité des cellules triées

Le but principal de la séparation des populations de cellules basales et cylindriques de l'épithélium respiratoire humain était de tester leur capacité à proliférer et à régénérer un épithélium respiratoire pseudostratifié mucociliaire *in vitro* et *in vivo*.

### D.2.3.1. In vitro

D.2.3.1.1. Cultures des cellules non-triées et triées sur plastique

Les cellules épithéliales respiratoires triées à partir des polypes nasaux de 6 patients différents ont été ensemencées dans des plaques de culture. Nous avons observé que les cellules basales CD151+/FT+ ont adhéré au support plastique, et ce, quelques heures après leur ensemencement, ce qui démontre la nature non-bloquante des anticorps anti-FT et anti-CD151 utilisés. Ces cellules ont proliféré jusqu'à confluence (figure 66B), de façon similaire aux cellules contrôles qui sont les cellules non-triées (figure 66A). Les cellules cylindriques CD151-/FT- quant à elles n'ont pas adhéré (figure 66C).



Figure 66. Capacité d'adhérence et de prolifération des cellules épithéliales respiratoire nontriées et triées.

Grossissement = x400.

### D.2.3.1.2. Cultures des cellules non-triées et triées en interface air-liquide

Les cellules épithéliales respiratoires issues de 3 patients différents ont été ensemencées sur des membranes poreuses recouvertes de collagène de type IV. Comme sur le

plastique, les cellules CD151+/FT+ ont adhéré et proliféré sur les membranes poreuses jusqu'à confluence, puis ont été mises à l'IAL. Nous avons pu observer qu'après 30 jours en IAL, les cellules sont capables de se différencier et de reconstituer un épithélium respiratoire mucociliaire (figure 67B) comparable à celui restauré à partir des cellules non-triées (figure 67A). A l'inverse, les cellules cylindriques CD151-/FT- n'ont pas adhéré dans ce modèle, et n'ont pas permis donc la reconstitution d'un épithélium respiratoire (figure 67C).



Figure 67. Capacité de régénération d'un épithélium respiratoire mucociliaire *in vitro* à partir des cellules épithéliales respiratoires non-triées et triées.

ca = compartiment apical, cb = compartiment basal. Barre = 25  $\mu$ m.

## D.2.3.2. In vivo

Nous avons également testé la capacité de différenciation *in vivo* des cellules épithéliales respiratoires triées à partir des polypes nasaux de 3 patients différents. Pour cela, nous les avons ensemencées dans des trachées de rats dénudées de leur propre épithélium puis greffées sous la peau de souris nude.

Après 35 jours de greffe, nous avons observé que les cellules CD151+/FT+ ont pu reconstituer un épithélium respiratoire pseudostratifié mucociliaire (figure 68B) identique à celui régénéré par les cellules contrôles non-triées (figure 68A), alors que les cellules négatives CD151-/FT- n'ont pas régénéré d'épithélium respiratoire (figure 68C).



Figure 68. Capacité de régénération *in vivo* des cellules épithéliales respiratoires non-triées et triées. Lu = lumière, m = mésenchyme. Barre = 25 μm.

## D.2.4. Caractérisation phénotypique des épithéliums régénérés

Les cellules basales CD151+/FT+, comme les cellules contrôles non triées, ont permis la régénération d'un épithélium respiratoire morphologiquement différencié *in vitro* et *in vivo*, alors que ceci n'est pas le cas des cellules cylindriques CD151-/FT-.

Afin de vérifier que les épithéliums régénérés, à partir des cellules basales issues du tri positif, sont bien différenciés, nous avons réalisé sur des coupes de cultures en IAL et des coupes de xénogreffes des marquages immunohistochimiques de marqueurs de différenciation généralement exprimés dans l'épithélium respiratoire de surface humain mature *in vivo*. Ces marqueurs sont : la CK13 spécifique des cellules basales, la CK18 spécifique des cellules cylindriques, le MUC5AC spécifique des cellules sécrétoires, la  $\beta$ -tubuline spécifique des cellules ciliées, le ZO-1, marqueur de l'intégrité de la barrière épithéliale et CFTR, canal chlorure exprimé sur la membrane apicale des cellules ciliées complètement différenciées. De plus, nous avons également recherché l'expression des marqueurs utilisés pour effectuer le tri cellulaire.

## D.2.4.1. Epithéliums régénérés en culture en interface air-liquide

Un double marquage immunohistochimique sur les coupes des membranes des cultures en IAL (n=3) du FT et du CD151 a confirmé la présence de ces 2 marqueurs sur les cellules basales des épithéliums régénérés à partir des cellules CD151+/FT+ (figure 69), de la même façon que sur les épithéliums contrôles régénérés à partir des cellules non-triées.



## Figure 69. Expression de FT et CD151 sur les épithéliums régénérés en culture en IAL à partir des cellules non-triées et triées.

Le FT (vert) et le CD151 (rouge) colocalisent parfaitement (jaune / orange) sur les cellules basales des épithéliums reconstitués. Noyaux en bleu par le DAPI. ca = compartiment apical, cb = compartiment basal. Barre =  $25 \mu m$ .

La détection immunohistochimique des marqueurs de différenciation cellulaire cités précédemment a montré la présence de ces différents marqueurs au niveau de la localisation attendue sur tous les épithéliums régénérés à partir des cellules basales triées, similairement aux contrôles régénérés à partir des cellules non-triées (figure 70). Les cellules basales expriment la CK13 et les cellules cylindriques la CK18 au niveau de leur cytoplasme. Quelques cellules sécrétoires sont mises en évidence par leur expression de MUC5AC et les cils des cellules ciliées sont marqués grâce à la  $\beta$ -tubuline. Nous avons observé un réseau ZO-1 au niveau apical du pôle baso-latéral des épithéliums régénérés, ainsi que la présence du canal CFTR.





Après avoir confirmé la différenciation de tous les épithéliums régénérés dans les cultures en IAL, nous avons procédé à la quantification des 3 types cellulaires principaux qui constituent

l'épithélium respiratoire afin de déterminer s'il existe une différence de distribution des cellules basales, sécrétoires et ciliées entre les épithéliums régénérés à partir des cellules basales CD151+/FT+ et les cultures régénérées à partir des cellules non-triées (tableau 7).

	Nombre de	e cellules/mm	membrane	Pourcentage de cellules			
	Cellules CK13+	Cellules MUC5AC+	Cellules β- tubuline+	Cellules CK13+	Cellules MUC5AC+	Cellules β- tubuline+	
Contrôles	$97,4 \pm 3,1$	$2,3 \pm 0,3$	$165,3 \pm 23,4$	$32,3 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$	$53,2 \pm 8,7$	
CD151+/FT+	$102,2 \pm 4,5$	$2,4 \pm 0,6$	$172,9 \pm 14,3$	$32,2 \pm 1,9$	0,8 ± 0,2	$55 \pm 2,4$	
Valeur de <i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

 

 Tableau 7. Quantification des différentes populations cellulaires épithéliales après régénération en culture en IAL. ns = différence statistique non significative.

D'après les résultats obtenus et les calculs statistiques, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les nombres et pourcentages de cellules basales, sécrétoires et ciliées dans les épithéliums contrôles et les épithéliums régénérés avec les cellules CD151+/FT+ triées.

## D.2.4.2. Epithéliums régénérés dans les xénogreffes

Comme pour les épithéliums régénérés en culture en IAL, un double marquage du FT et du CD151 sur les coupes de xénogreffes (n=3) a confirmé la présence de ces 2 marqueurs sur les cellules basales des épithéliums régénérés à partir des cellules CD151+/FT+ (figure 71), de la même façon que dans les épithéliums contrôles régénérés.



## Figure 71. Expression de FT et CD151 par les épithéliums régénérés en xénogreffes à partir des cellules non-triées et triées.

Le FT (vert) et le CD151 (rouge) colocalisent parfaitement (jaune / orange) sur les cellules basales des épithéliums reconstitués. Noyaux en bleu colorés par le DAPI. Lu = lumière, m = mésenchyme. Barre =  $25 \mu m$ .

Les marqueurs de différenciation cellulaire présentés précédemment ont été étudiés pour analyser la différenciation des épithéliums régénérés *in vivo* dans le modèle de xénogreffe dans la souris nude à partir de cellules CD151+/FT+ triées et à partir des cellules non-triées (figure 72). Les cellules basales expriment la CK13 et les cellules cylindriques la CK18 au niveau de leur cytoplasme. Plusieurs cellules sécrétoires sont mises en évidence par leur expression de MUC5AC et les cils des cellules ciliées sont marqués grâce à la  $\beta$ -tubuline. Nous avons observé un réseau ZO-1 au niveau apical du pôle baso-latéral des épithéliums régénérés, ainsi que la présence du canal CFTR.



## Figure 72. Expression des marqueurs de différenciation par les épithéliums régénérés dans les xénogreffes.

Noyaux en bleu par le DAPI. Lu = lumière, m = mésenchyme. Barre =  $25 \mu m$ .

Les marqueurs de différenciation ont été retrouvés au niveau de leur localisation attendue dans les épithéliums régénérés à partir des cellules basales triées avec le CD151 et le FT, ainsi que dans les épithéliums contrôles.

Après avoir confirmé la différenciation des épithéliums régénérés *in vivo*, nous avons procédé à la quantification du nombre de cellules basales, sécrétoires et ciliées dans ces épithéliums afin de déterminer l'existence d'une éventuelle différence entre les épithéliums régénérés à partir des cellules CD151+/FT+ et les contrôles régénérés à partir des cellules non-triées (tableau 8).

	Nombre de cellules/mmLB			Pourcentage de cellules			
	Cellules CK13+	Cellules MUC5AC+	Cellules β-tubuline+	Cellules CK13+	Cellules MUC5AC+	Cellules β-tubuline+	
Contrôles	94,9 ± 13	$31,1 \pm 14,5$	$138 \pm 4,6$	$27,5 \pm 2,5$	$8,9 \pm 4,3$	$39,2 \pm 4,9$	
CD151+/FT+	$95,3 \pm 4,2$	$34,8 \pm 5,1$	$145,1 \pm 20,7$	$26,2 \pm 2,8$	9,6 ± 1,2	$40,5 \pm 5,9$	
Valeur de <i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

 Tableau 8. Quantification des différentes populations cellulaires épithéliales après régénération dans les xénogreffes. ns = différence statistique non significative.

Dans le modèle de xénogreffe, nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les nombres et les pourcentages des cellules basales, ciliées et sécrétoires dans les épithéliums régénérés à partir des cellules CD151+/FT+ et dans les épithéliums contrôles. Notons que ces pourcentages obtenus sont en accord avec les pourcentages observés *in vivo* dans l'épithélium humain (Mercer *et al.*, 1994).

Dans les 2 modèles de régénération épithéliale respiratoire (IAL et xénogreffe), les cellules basales CD151+/FT+ ont permis la reconstitution d'un épithélium respiratoire pseudostratifié mucociliaire différencié identique à celui observé *in vivo* dans les voies aériennes humaines adultes. Ceci confère aux cellules basales une caractéristique de cellules progénitrices, c'est-à-dire des cellules capables de générer plusieurs autres types cellulaires, notamment dans notre cas les cellules sécrétoires et ciliées.

## D.2.5. Activité de la télomérase dans les cellules triées

Les cellules triées CD151+/FT+ et CD151-/FT- ont fait l'objet d'une étude de leur activité de la télomérase par la technique TRAP. Comme nous l'avons signalé auparavant, l'activité de la télomérase se traduit par la présence d'une échelle de bandes différentes les unes des autres de 6 pb de taille. Nos résultats montrent que les cellules basales qui dérivent du tri positif, CD151+/FT+, présentent une activité claire de la télomérase. A l'inverse, les

cellules cylindriques triées CD151-/FT- ne montrent aucune activité de la télomérase (figure 73).



Figure 73. Détection de l'activité de la télomérase dans les cellules épithéliales triées.

-Taq = sans Taq polymérase, +Taq = avec Taq polymérase. Le contrôle positif est constitué d'extraits protéiques de la lignée A549. Les contrôles internes sont réalisés avec les fragments TSNT. Les bandes de dimères TS+CXext ne comptent pas dans l'activité de la télomérase.

Nos résultats montrent que la population des cellules basales contient des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire humain de surface, ce qui est mis en évidence par leur activité de la télomérase ainsi que par leur capacité à générer un épithélium respiratoire différencié mature.

### **D.3.** Discussion

Dans cette partie de notre travail, nous avons montré que les cellules basales de l'épithélium respiratoire humain adulte de surface, isolées grâce à leur expression spécifique du FT et du CD151, sont capables de reconstituer un épithélium respiratoire différencié mucociliaire *in vivo* dans le modèle de xénogreffe dans la souris nude, et *in vitro* dans le modèle de culture en interface air-liquide. De plus, l'activité de la télomérase détectée dans ces cellules triées suggère fortement la présence d'une population de cellules progénitrices parmi ces cellules.

En plus de son rôle dans la coagulation sanguine, le FT a été impliqué dans la croissance tumorale, l'angiogénèse, les phénomènes de métastases (Forster et al., 2006), et de migration cellulaire (Muller et al., 1999), et a également montré son rôle modulateur de l'inflammation (Chu et al., 2005). Les souris déficientes en FT présentent une migration fortement atténuée des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins par rapport aux cellules musculaires des souris normales (Pyo et al., 2004). Par ailleur, le CD151 est exprimé sur une variété de cellules comme les plaquettes, les mégacaryocytes et les lymphocytes T activés (Ashman et al., 1991 ; Hasegawa et al., 1996), et a montré son expression dans plusieurs tissus de l'organisme, en particulier dans les poumons (Sincock et al., 1997). Le CD151 est, en outre, impliqué dans le phénomène d'oncogenèse, dans le contrôle des métastases, ainsi que dans la modulation de la motilité cellulaire in vivo et in vitro (Tokuhara et al., 2001). Les souris déficientes en CD151 montrent un phénotype général normal, mais présentent des anomalies de l'hémostase, et leurs kératinocytes migrent plus lentement que les kératinocytes des souris normales (Wright et al., 2004 ; Cowin et al., 2006). Le FT et le CD151, montrent donc des similarités de fonctions. Jusqu'ici, ils n'ont jamais été décrits comme marqueurs de cellules souches ou progénitrices, et leur rôle dans la couche des cellules basales de l'épithélium respiratoire de surface reste toujours indéfini. Néanmoins, ils pourraient exercer une fonction dans l'adhérence cellulaire puisqu'il a été montré que le FT serait impliqué dans l'adhérence intercellulaire des cardiomyocytes dans le muscle cardiaque (Luther et al., 2000), et que le CD151, outre son rôle dans la formation des complexes d'adhérence cellule-lame basale (Sterk et al., 2002), jouerait un rôle dans la modulation de l'adhérence intercellulaire dans les lignées hématopoïétiques (Fitter et al., 1999).

Ces deux récepteurs de surface ont montré dans notre étude leur résistance à l'enzyme protéolytique servant à la dissociation des cellules épithéliales à partir des tissus respiratoires humains, ainsi que leur absence de blocage de l'adhérence des cellules épithéliales sur le plastique et sur le collagène, ce qui les rend particulièrement intéressant pour le tri des cellules basales épithéliales respiratoires sur la base de leur expression membranaire de ces marqueurs. Il a été montré que le FT était exprimé, dans certaines conditions, par une sous-

population de lymphocytes B (Mechiche *et al.*, 2005), et que le CD151 était présent sur les lymphocytes T activés (Hasegawa *et al.*, 1996). Il n'est pas exclu, dans notre étude, que ce type de cellules sanguines provenant des vaisseaux sanguins, contaminent les cellules épithéliales respiratoires au moment de la dissociation des tissus. Cependant, l'usage des ces deux marqueurs simultanément pour le tri des cellules épithéliales par cytométrie en flux exclut toute contamination potentielle des cellules triées épithéliales par des cellules d'origine sanguine.

De nombreux résultats contradictoires ont été publiés sur la nature des cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire des voies aériennes. Certaines équipes proposent les cellules basales comme cellules souche/progénitrices (Inayama et al., 1988 ; Inayama et al., 1989; Nettesheim et al., 1990; Ford et al., 1992a; Ford et al., 1992b; Schoch et al., 2004), alors que d'autres affirment que les cellules souches/progénitrices sont les cellules sécrétoires (Johnson et al., 1990a ; Johnson et al., 1990b). Toutes ces études ont été effectuées sur les animaux comme le lapin, le rat et la souris, en utilisant des techniques de séparation cellulaire basées sur la densité (élutriation) ou la forme physique des cellules (cytométrie en flux), techniques entraînant une pureté des cellules isolées relativement faible. Plus récemment, en collaboration avec le groupe de B. Péault (INSERM U506, Villejuif), notre laboratoire a isolé les cellules basales trachéales fœtales humaines, qui expriment l'AQP3 sur leur membrane plasmique péricellulaire, des cellules cylindriques fœtales négatives pour ce marqueur (Avril-Delplanque et al., 2005). Quand ces deux populations positives et négatives triées ont été ensemencées dans des trachées fœtales humaines dénudées et greffées dans des souris SCID, un épithélium pseudostratifié différencié a été généré à partir des deux populations suggérant la présence de cellules souches/progénitrices au sein de la population des cellules basales mais également au sein de la population de cellules cylindriques. La différence de résultats entre cette étude et notre travail pourrait être due au fait que nous avons utilisé des cellules adultes. En effet, les cellules fœtales différenciées pourraient conserver et présenter un caractère « plus pluripotent » que les cellules adultes, ce qui expliquerait que les cellules cylindriques fœtales soient encore capables de régénérer un épithélium respiratoire différencié. Dans notre étude, nous avons pu obtenir des cellules basales CD151+/FT+ pures à 99,9%, pureté confirmée en immunocytochimie, et une population de cellules cylindriques de pureté supérieure à 98,5%, résultats rarement obtenus dans la littérature, et qui permettent de conforter la validité de nos observations. Au final, la population des cellules basales triées constitue environ 25-30% des cellules épithéliales totales, ce qui est en accord avec des résultats précédemment obtenus après quantification des différents types cellulaires de l'épithélium respiratoire, notamment les cellules basales (Soderberg et al., 1990; Mercer et al., 1994; Boers et al., 1998). Les marqueurs FT et CD151 marquent donc toutes les cellules basales épithéliales et pourraient constituer l'analogue de la

GSI-B4 qui marque toutes les cellules basales de l'épithélium respiratoire de surface chez la souris et le rat.

Lorsque les cellules basales CD151+/FT+ triées ont été ensemencées, elles ont proliféré sur plastique et collagène de type IV et ont été capables de reconstituer un épithélium respiratoire mucociliaire, dans le modèle de xénogreffe humanisée *in vivo*, ainsi que dans le modèle de culture en IAL *in vitro*, alors que les cellules cylindriques n'ont pas présenté cette capacité. Pour pouvoir former un épithélium mucociliaire différencié, les cellules basales ont donc généré d'autres cellules basales, ainsi que des cellules sécrétoires et ciliées. Ces capacités de prolifération et de différenciation leur confèrent donc le statut de cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire de surface humain. A l'heure actuelle, il existe peu de preuves en faveur du caractère souche/progéniteur des cellules sécrétoires de l'épithélium respiratoire de surface, alors que ce potentiel est de plus en plus proposé pour les cellules basales (Schoch *et al.*, 2004 ; Hong *et al.*, 2004a ; Hong *et al.*, 2004b). Cependant, au niveau des voies aériennes distales de type bronchiolaire, si le caractère souche/progéniteur des cellules sécrétoires de Clara a été proposé (Hook *et al.*, 1987 ; Brody *et al.*, 1987 ; Reynolds *et al.*, 2000a ; Hong *et al.*, 2001), le potentiel des cellules basales reste mal défini, ce qui est probablement lié au fait qu'elles soient très peu nombreuses à ce niveau.

Dans chacune de nos expériences, le même nombre de cellules triées basales et cylindriques a été ensemencé in vivo et in vitro, mais la population négative CD151-/FT- n'a jamais adhéré. Dans la mesure où cette dernière population contenait environ 24% de cellules sécrétoires, nous avons ensemencé dans des expériences supplémentaires in vitro quatre fois plus de cellules cylindriques afin d'avoir un nombre équivalent de cellules basales et de cellules sécrétoires sur nos membranes de culture en IAL. Malgré le nombre élevé des cellules sécrétoires, ces dernières n'ont pas adhéré. Ce résultat suggère que les cellules sécrétoires perdent leur capacité d'adhérence cellulaire et donc de prolifération lorsqu'elles sont isolées des tissus respiratoires. En effet, les cellules sécrétoires sont capables de se diviser in vivo chez l'homme (Keenan et al., 1982a ; Keenan et al., 1982b ; Keenan et al., 1982c ; Evans et al., 1986 ; Breuer et al., 1993), mais une fois isolées, elles perdraient ce potentiel. Lorsqu'elles sont isolées des tissus respiratoires, les cellules sécrétoires pourraient perdre la capacité d'adhérer à un substrat. En effet, in vivo, l'attachement des cellules sécrétoires à la lame basale est principalement établi via les cellules basales par l'intermédiaire des desmosomes intercellulaires (Shebani et al., 2005). Les cellules sécrétoires ne possèderaient donc pas les récepteurs qui leurs permettraient d'adhérer à des molécules de la matrice extracellulaire, telles que le collagène, ou la lame basale de la trachée de rat dénudée dans nos expériences.

Les cellules ciliées, considérées comme étant complètement différenciées et donc incapables de se diviser (Kauffman *et al.*, 1980 ; McDowell *et al.*, 1983), ont récemment montré leur

capacité de transdifférenciation en d'autres types cellulaires épithéliaux pendant la réparation de l'épithélium respiratoire lésé de souris (Park *et al.*, 2006). Dans notre étude, les cellules ciliées, comme les cellules sécrétoires, n'ont jamais adhéré, excluant toute possibilité de leur proposer une fonction de cellules progénitrices.

Dans le but de démontrer l'existence d'une population de cellules progénitrices parmi les cellules basales respiratoires humaines, nous avons analysé l'activité de la télomérase des cellules triées CD151+/FT+ et CD151-/FT-. Les télomères sont formés par un complexe d'ADN (répétitions 5'-TTAGGG-3') et de protéines, et protègent les extrémités des chromosomes des cellules eucaryotes des fusions, réarrangements et translocations. L'ADN télomérique est synthétisé spécifiquement par la télomérase, une ribonucléoprotéine constituée d'un ARN et de plusieurs sous-unités protéiques dont une transcriptase inverse, appelée hTERT (human telomerase reverse transcriptase) chez l'humain, capable d'ajouter des répétitions (TTAGG)<sub>n</sub> à l'extrémité 3' des chromosomes tout en utilisant son propre ARN comme amorce (Blackburn et al., 1992 ; Forsyth et al., 2002). La télomérase est très active dans les tissus et les cellules embryonnaires humaines (Wright et al., 1996), alors que son activité dans les cellules souches reste controversée. En effet, plusieurs études ont montré que l'activité de la télomérase est absente dans les cellules souches de l'épiderme (Bickenbach et al., 1998) ou du bulge du follicule pileux (Sarin et al., 2005), ainsi que dans les cellules souches mésenchymateuses (Zimmermann et al., 2003), alors que d'autres équipes ont montré sa faible activité dans les cellules souches hématopoïétiques (Chiu et al., 1996 ; Elwood et al., 2004) et les cellules souches du bulge (Ramirez et al., 1997). La télomérase a également été retrouvée réactivée dans le cancer (Kim et al., 1994) où son inhibition a empêché la formation de métastases pulmonaires (Dikmen et al., 2005), et la sénescence de cellules d'adénocarcinome œsophagien (Shammas et al., 2005). De plus, la télomérase a été utilisée pour l'immortalisation de plusieurs types cellulaires, comme les cellules épithéliales respiratoires humaines (Piao et al., 2005), les cellules pancréatiques (Narushima et al., 2005), les fibroblastes de la peau (Ouellette et al., 2000), les cellules progénitrices neurales (Bai et al., 2004) et les cellules souches mésenchymateuses (Bentzon et al., 2005) afin de générer des lignées cellulaires à prolifération indéfinie, et ce, sans aucune altération du phénotype, du caryotype, de la capacité de différenciation cellulaire, ou d'activation de certains oncogènes (Jiang et al., 1999; Morales et al., 1999; Simonsen et al., 2002). Il est actuellement admis que l'activité de la télomérase est détectée dans les cellules progénitrices et représente donc un marqueur de ce type de cellules (Harle-Bachor et al., 1996 ; Ramirez et al., 1997 ; Bickenbach et al., 1998; Marshall et al., 2005; Sarin et al., 2005; Whikehart et al., 2005; Umemoto et al., 2006). Au niveau pulmonaire, la télomérase a été détectée dans le tissu fœtal pendant la gestation (Ulaner et al., 1997), où elle était concentrée dans les cellules épithéliales très proches de la lame basale (Kong et al., 2004). Elle a également été détectée dans les cellules basales de l'épithélium respiratoire humain bronchique in situ (Yashima et al., 1997), ce qui suggère la présence de cellules progénitrices au niveau de cette population cellulaire. Dans notre étude, nous avons trouvé que les cellules triées CD151+/FT+ avaient une activité claire de la télomérase, alors que les cellules cylindriques CD151-/FT- ne possédaient pas cette activité. Ainsi, nos résultats montrent que les cellules basales sont ou contiennent des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire proximal humain adulte.

En conclusion, notre étude suggère fortement que les cellules basales sont des progéniteurs de l'épithélium respiratoire humain de surface comme le montrent leur capacité de régénération ainsi que leur activité de la télomérase.

## E. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le travail de cette thèse s'est articulé autour de deux études complémentaires qui concernent la régénération de l'épithélium respiratoire humain, la première s'intéressant aux mécanismes de régénération de l'épithélium CF, et la deuxième s'intéressant aux cellules capables de régénérer l'épithélium. Nous avons conçu notre démarche sur le fait que la CF est une maladie caractérisée par des remaniements et des lésions de l'épithélium respiratoire, qui doit régénérer sa fonction, cette régénération faisant intervenir les cellules souches/progénitrices. Dans un premier temps, nous nous sommes interrogés sur l'origine des remaniements observés dans la CF et dans un deuxième temps, nous avons cherché à connaître la nature des cellules responsables de la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire humain.

## E.1. Régénération de l'épithélium respiratoire CF

Dans la première étude, nous avons montré que, indépendamment de toute infection bactérienne, la régénération de l'épithélium respiratoire CF est retardée par rapport à la régénération non-CF, ce qui pourrait favoriser la susceptibilité de l'épithélium à l'infection bactérienne. Nous avons également montré que l'épithélium régénéré CF est remanié, et que sa régénération est associée à un déséquilibre de certaines protéines sécrétées, telles que l'IL-8, les MMP-7 et-9, ainsi que le TIMP-1. Cette étude est la première à montrer que la régénération de l'épithélium respiratoire CF est anormale, même dans un contexte non infectieux, et suggère que les remaniements épithéliaux observés chez les patients CF sont dus, au moins en partie, à un mécanisme dérégulé de la régénération de l'épithélium, ce phénomène pouvant être accentué par l'infection. En effet, il est bien connu que l'infection bactérienne ou virale entraîne souvent des remaniements cellulaires sans qu'une quelconque maladie soit nécessairement présente (Holtzman et al., 2002 ; Kajon et al., 2003). Dans la CF, ces anomalies de régénération pourraient être liées à un déséquilibre précoce de l'expression de l'IL-8 et des MMPs. Une perspective intéressante de ce travail sera d'étudier les effets de l'inhibition de l'IL-8 au cours de la régénération CF et non-CF pour confirmer l'hypothèse de son implication dans la prolifération cellulaire observée précocement dans la régénération CF, l'IL-8 étant un des acteurs intervenant dans la régénération de l'épithélium normal non-CF (Coraux et al., 2005b). De plus, la modulation de l'inhibition des MMPs pendant la régénération permettra de confirmer leur rôle dans les phénomènes de remaniement observés dans la CF.

Le rôle de la mutation de CFTR dans les anomalies observées pendant la régénération CF n'est toutefois pas à exclure. Il sera judicieux pour étudier cette hypothèse, de corriger les cellules CF par transduction avec un vecteur lentiviral codant pour la protéine CFTR (Shoji *et al.*, 1990 ; Castillon *et al.*, 2004) et de déterminer l'effet de la correction de CFTR sur la régénération de l'épithélium CF en la comparant à la régénération épithéliale à partir de cellules CF non corrigées, et de cellules normales non-CF.

Il est bien connu que la régénération de l'épithélium respiratoire est modulée par une multitude de facteurs protéiques et transcriptionnels (Coraux *et al.*, 2005a). Dans notre étude de la régénération CF, nous avons décelé la dérégulation de quelques uns de ces facteurs. Cette régénération CF est sans doute accompagnée de la modulation de nombreux autres facteurs responsables d'anomalies diverses. Une des approches qui permettra de mettre en évidence des facteurs régulant la régénération de l'épithélium respiratoire non-CF et CF sera la technique de microarray. En effet, en criblant l'expression de plusieurs milliers de gènes au cours des différentes étapes de la régénération épithéliale non-CF et CF, nous pourrons obtenir une liste de gènes modulés à étudier plus avant afin de mieux comprendre la maladie, et d'établir ensuite une stratégie thérapeutique appropriée.

De nombreux aspects de la régénération de l'épithélium respiratoire CF et non-CF restent à explorer, mais auparavant, il faudra vérifier l'état de fonctionnalité de l'épithélium régénéré CF, en chambre de Ussing par exemple pour déterminer la capacité de CFTR, exprimé sur les cellules ciliées CF des épithéliums régénérés, à sécréter des ions Cl<sup>-</sup>, quelque soit le génotype.

## E.2. Cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire normal

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons montré pour la première fois, que les cellules basales humaines adultes, triées par double marquage du FT et du CD151, présentent un potentiel progéniteur puisqu'elles sont capables de reconstituer un épithélium respiratoire différencié, et présentent une activité de la télomérase. C'est un premier pas important qui permettra d'envisager l'identification des cellules souches épithéliales respiratoires humaines. En 2005, un congrès intitulé « cellules souches adultes, biologie et maladies pulmonaires » s'est déroulé à Burlington, dans lequel les spécialistes dans l'étude des cellules souches/progénitrices pulmonaires (Scott Randell, Barry Stripp, Susan Reynolds,...) ont attiré l'attention sur le besoin de nouvelles méthodes et marqueurs permettant l'identification et le phénotypage des cellules souches. L'utilisation de nos marqueurs pourrait entrer dans ce cadre. En effet, le tri des cellules basales grâce au FT et au CD151 est un prérequis à l'étude de la présence d'une sous-population de cellules souches au

sein de cette population de cellules basales. La présence d'une sous-population de cellules souches pourra être mise en évidence par différentes techniques. La première consiste à essayer de trouver d'autres marqueurs que FT et CD151, qui ne seraient exprimés que par des sous-populations de cellules basales, ou exprimés de façon différente par ces sous-populations. L'exemple d'une telle démarche est celui de l'épiderme. En fait, les cellules souches épidermiques, présentes dans la population des cellules basales toutes identiques sur le plan morphologique, sont isolées sur la base de leur expression élevée de la sous-unité d'intégrine  $\beta$ 1 (Jones *et al.*, 1993).

Actuellement, nous sommes en train de mettre au point une méthode de test de clonogénicité cellulaire par cytométrie en flux. Par cette méthode, les cellules basales marquées avec le FT et le CD151 seront isolées, une par puits, et cultivées, afin d'évaluer leur potentiel souche ou progéniteur. En effet, une cellule souche est, en principe, capable de proliférer à l'infini alors qu'une cellule progénitrice ne peut se diviser qu'un nombre restreint de fois. Les mises au point de cette technique concernent surtout les conditions de cultures des cellules clonées, c'est-à-dire le type du milieu et la couche nourricière à utiliser. Une telle technique permettra, si elle aboutit, d'identifier les cellules souches de l'épithélium respiratoire et de mettre en évidence leur capacité d'autorenouvellement.

La mise en évidence de la présence de cellules souches au sein de la population des cellules basales CD151+/FT+ pourra également être réalisée en mettant à profit leur capacité d'autorenouvellement, grâce à des tests de reconstitution itérative de l'épithélium respiratoire consistant à régénérer un épithélium à partir de cellules basales CD151+/FT+, d'isoler les cellules basales de ce nouvel épithélium grâce aux mêmes marqueurs et de tenter de générer un épithélium à partir de cellules fois de suite.

D'autres méthodes utilisant la technologie de la cytométrie en flux pourraient être appliquées à la recherche de cellules souches dans notre population de cellules basales triées. Elles consistent à utiliser par exemple la capacité des cellules souches, comme les cellules souches de la moelle osseuse, à exclure des colorants comme le Hoechst. On pourrait également imaginer l'utilisation de l'approche de l'aldéhyde déshydrogénase (ADH), une enzyme fortement exprimée par les cellules souches (Sahovic *et al.*, 1988 ; Storms *et al.*, 1999 ; Armstrong *et al.*, 2004 ; Hess *et al.*, 2004). En effet, une molécule fluorescente (appelée BAAA) diffuse librement à l'intérieur de toutes les cellules, mais est convertie par l'ADH en une autre molécule chargée négativement (BAA) qui sera retenue au niveau intracytoplasmique. Comme les cellules souches ont une forte activité d'ADH, un nombre important de molécules fluorescentes sera retenu, et par suite, les cellules à haute fluorescence représenteront les cellules souches à isoler par cytométrie en flux.

Les cellules basales participant à la formation des glandes sous-muqueuses (Engelhardt *et al.*, 1995), nous étudierons également l'aptitude des cellules basales CD151+/FT+ à générer un réseau de glandes respiratoires *in vitro* dans un modèle de culture en trois dimensions dans du matrigel ou dans des gels de collagène en présence ou non de facteurs pro-régénérateurs, en co-culture avec des cellules fibroblastiques issues du mésenchyme de voies aériennes humaines, ou en présence de milieu conditionné par ces mêmes fibroblastes, selon la méthode décrite par Montesano *et al.*, pour les cellules MDCK (Montesano *et al.*, 1991), car il a été démontré que les cellules mésenchymateuses influencent le devenir des cellules épithéliales qui leur sont associées (Shannon *et al.*, 1998).

## E.3. Retombées scientifiques

Une meilleure connaissance des phénomènes de régénération de l'épithélium respiratoire CF peut permettre d'envisager d'améliorer ce processus grâce à l'identification de molécules prorégénératrices. De plus, l'identification des cellules souches peut idéalement avoir comme retombée finale une application directe en thérapie cellulaire et génique de la CF. En effet, il pourrait être envisageable d'isoler des cellules souches à partir de prélèvements effectués chez les patients CF, de les corriger efficacement par transduction lentivirale du gène *cftr* normal et de les réimplanter chez ces malades CF afin de corriger leur épithélium respiratoire. Cependant, cette perspective reste peu envisageable à l'heure actuelle. A moins long terme, l'identification et la caractérisation des cellules souches pourraient permettre de les stimuler localement et ainsi de favoriser la régénération de l'épithélium respiratoire lésé dans la CF.

## BIBLIOGRAPHIE

## AARBIOU J, VERHOOSEL RM, VAN WETERING S, DE BOER WI, VAN KRIEKEN JH, LITVINOV SV et al.

Neutrophil Defensins Enhance Lung Epithelial Wound Closure and Mucin Gene Expression in Vitro. Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 30 (2) : 193-201.

#### ABE S, LAUBY G, BOYER C, MANOUILOVA L, RENNARD SI, SHARP JG.

Lung Cells Transplanted to Irradiated Recipients Generate Lymphohematopoietic Progeny. Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 30 (4) : 491-499.

#### ACKERMAN MJ, CLAPHAM DE.

Ion Channels--Basic Science and Clinical Disease. N Engl J Med 1997 ; 336 (22) : 1575-1586.

#### ADAMS RB, PLANCHON SM, ROCHE JK.

IFN-Gamma Modulation of Epithelial Barrier Function. Time Course, Reversibility, and Site of Cytokine Binding. J Immunol 1993 ; 150 (6) : 2356-2363.

ADAMSON IY, BOWDEN DH.

The Type 2 Cell As Progenitor of Alveolar Epithelial Regeneration. A Cytodynamic Study in Mice After Exposure to Oxygen. Lab Invest 1974 ; 30 (1) : 35-42.

ADRIAENSEN D, SCHEUERMANN DW.

Neuroendocrine Cells and Nerves of the Lung. Anat Rec 1993 ; 236 (1) : 70-85.

#### AHMAD S, MARTIN PE, EVANS WH.

Assembly of Gap Junction Channels: Mechanism, Effects of Calmodulin Antagonists and Identification of Connexin Oligomerization Determinants. Eur J Biochem 2001 ; 268 (16) : 4544-4552.

#### AITKEN ML, VILLALON M, VERDUGO P, NAMEROFF M.

Enrichment of Subpopulations of Respiratory Epithelial Cells Using Flow Cytometry. Am J Respir Cell Mol Biol 1991 ; 4 (2) : 174-178.

#### AKABAS MH.

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Structure and Function of an Epithelial Chloride Channel.

J Biol Chem 2000 ; 275 (6) : 3729-3732.

#### AKAIWA M, YU B, UMESHITA-SUYAMA R, TERADA N, SUTO H, KOGA T et al.

Localization of Human Interleukin 13 Receptor in Non-Haematopoietic Cells. Cytokine 2001 ; 13 (2) : 75-84.

## ALI NN, EDGAR AJ, SAMADIKUCHAKSARAEI A, TIMSON CM, ROMANSKA HM, POLAK JM et al.

Derivation of Type II Alveolar Epithelial Cells From Murine Embryonic Stem Cells. Tissue Eng 2002 ; 8 (4) : 541-550.

#### ALIOTTA JM, PASSERO M, MEHARG J, KLINGER J, DOONER MS, PIMENTEL J et al.

Stem Cells and Pulmonary Metamorphosis: New Concepts in Repair and Regeneration. J Cell Physiol 2005 ; 204 (3) : 725-741.

#### ALISON MR, LOVELL MJ, DIREKZE NC, WRIGHT NA, POULSOM R.

Stem Cell Plasticity and Tumour Formation. Eur J Cancer 2006a ; 42 (9) : 1247-1256.

#### ALISON MR, POULSOM R, BRITTAN M, SCHIER S, BURKERT J, WRIGHT NA.

Isolation of Gut SP Cells Does Not Automatically Enrich for Stem Cells. Gastroenterology 2006b ; 130 (3) : 1012-1013.

#### ALISON MR, POULSOM R, OTTO WR, VIG P, BRITTAN M, DIREKZE NC et al.

Recipes for Adult Stem Cell Plasticity: Fusion Cuisine or Readymade? J Clin Pathol 2004 ; 57 (2) : 113-120.

#### AMIT M, CARPENTER MK, INOKUMA MS, CHIU CP, HARRIS CP, WAKNITZ MA et al.

Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. Dev Biol 2000 ; 227 (2) : 271-278.

#### ANDERSON JM, STEVENSON BR, JESAITIS LA, GOODENOUGH DA, MOOSEKER MS.

Characterization of ZO-1, a Protein Component of the Tight Junction From Mouse Liver and Madin-Darby Canine Kidney Cells. J Cell Biol 1988 ; 106 (4) : 1141-1149.

#### ANJOS-AFONSO F, SIAPATI EK, BONNET D.

In Vivo Contribution of Murine Mesenchymal Stem Cells into Multiple Cell-Types Under Minimal Damage Conditions.

J Cell Sci 2004 ; 117 (Pt 23) : 5655-5664.

#### ARMSTRONG DS, GRIMWOOD K, CARZINO R, CARLIN JB, OLINSKY A, PHELAN PD.

Lower Respiratory Infection and Inflammation in Infants With Newly Diagnosed Cystic Fibrosis. BMJ 1995 ; 310 (6994) : 1571-1572.

#### ARMSTRONG DS, HOOK SM, JAMSEN KM, NIXON GM, CARZINO R, CARLIN JB et al.

Lower Airway Inflammation in Infants With Cystic Fibrosis Detected by Newborn Screening. Pediatr Pulmonol 2005 ; 40 (6) : 500-510.

#### ARMSTRONG L, STOJKOVIC M, DIMMICK I, AHMAD S, STOJKOVIC P, HOLE N et al.

Phenotypic Characterization of Murine Primitive Hematopoietic Progenitor Cells Isolated on Basis of Aldehyde Dehydrogenase Activity.

Stem Cells 2004 ; 22 (7) : 1142-1151.

#### ASAKURA A, RUDNICKI MA.

Side Population Cells From Diverse Adult Tissues Are Capable of in Vitro Hematopoietic Differentiation. Exp Hematol 2002; 30 (11) : 1339-1345.

### ASHMAN LK, AYLETT GW, MEHRABANI PA, BENDALL LJ, NIUTTA S, CAMBARERI AC et al.

The Murine Monoclonal Antibody, 14A2.H1, Identifies a Novel Platelet Surface Antigen. Br J Haematol 1991 ; 79 (2) : 263-270.

#### ATKINSON JJ, SENIOR RM.

Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol 2003 ; 28 (1) : 12-24.

#### AUDIE JP, JANIN A, PORCHET N, COPIN MC, GOSSELIN B, AUBERT JP.

Expression of Human Mucin Genes in Respiratory, Digestive, and Reproductive Tracts Ascertained by in Situ Hybridization.

J Histochem Cytochem 1993 ; 41 (10) : 1479-1485.

#### AUGARTEN A, PARET G, AVNERI I, AKONS H, AVIRAM M, BENTUR L et al.

Systemic Inflammatory Mediators and Cystic Fibrosis Genotype. Clin Exp Med 2004 ; 4 (2) : 99-102.

#### AVIVI-GREEN C, SINGAL M, VOGEL WF.

Discoidin Domain Receptor 1-Deficient Mice Are Resistant to Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006 ; 174 (4) : 420-427.

#### AVRIL-DELPLANQUE A, CASAL I, CASTILLON N, HINNRASKY J, PUCHELLE E, PEAULT B.

Aquaporin-3 Expression in Human Fetal Airway Epithelial Progenitor Cells. Stem Cells 2005 ; 23 (7) : 992-1001.

#### AXELSSON MA, ASKER N, HANSSON GC.

O-Glycosylated MUC2 Monomer and Dimer From LS 174T Cells Are Water-Soluble, Whereas Larger MUC2 Species Formed Early During Biosynthesis Are Insoluble and Contain Nonreducible Intermolecular Bonds. J Biol Chem 1998 ; 273 (30) : 18864-18870.

#### AYERS MM, JEFFERY PK.

Proliferation and Differentiation in Mammalian Airway Epithelium. Eur Respir J 1988 ; 1 (1) : 58-80.

#### AZGHANI AO.

Pseudomonas Aeruginosa and Epithelial Permeability: Role of Virulence Factors Elastase and Exotoxin A. Am J Respir Cell Mol Biol 1996 ; 15 (1) : 132-140.

#### AZIZI SA, STOKES D, AUGELLI BJ, DIGIROLAMO C, PROCKOP DJ.

Engraftment and Migration of Human Bone Marrow Stromal Cells Implanted in the Brains of Albino Rats--Similarities to Astrocyte Grafts.

Proc Natl Acad Sci U S A 1998 ; 95 (7) : 3908-3913.

#### BACKSTROM JR, TOKES ZA.

The 84-KDa Form of Human Matrix Metalloproteinase-9 Degrades Substance P and Gelatin. J Neurochem 1995 ; 64 (3) : 1312-1318.

#### BACONNAIS S, DELAVOIE F, ZAHM JM, MILLIOT M, TERRYN C, CASTILLON N et al.

Abnormal Ion Content, Hydration and Granule Expansion of the Secretory Granules From Cystic Fibrosis Airway Glandular Cells.

Exp Cell Res 2005 ; 309 (2) : 296-304.

## BACONNAIS S, TIROUVANZIAM R, ZAHM JM, DE BENTZMANN S, PEAULT B, BALOSSIER G et al.

Ion Composition and Rheology of Airway Liquid From Cystic Fibrosis Fetal Tracheal Xenografts. Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (4) : 605-611.

#### BAI Y, HU Q, LI X, WANG Y, LIN C, SHEN L et al.

Telomerase Immortalization of Human Neural Progenitor Cells. Neuroreport 2004 ; 15 (2) : 245-249.

#### BALDA MS, MATTER K.

Transmembrane Proteins of Tight Junctions. Semin Cell Dev Biol 2000 ; 11 (4) : 281-289.

#### BALDWIN F.

Basal Cells in Human Bronchial Epithelium. Anat Rec 1994 ; 238 (3) : 360-367.

#### BALIS JU, PATERSON JF, PACIGA JE, HALLER EM, SHELLEY SA.

Distribution and Subcellular Localization of Surfactant-Associated Glycoproteins in Human Lung. Lab Invest 1985 ; 52 (6) : 657-669.

#### BALLARD ST, TROUT L, BEBOK Z, SORSCHER EJ, CREWS A.

CFTR Involvement in Chloride, Bicarbonate, and Liquid Secretion by Airway Submucosal Glands. Am J Physiol 1999 ; 277 (4 Pt 1) : L694-L699.

#### BALS R, HIEMSTRA PS.

Innate Immunity in the Lung: How Epithelial Cells Fight Against Respiratory Pathogens. Eur Respir J 2004 ; 23 (2) : 327-333.

#### BALS R, WANG X, WU Z, FREEMAN T, BAFNA V, ZASLOFF M et al.

Human Beta-Defensin 2 Is a Salt-Sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung. J Clin Invest 1998 ; 102 (5) : 874-880.

#### BALS R, WEINER DJ, MEEGALLA RL, WILSON JM.

Transfer of a Cathelicidin Peptide Antibiotic Gene Restores Bacterial Killing in a Cystic Fibrosis Xenograft Model.

J Clin Invest 1999 ; 103 (8) : 1113-1117.

#### BALS R, WELSCH U.

Lectins and Antibodies to Blood Group Antigens As Markers for the Basal Cells of the Human Respiratory Epithelium. Microsc Res Tech 1997 ; 38 (5) : 505-511.

#### BARASCH J, KISS B, PRINCE A, SAIMAN L, GRUENERT D, AL AWQATI Q.

Defective Acidification of Intracellular Organelles in Cystic Fibrosis. Nature 1991 ; 352 (6330) : 70-73.

#### BARKHORDARI A, STODDART RW, MCCLURE SF, MCCLURE J.

Lectin Histochemistry of Normal Human Lung. J Mol Histol 2004 ; 35 (2) : 147-156.

#### BARROW RE, WANG CZ, EVANS MJ, HERNDON DN.

Growth Factors Accelerate Epithelial Repair in Sheep Trachea. Lung 1993 ; 171 (6) : 335-344.

#### BARTH PJ, KOCH S, MULLER B, UNTERSTAB F, VON WICHERT P, MOLL R.

Proliferation and Number of Clara Cell 10-KDa Protein (CC10)-Reactive Epithelial Cells and Basal Cells in Normal, Hyperplastic and Metaplastic Bronchial Mucosa. Virchows Arch 2000 ; 437 (6) : 648-655.

#### BEAR CE, LI CH, KARTNER N, BRIDGES RJ, JENSEN TJ, RAMJEESINGH M et al.

Purification and Functional Reconstitution of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR).

Cell 1992 ; 68 (4) : 809-818.

#### BEBOK Z, TOUSSON A, SCHWIEBERT LM, VENGLARIK CJ.

Improved Oxygenation Promotes CFTR Maturation and Trafficking in MDCK Monolayers. Am J Physiol Cell Physiol 2001 ; 280 (1) : C135-C145.

#### BECKER MN, SAUER MS, MUHLEBACH MS, HIRSH AJ, WU Q, VERGHESE MW et al.

Cytokine Secretion by Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. Am J Respir Crit Care Med 2004 ; 169 (5) : 645-653.

#### BEDROSSIAN CW, GREENBERG SD, SINGER DB, HANSEN JJ, ROSENBERG HS.

The Lung in Cystic Fibrosis. A Quantitative Study Including Prevalence of Pathologic Findings Among Different Age Groups.

Hum Pathol 1976 ; 7 (2) : 195-204.

#### BEEH KM, BEIER J, KORNMANN O, BUHL R.

Sputum Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Inhibitor of Metalloprotinease-1, and Their Molar Ratio in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Healthy Subjects. Respir Med 2003 ; 97 (6) : 634-639.

#### BEHFAR A, HODGSON DM, ZINGMAN LV, PEREZ-TERZIC C, YAMADA S, KANE GC et al.

Administration of Allogenic Stem Cells Dosed to Secure Cardiogenesis and Sustained Infarct Repair.

Ann N Y Acad Sci 2005 ; 1049 : 189-198.

#### BELLINGER DL, LORTON D, BROUXHON S, FELTEN S, FELTEN DL.

The Significance of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) in Immunomodulation. Adv Neuroimmunol 1996 ; 6 (1) : 5-27.

#### BENNETT AR, FARLEY A, BLAIR NF, GORDON J, SHARP L, BLACKBURN CC.

Identification and Characterization of Thymic Epithelial Progenitor Cells. Immunity 2002 ; 16 (6) : 803-814.

#### BENNETT WD, OLIVIER KN, ZEMAN KL, HOHNEKER KW, BOUCHER RC, KNOWLES MR.

Effect of Uridine 5'-Triphosphate Plus Amiloride on Mucociliary Clearance in Adult Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 153 (6 Pt 1) : 1796-1801.

#### BENTZON JF, STENDERUP K, HANSEN FD, SCHRODER HD, ABDALLAH BM, JENSEN TG et al.

Tissue Distribution and Engraftment of Human Mesenchymal Stem Cells Immortalized by Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene.

Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 330 (3) : 633-640.

#### BERGOIN C, GOSSET P, LAMBLIN C, BOLARD F, TURCK D, TONNEL AB et al.

Cell and Cytokine Profile in Nasal Secretions in Cystic Fibrosis. J Cyst Fibros 2002 ; 1 (3) : 110-115.

#### BERNACKI SH, NELSON AL, ABDULLAH L, SHEEHAN JK, HARRIS A, DAVIS CW et al.

Mucin Gene Expression During Differentiation of Human Airway Epithelia in Vitro. Muc4 and Muc5b Are Strongly Induced.

Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (4) : 595-604.

#### **BIANCO P, GEHRON RP.**

Marrow Stromal Stem Cells. J Clin Invest 2000 ; 105 (12) : 1663-1668.

#### BICKENBACH JR, VORMWALD-DOGAN V, BACHOR C, BLEUEL K, SCHNAPP G, BOUKAMP P.

Telomerase Is Not an Epidermal Stem Cell Marker and Is Downregulated by Calcium. J Invest Dermatol 1998; 111 (6) : 1045-1052.

#### BINDREITER M, SCHUPPLER J, STOCKINGER L.

[Cell Proliferation and Differentiation in the Tracheal Epithelium of Rats]. Exp Cell Res 1968 ; 50 (2) : 377-382.

#### BINGLE CD, GITLIN JD.

Identification of Hepatocyte Nuclear Factor-3 Binding Sites in the Clara Cell Secretory Protein Gene. Biochem J 1993 ; 295 ( Pt 1) : 227-232.

#### **BISHOP AE.**

Pulmonary Epithelial Stem Cells. Cell Prolif 2004 ; 37 (1) : 89-96.

#### BJORNSON CR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI MC, VESCOVI AL.

Turning Brain into Blood: a Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo. Science 1999 ; 283 (5401) : 534-537.

#### BLACKBURN EH.

Telomerases. Annu Rev Biochem 1992 ; 61 : 113-129.

#### BLATT EN, YAN XH, WUERFFEL MK, HAMILOS DL, BRODY SL.

Forkhead Transcription Factor HFH-4 Expression Is Temporally Related to Ciliogenesis. Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 21 (2) : 168-176.

#### **BLENKINSOPP WK.**

Effect of Tritiated Thymidine on Cell Proliferation. J Cell Sci 1967 ; 2 (3) : 305-308.

#### BOBADILLA JL, MACEK M, JR., FINE JP, FARRELL PM.

Cystic Fibrosis: a Worldwide Analysis of CFTR Mutations--Correlation With Incidence Data and Application to Screening.

Hum Mutat 2002 ; 19 (6) : 575-606.

#### BODINI A, D'ORAZIO C, PERONI D, CORRADI M, FOLESANI G, BARALDI E et al.

Biomarkers of Neutrophilic Inflammation in Exhaled Air of Cystic Fibrosis Children With Bacterial Airway Infections.

Pediatr Pulmonol 2005 ; 40 (6) : 494-499.

#### BOERS JE, AMBERGEN AW, THUNNISSEN FB.

Number and Proliferation of Basal and Parabasal Cells in Normal Human Airway Epithelium. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 (6 Pt 1) : 2000-2006.

#### BOERS JE, AMBERGEN AW, THUNNISSEN FB.

Number and Proliferation of Clara Cells in Normal Human Airway Epithelium. Am J Respir Crit Care Med 1999 ; 159 (5 Pt 1) : 1585-1591.

#### BONFIELD TL, KONSTAN MW, BERGER M.

Altered Respiratory Epithelial Cell Cytokine Production in Cystic Fibrosis. J Allergy Clin Immunol 1999 ; 104 (1) : 72-78.

#### BOOTH BW, ADLER KB, BONNER JC, TOURNIER F, MARTIN LD.

Interleukin-13 Induces Proliferation of Human Airway Epithelial Cells in Vitro Via a Mechanism Mediated by Transforming Growth Factor-Alpha. Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 25 (6) : 739-743.

#### **BOOTH C, POTTEN CS.**

Gut Instincts: Thoughts on Intestinal Epithelial Stem Cells. J Clin Invest 2000 ; 105 (11) : 1493-1499.

#### BORRADORI L, SONNENBERG A.

Hemidesmosomes: Roles in Adhesion, Signaling and Human Diseases. Curr Opin Cell Biol 1996 ; 8 (5) : 647-656.

#### BORTHWICK DW, SHAHBAZIAN M, KRANTZ QT, DORIN JR, RANDELL SH.

Evidence for Stem-Cell Niches in the Tracheal Epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 24 (6) : 662-670.

#### **BOUCHER RC.**

Human Airway Ion Transport. Part One. Am J Respir Crit Care Med 1994a ; 150 (1) : 271-281.

#### **BOUCHER RC.**

Human Airway Ion Transport. Part Two. Am J Respir Crit Care Med 1994b ; 150 (2) : 581-593.

#### BOUCHER RC, COTTON CU, GATZY JT, KNOWLES MR, YANKASKAS JR.

Evidence for Reduced Cl- and Increased Na+ Permeability in Cystic Fibrosis Human Primary Cell Cultures. J Physiol 1988a ; 405 : 77-103.

#### BOUCHER RC, JOHNSON J, INOUE S, HULBERT W, HOGG JC.

The Effect of Cigarette Smoke on the Permeability of Guinea Pig Airways. Lab Invest 1980 ; 43 (1) : 94-100.

#### BOUCHER RC, VAN SCOTT MR, WILLUMSEN N, STUTTS MJ.

3. Epithelial Injury. Mechanisms and Cell Biology of Airway Epithelial Injury. Am Rev Respir Dis 1988b ; 138 (6 Pt 2) : S41-S44.

#### BOUSSAUD V, SOLER P, MOREAU J, GOODWIN RG, HANCE AJ.

Expression of Three Members of the TNF-R Family of Receptors (4-1BB, Lymphotoxin-Beta Receptor, and Fas) in Human Lung.

Eur Respir J 1998 ; 12 (4) : 926-931.

#### BOWDEN DH.

Cell Turnover in the Lung. Am Rev Respir Dis 1983 ; 128 (2 Pt 2) : S46-S48.

#### BOWES D, CLARK AE, CORRIN B.

Ultrastructural Localisation of Lactoferrin and Glycoprotein in Human Bronchial Glands. Thorax 1981 ; 36 (2) : 108-115.

#### BOYLAN GM, PRYDE JG, DOBBS LG, MCELROY MC.

Identification of a Novel Antigen on the Apical Surface of Rat Alveolar Epithelial Type II and Clara Cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 280 (6) : L1318-L1326.

#### BRADBURY NA, JILLING T, BERTA G, SORSCHER EJ, BRIDGES RJ, KIRK KL.

Regulation of Plasma Membrane Recycling by CFTR. Science 1992 ; 256 (5056) : 530-532.

#### BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHET GI, BLAU HM.

From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. Science 2000 ; 290 (5497) : 1775-1779.

#### BREEZE RG, WHEELDON EB.

The Cells of the Pulmonary Airways. Am Rev Respir Dis 1977 ; 116 (4) : 705-777.

#### BREUER R, CHRISTENSEN TG, WAX Y, BOLBOCHAN G, LUCEY EC, STONE PJ et al.

Relationship of Secretory Granule Content and Proliferative Intensity in the Secretory Compartment of the Hamster Bronchial Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 1993 ; 8 (5) : 480-485.

#### BREUER R, ZAJICEK G, CHRISTENSEN TG, LUCEY EC, SNIDER GL.

Cell Kinetics of Normal Adult Hamster Bronchial Epithelium in the Steady State. Am J Respir Cell Mol Biol 1990 ; 2 (1) : 51-58.

#### BREZILLON S, DUPUIT F, HINNRASKY J, MARCHAND V, KALIN N, TUMMLER B et al.

Decreased Expression of the CFTR Protein in Remodeled Human Nasal Epithelium From Non-Cystic Fibrosis Patients.

Lab Invest 1995 ; 72 (2) : 191-200.

#### BREZILLON S, HAMM H, HEILMANN M, SCHAFERS HJ, HINNRASKY J, WAGNER TO et al.

Decreased Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in Remodeled Airway Epithelium From Lung Transplanted Patients.

Hum Pathol 1997a ; 28 (8) : 944-952.

#### BREZILLON S, ZAHM JM, PIERROT D, GAILLARD D, HINNRASKY J, MILLART H et al.

ATP Depletion Induces a Loss of Respiratory Epithelium Functional Integrity and Down-Regulates CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Expression. J Biol Chem 1997b ; 272 (44) : 27830-27838.

#### BRODY AR, HOOK GE, CAMERON GS, JETTEN AM, BUTTERICK CJ, NETTESHEIM P.

The Differentiation Capacity of Clara Cells Isolated From the Lungs of Rabbits. Lab Invest 1987 ; 57 (2) : 219-229.

#### **BROECKAERT F, BERNARD A.**

Clara Cell Secretory Protein (CC16): Characteristics and Perspectives As Lung Peripheral Biomarker. Clin Exp Allergy 2000 ; 30 (4) : 469-475.

#### BROERS JL, DE LEIJ L, ROT MK, TER HAAR A, LANE EB, LEIGH IM et al.

Expression of Intermediate Filament Proteins in Fetal and Adult Human Lung Tissues. Differentiation 1989 ; 40 (2) : 119-128.

#### BRUSCIA EM, PRICE JE, CHENG EC, WEINER S, CAPUTO C, FERREIRA EC et al.

Assessment of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Activity in CFTR-Null Mice After Bone Marrow Transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ; 103 (8) : 2965-2970.

#### **BUCHER U, REID L.**

Development of the Mucus-Secreting Elements in Human Lung. Thorax 1961 ; 16 : 219-225.

#### BUISINE MP, DEVISME L, COPIN MC, DURAND-REVILLE M, GOSSELIN B, AUBERT JP et al.

Developmental Mucin Gene Expression in the Human Respiratory Tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (2) : 209-218.

#### BUISSON AC, GILLES C, POLETTE M, ZAHM JM, BIREMBAUT P, TOURNIER JM.

Wound Repair-Induced Expression of a Stromelysins Is Associated With the Acquisition of a Mesenchymal Phenotype in Human Respiratory Epithelial Cells. Lab Invest 1996a ; 74 (3) : 658-669.

#### BUISSON AC, ZAHM JM, POLETTE M, PIERROT D, BELLON G, PUCHELLE E et al.

Gelatinase B Is Involved in the in Vitro Wound Repair of Human Respiratory Epithelium. J Cell Physiol 1996b ; 166 (2) : 413-426.

#### BURDON T, SMITH A, SAVATIER P.

Signalling, Cell Cycle and Pluripotency in Embryonic Stem Cells. Trends Cell Biol 2002 ; 12 (9) : 432-438.

#### BURGEL PR, NADEL JA.

Roles of Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Epithelial Cell Repair and Mucin Production in Airway Epithelium.

Thorax 2004 ; 59 (11) : 992-996.

#### CANTIN AM, FELLS GA, HUBBARD RC, CRYSTAL RG.

Antioxidant Macromolecules in the Epithelial Lining Fluid of the Normal Human Lower Respiratory Tract. J Clin Invest 1990; 86 (3): 962-971.

#### CANTIN AM, NORTH SL, HUBBARD RC, CRYSTAL RG.

Normal Alveolar Epithelial Lining Fluid Contains High Levels of Glutathione. J Appl Physiol 1987 ; 63 (1) : 152-157.

#### CARRABINO S, CARPANI D, LIVRAGHI A, DI CICCO M, COSTANTINI D, COPRENI E et al.

Dysregulated Interleukin-8 Secretion and NF-KappaB Activity in Human Cystic Fibrosis Nasal Epithelial Cells. J Cyst Fibros 2006 ; 5 (2) : 113-119.

#### CASTELL JV, DONATO MT, GOMEZ-LECHON MJ.

Metabolism and Bioactivation of Toxicants in the Lung. The in Vitro Cellular Approach. Exp Toxicol Pathol 2005 ; 57 Suppl 1 : 189-204.

#### CASTILLON N, AVRIL-DELPLANQUE A, CORAUX C, DELENDA C, PEAULT B, DANOS O et al.

Regeneration of a Well-Differentiated Human Airway Surface Epithelium by Spheroid and Lentivirus Vector-Transduced Airway Cells.

J Gene Med 2004 ; 6 (8) : 846-856.
#### CASTILLON N, HINNRASKY J, ZAHM JM, KAPLAN H, BONNET N, CORLIEU P et al.

Polarized Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and Associated Epithelial Proteins During the Regeneration of Human Airway Surface Epithelium in Three-Dimensional Culture. Lab Invest 2002; 82 (8): 989-998.

#### CASTRANOVA V, RABOVSKY J, TUCKER JH, MILES PR.

The Alveolar Type II Epithelial Cell: a Multifunctional Pneumocyte. Toxicol Appl Pharmacol 1988; 93 (3): 472-483.

## CATALDO D, MUNAUT C, NOEL A, FRANKENNE F, BARTSCH P, FOIDART JM et al.

MMP-2- and MMP-9-Linked Gelatinolytic Activity in the Sputum From Patients With Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Int Arch Allergy Immunol 2000 ; 123 (3) : 259-267.

#### CEGIELSKI M, CALKOSINSKI I, DZIEGIEL P, ZABEL M.

The Search for Stem Cells of the Epithelium in Pulmonary Alveoli. Folia Morphol (Warsz ) 2004 ; 63 (2) : 221-223.

#### CHALLEN GA, LITTLE MH.

A Side Order of Stem Cells: the SP Phenotype. Stem Cells 2006 ; 24 (1) : 3-12.

#### CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, NICHOLS J, LEE S, TWEEDIE S et al.

Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. Cell 2003 ; 113 (5) : 643-655.

#### CHAN MM, CHMURA K, CHAN ED.

Increased NaCl-Induced Interleukin-8 Production by Human Bronchial Epithelial Cells Is Enhanced by the DeltaF508/W1282X Mutation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. Cytokine 2006 ; 33 (6) : 309-316.

#### CHANG JC, SUMMER R, SUN X, FITZSIMMONS K, FINE A.

Evidence That Bone Marrow Cells Do Not Contribute to the Alveolar Epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2005 ; 33 (4) : 335-342.

#### CHANG LY, WU R, NETTESHEIM P.

Morphological Changes in Rat Tracheal Cells During the Adaptive and Early Growth Phase in Primary Cell Culture.

J Cell Sci 1985 ; 74 : 283-301.

## CHILOSI M, POLETTI V, MURER B, LESTANI M, CANCELLIERI A, MONTAGNA L et al.

Abnormal Re-Epithelialization and Lung Remodeling in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: the Role of DeltaN-P63. Lab Invest 2002 ; 82 (10) : 1335-1345.

#### CHILTON BS, KENNEDY JR, NICOSIA SV.

Isolation of Basal and Mucous Cell Populations From Rabbit Trachea. Am Rev Respir Dis 1981 ; 124 (6) : 723-727.

#### CHIU CP, DRAGOWSKA W, KIM NW, VAZIRI H, YUI J, THOMAS TE et al.

Differential Expression of Telomerase Activity in Hematopoietic Progenitors From Adult Human Bone Marrow. Stem Cells 1996 ; 14 (2) : 239-248.

#### CHIU RC.

Bone-Marrow Stem Cells As a Source for Cell Therapy. Heart Fail Rev 2003 ; 8 (3) : 247-251.

#### CHMIEL JF, DAVIS PB.

State of the Art: Why Do the Lungs of Patients With Cystic Fibrosis Become Infected and Why Can't They Clear the Infection?

Respir Res 2003 ; 4 (1) : 8.

#### CHRISTENSEN TG, BLANCHARD GC, NOLLEY G, HAYES JA.

Ultrastructural Localization of Endogenous Peroxidase in the Lower Respiratory Tract of the Guinea Pig. Cell Tissue Res 1981 ; 214 (2) : 407-415.

#### CHRISTENSEN TG, HAYES JA.

Endogenous Peroxidase in the Conducting Airways of Hamsters: Morphologic Evidence of Synthesis and Secretion.

Am Rev Respir Dis 1982 ; 125 (3) : 341-346.

#### CHU AJ.

Tissue Factor Mediates Inflammation. Arch Biochem Biophys 2005 ; 440 (2) : 123-132.

#### CHURCH DF, PRYOR WA.

Free-Radical Chemistry of Cigarette Smoke and Its Toxicological Implications. Environ Health Perspect 1985 ; 64 : 111-126.

#### CHWIERALSKI CE, SCHNURRA I, THIM L, HOFFMANN W.

Epidermal Growth Factor and Trefoil Factor Family 2 Synergistically Trigger Chemotaxis on BEAS-2B Cells Via Different Signaling Cascades. Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 31 (5) : 528-537.

#### CITI S, SABANAY H, JAKES R, GEIGER B, KENDRICK-JONES J.

Cingulin, a New Peripheral Component of Tight Junctions. Nature 1988 ; 333 (6170) : 272-276.

# CLAEYS S, VAN HOECKE H, HOLTAPPELS G, GEVAERT P, DE BELDER T, VERHASSELT B et al.

Nasal Polyps in Patients With and Without Cystic Fibrosis: a Differentiation by Innate Markers and Inflammatory Mediators.

Clin Exp Allergy 2005 ; 35 (4) : 467-472.

#### CLARK AB, RANDELL SH, NETTESHEIM P, GRAY TE, BAGNELL B, OSTROWSKI LE.

Regulation of Ciliated Cell Differentiation in Cultures of Rat Tracheal Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1995 ; 12 (3) : 329-338.

#### CLARK AT, RODRIGUEZ RT, BODNAR MS, ABEYTA MJ, CEDARS MI, TUREK PJ et al.

Human STELLAR, NANOG, and GDF3 Genes Are Expressed in Pluripotent Cells and Map to Chromosome 12p13, a Hotspot for Teratocarcinoma. Stem Cells 2004 ; 22 (2) : 169-179.

Stelli Cells 2004, 22 (2). 109-179.

#### CLEGG GR, TYRRELL C, MCKECHNIE SR, BEERS MF, HARRISON D, MCELROY MC.

Coexpression of RTI40 With Alveolar Epithelial Type II Cell Proteins in Lungs Following Injury: Identification of Alveolar Intermediate Cell Types.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005 ; 289 (3) : L382-L390.

#### COAKLEY RD, BOUCHER RC.

Regulation and Functional Significance of Airway Surface Liquid PH. JOP 2001 ; 2 (4 Suppl) : 294-300.

#### COAKLEY RD, GRUBB BR, PARADISO AM, GATZY JT, JOHNSON LG, KREDA SM et al.

Abnormal Surface Liquid PH Regulation by Cultured Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ; 100 (26) : 16083-16088.

#### COLE AM, DEWAN P, GANZ T.

Innate Antimicrobial Activity of Nasal Secretions. Infect Immun 1999 ; 67 (7) : 3267-3275.

## CONESE M, REJMAN J.

Stem Cells and Cystic Fibrosis.

J Cyst Fibros 2006.

#### CONSTANTINESCU D, GRAY HL, SAMMAK PJ, SCHATTEN GP, CSOKA AB.

Lamin A/C Expression Is a Marker of Mouse and Human Embryonic Stem Cell Differentiation. Stem Cells 2005 .

#### CORAUX C, DELPLANQUE A, HINNRASKY J, PEAULT B, PUCHELLE E, GAILLARD D.

Distribution of Integrins During Human Fetal Lung Development. J Histochem Cytochem 1998 ; 46 (7) : 803-810.

## CORAUX C, HAJJ R, LESIMPLE P, PUCHELLE E.

[Repair and Regeneration of the Airway Epithelium]. Med Sci (Paris) 2005a ; 21 (12) : 1063-1069.

# CORAUX C, MARTINELLA-CATUSSE C, NAWROCKI-RABY B, HAJJ R, BURLET H, ESCOTTE S et al.

Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Interleukin-8 During Regeneration of Human Airway Epithelium in Vivo. J Pathol 2005b ; 206 (2) : 160-169.

## CORAUX C, NAWROCKI-RABY B, HINNRASKY J, KILEZTKY C, GAILLARD D, DANI C et al.

Embryonic Stem Cells Generate Airway Epithelial Tissue. Am J Respir Cell Mol Biol 2005c ; 32 (2) : 87-92.

#### CORTES F, DESCHASEAUX F, UCHIDA N, LABASTIE MC, FRIERA AM, HE D et al.

HCA, an Immunoglobulin-Like Adhesion Molecule Present on the Earliest Human Hematopoietic Precursor Cells, Is Also Expressed by Stromal Cells in Blood-Forming Tissues. Blood 1999 : 93 (3) : 826-837.

#### COWIN AJ, ADAMS D, GEARY SM, WRIGHT MD, JONES JC, ASHMAN LK.

Wound Healing Is Defective in Mice Lacking Tetraspanin CD151. J Invest Dermatol 2006 ; 126 (3) : 680-689.

## CRAPO JD, BARRY BE, GEHR P, BACHOFEN M, WEIBEL ER.

Cell Number and Cell Characteristics of the Normal Human Lung. Am Rev Respir Dis 1982 ; 126 (2) : 332-337.

#### CRAWFORD I, MALONEY PC, ZEITLIN PL, GUGGINO WB, HYDE SC, TURLEY H et al.

Immunocytochemical Localization of the Cystic Fibrosis Gene Product CFTR. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 ; 88 (20) : 9262-9266.

## CRYSTAL RG.

Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: Pathogenesis and Treatment. Hosp Pract (Off Ed) 1991 ; 26 (2) : 81-9, 93.

## DAHERON L, OPITZ SL, ZAEHRES H, LENSCH WM, ANDREWS PW, ITSKOVITZ-ELDOR J et al.

LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2004 ; 22 (5) : 770-778.

## DAKIN CJ, NUMA AH, WANG H, MORTON JR, VERTZYAS CC, HENRY RL.

Inflammation, Infection, and Pulmonary Function in Infants and Young Children With Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2002 ; 165 (7) : 904-910.

## DANEL C, ERZURUM SC, MCELVANEY NG, CRYSTAL RG.

Quantitative Assessment of the Epithelial and Inflammatory Cell Populations in Large Airways of Normals and Individuals With Cystic Fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 153 (1) : 362-368.

#### DANIELY Y, LIAO G, DIXON D, LINNOILA RI, LORI A, RANDELL SH et al.

Critical Role of P63 in the Development of a Normal Esophageal and Tracheobronchial Epithelium.

Am J Physiol Cell Physiol 2004 ; 287 (1) : C171-C181.

#### DANTO SI, SHANNON JM, BOROK Z, ZABSKI SM, CRANDALL ED.

Reversible Transdifferentiation of Alveolar Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1995 ; 12 (5) : 497-502.

#### DAVIDSON DJ, KILANOWSKI FM, RANDELL SH, SHEPPARD DN, DORIN JR.

A Primary Culture Model of Differentiated Murine Tracheal Epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 279 (4) : L766-L778.

#### DAVIES JC.

Gene and Cell Therapy for Cystic Fibrosis. Paediatr Respir Rev 2006 ; 7 Suppl 1 : S163-S165.

#### DAVIES JC, STERN M, DEWAR A, CAPLEN NJ, MUNKONGE FM, PITT T et al.

CFTR Gene Transfer Reduces the Binding of Pseudomonas Aeruginosa to Cystic Fibrosis Respiratory Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ; 16 (6) : 657-663.

## DAVIES JR, HERRMANN A, RUSSELL W, SVITACHEVA N, WICKSTROM C, CARLSTEDT I.

Respiratory Tract Mucins: Structure and Expression Patterns. Novartis Found Symp 2002 ; 248 : 76-88.

#### DAVIES JR, SVITACHEVA N, LANNEFORS L, KORNFALT R, CARLSTEDT I.

Identification of MUC5B, MUC5AC and Small Amounts of MUC2 Mucins in Cystic Fibrosis Airway Secretions.

Biochem J 1999 ; 344 Pt 2 : 321-330.

#### DAVIS PB.

Cystic Fibrosis Since 1938. Am J Respir Crit Care Med 2006 ; 173 (5) : 475-482.

#### DE BARI C, DELL'ACCIO F, TYLZANOWSKI P, LUYTEN FP.

Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. Arthritis Rheum 2001 ; 44 (8) : 1928-1942.

#### DE BENTZMANN S, PLOTKOWSKI C, PUCHELLE E.

Receptors in the Pseudomonas Aeruginosa Adherence to Injured and Repairing Airway Epithelium. Am J Respir Crit Care Med 1996a ; 154 (4 Pt 2) : S155-S162.

## DE BENTZMANN S, ROGER P, DUPUIT F, BAJOLET-LAUDINAT O, FUCHEY C, PLOTKOWSKI MC et al.

Asialo GM1 Is a Receptor for Pseudomonas Aeruginosa Adherence to Regenerating Respiratory Epithelial Cells. Infect Immun 1996b ; 64 (5) : 1582-1588.

#### **DE BOER WI.**

Cytokines and Therapy in COPD: a Promising Combination? Chest 2002 ; 121 (5 Suppl) : 209S-218S.

#### DE WATER R, WILLEMS LN, VAN MUIJEN GN, FRANKEN C, FRANSEN JA, DIJKMAN JH et al.

Ultrastructural Localization of Bronchial Antileukoprotease in Central and Peripheral Human Airways by a Gold-Labeling Technique Using Monoclonal Antibodies. Am Rev Respir Dis 1986 ; 133 (5) : 882-890.

DEAN M, ALLIKMETS R.

Evolution of ATP-Binding Cassette Transporter Genes. Curr Opin Genet Dev 1995 ; 5 (6) : 779-785.

## DEAN TP, DAI Y, SHUTE JK, CHURCH MK, WARNER JO.

Interleukin-8 Concentrations Are Elevated in Bronchoalveolar Lavage, Sputum, and Sera of Children With Cystic Fibrosis. Pediatr Res 1993 ; 34 (2) : 159-161.

#### DEKKER J, ROSSEN JW, BULLER HA, EINERHAND AW.

The MUC Family: an Obituary. Trends Biochem Sci 2002 ; 27 (3) : 126-131.

#### DELACOURT C, LE BOURGEOIS M, D'ORTHO MP, DOIT C, SCHEINMANN P, NAVARRO J et al.

Imbalance Between 95 KDa Type IV Collagenase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Sputum of Patients With Cystic Fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 152 (2) : 765-774.

## DELPLANQUE A, CORAUX C, TIROUVANZIAM R, KHAZAAL I, PUCHELLE E, AMBROS P et al.

Epithelial Stem Cell-Mediated Development of the Human Respiratory Mucosa in SCID Mice. J Cell Sci 2000 ; 113 ( Pt 5) : 767-778.

#### DEMEDTS IK, BRUSSELLE GG, BRACKE KR, VERMAELEN KY, PAUWELS RA.

Matrix Metalloproteinases in Asthma and COPD. Curr Opin Pharmacol 2005 ; 5 (3) : 257-263.

#### DEVEREUX TR, FOUTS JR.

Isolation and Identification of Clara Cells From Rabbit Lung. In Vitro 1980; 16 (11): 958-968.

## DEVEREUX TR, SERABJIT-SINGH CJ, SLAUGHTER SR, WOLF CR, PHILPOT RM, FOUTS JR.

Identification of Cytochrome P-450 Isozymes in Nonciliated Bronchiolar Epithelial (Clara) and Alveolar Type II Cells Isolated From Rabbit Lung.

Exp Lung Res 1981 ; 2 (3) : 221-230.

#### DIKMEN ZG, GELLERT GC, JACKSON S, GRYAZNOV S, TRESSLER R, DOGAN P et al.

In Vivo Inhibition of Lung Cancer by GRN163L: a Novel Human Telomerase Inhibitor. Cancer Res 2005 ; 65 (17) : 7866-7873.

## DOBBS LG, WILLIAMS MC, GONZALEZ R.

Monoclonal Antibodies Specific to Apical Surfaces of Rat Alveolar Type I Cells Bind to Surfaces of Cultured, but Not Freshly Isolated, Type II Cells. Biochim Biophys Acta 1988 ; 970 (2) : 146-156.

## DOHRMAN A, MIYATA S, GALLUP M, LI JD, CHAPELIN C, COSTE A et al.

Mucin Gene (MUC 2 and MUC 5AC) Upregulation by Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Biochim Biophys Acta 1998 ; 1406 (3) : 251-259.

## DONNELLY GM, HAACK DG, HEIRD CS.

Tracheal Epithelium: Cell Kinetics and Differentiation in Normal Rat Tissue. Cell Tissue Kinet 1982 ; 15 (2) : 119-130.

#### DONTU G, ABDALLAH WM, FOLEY JM, JACKSON KW, CLARKE MF, KAWAMURA MJ et al.

In Vitro Propagation and Transcriptional Profiling of Human Mammary Stem/Progenitor Cells. Genes Dev 2003 ; 17 (10) : 1253-1270.

## DORSCHEID DR, WOJCIK KR, YULE K, WHITE SR.

Role of Cell Surface Glycosylation in Mediating Repair of Human Airway Epithelial Cell Monolayers. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 281 (4) : L982-L992.

## DRAPER JS, PIGOTT C, THOMSON JA, ANDREWS PW.

Surface Antigens of Human Embryonic Stem Cells: Changes Upon Differentiation in Culture. J Anat 2002 ; 200 (Pt 3) : 249-258.

## DRUKKER M, KATCHMAN H, KATZ G, EVEN-TOV FS, SHEZEN E, HORNSTEIN E et al.

Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Are Less Susceptible to Immune Rejection Than Adult Cells. Stem Cells 2006 : 24 (2) : 221 229

Stem Cells 2006 ; 24 (2) : 221-229.

# DUNSMORE SE, SAARIALHO-KERE UK, ROBY JD, WILSON CL, MATRISIAN LM, WELGUS HG et al.

Matrilysin Expression and Function in Airway Epithelium. J Clin Invest 1998; 102 (7): 1321-1331.

## DUPUIT F, BOUT A, HINNRASKY J, FUCHEY C, ZAHM JM, IMLER JL et al.

Expression and Localization of CFTR in the Rhesus Monkey Surface Airway Epithelium. Gene Ther 1995a ; 2 (2) : 156-163.

## DUPUIT F, GAILLARD D, HINNRASKY J, MONGODIN E, DE BENTZMANN S, COPRENI E et al.

Differentiated and Functional Human Airway Epithelium Regeneration in Tracheal Xenografts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 278 (1) : L165-L176.

#### DUPUIT F, KALIN N, BREZILLON S, HINNRASKY J, TUMMLER B, PUCHELLE E.

CFTR and Differentiation Markers Expression in Non-CF and Delta F 508 Homozygous CF Nasal Epithelium. J Clin Invest 1995b ; 96 (3) : 1601-1611.

#### EGLITIS MA, MEZEY E.

Hematopoietic Cells Differentiate into Both Microglia and Macroglia in the Brains of Adult Mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 ; 94 (8) : 4080-4085.

#### EKEKEZIE II, THIBEAULT DW, SIMON SD, NORBERG M, MERRILL JD, BALLARD RA et al.

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) : 1709-1714.

## ELKJAER ML, NEJSUM LN, GRESZ V, KWON TH, JENSEN UB, FROKIAER J et al.

Immunolocalization of Aquaporin-8 in Rat Kidney, Gastrointestinal Tract, Testis, and Airways. Am J Physiol Renal Physiol 2001 ; 281 (6) : F1047-F1057.

## ELLEFSEN P, TOS M.

Goblet Cells in the Human Trachea. Quantitative Studies of Normal Tracheae. Anat Anz 1972 ; 130 (5) : 501-520.

## ELWOOD N.

Telomere Biology of Human Hematopoietic Stem Cells. Cancer Control 2004 ; 11 (2) : 77-85.

#### EMURA M.

Stem Cells of the Respiratory Epithelium and Their in Vitro Cultivation. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1997 ; 33(1) : 3-14.

## ENGELHARDT JF.

Stem Cell Niches in the Mouse Airway. Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 24 (6) : 649-652.

## ENGELHARDT JF, ALLEN ED, WILSON JM.

Reconstitution of Tracheal Grafts With a Genetically Modified Epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 ; 88 (24) : 11192-11196.

#### ENGELHARDT JF, SCHLOSSBERG H, YANKASKAS JR, DUDUS L.

Progenitor Cells of the Adult Human Airway Involved in Submucosal Gland Development. Development 1995 ; 121 (7) : 2031-2046.

## ENGELHARDT JF, YANKASKAS JR, WILSON JM.

In Vivo Retroviral Gene Transfer into Human Bronchial Epithelia of Xenografts. J Clin Invest 1992; 90 (6) : 2598-2607.

## ERJEFALT JS, ERJEFALT I, SUNDLER F, PERSSON CG.

Microcirculation-Derived Factors in Airway Epithelial Repair in Vivo. Microvasc Res 1994 ; 48 (2) : 161-178.

## ERJEFALT JS, SUNDLER F, PERSSON CG.

Epithelial Barrier Formation by Airway Basal Cells. Thorax 1997; 52 (3): 213-217.

## ESCOTTE S, CATUSSE C, CORAUX C, PUCHELLE E.

Reconstitution of Human Airway Tissue in the Humanized Xenograft Model. J Cyst Fibros 2004 ; 3 Suppl 2 : 63-65.

## ESCOTTE S, DANEL C, GAILLARD D, BENOIT S, JACQUOT J, DUSSER D et al.

Fluticasone Propionate Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Response in Human Cystic Fibrosis Airway Grafts.

J Pharmacol Exp Ther 2002 ; 302 (3) : 1151-1157.

## ESCOTTE S, TABARY O, DUSSER D, MAJER-TEBOUL C, PUCHELLE E, JACQUOT J.

Fluticasone Reduces IL-6 and IL-8 Production of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells Via IKK-Beta Kinase Pathway.

Eur Respir J 2003 ; 21 (4) : 574-581.

## EVANS CM, WILLIAMS OW, TUVIM MJ, NIGAM R, MIXIDES GP, BLACKBURN MR et al.

Mucin Is Produced by Clara Cells in the Proximal Airways of Antigen-Challenged Mice. Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 31 (4) : 382-394.

## EVANS MJ, CABRAL LJ, STEPHENS RJ, FREEMAN G.

Renewal of Alveolar Epithelium in the Rat Following Exposure to NO2. Am J Pathol 1973 ; 70 (2) : 175-198.

## EVANS MJ, CABRAL LJ, STEPHENS RJ, FREEMAN G.

Transformation of Alveolar Type 2 Cells to Type 1 Cells Following Exposure to NO2. Exp Mol Pathol 1975 ; 22 (1) : 142-150.

## EVANS MJ, CABRAL-ANDERSON LJ, FREEMAN G.

Role of the Clara Cell in Renewal of the Bronchiolar Epithelium. Lab Invest 1978 ; 38 (6) : 648-653.

## EVANS MJ, COX RA, BURKE AS, MOLLER PC.

Differentiation of Anchoring Junctions in Tracheal Basal Cells in the Growing Rat. Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 6 (2) : 153-157.

## EVANS MJ, COX RA, SHAMI SG, PLOPPER CG.

Junctional Adhesion Mechanisms in Airway Basal Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1990 ; 3 (4) : 341-347.

#### EVANS MJ, COX RA, SHAMI SG, WILSON B, PLOPPER CG.

The Role of Basal Cells in Attachment of Columnar Cells to the Basal Lamina of the Trachea. Am J Respir Cell Mol Biol 1989 ; 1 (6) : 463-469.

## EVANS MJ, JOHNSON LV, STEPHENS RJ, FREEMAN G.

Renewal of the Terminal Bronchiolar Epithelium in the Rat Following Exposure to NO2 or O3. Lab Invest 1976; 35 (3) : 246-257.

## EVANS MJ, KAUFMAN MH.

Establishment in Culture of Pluripotential Cells From Mouse Embryos. Nature 1981 ; 292 (5819) : 154-156.

## EVANS MJ, MOLLER PC.

Biology of Airway Basal Cells. Exp Lung Res 1991 ; 17 (3) : 513-531.

#### EVANS MJ, SHAMI SG, CABRAL-ANDERSON LJ, DEKKER NP.

Role of Nonciliated Cells in Renewal of the Bronchial Epithelium of Rats Exposed to NO2. Am J Pathol 1986 ; 123 (1) : 126-133.

## EVANS MJ, VAN WINKLE LS, FANUCCHI MV, PLOPPER CG.

Cellular and Molecular Characteristics of Basal Cells in Airway Epithelium. Exp Lung Res 2001 ; 27 (5) : 401-415.

#### FALK MM.

Cell-Free Synthesis for Analyzing the Membrane Integration, Oligomerization, and Assembly Characteristics of Gap Junction Connexins. Methods 2000a ; 20 (2) : 165-179.

#### FALK MM.

Connexin-Specific Distribution Within Gap Junctions Revealed in Living Cells. J Cell Sci 2000b; 113 (Pt 22): 4109-4120.

#### FARQUHAR MG, PALADE GE.

Junctional Complexes in Various Epithelia. J Cell Biol 1963 ; 17 : 375-412.

#### FEHRENBACH H, SCHMIEDL A, WAHLERS T, HIRT SW, BRASCH F, RIEMANN D et al.

Morphometric Characterisation of the Fine Structure of Human Type II Pneumocytes. Anat Rec 1995 ; 243 (1) : 49-62.

# FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G et al.

Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. Science 1998 ; 279 (5356) : 1528-1530.

## FIBBE WE, PRUIJT JF, VELDERS GA, OPDENAKKER G, VAN KOOYK Y, FIGDOR CG et al.

Biology of IL-8-Induced Stem Cell Mobilization. Ann N Y Acad Sci 1999 ; 872 : 71-82.

## FINLAY GA, RUSSELL KJ, MCMAHON KJ, D'ARCY EM, MASTERSON JB, FITZGERALD MX et al.

Elevated Levels of Matrix Metalloproteinases in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Emphysematous Patients. Thorax 1997 ; 52 (6) : 502-506.

## FITTER S, SINCOCK PM, JOLLIFFE CN, ASHMAN LK.

Transmembrane 4 Superfamily Protein CD151 (PETA-3) Associates With Beta 1 and Alpha IIb Beta 3 Integrins in Haemopoietic Cell Lines and Modulates Cell-Cell Adhesion. Biochem J 1999 ; 338 (Pt 1) : 61-70.

## FITTER S, TETAZ TJ, BERNDT MC, ASHMAN LK.

Molecular Cloning of CDNA Encoding a Novel Platelet-Endothelial Cell Tetra-Span Antigen, PETA-3. Blood 1995 ; 86 (4) : 1348-1355.

## FOLKESSON HG, MATTHAY MA, HEBERT CA, BROADDUS VC.

Acid Aspiration-Induced Lung Injury in Rabbits Is Mediated by Interleukin-8-Dependent Mechanisms. J Clin Invest 1995 ; 96 (1) : 107-116.

## FORD JR, TERZAGHI-HOWE M.

Basal Cells Are the Progenitors of Primary Tracheal Epithelial Cell Cultures. Exp Cell Res 1992a ; 198 (1) : 69-77.

#### FORD JR, TERZAGHI-HOWE M.

Characteristics of Magnetically Separated Rat Tracheal Epithelial Cell Populations. Am J Physiol 1992b ; 263 (5 Pt 1) : L568-L574.

#### FORSTER Y, MEYE A, ALBRECHT S, SCHWENZER B.

Tissue Factor and Tumor: Clinical and Laboratory Aspects. Clin Chim Acta 2006 ; 364 (1-2) : 12-21.

#### FORSYTH NR, WRIGHT WE, SHAY JW.

Telomerase and Differentiation in Multicellular Organisms: Turn It Off, Turn It on, and Turn It Off Again. Differentiation 2002 ; 69 (4-5) : 188-197.

#### FOSTER C, AKTAR A, KOPF D, ZHANG P, GUTTENTAG S.

Pepsinogen C: a Type 2 Cell-Specific Protease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 286 (2) : L382-L387.

#### FRANCOEUR C, DENIS M.

Nitric Oxide and Interleukin-8 As Inflammatory Components of Cystic Fibrosis. Inflammation 1995 ; 19 (5) : 587-598.

#### FRANCOIS S, BENSIDHOUM M, MOUISEDDINE M, MAZURIER C, ALLENET B, SEMONT A et al.

Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: a Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage.

Stem Cells 2006 ; 24 (4) : 1020-1029.

#### FRANKEN C, KRAMPS JA, MEYER CJ, DIJKMAN JH.

Localization of a Low Molecular Weight Protease Inhibitor in the Respiratory Tract. Bull Eur Physiopathol Respir 1980 ; 16 Suppl : 231-236.

#### FUCHS E, SEGRE JA.

Stem Cells: a New Lease on Life. Cell 2000 ; 100 (1) : 143-155.

## FUJITANI N, LIU Y, OKAMURA T, KIMURA H.

Distribution of H Type 1-4 Chains of the ABO(H) System in Different Cell Types of Human Respiratory Epithelium.

J Histochem Cytochem 2000 ; 48 (12) : 1649-1656.

#### FULCHER ML, GABRIEL S, BURNS KA, YANKASKAS JR, RANDELL SH.

Well-Differentiated Human Airway Epithelial Cell Cultures. Methods Mol Med 2005 ; 107 : 183-206.

#### FURUSE M, HIRASE T, ITOH M, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, TSUKITA S et al.

Occludin: a Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions. J Cell Biol 1993 ; 123 (6 Pt 2) : 1777-1788.

#### GADSBY DC, NAIRN AC.

Control of CFTR Channel Gating by Phosphorylation and Nucleotide Hydrolysis. Physiol Rev 1999 ; 79 (1 Suppl) : S77-S107.

#### GAGE FH.

Mammalian Neural Stem Cells. Science 2000 ; 287 (5457) : 1433-1438.

#### GAILLARD D, RUOCCO S, LALLEMAND A, DALEMANS W, HINNRASKY J, PUCHELLE E.

Immunohistochemical Localization of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Human Fetal Airway and Digestive Mucosa.

Pediatr Res 1994 ; 36 (2) : 137-143.

#### GAILLARD DA, LALLEMENT AV, PETIT AF, PUCHELLE ES.

In Vivo Ciliogenesis in Human Fetal Tracheal Epithelium. Am J Anat 1989 ; 185 (4) : 415-428.

#### GALABERT C, JACQUOT J, ZAHM JM, PUCHELLE E.

Relationships Between the Lipid Content and the Rheological Properties of Airway Secretions in Cystic Fibrosis.

Clin Chim Acta 1987 ; 164 (2) : 139-149.

#### GALLAGHER AM, GOTTLIEB RA.

Proliferation, Not Apoptosis, Alters Epithelial Cell Migration in Small Intestine of CFTR Null Mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001 ; 281 (3) : G681-G687.

#### GANZ T.

Antimicrobial Polypeptides in Host Defense of the Respiratory Tract. J Clin Invest 2002 ; 109 (6) : 693-697.

#### GARROD D, CHIDGEY M, NORTH A.

Desmosomes: Differentiation, Development, Dynamics and Disease. Curr Opin Cell Biol 1996 ; 8 (5) : 670-678.

#### GARROD DR.

Desmosomes and Hemidesmosomes. Curr Opin Cell Biol 1993 ; 5 (1) : 30-40.

#### GERRARD CS, GERRITY TR, YEATES DB.

The Relationships of Aerosol Deposition, Lung Size, and the Rate of Mucociliary Clearance. Arch Environ Health 1986; 41 (1): 11-15.

#### GIANGRECO A, REYNOLDS SD, STRIPP BR.

Terminal Bronchioles Harbor a Unique Airway Stem Cell Population That Localizes to the Bronchoalveolar Duct Junction. Am J Pathol 2002 ; 161 (1) : 173-182.

## GIANGRECO A, SHEN H, REYNOLDS SD, STRIPP BR.

Molecular Phenotype of Airway Side Population Cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 286 (4) : L624-L630.

## GIBSON GA, HILL WG, WEISZ OA.

Evidence Against the Acidification Hypothesis in Cystic Fibrosis. Am J Physiol Cell Physiol 2000 ; 279 (4) : C1088-C1099.

#### GINIS I, LUO Y, MIURA T, THIES S, BRANDENBERGER R, GERECHT-NIR S et al.

Differences Between Human and Mouse Embryonic Stem Cells. Dev Biol 2004 ; 269 (2) : 360-380.

#### GIROD S, ZAHM JM, PLOTKOWSKI C, BECK G, PUCHELLE E.

Role of the Physiochemical Properties of Mucus in the Protection of the Respiratory Epithelium. Eur Respir J 1992 ; 5 (4) : 477-487.

#### GIUDICE GJ, EMERY DJ, DIAZ LA.

Cloning and Primary Structural Analysis of the Bullous Pemphigoid Autoantigen BP180. J Invest Dermatol 1992; 99 (3) : 243-250.

#### GLICK MC, KOTHARI VA, LIU A, STOYKOVA LI, SCANLIN TF.

Activity of Fucosyltransferases and Altered Glycosylation in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. Biochimie 2001; 83 (8): 743-747.

## GODFREY RW, SEVERS NJ, JEFFERY PK.

Freeze-Fracture Morphology and Quantification of Human Bronchial Epithelial Tight Junctions.

Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 6 (4) : 453-458.

#### GOLDMAN MJ, ANDERSON GM, STOLZENBERG ED, KARI UP, ZASLOFF M, WILSON JM.

Human Beta-Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. Cell 1997; 88 (4): 553-560.

#### GOMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP.

Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Regulation and Biological Functions. Eur J Cell Biol 1997 ; 74 (2) : 111-122.

#### GONZALEZ R, YANG YH, GRIFFIN C, ALLEN L, TIGUE Z, DOBBS L.

Freshly Isolated Rat Alveolar Type I Cells, Type II Cells, and Cultured Type II Cells Have Distinct Molecular Phenotypes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005 ; 288 (1) : L179-L189.

#### GONZALEZ-MARISCAL L, BETANZOS A, AVILA-FLORES A.

MAGUK Proteins: Structure and Role in the Tight Junction. Semin Cell Dev Biol 2000 ; 11 (4) : 315-324.

#### GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G, CONNER AS, MULLIGAN RC.

Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating in Vivo. J Exp Med 1996 ; 183 (4) : 1797-1806.

#### GOODMAN MR, LINK DW, BROWN WR, NAKANE PK.

Ultrastructural Evidence of Transport of Secretory IgA Across Bronchial Epithelium. Am Rev Respir Dis 1981 ; 123 (1) : 115-119.

#### GORDON RE. LANE BP.

Cytokinetics of Rat Tracheal Epithelium Stimulated by Mechanical Trauma. Cell Tissue Kinet 1977 ; 10 (2) : 171-181.

#### GRAY T, COAKLEY R, HIRSH A, THORNTON D, KIRKHAM S, KOO JS et al.

Regulation of MUC5AC Mucin Secretion and Airway Surface Liquid Metabolism by IL-1beta in Human Bronchial Epithelia.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 286 (2) : L320-L330.

#### GRAY TE, GUZMAN K, DAVIS CW, ABDULLAH LH, NETTESHEIM P.

Mucociliary Differentiation of Serially Passaged Normal Human Tracheobronchial Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1996 ; 14 (1) : 104-112.

#### GREEN KJ, GAUDRY CA.

Are Desmosomes More Than Tethers for Intermediate Filaments? Nat Rev Mol Cell Biol 2000 ; 1 (3) : 208-216.

#### **GREEN KJ, JONES JC.**

Desmosomes and Hemidesmosomes: Structure and Function of Molecular Components. FASEB J 1996 ; 10 (8) : 871-881.

#### **GREENWOOD MF. HOLLAND P.**

The Mammalian Respiratory Tract Surface. A Scanning Electron Microscopic Study. Lab Invest 1972 ; 27 (3) : 296-304.

#### GRONEBERG DA, EYNOTT PR, OATES T, LIM S, WU R, CARLSTEDT I et al.

Expression of MUC5AC and MUC5B Mucins in Normal and Cystic Fibrosis Lung. Respir Med 2002 ; 96 (2) : 81-86.

## **GRONEBERG DA, HARTMANN P, DINH QT, FISCHER A.**

Expression and Distribution of Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor VPAC(2) MRNA in Human Airways. Lab Invest 2001; 81 (5): 749-755.

#### GRONEBERG DA, PEISER C, DINH QT, MATTHIAS J, EYNOTT PR, HEPPT W et al.

Distribution of Respiratory Mucin Proteins in Human Nasal Mucosa. Laryngoscope 2003 ; 113 (3) : 520-524.

#### GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S.

Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (25) : 13625-13630.

## GRUBER AD, GANDHI R, PAULI BU.

The Murine Calcium-Sensitive Chloride Channel (MCaCC) Is Widely Expressed in Secretory Epithelia and in Other Select Tissues. Histochem Cell Biol 1998 ; 110 (1) : 43-49.

#### GUDMUNDSSON GH, AGERBERTH B, ODEBERG J, BERGMAN T, OLSSON B, SALCEDO R.

The Human Gene FALL39 and Processing of the Cathelin Precursor to the Antibacterial Peptide LL-37 in Granulocytes. Eur J Biochem 1996 ; 238 (2) : 325-332.

#### **GUGGINO WB.**

Cystic Fibrosis and the Salt Controversy. Cell 1999 ; 96 (5) : 607-610.

#### GUM JR, JR.

Mucin Genes and the Proteins They Encode: Structure, Diversity, and Regulation. Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 7 (6) : 557-564.

#### GUMBINER B, LOWENKOPF T, APATIRA D.

Identification of a 160-KDa Polypeptide That Binds to the Tight Junction Protein ZO-1. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 ; 88 (8) : 3460-3464.

#### GUO Y, COSTA R, RAMSEY H, STARNES T, VANCE G, ROBERTSON K et al.

The Embryonic Stem Cell Transcription Factors Oct-4 and FoxD3 Interact to Regulate Endodermal-Specific Promoter Expression.

Proc Natl Acad Sci U S A 2002 ; 99 (6) : 3663-3667.

#### GUO Y, KRUMWIEDE M, WHITE JG, WANGENSTEEN OD.

HOCl Effects on the Tight Junctions of Rabbit Tracheal Epithelium. Am J Physiol 1996 ; 270 (2 Pt 1) : L224-L231.

#### GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF et al.

Dystrophin Expression in the Mdx Mouse Restored by Stem Cell Transplantation. Nature 1999 ; 401 (6751) : 390-394.

## HALBERT CL, AITKEN ML, MILLER AD.

Retroviral Vectors Efficiently Transduce Basal and Secretory Airway Epithelial Cells in Vitro Resulting in Persistent Gene Expression in Organotypic Culture. Hum Gene Ther 1996 ; 7 (15) : 1871-1881.

## HARLE-BACHOR C, BOUKAMP P.

Telomerase Activity in the Regenerative Basal Layer of the Epidermis Inhuman Skin and in Immortal and Carcinoma-Derived Skin Keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93 (13) : 6476-6481.

## HARRELL PC, MCCAWLEY LJ, FINGLETON B, MCINTYRE JO, MATRISIAN LM.

Proliferative Effects of Apical, but Not Basal, Matrix Metalloproteinase-7 Activity in Polarized MDCK Cells. Exp Cell Res 2005; 303 (2): 308-320.

#### HASEGAWA H, UTSUNOMIYA Y, KISHIMOTO K, YANAGISAWA K, FUJITA S.

SFA-1, a Novel Cellular Gene Induced by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1, Is a Member of the Transmembrane 4 Superfamily.

J Virol 1996 ; 70 (5) : 3258-3263.

#### HASHIMOTO N, JIN H, LIU T, CHENSUE SW, PHAN SH.

Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Pulmonary Fibrosis. J Clin Invest 2004 ; 113 (2) : 243-252.

# HAUBER HP, TSICOPOULOS A, WALLAERT B, GRIFFIN S, MCELVANEY NG, DAIGNEAULT P et al.

Expression of HCLCA1 in Cystic Fibrosis Lungs Is Associated With Mucus Overproduction. Eur Respir J 2004 ; 23 (6) : 846-850.

#### HAYAKAWA T, YAMASHITA K, TANZAWA K, UCHIJIMA E, IWATA K.

Growth-Promoting Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a Wide Range of Cells. A Possible New Growth Factor in Serum. FEBS Lett 1992; 298 (1): 29-32.

#### HECK LW, BLACKBURN WD, IRWIN MH, ABRAHAMSON DR.

Degradation of Basement Membrane Laminin by Human Neutrophil Elastase and Cathepsin G. Am J Pathol 1990 ; 136 (6) : 1267-1274.

#### HEIJERMAN H.

Infection and Inflammation in Cystic Fibrosis: a Short Review. J Cyst Fibros 2005 ; 4 Suppl 2 : 3-5.

#### HENDERSON JK, DRAPER JS, BAILLIE HS, FISHEL S, THOMSON JA, MOORE H et al.

Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens.

Stem Cells 2002 ; 20 (4) : 329-337.

#### HENKE MO, RENNER A, HUBER RM, SEEDS MC, RUBIN BK.

MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 31 (1) : 86-91.

#### HERARD AL, PIERROT D, HINNRASKY J, KAPLAN H, SHEPPARD D, PUCHELLE E et al.

Fibronectin and Its Alpha 5 Beta 1-Integrin Receptor Are Involved in the Wound-Repair Process of Airway Epithelium.

Am J Physiol 1996a ; 271 (5 Pt 1) : L726-L733.

#### HERARD AL, ZAHM JM, PIERROT D, HINNRASKY J, FUCHEY C, PUCHELLE E.

Epithelial Barrier Integrity During in Vitro Wound Repair of the Airway Epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 1996b ; 15 (5) : 624-632.

## HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS.

Plasticity of Marrow-Derived Stem Cells. Blood 2003 ; 102 (10) : 3483-3493.

#### HERZOG EL, VAN ARNAM J, HU B, KRAUSE DS.

Threshold of Lung Injury Required for the Appearance of Marrow-Derived Lung Epithelia. Stem Cells 2006 ; 24 (8) : 1986-1992.

#### HESS DA, MEYERROSE TE, WIRTHLIN L, CRAFT TP, HERRBRICH PE, CREER MH et al.

Functional Characterization of Highly Purified Human Hematopoietic Repopulating Cells Isolated According to Aldehyde Dehydrogenase Activity. Blood 2004 ; 104 (6) : 1648-1655.

HICKS W, JR., HALL L, III, SIGURDSON L, STEWART C, HARD R, WINSTON J et al.

Isolation and Characterization of Basal Cells From Human Upper Respiratory Epithelium. Exp Cell Res 1997 ; 237 (2) : 357-363.

## HICKS W, JR., HALL LA, III, TRISTRAM DA, GARDELLA JA, JR., BRIGHT FV, HARD R et al.

Interleukin-1 Facilitates Airway Epithelial Migration in Response to Injury. Laryngoscope 2003 ; 113 (2) : 243-247.

## HICKS W, JR., SIGURDSON L, GABALSKI E, HARD R, HALL L, III, GARDELLA J et al.

Does Cartilage Down-Regulate Growth Factor Expression in Tracheal Epithelium? Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999 ; 125 (11) : 1239-1243.

## HINNRASKY J, CHEVILLARD M, PUCHELLE E.

Immunocytochemical Demonstration of Quantitative Differences in the Distribution of Lysozyme in Human Airway Secretory Granule Phenotypes. Biol Cell 1990 ; 68 (3) : 239-243.

#### HOFFMAN LM, CARPENTER MK.

Characterization and Culture of Human Embryonic Stem Cells. Nat Biotechnol 2005 ; 23 (6) : 699-708.

#### HOFFMAN RM, CLAYPOOL WD, KATYAL SL, SINGH G, ROGERS RM, DAUBER JH.

Augmentation of Rat Alveolar Macrophage Migration by Surfactant Protein. Am Rev Respir Dis 1987 ; 135 (6) : 1358-1362.

#### HOLMEN JM, KARLSSON NG, ABDULLAH LH, RANDELL SH, SHEEHAN JK, HANSSON GC et al.

Mucins and Their O-Glycans From Human Bronchial Epithelial Cell Cultures. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 287 (4) : L824-L834.

#### HOLTZMAN MJ, LOOK DC, SAMPATH D, CASTRO M, KOGA T, WALTER MJ.

Control of Epithelial Immune-Response Genes and Implications for Airway Immunity and Inflammation. Proc Assoc Am Physicians 1998 ; 110 (1) : 1-11.

#### HOLTZMAN MJ, MORTON JD, SHORNICK LP, TYNER JW, O'SULLIVAN MP, ANTAO A et al.

Immunity, Inflammation, and Remodeling in the Airway Epithelial Barrier: Epithelial-Viral-Allergic Paradigm. Physiol Rev 2002 ; 82 (1) : 19-46.

#### HONG KU, REYNOLDS SD, GIANGRECO A, HURLEY CM, STRIPP BR.

Clara Cell Secretory Protein-Expressing Cells of the Airway Neuroepithelial Body Microenvironment Include a Label-Retaining Subset and Are Critical for Epithelial Renewal After Progenitor Cell Depletion. Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 24 (6) : 671-681.

## HONG KU, REYNOLDS SD, WATKINS S, FUCHS E, STRIPP BR.

Basal Cells Are a Multipotent Progenitor Capable of Renewing the Bronchial Epithelium. Am J Pathol 2004a ; 164 (2) : 577-588.

## HONG KU, REYNOLDS SD, WATKINS S, FUCHS E, STRIPP BR.

In Vivo Differentiation Potential of Tracheal Basal Cells: Evidence for Multipotent and Unipotent Subpopulations.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004b ; 286 (4) : L643-L649.

#### HOOK GE, BRODY AR, CAMERON GS, JETTEN AM, GILMORE LB, NETTESHEIM P.

Repopulation of Denuded Tracheas by Clara Cells Isolated From the Lungs of Rabbits. Exp Lung Res 1987 ; 12 (4) : 311-329.

## HORIBA K, FUKUDA Y.

Synchronous Appearance of Fibronectin, Integrin Alpha 5 Beta 1, Vinculin and Actin in Epithelial Cells and Fibroblasts During Rat Tracheal Wound Healing. Virchows Arch 1994 ; 425 (4) : 425-434.

## HOVENBERG HW, DAVIES JR, CARLSTEDT I.

Different Mucins Are Produced by the Surface Epithelium and the Submucosa in Human Trachea: Identification of MUC5AC As a Major Mucin From the Goblet Cells. Biochem J 1996a ; 318 (Pt 1) : 319-324.

## HOVENBERG HW, DAVIES JR, HERRMANN A, LINDEN CJ, CARLSTEDT I.

MUC5AC, but Not MUC2, Is a Prominent Mucin in Respiratory Secretions. Glycoconj J 1996b ; 13 (5) : 839-847.

#### HOYT RF, JR., SOROKIN SP, MCDOWELL EM, MCNELLY NA.

Neuroepithelial Bodies and Growth of the Airway Epithelium in Developing Hamster Lung. Anat Rec 1993 ; 236 (1) : 15-22.

#### HUBEAU C, LE NAOUR R, ABELY M, HINNRASKY J, GUENOUNOU M, GAILLARD D et al.

Dysregulation of IL-2 and IL-8 Production in Circulating T Lymphocytes From Young Cystic Fibrosis Patients. Clin Exp Immunol 2004 ; 135 (3) : 528-534.

#### HUBEAU C, LORENZATO M, COUETIL JP, HUBERT D, DUSSER D, PUCHELLE E et al.

Quantitative Analysis of Inflammatory Cells Infiltrating the Cystic Fibrosis Airway Mucosa. Clin Exp Immunol 2001a ; 124 (1) : 69-76.

## HUBEAU C, PUCHELLE E, GAILLARD D.

Distinct Pattern of Immune Cell Population in the Lung of Human Fetuses With Cystic Fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2001b; 108 (4) : 524-529.

#### HULBERT WC, WALKER DC, JACKSON A, HOGG JC.

Airway Permeability to Horseradish Peroxidase in Guinea Pigs: the Repair Phase After Injury by Cigarette Smoke.

Am Rev Respir Dis 1981 ; 123 (3) : 320-326.

#### IBA Y, HARADA T, HORIE S, DEURA I, IWABE T, TERAKAWA N.

Lipopolysaccharide-Promoted Proliferation of Endometriotic Stromal Cells Via Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-8 Expression. Fertil Steril 2004 ; 82 Suppl 3 : 1036-1042.

#### IMAMURA Y, ITOH M, MAENO Y, TSUKITA S, NAGAFUCHI A.

Functional Domains of Alpha-Catenin Required for the Strong State of Cadherin-Based Cell Adhesion. J Cell Biol 1999 ; 144 (6) : 1311-1322.

#### IMOKAWA S, SATO A, HAYAKAWA H, KOTANI M, URANO T, TAKADA A.

Tissue Factor Expression and Fibrin Deposition in the Lungs of Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Systemic Sclerosis.

Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 156 (2 Pt 1) : 631-636.

## INAYAMA Y, HOOK GE, BRODY AR, CAMERON GS, JETTEN AM, GILMORE LB et al.

The Differentiation Potential of Tracheal Basal Cells. Lab Invest 1988 ; 58 (6) : 706-717.

## INAYAMA Y, HOOK GE, BRODY AR, JETTEN AM, GRAY T, MAHLER J et al.

In Vitro and in Vivo Growth and Differentiation of Clones of Tracheal Basal Cells. Am J Pathol 1989 ; 134 (3) : 539-549.

#### ISMAILOV II, AWAYDA MS, JOVOV B, BERDIEV BK, FULLER CM, DEDMAN JR et al.

Regulation of Epithelial Sodium Channels by the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. J Biol Chem 1996 ; 271 (9) : 4725-4732.

## ITO A, MUKAIYAMA A, ITOH Y, NAGASE H, THOGERSEN IB, ENGHILD JJ et al.

Degradation of Interleukin 1beta by Matrix Metalloproteinases. J Biol Chem 1996 ; 271 (25) : 14657-14660.

#### ITSKOVITZ-ELDOR J, SCHULDINER M, KARSENTI D, EDEN A, YANUKA O, AMIT M et al.

Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Compromising the Three Embryonic Germ Layers.

Mol Med 2000 ; 6 (2) : 88-95.

## JACKSON AD.

Airway Goblet-Cell Mucus Secretion. Trends Pharmacol Sci 2001 ; 22 (1) : 39-45.

#### JACKSON KA, MI T, GOODELL MA.

Hematopoietic Potential of Stem Cells Isolated From Murine Skeletal Muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 ; 96 (25) : 14482-14486.

## JAYARAMAN S, SONG Y, VETRIVEL L, SHANKAR L, VERKMAN AS.

Noninvasive in Vivo Fluorescence Measurement of Airway-Surface Liquid Depth, Salt Concentration, and PH. J Clin Invest 2001; 107 (3): 317-324.

#### JEFFERY PK, LI D.

Airway Mucosa: Secretory Cells, Mucus and Mucin Genes. Eur Respir J 1997 ; 10 (7) : 1655-1662.

#### JEZIERSKA A, MATYSIAK W, MOTYL T.

ALCAM/CD166 Protects Breast Cancer Cells Against Apoptosis and Autophagy. Med Sci Monit 2006 ; 12 (8) : BR263-BR273.

#### JIANG XR, JIMENEZ G, CHANG E, FROLKIS M, KUSLER B, SAGE M et al.

Telomerase Expression in Human Somatic Cells Does Not Induce Changes Associated With a Transformed Phenotype.

Nat Genet 1999 ; 21 (1) : 111-114.

## JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR et al.

Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Adult Marrow. Nature 2002 ; 418 (6893) : 41-49.

#### JIN N, NARASARAJU T, KOLLIPUTI N, CHEN J, LIU L.

Differential Expression of GABAA Receptor Pi Subunit in Cultured Rat Alveolar Epithelial Cells. Cell Tissue Res 2005 ; 321 (2) : 173-183.

#### JOHANSSON J, CURSTEDT T, ROBERTSON B.

The Proteins of the Surfactant System. Eur Respir J 1994 ; 7 (2) : 372-391.

#### JOHNSON EW, ELLER PM, JAFEK BW.

Protein Gene Product 9.5-Like and Calbindin-Like Immunoreactivity in the Nasal Respiratory Mucosa of Perinatal Humans. Anat Rec 1997 ; 247 (1) : 38-45.

## JOHNSON NF, HUBBS AF.

Epithelial Progenitor Cells in the Rat Trachea. Am J Respir Cell Mol Biol 1990a ; 3 (6) : 579-585.

#### JOHNSON NF, WILSON JS, HABBERSETT R, THOMASSEN DG, SHOPP GM, SMITH DM.

Separation and Characterization of Basal and Secretory Cells From the Rat Trachea by Flow Cytometry. Cytometry 1990b ; 11 (3) : 395-405.

## JONES JC, ASMUTH J, BAKER SE, LANGHOFER M, ROTH SI, HOPKINSON SB.

Hemidesmosomes: Extracellular Matrix/Intermediate Filament Connectors. Exp Cell Res 1994 ; 213 (1) : 1-11.

#### JONES PH, WATT FM.

Separation of Human Epidermal Stem Cells From Transit Amplifying Cells on the Basis of Differences in Integrin Function and Expression. Cell 1993 ; 73 (4) : 713-724.

## KAJON AE, GIGLIOTTI AP, HARROD KS.

Acute Inflammatory Response and Remodeling of Airway Epithelium After Subspecies B1 Human Adenovirus Infection of the Mouse Lower Respiratory Tract. J Med Virol 2003 ; 71 (2) : 233-244.

## KALIN N, CLAASS A, SOMMER M, PUCHELLE E, TUMMLER B.

DeltaF508 CFTR Protein Expression in Tissues From Patients With Cystic Fibrosis. J Clin Invest 1999 ; 103 (10) : 1379-1389.

## KALINER MA.

Human Nasal Respiratory Secretions and Host Defense. Am Rev Respir Dis 1991 ; 144 (3 Pt 2) : S52-S56.

## KAMMOUNI W, FIGARELLA C, MARCHAND S, MERTEN M.

Altered Cytokine Production by Cystic Fibrosis Tracheal Gland Serous Cells. Infect Immun 1997; 65 (12): 5176-5183.

#### KANIA G, CORBEIL D, FUCHS J, TARASOV KV, BLYSZCZUK P, HUTTNER WB et al.

Somatic Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 Is Expressed in Embryonic Stem Cell-Derived Progenitors. Stem Cells 2005 ; 23 (6) : 791-804.

#### KANNAGI R, COCHRAN NA, ISHIGAMI F, HAKOMORI S, ANDREWS PW, KNOWLES BB et al.

Stage-Specific Embryonic Antigens (SSEA-3 and -4) Are Epitopes of a Unique Globo-Series Ganglioside Isolated From Human Teratocarcinoma Cells.

EMBO J 1983 ; 2 (12) : 2355-2361.

#### KANNAN S., WU M.

Respiratory Stem Cells and Progenitors: Overview, Derivation, Differentiation, Carcinogenisis, Regeneration and Therapeutic Application. Current Stem Cell Research & Therapy 2006; 1:37-46.

## KAPANCI Y, WEIBEL ER, KAPLAN HP, ROBINSON FR.

Pathogenesis and Reversibility of the Pulmonary Lesions of Oxygen Toxicity in Monkeys. II. Ultrastructural and Morphometric Studies. Lab Invest 1969; 20 (1) : 101-118.

## KASACKA I, SAWICKI B.

Immunohistochemical and Electron-Microscopical Identification of Neuroendocrine Cells in the Respiratory Tract of Rats With Experimental Uraemia. Folia Morphol (Warsz ) 2004 ; 63 (2) : 233-235.

#### KASSEM M.

Stem Cells: Potential Therapy for Age-Related Diseases. Ann N Y Acad Sci 2006 ; 1067 : 436-442.

## KAUFFMAN SL.

Cell Proliferation in the Mammalian Lung. Int Rev Exp Pathol 1980 ; 22 : 131-191.

## KEENAN KP, COMBS JW, MCDOWELL EM.

Regeneration of Hamster Tracheal Epithelium After Mechanical Injury. I. Focal Lesions: Quantitative Morphologic Study of Cell Proliferation. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1982a; 41 (3) : 193-214.

## KEENAN KP, COMBS JW, MCDOWELL EM.

Regeneration of Hamster Tracheal Epithelium After Mechanical Injury. II. Multifocal Lesions: Stathmokinetic and Autoradiographic Studies of Cell Proliferation. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1982b ; 41 (3) : 215-229.

## KEENAN KP, COMBS JW, MCDOWELL EM.

Regeneration of Hamster Tracheal Epithelium After Mechanical Injury. III. Large and Small Lesions: Comparative Stathmokinetic and Single Pulse and Continuous Thymidine Labeling Autoradiographic Studies. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1982c; 41 (3): 231-252.

## KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A et al.

Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. Science 1989 ; 245 (4922) : 1073-1080.

## KHAN TZ, WAGENER JS, BOST T, MARTINEZ J, ACCURSO FJ, RICHES DW.

Early Pulmonary Inflammation in Infants With Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 151 (4) : 1075-1082.

#### KIM CF, JACKSON EL, WOOLFENDEN AE, LAWRENCE S, BABAR I, VOGEL S et al.

Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. Cell 2005 ; 121 (6) : 823-835.

## KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL et al.

Specific Association of Human Telomerase Activity With Immortal Cells and Cancer. Science 1994 ; 266 (5193) : 2011-2015.

## KING M.

The Role of Mucus Viscoelasticity in Cough Clearance. Biorheology 1987 ; 24 (6) : 589-597.

## KING M, ZAHM JM, PIERROT D, VAQUEZ-GIROD S, PUCHELLE E.

The Role of Mucus Gel Viscosity, Spinnability, and Adhesive Properties in Clearance by Simulated Cough. Biorheology 1989 ; 26 (4) : 737-745.

#### KIRKHAM S, SHEEHAN JK, KNIGHT D, RICHARDSON PS, THORNTON DJ.

Heterogeneity of Airways Mucus: Variations in the Amounts and Glycoforms of the Major Oligomeric Mucins MUC5AC and MUC5B.

Biochem J 2002 ; 361 (Pt 3) : 537-546.

## KLEIN-SZANTO AJ, TERZAGHI M, MIRKIN LD, MARTIN D, SHIBA M.

Propagation of Normal Human Epithelial Cell Populations Using an in Vivo Culture System. Description and Applications.

Am J Pathol 1982 ; 108 (2) : 231-239.

## KNOWLES MR, BOUCHER RC.

Mucus Clearance As a Primary Innate Defense Mechanism for Mammalian Airways. J Clin Invest 2002 ; 109 (5) : 571-577.

#### KNOWLES MR, ROBINSON JM, WOOD RE, PUE CA, MENTZ WM, WAGER GC et al.

Ion Composition of Airway Surface Liquid of Patients With Cystic Fibrosis As Compared With Normal and Disease-Control Subjects.

J Clin Invest 1997 ; 100 (10) : 2588-2595.

## KNOWLES MR, STUTTS MJ, SPOCK A, FISCHER N, GATZY JT, BOUCHER RC.

Abnormal Ion Permeation Through Cystic Fibrosis Respiratory Epithelium. Science 1983 ; 221 (4615) : 1067-1070.

## KOBAYASHI K, SALATHE M, PRATT MM, CARTAGENA NJ, SOLONI F, SEYBOLD ZV et al.

Mechanism of Hydrogen Peroxide-Induced Inhibition of Sheep Airway Cilia. Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 6 (6) : 667-673.

## KONG XY, AN J, TAO SH, CHEN Y, DU J, FENG ZC.

[Expression of Telomerase Reverse Transcriptase and Its Significance in Human Fetal Lung Development]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 2004 ; 24 (5) : 566-568.

## KONRADOVA V, VAVROVA V, HLOUSKOVA Z, COPOVA M, TOMANEK A, HOUSTEK J.

Ultrastructure of Bronchial Epithelium in Children With Chronic or Recurrent Respiratory Diseases. Eur J Respir Dis 1982 ; 63 (6) : 516-525.

#### KONSTAN MW, BERGER M.

Current Understanding of the Inflammatory Process in Cystic Fibrosis: Onset and Etiology. Pediatr Pulmonol 1997 ; 24 (2) : 137-142.

#### KOOCHEKPOUR S, PILKINGTON GJ, MERZAK A.

Hyaluronic Acid/CD44H Interaction Induces Cell Detachment and Stimulates Migration and Invasion of Human Glioma Cells in Vitro. Int J Cancer 1995 ; 63 (3) : 450-454.

KOSTAMO K. SORSA T. LEINO M. TERVAHARTIALA T. ALENIUS H. RICHARDSON M et al.

In Vivo Relationship Between Collagenase-2 and Interleukin-8 but Not Tumour Necrosis Factor-Alpha in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyposis.

Allergy 2005 ; 60 (10) : 1275-1279.

#### KOTTON DN, FABIAN AJ, MULLIGAN RC.

Failure of Bone Marrow to Reconstitute Lung Epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2005 ; 33 (4) : 328-334.

#### KOTTON DN, MA BY, CARDOSO WV, SANDERSON EA, SUMMER RS, WILLIAMS MC et al.

Bone Marrow-Derived Cells As Progenitors of Lung Alveolar Epithelium. Development 2001 ; 128 (24) : 5181-5188.

#### KOZLOVA I, NILSSON H, HENRIKSNAS J, ROOMANS GM.

X-Ray Microanalysis of Apical Fluid in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cell Lines. Cell Physiol Biochem 2006a ; 17 (1-2) : 13-20.

#### KOZLOVA I, VANTHANOUVONG V, JOHANNESSON M, ROOMANS GM.

Composition of Airway Surface Liquid Determined by X-Ray Microanalysis. Ups J Med Sci 2006b ; 111 (1) : 137-153.

## KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, ZAPATA JM, VAN ARSDALE T, GASCOYNE RD, BERERN K et al.

TRAF-4 Expression in Epithelial Progenitor Cells. Analysis in Normal Adult, Fetal, and Tumor Tissues. Am J Pathol 1998 ; 152 (6) : 1549-1561.

#### KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R et al.

Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. Cell 2001 ; 105 (3) : 369-377.

#### KRAUSS RD, BUBIEN JK, DRUMM ML, ZHENG T, PEIPER SC, COLLINS FS et al.

Transfection of Wild-Type CFTR into Cystic Fibrosis Lymphocytes Restores Chloride Conductance at G1 of the Cell Cycle.

EMBO J 1992 ; 11 (3) : 875-883.

#### KREDA SM, GYNN MC, FENSTERMACHER DA, BOUCHER RC, GABRIEL SE.

Expression and Localization of Epithelial Aquaporins in the Adult Human Lung. Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 24 (3) : 224-234.

## KUVER R, LEE SP.

Calcium Binding to Biliary Mucins Is Dependent on Sodium Ion Concentration: Relevance to Cystic Fibrosis. Biochem Biophys Res Commun 2004 ; 314 (2) : 330-334.

#### LABARGE MA, BLAU HM.

Biological Progression From Adult Bone Marrow to Mononucleate Muscle Stem Cell to Multinucleate Muscle Fiber in Response to Injury. Cell 2002 ; 111 (4) : 589-601.

#### LAGASSE E, CONNORS H, AL DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L et al.

Purified Hematopoietic Stem Cells Can Differentiate into Hepatocytes in Vivo. Nat Med 2000 ; 6 (11) : 1229-1234.

#### LAJTHA LG.

Stem Cell Concepts. Differentiation 1979 ; 14 (1-2) : 23-34.

## LAMB D, REID L.

Histochemical and Autoradiographic Investigation of the Serous Cells of the Human Bronchial Glands. J Pathol 1970 ; 100 (2) : 127-138.

#### LAMBLIN G, LHERMITTE M, KLEIN A, HOUDRET N, SCHARFMAN A, RAMPHAL R et al.

The Carbohydrate Diversity of Human Respiratory Mucins: a Protection of the Underlying Mucosa? Am Rev Respir Dis 1991a ; 144 (3 Pt 2) : S19-S24.

#### LAMBLIN G, RAHMOUNE H, WIERUSZESKI JM, LHERMITTE M, STRECKER G, ROUSSEL P.

Structure of Two Sulphated Oligosaccharides From Respiratory Mucins of a Patient Suffering From Cystic Fibrosis. A Fast-Atom-Bombardment M.s. and 1H-n.m.r. Spectroscopic Study. Biochem J 1991b ; 275 (Pt 1) : 199-206.

#### LAMBLIN G, RAMPHAL R.

[Bronchial Mucins and Infection in Cystic Fibrosis]. Pathol Biol (Paris) 1991c ; 39 (6) : 592-597.

#### LANE BP, GORDON R.

Regeneration of Rat Tracheal Epithelium After Mechanical Injury. I. The Relationship Between Mitotic Activity and Cellular Differentiation. Proc Soc Exp Biol Med 1974 ; 145 (4) : 1139-1144.

#### LAOUKILI J, PERRET E, WILLEMS T, MINTY A, PARTHOENS E, HOUCINE O et al.

IL-13 Alters Mucociliary Differentiation and Ciliary Beating of Human Respiratory Epithelial Cells. J Clin Invest 2001; 108 (12): 1817-1824.

## LARSON JE, DELCARPIO JB, FARBERMAN MM, MORROW SL, COHEN JC.

CFTR Modulates Lung Secretory Cell Proliferation and Differentiation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 279 (2) : L333-L341.

#### LECHNER J.F., LAVECK M.A.

A Serum-Free Method for Culturing Normal Human Bronchial Epithelial Cells at Clonal Density. Journal of Tissue Culture Methods 1985 ; 9 (2) : 43-48.

## LEE CH, IGARASHI Y, HOHMAN RJ, KAULBACH H, WHITE MV, KALINER MA.

Distribution of Secretory Leukoprotease Inhibitor in the Human Nasal Airway. Am Rev Respir Dis 1993 ; 147 (3) : 710-716.

## LEE EC, LOTZ MM, STEELE GD, JR., MERCURIO AM.

The Integrin Alpha 6 Beta 4 Is a Laminin Receptor. J Cell Biol 1992 ; 117 (3) : 671-678.

#### LEE MM, YOON BJ, OSIEWICZ K, PRESTON M, BUNDY B, VAN HEECKEREN AM et al.

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Regulates Resistance to Infection. Infect Immun 2005a ; 73 (1) : 661-665.

## LEE TW, MATTHEWS DA, BLAIR GE.

Novel Molecular Approaches to Cystic Fibrosis Gene Therapy. Biochem J 2005b ; 387 (Pt 1) : 1-15.

## LEGRAND C, GILLES C, ZAHM JM, POLETTE M, BUISSON AC, KAPLAN H et al.

Airway Epithelial Cell Migration Dynamics. MMP-9 Role in Cell-Extracellular Matrix Remodeling.

J Cell Biol 1999 ; 146 (2) : 517-529.

## LEHRER RI, LICHTENSTEIN AK, GANZ T.

Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. Annu Rev Immunol 1993 ; 11 : 105-128.

#### LEIGH MW, KYLANDER JE, YANKASKAS JR, BOUCHER RC.

Cell Proliferation in Bronchial Epithelium and Submucosal Glands of Cystic Fibrosis Patients. Am J Respir Cell Mol Biol 1995 ; 12 (6) : 605-612.

#### LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P.

Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. Physiol Rev 2005 ; 85 (4) : 1373-1416.

## LESIMPLE P., VAN SEUNINGEN I., BUISINE M-P., COPIN M-C.HINZ M., HOFFMAN W., HAJJ R. et al.

TTF3 (Trefoil Factor Family 3) Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation. Am J Respir Cell Mol Biol 2006.

#### LEWIS SA, BERG JR, KLEINE TJ.

Modulation of Epithelial Permeability by Extracellular Macromolecules. Physiol Rev 1995 ; 75 (3) : 561-589.

#### LI A, DUBEY S, VARNEY ML, DAVE BJ, SINGH RK.

IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. J Immunol 2003 ; 170 (6) : 3369-3376.

#### LI A, DUBEY S, VARNEY ML, SINGH RK.

Interleukin-8-Induced Proliferation, Survival, and MMP Production in CXCR1 and CXCR2 Expressing Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Microvasc Res 2002 ; 64 (3) : 476-481.

#### LI A, VARNEY ML, SINGH RK.

Expression of Interleukin 8 and Its Receptors in Human Colon Carcinoma Cells With Different Metastatic Potentials.

Clin Cancer Res 2001 ; 7 (10) : 3298-3304.

#### LI K, NAGALLA SR, SPINDEL ER.

A Rhesus Monkey Model to Characterize the Role of Gastrin-Releasing Peptide (GRP) in Lung Development. Evidence for Stimulation of Airway Growth. J Clin Invest 1994 ; 94 (4) : 1605-1615.

#### LI XY, DONALDSON K, BROWN D, MACNEE W.

The Role of Tumor Necrosis Factor in Increased Airspace Epithelial Permeability in Acute Lung Inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol 1995 ; 13 (2) : 185-195.

#### LI YY, MCTIERNAN CF, FELDMAN AM.

Interplay of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Their Regulators in Cardiac Matrix Remodeling. Cardiovase Res 2000 ; 46 (2) : 214-224.

Caldiovasc Res 2000, 40(2). 214-224.

#### LIANG SX, SUMMER R, SUN X, FINE A.

Gene Expression Profiling and Localization of Hoechst-Effluxing CD45- and CD45+ Cells in the Embryonic Mouse Lung. Physiol Genomics 2005; 23 (2): 172-181.

#### LIOTE H, ZAHM JM, PIERROT D, PUCHELLE E.

Role of Mucus and Cilia in Nasal Mucociliary Clearance in Healthy Subjects. Am Rev Respir Dis 1989 ; 140 (1) : 132-136.

#### LIU JY, NETTESHEIM P, RANDELL SH.

Growth and Differentiation of Tracheal Epithelial Progenitor Cells. Am J Physiol 1994 ; 266 (3 Pt 1) : L296-L307.

#### LIU Z, SHIPLEY JM, VU TH, ZHOU X, DIAZ LA, WERB Z et al.

Gelatinase B-Deficient Mice Are Resistant to Experimental Bullous Pemphigoid. J Exp Med 1998 ; 188 (3) : 475-482.

## LOEFFLER M, ROEDER I.

Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models--a Conceptual Approach. Cells Tissues Organs 2002 ; 171 (1) : 8-26.

#### LOI R, BECKETT T, GONCZ KK, SURATT BT, WEISS DJ.

Limited Restoration of Cystic Fibrosis Lung Epithelium in Vivo With Adult Bone Marrow-Derived Cells. Am J Respir Crit Care Med 2006 ; 173 (2) : 171-179.

#### LOPEZ-FERRER A, CURULL V, BARRANCO C, GARRIDO M, LLORETA J, REAL FX et al.

Mucins As Differentiation Markers in Bronchial Epithelium. Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Display Similar Expression Patterns.

Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 24 (1) : 22-29.

## LOUSSOUARN G, DEMOLOMBE S, MOHAMMAD-PANAH R, ESCANDE D, BARO I.

Expression of CFTR Controls CAMP-Dependent Activation of Epithelial K+ Currents. Am J Physiol 1996 ; 271 (5 Pt 1) : C1565-C1573.

#### LU PC, YE H, MAEDA M, AZAR DT.

Immunolocalization and Gene Expression of Matrilysin During Corneal Wound Healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999 ; 40 (1) : 20-27.

#### LUNDIEN MC, MOHAMMED KA, NASREEN N, TEPPER RS, HARDWICK JA, SANDERS KL et al.

Induction of MCP-1 Expression in Airway Epithelial Cells: Role of CCR2 Receptor in Airway Epithelial Injury. J Clin Immunol 2002; 22 (3) : 144-152.

#### LUTHER T, DITTERT DD, KOTZSCH M, ERLICH J, ALBRECHT S, MACKMAN N et al.

Functional Implications of Tissue Factor Localization to Cell-Cell Contacts in Myocardium. J Pathol 2000 ; 192 (1) : 121-130.

#### MA R, WANG Y, CHENG G, ZHANG HZ, WAN HY, HUANG SG.

MUC5AC Expression Up-Regulation Goblet Cell Hyperplasia in the Airway of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Chin Med Sci J 2005 ; 20 (3) : 181-184.

## MACHEN TE.

Innate Immune Response in CF Airway Epithelia: Hyperinflammatory? Am J Physiol Cell Physiol 2006 ; 291 (2) : C218-C230.

#### MACKAY CR, TERPE HJ, STAUDER R, MARSTON WL, STARK H, GUNTHERT U.

Expression and Modulation of CD44 Variant Isoforms in Humans. J Cell Biol 1994 ; 124 (1-2) : 71-82.

#### MACKLIN CC.

The Pulmonary Alveolar Mucoid Film and the Pneumonocytes. Lancet 1954 ; 266 (6822) : 1099-1104.

#### MADARA JL.

Intestinal Absorptive Cell Tight Junctions Are Linked to Cytoskeleton. Am J Physiol 1987 ; 253 (1 Pt 1) : C171-C175.

#### MADARA JL, DHARMSATHAPHORN K.

Occluding Junction Structure-Function Relationships in a Cultured Epithelial Monolayer.

J Cell Biol 1985 ; 101 (6) : 2124-2133.

## MAEDA S, ITO H, TANAKA K, HAYAKAWA T, SEKI M.

Localization of Aquaporin Water Channels in the Airway of the Musk Shrew (Suncus Murinus) and the Rat. J Vet Med Sci 2005 ; 67 (10) : 975-984.

## MAGGI CA.

Tachykinin Receptors and Airway Pathophysiology. Eur Respir J 1993 ; 6 (5) : 735-742.

## MAHESHWARI A, LU W, LACSON A, BARLEYCORN AA, NOLAN S, CHRISTENSEN RD et al.

Effects of Interleukin-8 on the Developing Human Intestine. Cytokine 2002 ; 20 (6) : 256-267.

#### MAILLEAU C, PAUL A, COLIN M, XING PX, GUERNIER C, BERNAUDIN JF et al.

Glycoconjugate Metabolism in a Cystic Fibrosis Knockout Mouse Model. Mol Genet Metab 2001 ; 72 (2) : 122-131.

#### MAJKA SM, BEUTZ MA, HAGEN M, IZZO AA, VOELKEL N, HELM KM.

Identification of Novel Resident Pulmonary Stem Cells: Form and Function of the Lung Side Population. Stem Cells 2005 ; 23 (8) : 1073-1081.

#### MALL M, GRUBB BR, HARKEMA JR, O'NEAL WK, BOUCHER RC.

Increased Airway Epithelial Na+ Absorption Produces Cystic Fibrosis-Like Lung Disease in Mice. Nat Med 2004 ; 10 (5) : 487-493.

#### MANTILE G, MIELE L, CORDELLA-MIELE E, SINGH G, KATYAL SL, MUKHERJEE AB.

Human Clara Cell 10-KDa Protein Is the Counterpart of Rabbit Uteroglobin. J Biol Chem 1993 ; 268 (27) : 20343-20351.

#### MARSHALL CT, GUO Z, LU C, KLUEBER KM, KHALYFA A, COOPER NG et al.

Human Adult Olfactory Neuroepithelial Derived Progenitors Retain Telomerase Activity and Lack Apoptotic Activity.

Brain Res 2005 ; 1045 (1-2) : 45-56.

## MARTIN GR.

Isolation of a Pluripotent Cell Line From Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1981 ; 78 (12) : 7634-7638.

#### MARTINEZ-ANTON A, DEBOLOS C, GARRIDO M, ROCA-FERRER J, BARRANCO C, ALOBID I et al.

Mucin Genes Have Different Expression Patterns in Healthy and Diseased Upper Airway Mucosa. Clin Exp Allergy 2006 ; 36 (4) : 448-457.

## MASON RJ, WILLIAMS MC, MOSES HL, MOHLA S, BERBERICH MA.

Stem Cells in Lung Development, Disease, and Therapy. Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ; 16 (4) : 355-363.

## MASSARO GD, FISCHMAN CM, CHIANG MJ, AMADO C, MASSARO D.

Regulation of Secretion in Clara Cells: Studies Using the Isolated Perfused Rat Lung. J Clin Invest 1981 ; 67 (2) : 345-351.

## MASSENGALE AR, QUINN F, JR., YANKASKAS J, WEISSMAN D, MCCLELLAN WT, CUFF C et al.

Reduced Interleukin-8 Production by Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (5) : 1073-1080.

## MATSUDA T, NAKAMURA T, NAKAO K, ARAI T, KATSUKI M, HEIKE T et al.

STAT3 Activation Is Sufficient to Maintain an Undifferentiated State of Mouse Embryonic Stem Cells. EMBO J 1999 ; 18 (15) : 4261-4269.

#### MATSUI H, DAVIS CW, TARRAN R, BOUCHER RC.

Osmotic Water Permeabilities of Cultured, Well-Differentiated Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelia. J Clin Invest 2000 ; 105 (10) : 1419-1427.

#### MATSUI H, GRUBB BR, TARRAN R, RANDELL SH, GATZY JT, DAVIS CW et al.

Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease.

Cell 1998 ; 95 (7) : 1005-1015.

#### MATSUI H, VERGHESE MW, KESIMER M, SCHWAB UE, RANDELL SH, SHEEHAN JK et al.

Reduced Three-Dimensional Motility in Dehydrated Airway Mucus Prevents Neutrophil Capture and Killing Bacteria on Airway Epithelial Surfaces.

J Immunol 2005 ; 175 (2) : 1090-1099.

# MATSUYAMA W, WATANABE M, SHIRAHAMA Y, HIRANO R, MITSUYAMA H, HIGASHIMOTO I et al.

Suppression of Discoidin Domain Receptor 1 by RNA Interference Attenuates Lung Inflammation. J Immunol 2006 ; 176 (3) : 1928-1936.

#### MATTSSON E, HARTUNG T, MORATH S, EGESTEN A.

Highly Purified Lipoteichoic Acid From Staphylococcus Aureus Induces Procoagulant Activity and Tissue Factor Expression in Human Monocytes but Is a Weak Inducer in Whole Blood: Comparison With Peptidoglycan.

Infect Immun 2004 ; 72 (7) : 4322-4326.

#### MCDOWELL EM, BARRETT LA, GLAVIN F, HARRIS CC, TRUMP BF.

The Respiratory Epithelium. I. Human Bronchus. J Natl Cancer Inst 1978 ; 61 (2) : 539-549.

#### MCDOWELL EM, BECCI PJ, SCHURCH W, TRUMP BF.

The Respiratory Epithelium. VII. Epidermoid Metaplasia of Hamster Tracheal Epithelium During Regeneration Following Mechanical Injury.

J Natl Cancer Inst 1979 ; 62 (4) : 995-1008.

#### MCDOWELL EM, COMBS JW, NEWKIRK C.

Changes in Secretory Cells of Hamster Tracheal Epithelium in Response to Acute Sublethal Injury: a Quantitative Study.

Exp Lung Res 1983 ; 4 (3) : 227-243.

#### MCDOWELL EM, HOYT RF, JR., SOROKIN SP.

Ontogeny of Endocrine Cells in the Respiratory System of Syrian Golden Hamsters. II. Intrapulmonary Airways and Alveoli. Cell Tissue Res 1994a ; 275 (1) : 157-167.

MCDOWELL EM, NEWKIRK C, COLEMAN B.

Development of Hamster Tracheal Epithelium: I. A Quantitative Morphologic Study in the Fetus.

Anat Rec 1985 ; 213 (3) : 429-447.

## MCDOWELL EM, SOROKIN SP, HOYT RF, JR.

Ontogeny of Endocrine Cells in the Respiratory System of Syrian Golden Hamsters. I. Larynx and Trachea. Cell Tissue Res 1994b ; 275 (1) : 143-156.

#### MCELVANEY NG, NAKAMURA H, BIRRER P, HEBERT CA, WONG WL, ALPHONSO M et al.

Modulation of Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. In Vivo Suppression of Interleukin-8 Levels on the Respiratory Epithelial Surface by Aerosolization of Recombinant Secretory Leukoprotease Inhibitor. J Clin Invest 1992 ; 90 (4) : 1296-1301.

#### MCGUIRE JK, LI Q, PARKS WC.

Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) Mediates E-Cadherin Ectodomain Shedding in Injured Lung Epithelium.

Am J Pathol 2003 ; 162 (6) : 1831-1843.

## MECHICHE H, CORNILLET-LEFEBVRE P, NGUYEN P.

A Subpopulation of Human B Lymphocytes Can Express a Functional Tissue Factor in Response to Phorbol Myristate Acetate. Thromb Haemost 2005 ; 94 (1) : 146-154.

MELLER D, PIRES RT, TSENG SC.

Ex Vivo Preservation and Expansion of Human Limbal Epithelial Stem Cells on Amniotic Membrane Cultures. Br J Ophthalmol 2002 ; 86 (4) : 463-471.

#### MERCER PF, SHUTE JK, BHOWMIK A, DONALDSON GC, WEDZICHA JA, WARNER JA.

MMP-9, TIMP-1 and Inflammatory Cells in Sputum From COPD Patients During Exacerbation. Respir Res 2005; 6:151.

#### MERCER RR, RUSSELL ML, ROGGLI VL, CRAPO JD.

Cell Number and Distribution in Human and Rat Airways. Am J Respir Cell Mol Biol 1994 ; 10 (6) : 613-624.

#### MERCURIO AR, RHODIN JA.

An Electron Microscopic Study on the Type I Pneumocyte in the Cat: Differentiation. Am J Anat 1976 ; 146 (3) : 255-271.

#### **MESNIL M.**

[Gap Junctions and Cancer: Implications and Perspectives]. Med Sci (Paris) 2004 ; 20 (2) : 197-206.

#### **MEYRICK B, REID L.**

Ultrastructure of Cells in the Human Bronchial Submucosal Glands. J Anat 1970 ; 107 (Pt 2) : 281-299.

#### **MEYRICK B, STURGESS JM, REID L.**

A Reconstruction of the Duct System and Secretory Tubules of the Human Bronchial Submucosal Gland. Thorax 1969 ; 24 (6) : 729-736.

#### MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR.

Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo From Bone Marrow. Science 2000 ; 290 (5497) : 1779-1782.

#### MIAN BM, DINNEY CP, BERMEJO CE, SWEENEY P, TELLEZ C, YANG XD et al.

Fully Human Anti-Interleukin 8 Antibody Inhibits Tumor Growth in Orthotopic Bladder Cancer Xenografts Via Down-Regulation of Matrix Metalloproteases and Nuclear Factor-KappaB. Clin Cancer Res 2003 ; 9 (8) : 3167-3175.

#### MILLER TL, SHASHIKANT BN, PILON AL, PIERCE RA, SHAFFER TH, WOLFSON MR.

Effects of an Intratracheally Delivered Anti-Inflammatory Protein (RhCC10) on Physiological and Lung Structural Indices in a Juvenile Model of Acute Lung Injury. Biol Neonate 2006; 89 (3) : 159-170.

#### MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, SEGAWA K, MURAKAMI M, TAKAHASHI K et al.

The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. Cell 2003 ; 113 (5) : 631-642.

## MOLL R, MOLL I.

Epidermal Adhesion Molecules and Basement Membrane Components As Target Structures of Autoimmunity. Virchows Arch 1998 ; 432 (6) : 487-504.

#### MONTESANO R, SCHALLER G, ORCI L.

Induction of Epithelial Tubular Morphogenesis In Vitro by Fibroblast-Derived Soluble Factors. Cell 1991; 66 (4): 697-711.

#### MORAES TJ, PLUMB J, MARTIN R, VACHON E, CHEREPANOV V, KOH A et al.

Abnormalities in the Pulmonary Innate Immune System in Cystic Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (3) : 364-374.

#### MORALES CP, HOLT SE, OUELLETTE M, KAUR KJ, YAN Y, WILSON KS et al.

Absence of Cancer-Associated Changes in Human Fibroblasts Immortalized With Telomerase. Nat Genet 1999 ; 21 (1) : 115-118.

#### MORRIS AP, CUNNINGHAM SA, TOUSSON A, BENOS DJ, FRIZZELL RA.

Polarization-Dependent Apical Membrane CFTR Targeting Underlies CAMP-Stimulated Cl- Secretion in Epithelial Cells.

Am J Physiol 1994 ; 266 (1 Pt 1) : C254-C268.

#### MORTENSEN J, HANSEN A, FALK M, NIELSEN IK, GROTH S.

Reduced Effect of Inhaled Beta 2-Adrenergic Agonists on Lung Mucociliary Clearance in Patients With Cystic Fibrosis

Chest 1993 ; 103 (3) : 805-811.

#### MOSCA L, BARBARESCHI M, MAURI MF, MUNGUIA-BARRERA J, FRIGO B, MUSCARA M et al.

Neuroendocrine Lung Structures and Tumours: Immunohistochemical Study by Specific Markers. Histol Histopathol 1988 ; 3 (4) : 367-376.

#### MOTOJIMA S, FRIGAS E, LOEGERING DA, GLEICH GJ.

Toxicity of Eosinophil Cationic Proteins for Guinea Pig Tracheal Epithelium in Vitro. Am Rev Respir Dis 1989 ; 139 (3) : 801-805.

#### MRUGACZ M, KACZMARSKI M, BAKUNOWICZ-LAZARCZYK A, ZELAZOWSKA B, WYSOCKA J. MINAROWSKA A.

IL-8 and IFN-Gamma in Tear Fluid of Patients With Cystic Fibrosis. J Interferon Cytokine Res 2006 ; 26 (2) : 71-75.

## MUHLEBACH MS, REED W, NOAH TL.

Quantitative Cytokine Gene Expression in CF Airway. Pediatr Pulmonol 2004 ; 37 (5) : 393-399.

## MUHLEBACH MS, STEWART PW, LEIGH MW, NOAH TL.

Quantitation of Inflammatory Responses to Bacteria in Young Cystic Fibrosis and Control Patients. Am J Respir Crit Care Med 1999 ; 160 (1) : 186-191.

#### MULAYIM N, SAVLU A, GUZELOGLU-KAYISLI O, KAYISLI UA, ARICI A.

Regulation of Endometrial Stromal Cell Matrix Metalloproteinase Activity and Invasiveness by Interleukin-8. Fertil Steril 2004 ; 81 Suppl 1 : 904-911.

## MULLER M. ALBRECHT S. GOLFERT F. HOFER A. FUNK RH. MAGDOLEN V et al.

Localization of Tissue Factor in Actin-Filament-Rich Membrane Areas of Epithelial Cells. Exp Cell Res 1999 ; 248 (1) : 136-147.

## NADEL JA.

Regulation of Airway Secretions. Chest 1985 ; 87 (1 Suppl) : 111S-113S.

#### NAGANO K, TAOKA M, YAMAUCHI Y, ITAGAKI C, SHINKAWA T, NUNOMURA K et al.

Large-Scale Identification of Proteins Expressed in Mouse Embryonic Stem Cells. Proteomics 2005 ; 5 (5) : 1346-1361.

## NAKAJIMA M, KAWANAMI O, JIN E, GHAZIZADEH M, HONDA M, ASANO G et al.

Immunohistochemical and Ultrastructural Studies of Basal Cells, Clara Cells and Bronchiolar Cuboidal Cells in Normal Human Airways.

Pathol Int 1998 ; 48 (12) : 944-953.

#### NARUSHIMA M, KOBAYASHI N, OKITSU T, TANAKA Y, LI SA, CHEN Y et al.

A Human Beta-Cell Line for Transplantation Therapy to Control Type 1 Diabetes. Nat Biotechnol 2005 ; 23 (10) : 1274-1282.

#### NELSON AR, FINGLETON B, ROTHENBERG ML, MATRISIAN LM.

Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. J Clin Oncol 2000 ; 18 (5) : 1135-1149.

## NETTESHEIM P, JETTEN AM, INAYAMA Y, BRODY AR, GEORGE MA, GILMORE LB et al.

Pathways of Differentiation of Airway Epithelial Cells. Environ Health Perspect 1990 ; 85 : 317-329.

#### **NEURINGER IP, RANDELL SH.**

Stem Cells and Repair of Lung Injuries. Respir Res 2004 ; 5 (1) : 6.

#### **NEURINGER IP, RANDELL SH.**

Lung Stem Cell Update: Promise and Controversy. Monaldi Arch Chest Dis 2006 ; 65 (1) : 47-51.

#### NIELSEN S, KING LS, CHRISTENSEN BM, AGRE P.

Aquaporins in Complex Tissues. II. Subcellular Distribution in Respiratory and Glandular Tissues of Rat. Am J Physiol 1997; 273 (5 Pt 1): C1549-C1561.

#### NIWA H, MIYAZAKI J, SMITH AG.

Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells. Nat Genet 2000 ; 24 (4) : 372-376.

#### NOAH TL, BLACK HR, CHENG PW, WOOD RE, LEIGH MW.

Nasal and Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytokines in Early Cystic Fibrosis. J Infect Dis 1997; 175 (3): 638-647.

#### NUNOMURA K, NAGANO K, ITAGAKI C, TAOKA M, OKAMURA N, YAMAUCHI Y et al.

Cell Surface Labeling and Mass Spectrometry Reveal Diversity of Cell-Surface Markers and Signaling Molecules Expressed in Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells. Mol Cell Proteomics 2005 .

#### NYGAARD SD, GANZ T, PETERSON MW.

Defensins Reduce the Barrier Integrity of a Cultured Epithelial Monolayer Without Cytotoxicity. Am J Respir Cell Mol Biol 1993 ; 8 (2) : 193-200.

#### **O'NEILL SJ, LESPERANCE E, KLASS DJ.**

Human Lung Lavage Surfactant Enhances Staphylococcal Phagocytosis by Alveolar Macrophages. Am Rev Respir Dis 1984 ; 130 (6) : 1177-1179.

#### ODORICO JS, KAUFMAN DS, THOMSON JA.

Multilineage Differentiation From Human Embryonic Stem Cell Lines. Stem Cells 2001 ; 19 (3) : 193-204.

## OKA M, TAGOKU K, RUSSELL TL, NAKANO Y, HAMAZAKI T, MEYER EM et al.

CD9 Is Associated With Leukemia Inhibitory Factor-Mediated Maintenance of Embryonic Stem Cells. Mol Biol Cell 2002 ; 13 (4) : 1274-1281.

#### OKAWA H, OKUDA O, ARAI H, SAKURAGAWA N, SATO K.

Amniotic Epithelial Cells Transform into Neuron-Like Cells in the Ischemic Brain. Neuroreport 2001; 12 (18): 4003-4007.

## OKUMURA K, NAKAMURA K, HISATOMI Y, NAGANO K, TANAKA Y, TERADA K et al.

Salivary Gland Progenitor Cells Induced by Duct Ligation Differentiate into Hepatic and Pancreatic Lineages. Hepatology 2003 ; 38 (1) : 104-113.

## OLIVIER KN, BENNETT WD, HOHNEKER KW, ZEMAN KL, EDWARDS LJ, BOUCHER RC et al.

Acute Safety and Effects on Mucociliary Clearance of Aerosolized Uridine 5'-Triphosphate +/- Amiloride in Normal Human Adults.

Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 154 (1) : 217-223.

#### ORDONEZ CL, KARTASHOV AI, WOHL ME.

Variability of Markers of Inflammation and Infection in Induced Sputum in Children With Cystic Fibrosis. J Pediatr 2004 ; 145 (5) : 689-692.

#### ORDONEZ CL, KHASHAYAR R, WONG HH, FERRANDO R, WU R, HYDE DM et al.

Mild and Moderate Asthma Is Associated With Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression.

Am J Respir Crit Care Med 2001 ; 163 (2) : 517-523.

#### ORTIZ LA, GAMBELLI F, MCBRIDE C, GAUPP D, BADDOO M, KAMINSKI N et al.

Mesenchymal Stem Cell Engraftment in Lung Is Enhanced in Response to Bleomycin Exposure and Ameliorates Its Fibrotic Effects.

Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ; 100 (14) : 8407-8411.

#### OSTROWSKI LE, ANDREWS K, POTDAR P, MATSUURA H, JETTEN A, NETTESHEIM P.

Cloning and Characterization of KPL2, a Novel Gene Induced During Ciliogenesis of Tracheal Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (4) : 675-683.

#### OTANI EM, NEWKIRK C, MCDOWELL EM.

Development of Hamster Tracheal Epithelium: IV. Cell Proliferation and Cytodifferentiation in the Neonate. Anat Rec 1986 ; 214 (2) : 183-192.

#### OTTO WR.

Lung Stem Cells. Int J Exp Pathol 1997 ; 78 (5) : 291-310.

#### OTTO WR.

Lung Epithelial Stem Cells. J Pathol 2002 ; 197 (4) : 527-535.

#### OUELLETTE MM, MCDANIEL LD, WRIGHT WE, SHAY JW, SCHULTZ RA.

The Establishment of Telomerase-Immortalized Cell Lines Representing Human Chromosome Instability Syndromes.

Hum Mol Genet 2000 ; 9 (3) : 403-411.

## PACK RJ, AL UGAILY LH, MORRIS G, WIDDICOMBE JG.

The Distribution and Structure of Cells in the Tracheal Epithelium of the Mouse. Cell Tissue Res 1980 ; 208 (1) : 65-84.

#### PAGANO SF, IMPAGNATIELLO F, GIRELLI M, COVA L, GRIONI E, ONOFRI M et al.

Isolation and Characterization of Neural Stem Cells From the Adult Human Olfactory Bulb. Stem Cells 2000 ; 18 (4) : 295-300.

## PALMQVIST L, GLOVER CH, HSU L, LU M, BOSSEN B, PIRET JM et al.

Correlation of Murine Embryonic Stem Cell Gene Expression Profiles With Functional Measures of Pluripotency.

Stem Cells 2005 ; 23 (5) : 663-680.

#### PARAD RB, GERARD CJ, ZURAKOWSKI D, NICHOLS DP, PIER GB.

Pulmonary Outcome in Cystic Fibrosis Is Influenced Primarily by Mucoid Pseudomonas Aeruginosa Infection and Immune Status and Only Modestly by Genotype. Infect Immun 1999 ; 67 (9) : 4744-4750.

#### PARK KS, WELLS JM, ZORN AM, WERT SE, LAUBACH VE, FERNANDEZ LG et al.

Transdifferentiation of Ciliated Cells During Repair of the Respiratory Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (2) : 151-157.

#### PARKS WC, LOPEZ-BOADO YS, WILSON CL.

Matrilysin in Epithelial Repair and Defense. Chest 2001 ; 120 (1 Suppl) : 36S-41S.

#### PASTOR LM, FERRAN A, CALVO A, SPREKELSEN C, HORN R, MARIN JA.

Morphological and Histochemical Study of Human Submucosal Laryngeal Glands. Anat Rec 1994 ; 239 (4) : 453-467.

## PAVIA D.

Bronchoalveolar Clearance. Respiration 1991 ; 58 Suppl 1 : 13-17.

#### PAVIA D, AGNEW JE, CLARKE SW.

Cough and Mucociliary Clearance. Bull Eur Physiopathol Respir 1987 ; 23 Suppl 10 : 41s-45s.

#### PEAKE JL, REYNOLDS SD, STRIPP BR, STEPHENS KE, PINKERTON KE.

Alteration of Pulmonary Neuroendocrine Cells During Epithelial Repair of Naphthalene-Induced Airway Injury. Am J Pathol 2000 ; 156 (1) : 279-286.

## PELLEGRINI G, DELLAMBRA E, GOLISANO O, MARTINELLI E, FANTOZZI I, BONDANZA S et al.

P63 Identifies Keratinocyte Stem Cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 ; 98 (6) : 3156-3161.

## PEREZ-MORENO M, JAMORA C, FUCHS E.

Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. Cell 2003 ; 112 (4) : 535-548.

#### PEREZ-VILAR J, BOUCHER RC.

Reevaluating Gel-Forming Mucins' Roles in Cystic Fibrosis Lung Disease. Free Radic Biol Med 2004 ; 37 (10) : 1564-1577.

#### PERONI DG, DJUKANOVIC R, BRADDING P, FEATHER IH, MONTEFORT S, HOWARTH PH et al.

Expression of CD44 and Integrins in Bronchial Mucosa of Normal and Mildly Asthmatic Subjects. Eur Respir J 1996 ; 9 (11) : 2236-2242.

**PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N et al.** Bone Marrow As a Potential Source of Hepatic Oval Cells.

Science 1999 ; 284 (5417) : 1168-1170.

#### PETERSON MW, WALTER ME, NYGAARD SD.

Effect of Neutrophil Mediators on Epithelial Permeability. Am J Respir Cell Mol Biol 1995 ; 13 (6) : 719-727.

#### PEZZELLA F, TURLEY H, KUZU I, TUNGEKAR MF, DUNNILL MS, PIERCE CB et al.

Bcl-2 Protein in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. N Engl J Med 1993 ; 329 (10) : 690-694.

#### PHELPS DS, FLOROS J.

Localization of Pulmonary Surfactant Proteins Using Immunohistochemistry and Tissue in Situ Hybridization. Exp Lung Res 1991 ; 17 (6) : 985-995.

#### PHILLIPS RJ, BURDICK MD, HONG K, LUTZ MA, MURRAY LA, XUE YY et al.

Circulating Fibrocytes Traffic to the Lungs in Response to CXCL12 and Mediate Fibrosis. J Clin Invest 2004 ; 114 (3) : 438-446.

#### PIAO CQ, LIU L, ZHAO YL, BALAJEE AS, SUZUKI M, HEI TK.

Immortalization of Human Small Airway Epithelial Cells by Ectopic Expression of Telomerase. Carcinogenesis 2005 ; 26 (4) : 725-731.

## PIER GB, GROUT M, ZAIDI T, MELULENI G, MUESCHENBORN SS, BANTING G et al.

Salmonella Typhi Uses CFTR to Enter Intestinal Epithelial Cells. Nature 1998 ; 393 (6680) : 79-82.

## PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS.

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is an Epithelial Cell Receptor for Clearance of Pseudomonas Aeruginosa From the Lung. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 ; 94 (22) : 12088-12093.

## PLOPPER CG.

Comparative Morphologic Features of Bronchiolar Epithelial Cells. The Clara Cell. Am Rev Respir Dis 1983 ; 128 (2 Pt 2) : S37-S41.

## PLOPPER CG, ALLEY JL, WEIR AJ.

Differentiation of Tracheal Epithelium During Fetal Lung Maturation in the Rhesus Monkey Macaca Mulatta. Am J Anat 1986 ; 175 (1) : 59-71.

## PLOPPER CG, HILL LH, MARIASSY AT.

Ultrastructure of the Nonciliated Bronchiolar Epithelial (Clara) Cell of Mammalian Lung. III. A Study of Man With Comparison of 15 Mammalian Species. Exp Lung Res 1980 ; 1 (2) : 171-180.

## PLOTKOWSKI MC, TOURNIER JM, PUCHELLE E.

Pseudomonas Aeruginosa Strains Possess Specific Adhesins for Laminin. Infect Immun 1996 ; 64 (2) : 600-605.

## POLAK JM, BECKER KL, CUTZ E, GAIL DB, GONIAKOWSKA-WITALINSKA L, GOSNEY JR et al.

Lung Endocrine Cell Markers, Peptides, and Amines. Anat Rec 1993 ; 236 (1) : 169-171.

## POLETTE M, GILLES C, DE BENTZMANN S, GRUENERT D, TOURNIER JM, BIREMBAUT P.

Association of Fibroblastoid Features With the Invasive Phenotype in Human Bronchial Cancer Cell Lines. Clin Exp Metastasis 1998 ; 16 (2) : 105-112.

## POLOSUKHIN VV.

Ultrastructural of the Bronchial Epithelium in Chronic Inflammation. Ultrastruct Pathol 2001 ; 25 (2) : 119-128.

## PORCHET N, AUBERT JP.

[MUC Genes: Mucin or Not Mucin? That Is the Question]. Med Sci (Paris) 2004 ; 20 (5) : 569-574.

## PROUX-GILLARDEAUX V, GAVARD J, IRINOPOULOU T, MEGE RM, GALLI T.

Tetanus Neurotoxin-Mediated Cleavage of Cellubrevin Impairs Epithelial Cell Migration and Integrin-Dependent Cell Adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 ; 102 (18) : 6362-6367.

## PRUSA AR, MARTON E, ROSNER M, BERNASCHEK G, HENGSTSCHLAGER M.

Oct-4-Expressing Cells in Human Amniotic Fluid: a New Source for Stem Cell Research? Hum Reprod 2003 ; 18 (7) : 1489-1493.

## PUCHELLE E, BAJOLET O, ABELY M.

Airway Mucus in Cystic Fibrosis. Paediatr Respir Rev 2002 ; 3 (2) : 115-119.

## PUCHELLE E, GAILLARD D, PLOTON D, HINNRASKY J, FUCHEY C, BOUTTERIN MC et al.

Differential Localization of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 7 (5) : 485-491.

## PUCHELLE E, JACQUOT J, BECK G, ZAHM JM, GALABERT C.

Rheological and Transport Properties of Airway Secretions in Cystic Fibrosis--Relationships With the Degree of Infection and Severity of the Disease. Eur J Clin Invest 1985 ; 15 (6) : 389-394.

## PUCHELLE E, ZAHM JM, DUVIVIER C.

Spinability of Bronchial Mucus. Relationship With Viscoelasticity and Mucous Transport Properties. Biorheology 1983 ; 20 (2) : 239-249.

## PUCHELLE E, ZAHM JM, GIRARD F, BERTRAND A, POLU JM, AUG F et al.

Mucociliary Transport in Vivo and in Vitro. Relations to Sputum Properties in Chronic Bronchitis. Eur J Respir Dis 1980 ; 61 (5) : 254-264.

## PUCHELLE E, ZAHM JM, QUEMADA D.

Rheological Properties Controlling Mucociliary Frequency and Respiratory Mucus Transport. Biorheology 1987 ; 24 (6) : 557-563.

## PUDDICOMBE SM, POLOSA R, RICHTER A, KRISHNA MT, HOWARTH PH, HOLGATE ST et al.

Involvement of the Epidermal Growth Factor Receptor in Epithelial Repair in Asthma. FASEB J 2000 ; 14 (10) : 1362-1374.

## PYO RT, SATO Y, MACKMAN N, TAUBMAN MB.

Mice Deficient in Tissue Factor Demonstrate Attenuated Intimal Hyperplasia in Response to Vascular Injury and Decreased Smooth Muscle Cell Migration. Thromb Haemost 2004 ; 92 (3) : 451-458.

## QUESENBERRY PJ, DOONER G, COLVIN G, ABEDI M.

Stem Cell Biology and the Plasticity Polemic. Exp Hematol 2005 ; 33 (4) : 389-394.

## **OUINTON PM.**

Chloride Impermeability in Cystic Fibrosis. Nature 1983 ; 301 (5899) : 421-422.

## RAMALHO-SANTOS M, YOON S, MATSUZAKI Y, MULLIGAN RC, MELTON DA.

"Stemness": Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells. Science 2002 ; 298 (5593) : 597-600.

## RAMIREZ RD, WRIGHT WE, SHAY JW, TAYLOR RS.

Telomerase Activity Concentrates in the Mitotically Active Segments of Human Hair Follicles. J Invest Dermatol 1997 ; 108 (1) : 113-117.

## RAMIYA VK, MARAIST M, ARFORS KE, SCHATZ DA, PECK AB, CORNELIUS JG.

Reversal of Insulin-Dependent Diabetes Using Islets Generated in Vitro From Pancreatic Stem Cells. Nat Med 2000 ; 6 (3) : 278-282.

## RAMPHAL R, CARNOY C, FIEVRE S, MICHALSKI JC, HOUDRET N, LAMBLIN G et al.

Pseudomonas Aeruginosa Recognizes Carbohydrate Chains Containing Type 1 (Gal Beta 1-3GlcNAc) or Type 2 (Gal Beta 1-4GlcNAc) Disaccharide Units. Infect Immun 1991 ; 59 (2) : 700-704.

## **RANDELL SH, BOUCHER RC.**

Effective Mucus Clearance Is Essential for Respiratory Health. Am J Respir Cell Mol Biol 2006 .

## RANDELL SH, COMMENT CE, RAMAEKERS FC, NETTESHEIM P.

Properties of Rat Tracheal Epithelial Cells Separated Based on Expression of Cell Surface Alpha-Galactosyl End Groups.

Am J Respir Cell Mol Biol 1991 ; 4 (6) : 544-554.

## RANDELL SH, SHIMIZU T, BAKEWELL W, RAMAEKERS FC, NETTESHEIM P.

Phenotypic Marker Expression During Fetal and Neonatal Differentiation of Rat Tracheal Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1993 ; 8 (5) : 546-555.

## RAO LV, PENDURTHI UR.

Tissue Factor on Cells. Blood Coagul Fibrinolysis 1998 ; 9 Suppl 1 : S27-S35.

## RATJEN F, HARTOG CM, PAUL K, WERMELT J, BRAUN J.

Matrix Metalloproteases in BAL Fluid of Patients With Cystic Fibrosis and Their Modulation by Treatment With Dornase Alpha. Therew  $2002 \pm 57$  (11)  $\pm 020$  024

Thorax 2002 ; 57 (11) : 930-934.

## RAVANTI L, KAHARI VM.

Matrix Metalloproteinases in Wound Repair (Review). Int J Mol Med 2000 ; 6 (4) : 391-407.

## REDDY R, BUCKLEY S, DOERKEN M, BARSKY L, WEINBERG K, ANDERSON KD et al.

Isolation of a Putative Progenitor Subpopulation of Alveolar Epithelial Type 2 Cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 286 (4) : L658-L667.

## **REID CJ, GOULD S, HARRIS A.**

Developmental Expression of Mucin Genes in the Human Respiratory Tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ; 17 (5) : 592-598.

## REINIGER N, ICHIKAWA JK, PIER GB.

Influence of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator on Gene Expression in Response to Pseudomonas Aeruginosa Infection of Human Bronchial Epithelial Cells. Infect Immun 2005; 73 (10): 6822-6830.

## RENAULT V, PIRON-HAMELIN G, FORESTIER C, DIDONNA S, DECARY S, HENTATI F et al.

Skeletal Muscle Regeneration and the Mitotic Clock. Exp Gerontol 2000 ; 35 (6-7) : 711-719.

# RENNEKAMPFF HO, HANSBROUGH JF, KIESSIG V, DORE C, STICHERLING M, SCHRODER JM.

Bioactive Interleukin-8 Is Expressed in Wounds and Enhances Wound Healing. J Surg Res 2000 ; 93 (1) : 41-54.

## REUBINOFF BE, PERA MF, FONG CY, TROUNSON A, BONGSO A.

Embryonic Stem Cell Lines From Human Blastocysts: Somatic Differentiation in Vitro. Nat Biotechnol 2000 ; 18 (4) : 399-404.

## REYNOLDS SD, GIANGRECO A, HONG KU, MCGRATH KE, ORTIZ LA, STRIPP BR.

Airway Injury in Lung Disease Pathophysiology: Selective Depletion of Airway Stem and Progenitor Cell Pools Potentiates Lung Inflammation and Alveolar Dysfunction. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 287 (6) : L1256-L1265.

## **REYNOLDS SD, GIANGRECO A, POWER JH, STRIPP BR.**

Neuroepithelial Bodies of Pulmonary Airways Serve As a Reservoir of Progenitor Cells Capable of Epithelial Regeneration.

Am J Pathol 2000a ; 156 (1) : 269-278.

## REYNOLDS SD, HONG KU, GIANGRECO A, MANGO GW, GURON C, MORIMOTO Y et al.

Conditional Clara Cell Ablation Reveals a Self-Renewing Progenitor Function of Pulmonary Neuroendocrine Cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000b ; 278 (6) : L1256-L1263.

#### **RHODIN JA.**

The Ciliated Cell. Ultrastructure and Function of the Human Tracheal Mucosa. Am Rev Respir Dis 1966 ; 93 (3) : Suppl-15.

## RICHARDS M, TAN SP, TAN JH, CHAN WK, BONGSO A.

The Transcriptome Profile of Human Embryonic Stem Cells As Defined by SAGE. Stem Cells 2004 ; 22 (1) : 51-64.

#### RICHMAN-EISENSTAT JB, JORENS PG, HEBERT CA, UEKI I, NADEL JA.

Interleukin-8: an Important Chemoattractant in Sputum of Patients With Chronic Inflammatory Airway Diseases.

Am J Physiol 1993 ; 264 (4 Pt 1) : L413-L418.

#### RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z et al.

Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. Science 1989 ; 245 (4922) : 1066-1073.

#### RITTER LM, GARFIELD SH, THORGEIRSSON UP.

Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) Binds to the Cell Surface and Translocates to the Nucleus of Human MCF-7 Breast Carcinoma Cells. Biochem Biophys Res Commun 1999 ; 257 (2) : 494-499.

#### RIZVI AZ, SWAIN JR, DAVIES PS, BAILEY AS, DECKER AD, WILLENBRING H et al.

Bone Marrow-Derived Cells Fuse With Normal and Transformed Intestinal Stem Cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ; 103 (16) : 6321-6325.

#### ROBIN C, PFLUMIO F, VAINCHENKER W, COULOMBEL L.

Identification of Lymphomyeloid Primitive Progenitor Cells in Fresh Human Cord Blood and in the Marrow of Nonobese Diabetic-Severe Combined Immunodeficient (NOD-SCID) Mice Transplanted With Human CD34(+) Cord Blood Cells.

J Exp Med 1999 ; 189 (10) : 1601-1610.

## ROBINSON D, ASH H, YAYON A, NEVO Z, AVIEZER D.

Characteristics of Cartilage Biopsies Used for Autologous Chondrocytes Transplantation. Cell Transplant 2001; 10 (2): 203-208.

#### ROCHAT A, KOBAYASHI K, BARRANDON Y.

Location of Stem Cells of Human Hair Follicles by Clonal Analysis. Cell 1994 ; 76 (6) : 1063-1073.

## ROGER P, PUCHELLE E, BAJOLET-LAUDINAT O, TOURNIER JM, DEBORDEAUX C, PLOTKOWSKI MC et al.

Fibronectin and Alpha5beta1 Integrin Mediate Binding of Pseudomonas Aeruginosa to Repairing Airway Epithelium.

Eur Respir J 1999 ; 13 (6) : 1301-1309.

#### ROGERS AV, DEWAR A, CORRIN B, JEFFERY PK.

Identification of Serous-Like Cells in the Surface Epithelium of Human Bronchioles. Eur Respir J 1993 ; 6 (4) : 498-504.

#### **ROGERS DF.**

Airway Goblet Cells: Responsive and Adaptable Front-Line Defenders. Eur Respir J 1994 ; 7 (9) : 1690-1706.

## **ROGERS DF.**

The Airway Goblet Cell. Int J Biochem Cell Biol 2003 ; 35 (1) : 1-6.

#### ROGERS GB, CARROLL MP, SERISIER DJ, HOCKEY PM, JONES G, BRUCE KD.

Characterization of Bacterial Community Diversity in Cystic Fibrosis Lung Infections by Use of 16s Ribosomal DNA Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. J Clin Microbiol 2004 ; 42 (11) : 5176-5183.

#### ROGERS GB, CARROLL MP, SERISIER DJ, HOCKEY PM, KEHAGIA V, JONES GR et al.

Bacterial Activity in Cystic Fibrosis Lung Infections. Respir Res 2005 ; 6 (1) : 49.

#### ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M et al.

Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. Science 1989 ; 245 (4922) : 1059-1065.

#### ROSE MC.

Characterization of Human Tracheobronchial Mucin Glycoproteins. Methods Enzymol 1989 ; 179 : 3-17.

#### ROSE MC, VOYNOW JA.

Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. Physiol Rev 2006 ; 86 (1) : 245-278.

#### ROSENBERG MF, KAMIS AB, ALEKSANDROV LA, FORD RC, RIORDAN JR.

Purification and Crystallization of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). J Biol Chem 2004 ; 279 (37) : 39051-39057.

## ROSENFELD M, GIBSON RL, MCNAMARA S, EMERSON J, BURNS JL, CASTILE R et al.

Early Pulmonary Infection, Inflammation, and Clinical Outcomes in Infants With Cystic Fibrosis. Pediatr Pulmonol 2001 ; 32 (5) : 356-366.

#### ROSNER MH, VIGANO MA, OZATO K, TIMMONS PM, POIRIER F, RIGBY PW et al.

A POU-Domain Transcription Factor in Early Stem Cells and Germ Cells of the Mammalian Embryo. Nature 1990 ; 345 (6277) : 686-692.

## RUBINSSTEIN E, JASMIN C, BOUCHEIX C.

Les Tétraspanines. Hématologie 2006 ; 6 : 280-288.

## RUTLAND J, GRIFFIN WM, COLE PJ.

Human Ciliary Beat Frequency in Epithelium From Intrathoracic and Extrathoracic Airways. Am Rev Respir Dis 1982 ; 125 (1) : 100-105.

## RUTTEN AA, BEEMS RB, WILMER JW, FERON VJ.

Ciliated Cells in Vitamin A-Deprived Cultured Hamster Tracheal Epithelium Do Divide. In Vitro Cell Dev Biol 1988 ; 24 (9) : 931-935.

## SAGEL SD, KAPSNER RK, OSBERG I.

Induced Sputum Matrix Metalloproteinase-9 Correlates With Lung Function and Airway Inflammation in Children With Cystic Fibrosis.

Pediatr Pulmonol 2005 ; 39 (3) : 224-232.

## SAHOVIC EA, COLVIN M, HILTON J, OGAWA M.

Role for Aldehyde Dehydrogenase in Survival of Progenitors for Murine Blast Cell Colonies After Treatment With 4-Hydroperoxycyclophosphamide in Vitro. Cancer Res 1988 ; 48 (5) : 1223-1226.

#### SAITO S, LIU B, YOKOYAMA K.

Animal Embryonic Stem (ES) Cells: Self-Renewal, Pluripotency, Transgenesis and Nuclear Transfer. 2004 ; 17 (3) : 107-115.

## SAKAMOTO O, SUGA M, SUDA T, ANDO M.

Expression of Discoidin Domain Receptor 1 Tyrosine Kinase on the Human Bronchial Epithelium. Eur Respir J 2001 ; 17 (5) : 969-974.

#### SALAUN B, SAINT-VIS B, PACHECO N, PACHECO Y, RIESLER A, ISAAC S et al.

CD208/Dendritic Cell-Lysosomal Associated Membrane Protein Is a Marker of Normal and Transformed Type II Pneumocytes.

Am J Pathol 2004 ; 164 (3) : 861-871.

## SALINGCARNBORIBOON R, YOSHITAKE H, TSUJI K, OBINATA M, AMAGASA T, NIFUJI A et al.

Establishment of Tendon-Derived Cell Lines Exhibiting Pluripotent Mesenchymal Stem Cell-Like Property. Exp Cell Res 2003 ; 287 (2) : 289-300.

#### SALVA PS, DOYLE NA, GRAHAM L, EIGEN H, DOERSCHUK CM.

TNF-Alpha, IL-8, Soluble ICAM-1, and Neutrophils in Sputum of Cystic Fibrosis Patients. Pediatr Pulmonol 1996 ; 21 (1) : 11-19.

#### SARIN KY, CHEUNG P, GILISON D, LEE E, TENNEN RI, WANG E et al.

Conditional Telomerase Induction Causes Proliferation of Hair Follicle Stem Cells. Nature 2005 ; 436 (7053) : 1048-1052.

#### SATO K, KOBAYASHI K, AIDA S, TAMAI S.

Bronchiolar Expression of Aquaporin-3 (AQP3) in Rat Lung and Its Dynamics in Pulmonary Oedema. Pflugers Arch 2004 ; 449 (1) : 106-114.

#### SCHARFMAN A, KROCZYNSKI H, CARNOY C, VAN BRUSSEL E, LAMBLIN G, RAMPHAL R et al.

Adhesion of Pseudomonas Aeruginosa to Respiratory Mucins and Expression of Mucin-Binding Proteins Are Increased by Limiting Iron During Growth.

Infect Immun 1996a ; 64 (12) : 5417-5420.

#### SCHARFMAN A, VAN BRUSSEL E, HOUDRET N, LAMBLIN G, ROUSSEL P.

Interactions Between Glycoconjugates From Human Respiratory Airways and Pseudomonas Aeruginosa. Am J Respir Crit Care Med 1996b ; 154 (4 Pt 2) : S163-S169.

#### SCHEID P, KEMPSTER L, GRIESENBACH U, DAVIES JC, DEWAR A, WEBER PP et al.

Inflammation in Cystic Fibrosis Airways: Relationship to Increased Bacterial Adherence. Eur Respir J 2001 ; 17 (1) : 27-35.

#### SCHLAGE WK, BULLES H, FRIEDRICHS D, KUHN M, TEREDESAI A.

Cytokeratin Expression Patterns in the Rat Respiratory Tract As Markers of Epithelial Differentiation in Inhalation Toxicology. I. Determination of Normal Cytokeratin Expression Patterns in Nose, Larynx, Trachea, and Lung.

Toxicol Pathol 1998 ; 26 (3) : 324-343.

## SCHMITT-GROHE S, NAUJOKS C, BARGON J, WAGNER TO, SCHUBERT R, HIPPE V et al.

Interleukin-8 in Whole Blood and Clinical Status in Cystic Fibrosis. Cytokine 2005 ; 29 (1) : 18-23.

#### SCHOCH KG, LORI A, BURNS KA, ELDRED T, OLSEN JC, RANDELL SH.

A Subset of Mouse Tracheal Epithelial Basal Cells Generates Large Colonies in Vitro. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 286 (4) : L631-L642.

#### SCHOEBERLEIN A, HOLZGREVE W, DUDLER L, HAHN S, SURBEK DV.

Tissue-Specific Engraftment After in Utero Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells into Sheep Fetuses.

Am J Obstet Gynecol 2005 ; 192 (4) : 1044-1052.

## SCHOLER HR, RUPPERT S, SUZUKI N, CHOWDHURY K, GRUSS P.

New Type of POU Domain in Germ Line-Specific Protein Oct-4. Nature 1990 ; 344 (6265) : 435-439.

## SCHREIBER R, NITSCHKE R, GREGER R, KUNZELMANN K.

The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Activates Aquaporin 3 in Airway Epithelial Cells. J Biol Chem 1999 ; 274 (17) : 11811-11816.

#### SCHROEDER TH, LEE MM, YACONO PW, CANNON CL, GERCEKER AA, GOLAN DE et al.

CFTR Is a Pattern Recognition Molecule That Extracts Pseudomonas Aeruginosa LPS From the Outer Membrane into Epithelial Cells and Activates NF-Kappa B Translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 ; 99 (10) : 6907-6912.

#### SCHULZ BL, SLOANE AJ, ROBINSON LJ, SEBASTIAN LT, GLANVILLE AR, SONG Y et al.

Mucin Glycosylation Changes in Cystic Fibrosis Lung Disease Are Not Manifest in Submucosal Gland Secretions.

Biochem J 2005 ; 387 (Pt 3) : 911-919.

#### SCHWARTZ Y, KORNOWSKI R.

Autologous Stem Cells for Functional Myocardial Repair. Heart Fail Rev 2003 ; 8 (3) : 237-245.

#### SCHWIEBERT EM, EGAN ME, HWANG TH, FULMER SB, ALLEN SS, CUTTING GR et al.

CFTR Regulates Outwardly Rectifying Chloride Channels Through an Autocrine Mechanism Involving ATP. Cell 1995; 81 (7): 1063-1073.

#### SEALE P, SABOURIN LA, GIRGIS-GABARDO A, MANSOURI A, GRUSS P, RUDNICKI MA.

Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. Cell 2000 ; 102 (6) : 777-786.

#### SERIKOV VB., FANG X, MATTHAY MA.

Delivery of Live GFP Labeled Alveolar Epithelial Type II Cells and Bone Marrow Cells to the Distal Airspaces of the Normal Mouse Lung: Kinetics and Anatomic Location Over 10 Days. Proc Am Thorac Soc 2006 ; 2 : A283.

#### SHAK S, CAPON DJ, HELLMISS R, MARSTERS SA, BAKER CL.

Recombinant Human DNase I Reduces the Viscosity of Cystic Fibrosis Sputum. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 ; 87 (23) : 9188-9192.

#### SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, LITTLEFIELD JW, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, CUI Y et al.

Human Embryonic Germ Cell Derivatives Express a Broad Range of Developmentally Distinct Markers and Proliferate Extensively in Vitro.

Proc Natl Acad Sci U S A 2001 ; 98 (1) : 113-118.

#### SHAMMAS MA, KOLEY H, BATCHU RB, BERTHEAU RC, PROTOPOPOV A, MUNSHI NC et al.

Telomerase Inhibition by SiRNA Causes Senescence and Apoptosis in Barrett's Adenocarcinoma Cells: Mechanism and Therapeutic Potential. Mol Cancer 2005 ; 4 : 24.

## SHANNON JM, JENNINGS SD, NIELSEN LD.

Modulation of Alveolar Type II Cell Differentiated Function in Vitro. Am J Physiol 1992 ; 262 (4 Pt 1) : L427-L436.

#### SHANNON JM, NIELSEN LD, GEBB SA, RANDELL SH.

Mesenchyme Specifies Epithelial Differentiation in Reciprocal Recombinants of Embryonic Lung and Trachea. Dev Dyn 1998 ; 212 (4) : 482-494.

#### SHAY JW, WRIGHT WE.

Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 2000 ; 1 (1) : 72-76.

#### SHEBANI E, SHAHANA S, JANSON C, ROOMANS GM.

Attachment of Columnar Airway Epithelial Cells in Asthma.
Tissue Cell 2005 ; 37 (2) : 145-152.

#### SHEN BQ, PANOS RJ, HANSEN-GUZMAN K, WIDDICOMBE JH, MRSNY RJ.

Hepatocyte Growth Factor Stimulates the Differentiation of Human Tracheal Epithelia in Vitro. Am J Physiol 1997 ; 272 (6 Pt 1) : L1115-L1120.

#### SHEPPARD DN, OSTEDGAARD LS, RICH DP, WELSH MJ.

The Amino-Terminal Portion of CFTR Forms a Regulated Cl- Channel. Cell 1994 ; 76 (6) : 1091-1098.

#### SHIMIZU T, NETTESHEIM P, MAHLER JF, RANDELL SH.

Cell Type-Specific Lectin Staining of the Tracheobronchial Epithelium of the Rat: Quantitative Studies With Griffonia Simplicifolia I Isolectin B4. J Histochem Cytochem 1991; 39 (1) : 7-14.

#### SHOJI S, RICKARD KA, TAKIZAWA H, ERTL RF, LINDER J, RENNARD SI.

Lung Fibroblasts Produce Growth Stimulatory Activity for Bronchial Epithelial Cells. Am Rev Respir Dis 1990 ; 141 (2) : 433-439.

#### SIBILLE Y, MARCHANDISE FX.

Pulmonary Immune Cells in Health and Disease: Polymorphonuclear Neutrophils. Eur Respir J 1993 ; 6 (10) : 1529-1543.

#### SIGURDSON L, SEN T, HALL L, III, RUBENFELD A, HARD R, GARDELLA J et al.

Possible Impedance of Luminal Reepithelialization by Tracheal Cartilage Metalloproteinases. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003 ; 129 (2) : 197-200.

#### SIMANI AS, INOUE S, HOGG JC.

Penetration of the Respiratory Epithelium of Guinea Pigs Following Exposure to Cigarette Smoke. Lab Invest 1974 ; 31 (1) : 75-81.

#### SIMEL DL, MASTIN JP, PRATT PC, WISSEMAN CL, SHELBURNE JD, SPOCK A et al.

Scanning Electron Microscopic Study of the Airways in Normal Children and in Patients With Cystic Fibrosis and Other Lung Diseases.

Pediatr Pathol 1984 ; 2 (1) : 47-64.

#### SIMONSEN JL, ROSADA C, SERAKINCI N, JUSTESEN J, STENDERUP K, RATTAN SI et al.

Telomerase Expression Extends the Proliferative Life-Span and Maintains the Osteogenic Potential of Human Bone Marrow Stromal Cells.

Nat Biotechnol 2002 ; 20 (6) : 592-596.

#### SINCOCK PM, MAYRHOFER G, ASHMAN LK.

Localization of the Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Member PETA-3 (CD151) in Normal Human Tissues: Comparison With CD9, CD63, and Alpha5beta1 Integrin. J Histochem Cytochem 1997; 45 (4) : 515-525.

#### SINGH G, KATYAL SL.

Clara Cells and Clara Cell 10 KD Protein (CC10). Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ; 17 (2) : 141-143.

#### SINGH G, KATYAL SL.

Clara Cell Proteins. Ann N Y Acad Sci 2000 ; 923 : 43-58.

#### SINGH G, SINGH J, KATYAL SL, BROWN WE, KRAMPS JA, PARADIS IL et al.

Identification, Cellular Localization, Isolation, and Characterization of Human Clara Cell-Specific 10 KD Protein.

J Histochem Cytochem 1988 ; 36 (1) : 73-80.

#### SINGH PK, JIA HP, WILES K, HESSELBERTH J, LIU L, CONWAY BA et al.

Production of Beta-Defensins by Human Airway Epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 ; 95 (25) : 14961-14966.

#### SKOTTMAN H, MIKKOLA M, LUNDIN K, OLSSON C, STROMBERG AM, TUURI T et al.

Gene Expression Signatures of Seven Individual Human Embryonic Stem Cell Lines. Stem Cells 2005 ; 23 (9) : 1343-1356.

#### SKOTTMAN H, STROMBERG AM, MATILAINEN E, INZUNZA J, HOVATTA O, LAHESMAA R.

Unique Gene Expression Signature by Human Embryonic Stem Cells Cultured Under Serum-Free Conditions Correlates With Their Enhanced and Prolonged Growth in an Undifferentiated Stage. Stem Cells 2006 ; 24 (1) : 151-167.

#### SLACK JM.

Stem Cells in Epithelial Tissues. Science 2000 ; 287 (5457) : 1431-1433.

#### SLEIGH MA.

Ciliary Function in Mucus Transport. Chest 1981 ; 80 (6 Suppl) : 791-795.

#### SLEIGH MA, BLAKE JR, LIRON N.

The Propulsion of Mucus by Cilia. Am Rev Respir Dis 1988 ; 137 (3) : 726-741.

#### SLOANE AJ, LINDNER RA, PRASAD SS, SEBASTIAN LT, PEDERSEN SK, ROBINSON M et al.

Proteomic Analysis of Sputum From Adults and Children With Cystic Fibrosis and From Control Subjects. Am J Respir Crit Care Med 2005 ; 172 (11) : 1416-1426.

#### SMITH A.

A Glossary for Stem-Cell Biology. Nature 2006 ; 441 (7097) : 1060.

#### SMITH JJ, TRAVIS SM, GREENBERG EP, WELSH MJ.

Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. Cell 1996 ; 85 (2) : 229-236.

#### SMITH JJ, WELSH MJ.

Fluid and Electrolyte Transport by Cultured Human Airway Epithelia. J Clin Invest 1993 ; 91 (4) : 1590-1597.

#### SMITH LJ, BRODY JS.

Influence of Methylprednisolone on Mouse Alveolar Type 2 Cell Response to Acute Lung Injury. Am Rev Respir Dis 1981 ; 123 (4 Pt 1) : 459-464.

#### SODERBERG M, HELLSTROM S, SANDSTROM T, LUNDGREN R, BERGH A.

Structural Characterization of Bronchial Mucosal Biopsies From Healthy Volunteers: a Light and Electron Microscopical Study.

Eur Respir J 1990 ; 3 (3) : 261-266.

#### SOFERMAN R.

Immunopathophysiologic Mechanisms of Cystic Fibrosis Lung Disease. Isr Med Assoc J 2006 ; 8 (1) : 44-48.

#### SOLTER D, KNOWLES BB.

Monoclonal Antibody Defining a Stage-Specific Mouse Embryonic Antigen (SSEA-1). Proc Natl Acad Sci U S A 1978 ; 75 (11) : 5565-5569.

#### SON YS, PARK JH, KANG YK, PARK JS, CHOI HS, LIM JY et al.

Heat Shock 70-KDa Protein 8 Isoform 1 Is Expressed on the Surface of Human Embryonic Stem Cells and Downregulated Upon Differentiation.

Stem Cells 2005 ; 23 (10) : 1502-1513.

#### SONG Y, SALINAS D, NIELSON DW, VERKMAN AS.

Hyperacidity of Secreted Fluid From Submucosal Glands in Early Cystic Fibrosis. Am J Physiol Cell Physiol 2006 ; 290 (3) : C741-C749.

#### SPANNHAKE EW, REDDY SP, JACOBY DB, YU XY, SAATIAN B, TIAN J.

Synergism Between Rhinovirus Infection and Oxidant Pollutant Exposure Enhances Airway Epithelial Cell Cytokine Production.

Environ Health Perspect 2002 ; 110 (7) : 665-670.

#### SPENCER H, SHORTER RG.

Cell Turnover in Pulmonary Tissues. Nature 1962 ; 194 : 880.

#### SPICER SS, MOCHIZUKI I, SETSER ME, MARTINEZ JR.

Complex Carbohydrates of Rat Tracheobronchial Surface Epithelium Visualized Ultrastructurally. Am J Anat 1980; 158 (1): 93-109.

#### SPINARDI L, EINHEBER S, CULLEN T, MILNER TA, GIANCOTTI FG.

A Recombinant Tail-Less Integrin Beta 4 Subunit Disrupts Hemidesmosomes, but Does Not Suppress Alpha 6 Beta 4-Mediated Cell Adhesion to Laminins. J Cell Biol 1995 ; 129 (2) : 473-487.

#### SPRINGER J, GRONEBERG DA, PREGLA R, FISCHER A.

Inflammatory Cells As Source of Tachykinin-Induced Mucus Secretion in Chronic Bronchitis. Regul Pept 2005 ; 124 (1-3) : 195-201.

# SPYRIDONIDIS A, SCHMITT-GRAFF A, TOMANN T, DWENGER A, FOLLO M, BEHRINGER D et al.

Epithelial Tissue Chimerism After Human Hematopoietic Cell Transplantation Is a Real Phenomenon. Am J Pathol 2004 ; 164 (4) : 1147-1155.

#### STAHLMAN MT, GRAY ME, WHITSETT JA.

Expression of Thyroid Transcription Factor-1(TTF-1) in Fetal and Neonatal Human Lung. J Histochem Cytochem 1996 ; 44 (7) : 673-678.

#### STEPP MA, SPURR-MICHAUD S, TISDALE A, ELWELL J, GIPSON IK.

Alpha 6 Beta 4 Integrin Heterodimer Is a Component of Hemidesmosomes. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 ; 87 (22) : 8970-8974.

#### STERK LM, GEUIJEN CA, OOMEN LC, CALAFAT J, JANSSEN H, SONNENBERG A.

The Tetraspan Molecule CD151, a Novel Constituent of Hemidesmosomes, Associates With the Integrin Alpha6beta4 and May Regulate the Spatial Organization of Hemidesmosomes. J Cell Biol 2000; 149 (4): 969-982.

#### STERK LM, GEUIJEN CA, VAN DEN BERG JG, CLAESSEN N, WEENING JJ, SONNENBERG A.

Association of the Tetraspanin CD151 With the Laminin-Binding Integrins Alpha3beta1, Alpha6beta1, Alpha6beta4 and Alpha7beta1 in Cells in Culture and in Vivo.

J Cell Sci 2002 ; 115 (Pt 6) : 1161-1173.

#### STEVENSON BR, SILICIANO JD, MOOSEKER MS, GOODENOUGH DA.

Identification of ZO-1: a High Molecular Weight Polypeptide Associated With the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia. J Cell Biol 1986; 103 (3) : 755-766.

#### STORMS RW, TRUJILLO AP, SPRINGER JB, SHAH L, COLVIN OM, LUDEMAN SM et al.

Isolation of Primitive Human Hematopoietic Progenitors on the Basis of Aldehyde Dehydrogenase Activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 ; 96 (16) : 9118-9123.

#### STREITZ JM, JR., SHAPSHAY SM.

Airway Injury After Tracheotomy and Endotracheal Intubation. Surg Clin North Am 1991 ; 71 (6) : 1211-1230.

#### STRIPP BR, REYNOLDS SD, PLOPPER CG, BOE IM, LUND J.

Pulmonary Phenotype of CCSP/UG Deficient Mice: a Consequence of CCSP Deficiency or Altered Clara Cell Function?

Ann N Y Acad Sci 2000 ; 923 : 202-209.

#### **STURGESS J, IMRIE J.**

Quantitative Evaluation of the Development of Tracheal Submucosal Glands in Infants With Cystic Fibrosis and Control Infants.

Am J Pathol 1982 ; 106 (3) : 303-311.

#### STUTTS MJ, CANESSA CM, OLSEN JC, HAMRICK M, COHN JA, ROSSIER BC et al.

CFTR As a CAMP-Dependent Regulator of Sodium Channels. Science 1995 ; 269 (5225) : 847-850.

#### SU WY, FOLZ R, CHEN JS, CRAPO JD, CHANG LY.

Extracellular Superoxide Dismutase MRNA Expressions in the Human Lung by in Situ Hybridization. Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ; 16 (2) : 162-170.

#### SUMMER R, KOTTON DN, LIANG S, FITZSIMMONS K, SUN X, FINE A.

Embryonic Lung Side Population Cells Are Hematopoietic and Vascular Precursors. Am J Respir Cell Mol Biol 2005 ; 33 (1) : 32-40.

#### SUMMER R, KOTTON DN, SUN X, FITZSIMMONS K, FINE A.

Translational Physiology: Origin and Phenotype of Lung Side Population Cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004 ; 287 (3) : L477-L483.

#### SUMMER R, KOTTON DN, SUN X, MA B, FITZSIMMONS K, FINE A.

Side Population Cells and Bcrp1 Expression in Lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003 ; 285 (1) : L97-104.

#### SUNDAY ME, HUA J, DAI HB, NUSRAT A, TORDAY JS.

Bombesin Increases Fetal Lung Growth and Maturation in Utero and in Organ Culture. Am J Respir Cell Mol Biol 1990 ; 3 (3) : 199-205.

#### SUTER S.

The Role of Bacterial Proteases in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1994 ; 150 (6 Pt 2) : S118-S122.

#### TABARY O, ZAHM JM, HINNRASKY J, COUETIL JP, CORNILLET P, GUENOUNOU M et al.

Selective Up-Regulation of Chemokine IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Bronchial Gland Cells in Vivo and in Vitro.

Am J Pathol 1998 ; 153 (3) : 921-930.

#### TAKIZAWA H.

Airway Epithelial Cells As Regulators of Airway Inflammation (Review). Int J Mol Med 1998 ; 1 (2) : 367-378.

#### TARRAN R.

Regulation of Airway Surface Liquid Volume and Mucus Transport by Active Ion Transport. Proc Am Thorac Soc 2004 ; 1 (1) : 42-46.

#### TARRAN R, GRUBB BR, PARSONS D, PICHER M, HIRSH AJ, DAVIS CW et al.

The CF Salt Controversy: in Vivo Observations and Therapeutic Approaches. Mol Cell 2001 ; 8(1) : 149-158.

#### TERZAGHI M, KLEIN-SZANTO AJ.

Differentiation of Normal and Cultured Preneoplastic Tracheal Epithelial Cells in Rats: Importance of Epithelial Mesenchymal Interactions.

J Natl Cancer Inst 1980 ; 65 (5) : 1039-1048.

#### TESFAIGZI Y, FISCHER MJ, MARTIN AJ, SEAGRAVE J.

Bcl-2 in LPS- and Allergen-Induced Hyperplastic Mucous Cells in Airway Epithelia of Brown Norway Rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 279 (6) : L1210-L1217.

#### THEISE ND, BADVE S, SAXENA R, HENEGARIU O, SELL S, CRAWFORD JM et al.

Derivation of Hepatocytes From Bone Marrow Cells in Mice After Radiation-Induced Myeloablation. Hepatology 2000 ; 31 (1) : 235-240.

# THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS et al.

Embryonic Stem Cell Lines Derived From Human Blastocysts. Science 1998 ; 282 (5391) : 1145-1147.

#### THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, BECKER RA et al.

Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 ; 92 (17) : 7844-7848.

#### THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, HEARN JP.

Pluripotent Cell Lines Derived From Common Marmoset (Callithrix Jacchus) Blastocysts. Biol Reprod 1996 ; 55 (2) : 254-259.

# THOMSSON KA, HINOJOSA-KURTZBERG M, AXELSSON KA, DOMINO SE, LOWE JB, GENDLER SJ et al.

Intestinal Mucins From Cystic Fibrosis Mice Show Increased Fucosylation Due to an Induced Fucalpha1-2 Glycosyltransferase. Biochem J 2002 ; 367 (Pt 3) : 609-616.

#### THORNTON DJ, CARLSTEDT I, HOWARD M, DEVINE PL, PRICE MR, SHEEHAN JK.

Respiratory Mucins: Identification of Core Proteins and Glycoforms. Biochem J 1996 ; 316 ( Pt 3) : 967-975.

#### THORNTON DJ, HOWARD M, KHAN N, SHEEHAN JK.

Identification of Two Glycoforms of the MUC5B Mucin in Human Respiratory Mucus. Evidence for a Cysteine-Rich Sequence Repeated Within the Molecule. J Biol Chem 1997 ; 272 (14) : 9561-9566.

# TIDDENS HA, KOOPMAN LP, LAMBERT RK, ELLIOTT WM, HOP WC, VAN DER MARK TW et al.

Cartilaginous Airway Wall Dimensions and Airway Resistance in Cystic Fibrosis Lungs. Eur Respir J 2000 ; 15 (4) : 735-742.

# TIROUVANZIAM R, DE BENTZMANN S, HUBEAU C, HINNRASKY J, JACQUOT J, PEAULT B et al.

Inflammation and Infection in Naive Human Cystic Fibrosis Airway Grafts. Am J Respir Cell Mol Biol 2000 ; 23 (2) : 121-127.

#### TOKUHARA T, HASEGAWA H, HATTORI N, ISHIDA H, TAKI T, TACHIBANA S et al.

Clinical Significance of CD151 Gene Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res 2001 ; 7 (12) : 4109-4114.

#### TOS M.

Development of the Tracheal Glands in Man. Number, Density, Structure, Shape, and Distribution of Mucous Glands Elucidated by Quantitative Studies of Whole Mounts. Acta Pathol Microbiol Scand 1966 ; 68 : Suppl.

#### TOURNIER F, LAOUKILI J, GIULIANI I, GENDRON MC, GUENNOU C, MARANO F.

Ciliated Differentiation of Rabbit Tracheal Epithelial Cells in Vitro. Eur J Cell Biol 1998 ; 77 (3) : 205-213.

# TOURNIER JM, MAOUCHE K, CORAUX C, ZAHM JM, CLOEZ-TAYARANI I, NAWROCKI-RABY B et al.

Alpha3alpha5beta2-Nicotinic Acetylcholine Receptor Contributes to the Wound Repair of the Respiratory Epithelium by Modulating Intracellular Calcium in Migrating Cells. Am J Pathol 2006 ; 168 (1) : 55-68.

#### TREZISE AE, CHAMBERS JA, WARDLE CJ, GOULD S, HARRIS A.

Expression of the Cystic Fibrosis Gene in Human Foetal Tissues. Hum Mol Genet 1993 ; 2 (3) : 213-218.

#### TROUT L, TOWNSLEY MI, BOWDEN AL, BALLARD ST.

Disruptive Effects of Anion Secretion Inhibitors on Airway Mucus Morphology in Isolated Perfused Pig Lung. J Physiol 2003 ; 549 (Pt 3) : 845-853.

#### TSANG KW, LEUNG JC, TIPOE GL, LEUNG R, YAN C, OOI GC et al.

Down-Regulation of Aquaporin 3 in Bronchiectatic Airways in Vivo. Respir Med 2003 ; 97 (1) : 59-64.

#### TSUI LC, BUCHWALD M, BARKER D, BRAMAN JC, KNOWLTON R, SCHUMM JW et al.

Cystic Fibrosis Locus Defined by a Genetically Linked Polymorphic DNA Marker. Science 1985 ; 230 (4729) : 1054-1057.

#### UCHIDA N, YANG Z, COMBS J, POURQUIE O, NGUYEN M, RAMANATHAN R et al.

The Characterization, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Hematopoietic Cell Antigen From CD34+ Human Bone Marrow Cells.

Blood 1997 ; 89 (8) : 2706-2716.

#### UHAL BD.

Cell Cycle Kinetics in the Alveolar Epithelium. Am J Physiol 1997 ; 272 (6 Pt 1) : L1031-L1045.

#### ULANER GA, GIUDICE LC.

Developmental Regulation of Telomerase Activity in Human Fetal Tissues During Gestation. Mol Hum Reprod 1997 ; 3 (9) : 769-773.

#### UMEMOTO T, YAMATO M, NISHIDA K, YANG J, TANO Y, OKANO T.

Limbal Epithelial Side-Population Cells Have Stem Cell-Like Properties, Including Quiescent State. Stem Cells 2006 ; 24 (1) : 86-94.

#### VALIUNAS V, WEINGART R.

Co-Operativity Between Mouse Connexin30 Gap Junction Channels. Pflugers Arch 2001 ; 441 (6) : 756-760.

#### VAN SCOTT MR, HESTER S, BOUCHER RC.

Ion Transport by Rabbit Nonciliated Bronchiolar Epithelial Cells (Clara Cells) in Culture. Proc Natl Acad Sci U S A 1987 ; 84 (15) : 5496-5500.

# VANTHANOUVONG V, KOZLOVA I, JOHANNESSON M, NAAS E, NORDVALL SL, DRAGOMIR A et al.

Composition of Nasal Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis and Other Airway Diseases Determined by X-Ray Microanalysis.

Microsc Res Tech 2006 ; 69 (4) : 271-276.

#### VARSANO S, BASBAUM CB, FORSBERG LS, BORSON DB, CAUGHEY G, NADEL JA.

Dog Tracheal Epithelial Cells in Culture Synthesize Sulfated Macromolecular Glycoconjugates and Release Them From the Cell Surface Upon Exposure to Extracellular Proteinases. Exp Lung Res 1987 ; 13 (2) : 157-184.

#### VELCICH A, YANG W, HEYER J, FRAGALE A, NICHOLAS C, VIANI S et al.

Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. Science 2002 ; 295 (5560) : 1726-1729.

#### VENABLE A, MITALIPOVA M, LYONS I, JONES K, SHIN S, PIERCE M et al.

Lectin Binding Profiles of SSEA-4 Enriched, Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Surfaces. BMC Dev Biol 2005 ; 5 : 15.

#### VERDUGO P.

Goblet Cells Secretion and Mucogenesis. Annu Rev Physiol 1990 ; 52 : 157-176.

#### VERKMAN AS.

Lung Disease in Cystic Fibrosis: Is Airway Surface Liquid Composition Abnormal? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 281 (2) : L306-L308.

#### VERMEER PD, EINWALTER LA, MONINGER TO, ROKHLINA T, KERN JA, ZABNER J et al.

Segregation of Receptor and Ligand Regulates Activation of Epithelial Growth Factor Receptor. Nature 2003 ; 422 (6929) : 322-326.

#### VIRKOLA R, LAHTEENMAKI K, EBERHARD T, KUUSELA P, VAN ALPHEN L, ULLBERG M et al.

Interaction of Haemophilus Influenzae With the Mammalian Extracellular Matrix. J Infect Dis 1996 ; 173 (5) : 1137-1147.

#### VISHWANATH S, RAMPHAL R.

Tracheobronchial Mucin Receptor for Pseudomonas Aeruginosa: Predominance of Amino Sugars in Binding Sites.

Infect Immun 1985 ; 48 (2) : 331-335.

#### VISSE R, NAGASE H.

Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. Circ Res 2003 ; 92 (8) : 827-839.

#### VOYNOW JA, FISCHER BM, ROBERTS BC, PROIA AD.

Basal-Like Cells Constitute the Proliferating Cell Population in Cystic Fibrosis Airways. Am J Respir Crit Care Med 2005 ; 172 (8) : 1013-1018.

#### VOYNOW JA, SELBY DM, ROSE MC.

Mucin Gene Expression (MUC1, MUC2, and MUC5/5AC) in Nasal Epithelial Cells of Cystic Fibrosis, Allergic Rhinitis, and Normal Individuals. Lung 1998; 176 (5): 345-354.

#### VU TH, SHIPLEY JM, BERGERS G, BERGER JE, HELMS JA, HANAHAN D et al.

MMP-9/Gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes.

Cell 1998; 93 (3): 411-422.

#### WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL.

Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. Science 2002 ; 297 (5590) : 2256-2259.

#### WAGERS AJ, WEISSMAN IL.

Plasticity of Adult Stem Cells. Cell 2004 ; 116 (5) : 639-648.

#### WALKER SR, WILLIAMS MC, BENSON B.

Immunocytochemical Localization of the Major Surfactant Apoproteins in Type II Cells, Clara Cells, and Alveolar Macrophages of Rat Lung.

J Histochem Cytochem 1986 ; 34 (9) : 1137-1148.

#### WANG G, BUNNELL BA, PAINTER RG, QUINIONES BC, TOM S, LANSON NA, JR. et al.

Adult Stem Cells From Bone Marrow Stroma Differentiate into Airway Epithelial Cells: Potential Therapy for Cystic Fibrosis.

Proc Natl Acad Sci U S A 2005a ; 102 (1) : 186-191.

#### WANG K, XUE T, TSANG SY, HUIZEN RV, WONG CW, LAI KW et al.

Electrophysiological Properties of Pluripotent Human and Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2005b.

#### WANG X, AL DHALIMY M, LAGASSE E, FINEGOLD M, GROMPE M.

Liver Repopulation and Correction of Metabolic Liver Disease by Transplanted Adult Mouse Pancreatic Cells. Am J Pathol 2001 ; 158 (2) : 571-579.

#### WANNER A, SALATHE M, O'RIORDAN TG.

Mucociliary Clearance in the Airways. Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 154 (6 Pt 1) : 1868-1902.

#### WARBURTON D, WUENSCHELL C, FLORES-DELGADO G, ANDERSON K.

Commitment and Differentiation of Lung Cell Lineages. Biochem Cell Biol 1998 ; 76 (6) : 971-995.

#### WARD CM, BARROW K, WOODS AM, STERN PL.

The 5T4 Oncofoetal Antigen Is an Early Differentiation Marker of Mouse ES Cells and Its Absence Is a Useful Means to Assess Pluripotency.

J Cell Sci 2003 ; 116 (Pt 22) : 4533-4542.

#### WASANO K, KIM KC, NILES RM, BRODY JS.

Membrane Differentiation Markers of Airway Epithelial Secretory Cells. J Histochem Cytochem 1988 ; 36 (2) : 167-178.

#### WATANABE H, IWASE M, OHASHI M, NAGUMO M.

Role of Interleukin-8 Secreted From Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. Oral Oncol 2002 ; 38 (7) : 670-679.

#### WATERS CM, SAVLA U.

Keratinocyte Growth Factor Accelerates Wound Closure in Airway Epithelium During Cyclic Mechanical Strain.

J Cell Physiol 1999 ; 181 (3) : 424-432.

#### WATSON TM, REYNOLDS SD, MANGO GW, BOE IM, LUND J, STRIPP BR.

Altered Lung Gene Expression in CCSP-Null Mice Suggests Immunoregulatory Roles for Clara Cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 281 (6) : L1523-L1530.

#### WEIBEL ER.

The Mystery of "Non-Nucleated Plates" in the Alveolar Epithelium of the Lung Explained. Acta Anat (Basel) 1971 ; 78 (3) : 425-443.

#### WEICHSELBAUM M, SPARROW MP, HAMILTON EJ, THOMPSON PJ, KNIGHT DA.

A Confocal Microscopic Study of Solitary Pulmonary Neuroendocrine Cells in Human Airway Epithelium. Respir Res 2005 ; 6 (1) : 115.

#### WEISSMAN IL.

Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. Cell 2000 ; 100 (1) : 157-168.

#### WHARTON J, POLAK JM, BLOOM SR, GHATEI MA, SOLCIA E, BROWN MR et al.

Bombesin-Like Immunoreactivity in the Lung. Nature 1978 ; 273 (5665) : 769-770.

#### WHIKEHART DR, PARIKH CH, VAUGHN AV, MISHLER K, EDELHAUSER HF.

Evidence Suggesting the Existence of Stem Cells for the Human Corneal Endothelium. Mol Vis 2005 ; 11 : 816-824.

#### WHITE SR, DORSCHEID DR, RABE KF, WOJCIK KR, HAMANN KJ.

Role of Very Late Adhesion Integrins in Mediating Repair of Human Airway Epithelial Cell Monolayers After Mechanical Injury.

Am J Respir Cell Mol Biol 1999 ; 20 (4) : 787-796.

#### WICKSTROM C, DAVIES JR, ERIKSEN GV, VEERMAN EC, CARLSTEDT I.

MUC5B Is a Major Gel-Forming, Oligomeric Mucin From Human Salivary Gland, Respiratory Tract and Endocervix: Identification of Glycoforms and C-Terminal Cleavage. Biochem J 1998 ; 334 (Pt 3) : 685-693.

#### WIDDICOMBE JG, PACK RJ.

The Clara Cell. Eur J Respir Dis 1982 ; 63 (3) : 202-220.

#### WILCOX JN, SMITH KM, SCHWARTZ SM, GORDON D.

Localization of Tissue Factor in the Normal Vessel Wall and in the Atherosclerotic Plaque. Proc Natl Acad Sci U S A 1989 ; 86 (8) : 2839-2843.

#### WILLECKE K, EIBERGER J, DEGEN J, ECKARDT D, ROMUALDI A, GULDENAGEL M et al.

Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. Biol Chem 2002 ; 383 (5) : 725-737.

#### WILLEMS LN, KRAMPS JA, JEFFERY PK, DIJKMAN JH.

Antileucoprotease in the Developing Fetal Lung. Thorax 1988 ; 43 (10) : 784-786.

#### WILLEMS LN, KRAMPS JA, STIJNEN T, STERK PJ, WEENING JJ, DIJKMAN JH.

Antileukoprotease-Containing Bronchiolar Cells. Relationship With Morphologic Disease of Small Airways and Parenchyma.

Am Rev Respir Dis 1989 ; 139 (5) : 1244-1250.

#### WILLIAMS MC.

Conversion of Lamellar Body Membranes into Tubular Myelin in Alveoli of Fetal Rat Lungs. J Cell Biol 1977 ; 72 (2) : 260-277.

#### WILLIAMS MC, HAWGOOD S, SCHENK DB, LEWICKI J, PHELPS MN, BENSON B.

Monoclonal Antibodies to Surfactant Proteins SP28-36 Label Canine Type II and Nonciliated Bronchiolar Cells by Immunofluorescence.

Am Rev Respir Dis 1988 ; 137 (2) : 399-405.

#### WILSON AJ, BYRON K, GIBSON PR.

Interleukin-8 Stimulates the Migration of Human Colonic Epithelial Cells in Vitro. Clin Sci (Lond) 1999 ; 97 (3) : 385-390.

#### WILSON CL, HEPPNER KJ, LABOSKY PA, HOGAN BL, MATRISIAN LM.

Intestinal Tumorigenesis Is Suppressed in Mice Lacking the Metalloproteinase Matrilysin. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 ; 94 (4) : 1402-1407.

#### WINE JJ.

The Genesis of Cystic Fibrosis Lung Disease. J Clin Invest 1999 ; 103 (3) : 309-312.

#### WISZNIEWSKI L, JORNOT L, DUDEZ T, PAGANO A, ROCHAT T, LACROIX JS et al.

Long-Term Cultures of Polarized Airway Epithelial Cells From Patients With Cystic Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (1) : 39-48.

#### WONG V, GUMBINER BM.

A Synthetic Peptide Corresponding to the Extracellular Domain of Occludin Perturbs the Tight Junction Permeability Barrier. J Cell Biol 1997; 136 (2): 399-409.

#### WRIGHT JR, CLEMENTS JA.

Metabolism and Turnover of Lung Surfactant. Am Rev Respir Dis 1987 ; 136 (2) : 426-444.

#### WRIGHT MD, GEARY SM, FITTER S, MOSELEY GW, LAU LM, SHENG KC et al.

Characterization of Mice Lacking the Tetraspanin Superfamily Member CD151. Mol Cell Biol 2004 ; 24 (13) : 5978-5988.

#### WRIGHT WE, PIATYSZEK MA, RAINEY WE, BYRD W, SHAY JW.

Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. Dev Genet 1996; 18 (2) : 173-179.

#### XIA B, ROYALL JA, DAMERA G, SACHDEV GP, CUMMINGS RD.

Altered O-Glycosylation and Sulfation of Airway Mucins Associated With Cystic Fibrosis. Glycobiology 2005 ; 15 (8) : 747-775.

#### XIAO W, HSU YP, ISHIZAKA A, KIRIKAE T, MOSS RB.

Sputum Cathelicidin, Urokinase Plasminogen Activation System Components, and Cytokines Discriminate Cystic Fibrosis, COPD, and Asthma Inflammation. Chest 2005 ; 128 (4) : 2316-2326.

#### YAMADA M, KUBO H, KOBAYASHI S, ISHIZAWA K, NUMASAKI M, UEDA S et al.

Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Are Important for Lung Repair After Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury.

J Immunol 2004 ; 172 (2) : 1266-1272.

#### YAMAYA M, SEKIZAWA K, MASUDA T, MORIKAWA M, SAWAI T, SASAKI H.

Oxidants Affect Permeability and Repair of the Cultured Human Tracheal Epithelium. Am J Physiol 1995 ; 268 (2 Pt 1) : L284-L293.

#### YANG L, LI S, HATCH H, AHRENS K, CORNELIUS JG, PETERSEN BE et al.

In Vitro Trans-Differentiation of Adult Hepatic Stem Cells into Pancreatic Endocrine Hormone-Producing Cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 ; 99 (12) : 8078-8083.

#### YANG MC, WANG B, WEISSLER JC, MARGRAF LR, YANG YS.

BR22, a 26 KDa Thyroid Transcription Factor-1 Associated Protein (TAP26), Is Expressed in Human Lung Cells.

Eur Respir J 2003 ; 22 (1) : 28-34.

#### YASHIMA K, LITZKY LA, KAISER L, ROGERS T, LAM S, WISTUBA II et al.

Telomerase Expression in Respiratory Epithelium During the Multistage Pathogenesis of Lung Carcinomas. Cancer Res 1997 ; 57 (12) : 2373-2377.

#### YE L, CHAN S, CHOW YH, TSUI LC, HU J.

Regulated Expression of the Human CFTR Gene in Epithelial Cells. Mol Ther 2001 ; 3 (5 Pt 1) : 723-733.

#### YEATES DB, STURGESS JM, KAHN SR, LEVISON H, ASPIN N.

Mucociliary Transport in Trachea of Patients With Cystic Fibrosis. Arch Dis Child 1976 ; 51 (1) : 28-33.

#### YING QL, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG.

Changing Potency by Spontaneous Fusion. Nature 2002 ; 416 (6880) : 545-548.

#### YOO SH, JUNG KC, KIM JH, SUNG SW, CHUNG JH, SHIM YS et al.

Expression Patterns of Markers for Type II Pneumocytes in Pulmonary Sclerosing Hemangiomas and Fetal Lung Tissues.

Arch Pathol Lab Med 2005 ; 129 (7) : 915-919.

#### YOSHIMURA K, NAKAMURA H, TRAPNELL BC, CHU CS, DALEMANS W, PAVIRANI A et al.

Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene in Cells of Non-Epithelial Origin.

Nucleic Acids Res 1991 ; 19 (19) : 5417-5423.

#### YOUNG HE, DUPLAA C, ROMERO-RAMOS M, CHESSELET MF, VOURC'H P, YOST MJ et al.

Adult Reserve Stem Cells and Their Potential for Tissue Engineering. Cell Biochem Biophys 2004 ; 40 (1) : 1-80.

#### YOUNG SL, KREMERS SA, APPLE JS, CRAPO JD, BRUMLEY GW.

Rat Lung Surfactant Kinetics Biochemical and Morphometric Correlation. J Appl Physiol 1981 ; 51 (2) : 248-253.

#### ZAHM JM, BACONNAIS S, DAVIDSON DJ, WEBB S, DORIN J, BONNET N et al.

X-Ray Microanalysis of Airway Surface Liquid Collected in Cystic Fibrosis Mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001 ; 281 (2) : L309-L313.

#### ZAHM JM, DEBORDEAUX C, RABY B, KLOSSEK JM, BONNET N, PUCHELLE E.

Motogenic Effect of Recombinant HGF on Airway Epithelial Cells During the in Vitro Wound Repair of the Respiratory Epithelium.

J Cell Physiol 2000 ; 185 (3) : 447-453.

#### ZAHM JM, GAILLARD D, DUPUIT F, HINNRASKY J, PORTEOUS D, DORIN JR et al.

Early Alterations in Airway Mucociliary Clearance and Inflammation of the Lamina Propria in CF Mice. Am J Physiol 1997a ; 272 (3 Pt 1) : C853-C859.

#### ZAHM JM, GALABERT C, CHAFFIN A, CHAZALETTE JP, GROSSKOPF C, PUCHELLE E.

Improvement of Cystic Fibrosis Airway Mucus Transportability by Recombinant Human DNase Is Related to Changes in Phospholipid Profile.

Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 (6 Pt 1) : 1779-1784.

#### ZAHM JM, KAPLAN H, HERARD AL, DORIOT F, PIERROT D, SOMELETTE P et al.

Cell Migration and Proliferation During the in Vitro Wound Repair of the Respiratory Epithelium. Cell Motil Cytoskeleton 1997b ; 37 (1) : 33-43.

#### ZAHM JM, PIERROT D, HINNRASKY J, FUCHEY C, CHEVILLARD M, GAILLARD D et al.

Functional Activity of Ciliated Outgrowths From Cultured Human Nasal and Tracheal Epithelia. Biorheology 1990 ; 27 (3-4) : 559-565.

#### ZAHM JM, PIERROT D, VAQUEZ-GIROD S, DUVIVIER C, KING M, PUCHELLE E.

The Role of Mucus Sol Phase in Clearance by Simulated Cough. Biorheology 1989 ; 26 (4) : 747-752.

#### ZAMAN MM, GELRUD A, JUNAIDI O, REGAN MM, WARNY M, SHEA JC et al.

Interleukin 8 Secretion From Monocytes of Subjects Heterozygous for the DeltaF508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Mutation Is Altered. Clin Diagn Lab Immunol 2004 ; 11 (5) : 819-824.

#### ZANETTI M, GENNARO R, ROMEO D.

Cathelicidins: a Novel Protein Family With a Common Proregion and a Variable C-Terminal Antimicrobial Domain.

FEBS Lett 1995 ; 374 (1) : 1-5.

#### ZAR H, SAIMAN L, QUITTELL L, PRINCE A.

Binding of Pseudomonas Aeruginosa to Respiratory Epithelial Cells From Patients With Various Mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator.

J Pediatr 1995 ; 126 (2) : 230-233.

#### ZEPEDA ML, CHINOY MR, WILSON JM.

Characterization of Stem Cells in Human Airway Capable of Reconstituting a Fully Differentiated Bronchial Epithelium.

Somat Cell Mol Genet 1995 ; 21 (1) : 61-73.

#### ZHAO C, WANG I, LEHRER RI.

Widespread Expression of Beta-Defensin HBD-1 in Human Secretory Glands and Epithelial Cells. FEBS Lett 1996 ; 396 (2-3) : 319-322.

#### ZHOU S, SCHUETZ JD, BUNTING KD, COLAPIETRO AM, SAMPATH J, MORRIS JJ et al.

The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype. Nat Med 2001; 7 (9): 1028-1034.

#### ZIELENSKI J, TSUI LC.

Cystic Fibrosis: Genotypic and Phenotypic Variations. Annu Rev Genet 1995 ; 29 : 777-807.

#### ZIMMERMANN S, VOSS M, KAISER S, KAPP U, WALLER CF, MARTENS UM.

Lack of Telomerase Activity in Human Mesenchymal Stem Cells. Leukemia 2003 ; 17 (6) : 1146-1149.

#### ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ et al.

Multilineage Cells From Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. Tissue Eng 2001; 7 (2): 211-228.

# **ARTICLE 1**

# Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis

Short title: Abnormal CF airway epithelial regeneration.

Rodolphe Hajj, Pierre Lesimple, Béatrice Nawrocki-Raby, Philippe Birembaut, Edith Puchelle, Christelle Coraux

INSERM U514, Reims, France; Université de Reims, IFR53, Reims, France; CHU Maison Blanche, Reims, France.

Corresponding author: Christelle Coraux INSERM U514 CHU Maison Blanche 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims Cedex - France. Phone: (33) 3 26 78 77 70, Fax: (33) 3 26 06 58 61 E-mail: christelle.coraux@univ-reims.fr

# ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is characterized at an advanced stage of the disease by airway epithelial injury and remodelling. Whether CF remodelling is related to infection and inflammation or due to an abnormal regeneration process is still undecided. We have recently established the expression and secretion profiles of IL-8, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 during non-CF airway epithelial regeneration in a humanized nude mouse xenograft model. To enhance our understanding of CF remodelling, we compared the regeneration process of non-infected human CF and non-CF nasal epithelia. In both CF and non-CF situations, the epithelial regeneration was characterized by successive steps of cell adhesion and migration, proliferation, pseudostratification and terminal differentiation. However, histological examination of the grafts showed a delay in differentiation of the CF airway epithelium. Cell proliferation was higher in the regenerating CF epithelium, and the differentiated CF epithelium exhibited a pronounced height increase and a basal cell hyperplasia by comparison to non-CF epithelium. In addition, while the number of goblet cells expressing MUC5AC was similar in CF and non-CF regenerated epithelia, the number of MUC5B-immunopositive goblet cells was lower in CF grafts. The expression of human IL-8, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 was enhanced in CF epithelium, especially early in the regenerative process. Together, our data strongly suggest that the regeneration of human CF airway surface epithelium is characterized by remodelling, delayed differentiation and altered proinflammatory and MMP responses.

**Keywords:** cystic fibrosis; human airway epithelial regeneration; humanized xenografts; matrix metalloproteinases; IL-8

## **INTRODUCTION**

Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic disease among Caucasians caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which encodes a cAMP-regulated membrane Cl<sup>-</sup> channel. At an advanced stage of the disease, CF is generally characterized by airway obstruction due to mucus accumulation (1) and reduced mucociliary transport (2). These abnormalities associated with airway infection and inflammation (3) are hallmarks of the CF pathogenesis. CF is also characterized by airway epithelial injury (4) and remodelling, such as squamous metaplasia (5), cell hyperproliferation (6), basal and goblet cell hyperplasia, airway epithelial height increase (7) and hypersecretion (8). However, it is still unknown whether these changes are related to the infection and inflammation that occur frequently in CF or due to an abnormal epithelial regeneration process.

The mucus layer that covers the surface respiratory epithelium is composed by two major secreted mucins, MUC5AC and MUC5B (9,10), mainly produced by airway goblet cells and submucosal glands respectively (11,12). MUC5AC is also expressed in all goblet cells and MUC5B in a subpopulation of these cells (13). In CF, only one study has quantified the percentage of goblet cells that express these mucins *in situ* (14), but none during the early stages of the disease.

CF is also characterized by an imbalance of cytokine expression as well (15). Various studies have reported increased levels of IL-8 (16,17). In addition to its pro-inflammatory activity, IL-8 has been also implicated in the regulation of matrix metalloproteinases (MMPs), in particular MMP-7 and MMP-9 (18-20). MMP activity is tightly regulated by their endogenous inhibitors TIMPs (21). TIMP-1 binds both pro-MMP-7 and -9 to block their activities (22,23). Few data are available on MMPs and TIMPs in relation to CF pathogenesis; it has been shown, however, that MMP-9 and TIMP-1 levels are increased in the sputa of CF patients (24-26), and that the expression of MMP-7 is high in CF tissue sections (27).

Using a humanized xenograft model, we have previously described the temporal expression of MMPs and IL-8 during human non-CF airway surface epithelial regeneration and showed their implications in this process (28). The aim of our present study is to compare the regeneration between human CF and non-CF airway epithelia in the absence of infection to determine whether the remodelling observed in human adult CF tissues is due to infection or to an abnormal regeneration process. We also compared the dynamics of non-CF and CF epithelial regenerations and the temporal expression of IL-8, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1.

# **METHODS**

# Human airway tissues, epithelial cell isolation and culture

The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the Public Health Code. Human airway tissues were collected after nasal polypectomy of 7 CF (median age 23, range 18-33; genotypes:  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 n=3;  $\Delta$ F508/G542X n=2;  $\Delta$ F508/E92K n=1;  $\Delta$ F508/547delA n=1) and 7 non-CF (median age 38.5, range 19-55) subjects who did not suffer of any other disease when experiments were carried out. The subjects' ages were statistically not different between the two groups. Human tissues were transferred to the laboratory and processed as described previously (28) with some modifications. Tissue-isolated epithelial cells were seeded on plastic at a density of 2x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> and cultured in the proliferation medium DMEM/Ham F-12 (Gibco BRL, Paisley, UK) supplemented with 0.87µM bovine insulin, 65nM human transferrin, 1.6nM rhEGF 1.38µM hydrocortisone,

30nM retinyl acetate,  $9.7\mu$ M 3,3',5-triiodo-L-thyronin,  $2.7\mu$ M (-)epinephrine,  $35\mu$ g/mL bovine pituitary extract,  $5\mu$ M ethanolamine,  $5\mu$ M O-phosphorylethanolamine, 30nM sodium selenite, 1nM manganese chloride tetrahydrate,  $0.5\mu$ M sodium metasilicate nonahydrate, 1nM ammonium molybdate tetrahydrate, 5nM ammonium vanadate, 1nM nickel sulfate hexahydrate, 0.5nM stannous chloride dihydrate (Sigma Aldrich, St Louis, USA), 100U/mL penicillin and  $100\mu$ g/mL streptomycin. Cells were cultured at  $37^{\circ}$ C up to confluency, then detached and counted.

# Bacteriological analyses of CF and non-CF cultures

Bacteriological analyses were carried out in the microbiology division of our hospital. All tissues and culture media were subjected to microbiological analyses. Aliquots were plated on Columbia agar containing 5% of horse blood (bioMérieux, Paris, France) and incubated at 37°C for 48h. In all cases, when bacterial growth was observed the experiment was discontinued.

# Humanized airway xenografts in nude mice

The use of animals was authorized by the French Veterinary Services (N° A51-454-5). Humanized xenografts were prepared as described previously (28). Briefly,  $1x10^6$  human airway epithelial cells suspended in proliferation medium, or culture medium alone (control tracheae), were inoculated in epithelium-denuded Wistar rats' tracheae that were grafted subcutaneously in nude mice (Charles Rivers, Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France). Xenografts were flushed twice a week with serum-free DMEM/Ham F-12 medium supplemented with 200U/mL penicillin, 200µg/mL streptomycin, 50µg/mL gentamicin, 2.5µg/mL amphotericin and 420U/mL colimycin. Animals were sacrificed after 4, 13, 25 and 35 days of engraftment, then CF and non-CF xenografts were removed. A portion of each xenograft was embedded in optimum cutting temperature (O.C.T.) compound (Tissue-Tek, Zoeterwoude, The Netherlands), frozen in liquid nitrogen and processed for RNA extraction.

# Airway liquid collection from tracheal xenografts

Tracheal xenografts were flushed at days 4, 13, 25 and 35 with serum-free DMEM/Ham F-12 medium, drained, and then  $80\mu$ L of this medium were instilled into the xenograft. After a 4-h incubation, each medium was collected, centrifuged, total protein concentration was determined with the DC Protein Assay kit (BioRad, Hercules, USA) and samples were stored at -80°C until use for ELISA and zymography. Collected media were gathered following the histological step of the epithelium in each graft (see below).

# Histological examination

Each CF and non-CF cryofixed graft portion was entirely cut and all 5- $\mu$ m frozen sections were collected on slides and were either stained with haematoxylin-eosin for histology, or frozen at -20°C for immunohistochemistry. The histology of each CF and non-CF airway epithelial xenograft was analysed in order to define the histological step of epithelial regeneration. Each step corresponds to an histological phenotype that has been previously described (28): step I is characterized by epithelial cell adhesion and migration where all epithelial cells, positive for vimentin (a mesenchymal cell marker; data not shown), form a monolayer covering the host denuded rat trachea; step II is characterized by cell proliferation and stratification (most cells were positive for Ki-67, a proliferation-cell marker) where epithelial cells form several layers of cuboidal cells covered by a flattened-cell layer; step III is characterized by the beginning of epithelial pseudostratification where epithelial cells were negative for several complete-differentiation markers (see step IV), and where the epithelium was columnar without any cilia or secretory granules; step IV is characterized by complete epithelial differentiation with appearance of basal (CK13-positve), ciliated ( $\beta$ -tubulinpositive) and goblet (MUC5AC-positive) cells. At this final step, the epithelium also stained for ZO-1 (data not shown), a tight junction-associated protein. All analyses were performed at these different regenerative steps. The differentiation of non-CF epithelia generally began after 25 days of engraftment. This time point was chosen to compare the degree of differentiation between non-CF and CF grafts. At least 40 sections per graft were analysed. The epithelial height was determined at step IV with 6 measurements per section using Visilog 5 software (Noesis, Courtaboeuf, France).

# Immunohistochemistry and cell quantification

Sections were fixed with cold acetone for 10min and incubated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% of bovine serum albumin (Sigma) for 30min at room temperature (RT) to prevent unspecific bindings. The primary antibodies used were: monoclonal mouse anti-cytokeratin (CK) 13 (Sigma) specific for basal cells, anti-\beta-tubulin (Amersham, Buckinghamshire, UK) for ciliated cells, anti-MUC5AC (Novocastra, Newcastle, UK) and anti-MUC5B (provided by Dr M-C. Copin, Lille, France) for goblet cells. Cell proliferation was assessed using an anti-Ki-67 antibody (DakoCytomation, Carpentaria, USA). For CK13, β-tubulin and Ki-67-positive cell detection, sections were incubated with the primary antibody for 1h at RT and then incubated with Alexa Fluor 488-goat anti-mouse antibody (1h at RT; Molecular Probes, Eugene, USA). For goblet cells detection, sections were stained with anti-MUC5B antibody, exposed to Alexa Fluor 594-goat anti-mouse antibody, then incubated with goat anti-mouse Fab (H+L) fragments (30min at RT; Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, USA) to block free sites of the mouse anti-MUC5B antibody, and finally stained with anti-MUC5AC antibody followed by incubation with Alexa Fluor 488 antibody. All sections were then counter-stained with Harris haematoxylin and mounted for fluorescence observation with an Axiophot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Negative controls were performed by replacing primary antibodies with mouse non-immune IgG fractions (Sigma) and with PBS-BSA 1% alone. Positive cells were counted in randomly selected slides in at least 40 sections. Results are expressed as number of positive cells per millimetre of basal lamina (mmBL).

# **RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR**

RNA extraction was realized with the High Pure RNA Isolation Kit as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). RT-PCR were performed with 10ng of total RNA using the GeneAmp Thermostable RNA PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and human-specific primers for MMP-7, MMP-9, TIMP-1, IL-8 and GAPDH as described previously (28). RT-PCR products were separated on acrylamide gels, stained with SYBRGold (Molecular probes), then quantified by fluorimetric densitometry with a LAS-1000 (Fuji, Stamford, USA). mRNA values of the different transcripts were normalized to the GAPDH mRNA values. Negative controls were performed with RNA extracted from xenografts inoculated with medium alone.

# **IL-8** quantification

ELISA was performed according to the manufacturer's instructions (R&D, Minneapolis, USA). Absorbance was read on a Xenius microplate spectrophotometer (SAFAS, MC, Monaco). Results are expressed as pg/mg of total proteins.

# Zymography analyses

The same amount of total proteins,  $1.2\mu g$  for MMP-9 and  $20\mu g$  for MMP-7, from each collected liquid sample was separated on 10% polyacrylamide gels containing 0.1% (w/v) gelatin or casein respectively, as described previously (28). Briefly, after two washes in 2%-Triton X-100, gels were incubated overnight at 37°C in 50mM Tris-HCl pH 7.6, 5mM CaCl<sub>2</sub> and 0.1% Triton X-100 buffer, then stained in 40% methanol, 10% acetic acid and 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma Aldrich), and de-stained in 10% acetic acid and 20% methanol. Proteolytic activities were quantified by densitometric scanning on LAS-1000.

# Inhibition of MMP-7 and MMP-9 activities

Inhibitors of MMP-7 and -9 (MMP Inhibitor III and MMP Inhibitor II respectively; Calbiochem, La Jolla, USA) were prepared as described previously (28), and added to 3 CF cell suspensions ( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 n=2; M152V/3120+1G>A n=1) that were inoculated in denuded rats' tracheae. Nude mice were sacrificed at day 35 and xenografts were removed for histological examination.

# Statistical analyses

Values are expressed as the mean±SD. The non-parametric Mann and Whitney test was used for statistical analyses.  $\chi^2$  test was used to compare the CF and non-CF airway epithelial differentiation degree. Significant differences were defined for  $p \le 0.05$ .

# RESULTS

In all the following results, CF and non-CF experiments were consistent and reproducible regardless of the subject's age: all CF epithelial cells, irrespective of the CF genotype, repopulated the host rat trachea in the same manner, and cell quantifications as well as the different expression profiles did not significantly vary between CF subjects; these observations were also valuable for non-CF epithelial cells (data not shown).

# Histology of Non-CF and CF epithelia during regeneration

The human CF airway surface epithelial regeneration (Figure 1E-H) followed four successive steps as previously described for the non-CF human airway epithelium (Figure 1A-D) (28,29): a step I of epithelial cell adhesion and migration (Figure 1A,E), a step II of epithelial cell proliferation (Figure 1B,F,G), a step III of epithelial pseudostratification (Figure 1B',G'), and a step IV of epithelial mucociliary differentiation (Figure 1C,D,H). The major histological difference between CF and non-CF resided in the height of the epithelium at step IV: the CF epithelium was significantly higher (p = 0.03) than the non-CF epithelium (46.7±8.9 vs. 34.7±4.8µm respectively).

In order to determine whether a difference in the differentiation degree could be observed between non-CF and CF airway epithelia, their histology was analysed at day 25. We observed that 80% of non-CF grafts were covered by a well-differentiated epithelium (step IV), whereas only 18.7% of CF grafts contained a well-differentiated epithelium (p = 0.03).

# Non-CF and CF epithelial proliferation during regeneration

At step I, no cell proliferation was observed. From step I to step II, cell proliferation significantly increased but was more pronounced in CF epithelia. Past this step, cell proliferation decreased significantly and similarly in both non-CF and CF grafts (Figure 2C). Of note, Ki-67-positive cells were detected near the basal lamina of non-CF (Figure 2A,A') and CF (Figure 2B,B') epithelia at step II. No immunostaining was observed in control sections (data not shown).

# Quantification of basal, goblet and ciliated cells in the regenerated epithelia

We compared the distribution of the different epithelial cell types at step IV. The number of CK13-positive basal cells was higher in CF (147.3 $\pm$ 23.7 cells/mmBL) than in non-CF epithelia (88.6 $\pm$ 5.2 cells/mmBL) (Figure 3A-C). MUC5AC stained positively all goblet cells as described previously (12), and as assessed by Alcian Blue/PAS staining (data not shown) on differentiated CF and non-CF airway epithelial xenograft sections. The number of MUC5AC-positive goblet cells was not statistically different in both grafts (31 $\pm$ 5.7 and 21.7 $\pm$ 12.4 cells/mmBL respectively), whereas the number of MUC5B-positive cells was lower in CF by comparison to non-CF epithelium (4.7 $\pm$ 2.1 vs. 15.1 $\pm$ 3.4 cells/mmBL respectively) (Figure 3D-G). The number of -tubulin-positive ciliated cells in non-CF and CF differentiated epithelia was not different (120.8 $\pm$ 20.1 and 104.7 $\pm$ 6.2 cells/mmBL respectively) (Figure 3H-J). No immunostaining was observed in control sections (data not shown).

# mRNA expression profile of IL-8, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 during non-CF and CF regeneration

We compared the expression profile of IL-8, MMPs and TIMP-1 during non-CF and CF regenerations at steps I, II, III and IV by semi-quantitative RT-PCR (Figure 4). IL-8 expression decreased progressively throughout the regenerative steps with higher values in CF than in non-CF grafts. MMP-7 mRNA expression increased in non-CF and did not change in CF during regeneration, with higher values at steps I and II in CF than in non-CF grafts. MMP-9 mRNA expression did not change during the first steps, then increased significantly at step IV of non-CF regeneration, whereas its expression increased at step II then progressively decreased during the CF regeneration. MMP-9 mRNA levels were significantly higher in CF than in non-CF grafts at steps II and III. TIMP-1 expression significantly increased at step II, then gradually decreased during CF regeneration, but did not change during non-CF regeneration. TIMP-1 mRNA levels were significantly higher in CF than non-CF grafts. IL-8, MMP-9 or TIMP-1 mRNA expression was not observed in control tracheae (data not shown).

# IL-8, MMP-7 and MMP-9 protein secretion profiles during non-CF and CF regeneration

IL-8 secretion decreased at step II then remained constant during non-CF regeneration, whereas it did not change during the first steps but significantly decreased at step IV in CF grafts (Figure 5). IL-8 levels were significantly higher in CF than non-CF grafts at steps I and III. After an initial decrease, MMP-7 secretion increased during non-CF regeneration, whereas in CF grafts, it increased during the first steps then slightly decreased at step IV. MMP-7 levels were significantly lower at step I and higher at step II in CF than non-CF grafts. MMP-9 secretion increased along the non-CF regeneration process, whereas after an initial increase, it progressively decreased in CF grafts. MMP-9 protein levels were significantly higher at steps I, II and III, but lower at step IV in CF than non-CF grafts.

# Inhibition of MMP-7 and MMP-9 during CF regeneration

We have previously shown, using MMPs inhibitors, that MMP-7 and -9 are involved in non-CF regeneration (28). The same experiment was performed in CF grafts: at day 35, control grafts contained well-differentiated pseudostratified epithelia (Figure 6A) whereas inhibition of MMP-7 during CF regeneration led to metaplastic and hyperplasic epithelia (Figure 6B), similar to our previous results obtained during the non-CF regeneration (28). The inhibition of MMP-9 led to the generation of thin CF epithelia composed mainly of differentiated cells where goblet cells were predominating (Figure 6C).

# DISCUSSION

Using a humanized xenograft model we demonstrate that, in a non-infected environment, the CF airway epithelial regeneration is delayed and characterized by the restoration of a remodelled airway epithelium. We also show that during the remodelling, the expression and secretion of the mediators IL-8, MMP-7, MMP-9 and their inhibitor TIMP-1 are altered. The xenograft model used in this study allows the regeneration and the differentiation of a pseudostratified airway epithelium in the absence of infection. Since CF is generally characterized by airway infection and inflammation (3), the choice of the xenograft model was very useful to determine whether remodelling of the CF epithelium was due to infection or to an abnormal regeneration process. The xenograft model also mimics the in vivo reepithelialisation of the injured airway epithelium, which occurs frequently in CF. One limitation of this model consists in the small volume of the collected airway surface liquid. In CF, the human nasal epithelium manifests many pathological signs, such as mucus accumulation, inflammation, hyperplasia and metaplasia (30), similar to those observed in the tracheal and bronchial epithelium (31). Moreover, when human nasal and bronchial epithelial cells are used for xenograft-differentiation experiments, they regenerate and restore an identical mucociliary epithelium (29,32). Thus, CF nasal epithelial cells are representative of lower airway epithelial cells in the CF disease.

The dynamics of CF airway surface epithelial regeneration as well as its comparison with that of non-CF have never been assessed. We observed a hyperproliferation of CF epithelial cells at step II concomitant with the sustained over-expression of IL-8, MMPs and TIMP-1. Indeed, in addition to its pro-inflammatory activity, IL-8 has been involved in cell proliferation and migration in the intestine, the skin and the endometrium (33-36). In the same way, MMPs, in particular MMP-7, and TIMP-1 have been described to enhance epithelial cell proliferation

(37,38). Taken together, these results strongly suggest that IL-8, MMPs and TIMP-1 stimulate CF cell proliferation at step II of regeneration leading possibly to the delay observed in the CF epithelial differentiation. The major consequence of this delay in CF epithelial regeneration could be an increased susceptibility of the CF epithelium to bacterial infection. In fact, the regenerating airway epithelium exposes receptors that could be used by *Pseudomonas aeruginosa* as sites of bacterial adherence (39,40).

In our study, the regenerated well-differentiated CF epithelium is marked by increased height by comparison to non-CF epithelium. This is in accordance with the observations of Voynow *et al.* (7) who have reported that, in infected and inflamed tissues obtained from CF patients who had undergone lung transplantations, the surface epithelium was higher as compared to non-CF epithelium. Their data suggest the involvement of infection and/or inflammation in the increase of the epithelial height. In our study, the regeneration of the CF airway epithelium occurred in the absence of infection, emphasizing then the potential contribution of the elevated IL-8 in this process.

Hyperproliferation and basal cell hyperplasia are generally associated to the CF pathology (41) and other inflammatory diseases (42). Our results demonstrate that hyperproliferation observed at step II in CF grafts became non-significant in terminally well-differentiated epithelia. These findings suggest that basal cell hyperplasia (step IV) could be a direct consequence of the increased cell proliferation observed early in CF (step II). The non-significant difference in cell proliferation between CF and non-CF epithelia at step IV is likely due to the non-infected environment in our xenograft model. Besides the airway epithelial remodelling that may arise from cytokine and MMP deregulation, mutated CFTR is likely to play a key role in the CF epithelial remodelling, particularly in hyperproliferation. It has been shown that CFTR knockout mice exhibited an increased migration and proliferative capacities of intestinal crypt epithelial cells as compared to control mice (43). Moreover, the over-expression of CFTR may result in either increased (44) or decreased (45) epithelial cell proliferation. Thus, it remains to be determined whether the correction of mutated CFTR in CF airway cells, before their implantation in xenografts, could prevent the basal cell proliferation and the differentiation delay during the CF regeneration process.

In this work, we show that the number of goblet cells assessed by MUC5AC staining is not different in CF and non-CF well-differentiated epithelia. Moreover, we observe that the number of goblet cells expressing MUC5B is lower in CF grafts. Several non-quantitative studies have described goblet cell hyperplasia in the CF airway epithelium *in situ* (8,46), while controversial conclusions have been reported by Danel *et al.* (47) in nasal brushings and by Voynow *et al.* (7) in airway sections. In addition, it has been recently shown that the number of surface MUC5AC-expressing cells is similar in CF and non-CF nasal polyps, and that MUC5B-positive cells are more numerous in CF tissues (14). It is important to note that most of CF tissues used in the literature for goblet cell quantification and mucin expression have been obtained from infected and inflamed CF patients at various stages of the disease, compromising the comparison with control patients. Our results are in accordance with several studies (47,48), particularly with those of Sturgess and Imrie (49) who have reported that the number of goblet cells is not modified in the airways of non-infected CF foetuses.

In our study, we observe concomitantly to the remodelling that the expression of IL-8 is increased both at the transcript and protein levels early in the human CF regeneration and is sustained until the differentiation step. Our findings highlight the pro-inflammatory state of the CF epithelium and are in agreement with many other studies as the expression and secretion of IL-8 by CF cells, by comparison to non-CF cells, have been shown in our laboratory (50) and widely reported in the literature (51). Our results also emphasize the

potential role of IL-8 in the regulation of MMPs as underlined previously (18-20), since its over-expression and over-secretion as well as those of MMP-7 and -9 are observed at the same time during CF regeneration. Throughout the first steps of CF regeneration, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 were over-expressed and over-secreted suggesting their possible involvement in cell migration, proliferation and epithelial pseudostratification. The implication of MMP-7 and MMP-9 in the control of epithelial cell migration during wound repair and remodelling of the injured airway epithelium has been demonstrated (27,52-55). We have recently shown in the same xenograft model the implication of these MMPs in the regenerative process, particularly during epithelial differentiation (28). In the present study, we also show their involvement in CF regeneration as their inhibition led to a remodelled epithelium. Regarding TIMP-1, we demonstrated its higher expression in CF epithelia during regeneration. Lee et al. (56) have shown recently that TIMP-1-deficient mice are more resistant to P. aeruginosa corneal infections and that they clear infections faster than wild type mice. They have also reported that MMP-9 is necessary for the resistance of these mice against infections. In the light of these data, we suggest that the high level of TIMP-1 and the low level of MMP-9 in well-differentiated CF airway epithelia could render the CF epithelium less resistant to P. aeruginosa infections.

In conclusion, our study provides evidence that, in the absence of bacterial infection, the CF airway surface epithelial regeneration is delayed, and that it leads to the restoration of a remodelled epithelium suggesting that the remodelling observed in human CF tissues is not directly related to bacterial infection but to an abnormal regeneration process that will be amplified by infection. Our results suggest also that the abnormal regeneration could be the consequence of a deregulation of at least MMP-7 and -9, TIMP-1 and IL-8 expression in CF airway epithelial cells.

# ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank J. Wuibout (Ph.D., Syracuse University, New York, USA -University of Medicine, Reims, France) for her reviewing of the English usage. We also thank all the ENT and surgeons who provided us CF and non-CF tissues: Pr J-M. Klossek, Hôpital Jean Bernard (Poitiers, France), Dr C. Ruaux, Clinique Mutualiste de la Sagesse (Rennes, France), Dr P. Corlieu, Hôpital Tenon (Paris, France), Dr C. Belleguic, Hôpital Sud (Rennes, France), Pr J-M. Triglia, Hôpital des Enfants (Marseille, France), Dr I. Durieu, Centre Hospitalier Lyon Sud (Lyon, France), Dr H. Faict, CHR Lisieux (Lisieux, France), Dr C. Pison, CHU Grenoble (Grenoble, France) and the Research Tissue Bank (BTR), Paris. We are grateful for V. Laplace (INSERM U514, Reims, France) for her technical assistance in tracheal xenografts in nude mice. We also thank Dr O. Bajolet (Department of microbiology, CHU Reims, France) for the bacteriological analyses that were carried out in her department. This work was supported by the French Association "Vaincre la Mucoviscidose (AVLM)", "Région Champagne-Ardenne" and Adult Stem Cells Thematic Concerted Action (INSERM and the French Ministry of Research).

# REFERENCES

- 1. Simel DL, Mastin JP, Pratt PC, Wisseman CL, Shelburne JD, Spock A, *et al.* Scanning electron microscopic study of the airways in normal children and in patients with cystic fibrosis and other lung diseases. *Pediatr Pathol* 1984;**2**:47-64.
- 2. Bennett WD, Olivier KN, Zeman KL, Hohneker KW, Boucher RC, Knowles MR. Effect of uridine 5'-triphosphate plus amiloride on mucociliary clearance in adult cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;**153**:1796-1801.
- 3. Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. J Cyst Fibros 2005;4:3-5.
- 4. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003;4:8.
- 5. Konradova V, Vavrova V, Hlouskova Z, Copova M, Tomanek A, Houstek J. Ultrastructure of bronchial epithelium in children with chronic or recurrent respiratory diseases. *Eur J Respir Dis* 1982;**63**:516-525.
- 6. Leigh MW, Kylander JE, Yankaskas JR, Boucher RC. Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;**12**:605-612.
- 7. Voynow JA, Fischer BM, Roberts BC, Proia AD. Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**172**:1013-1018.
- 8. Hauber HP, Tsicopoulos A, Wallaert B, Griffin S, McElvaney NG, Daigneault P, *et al.* Expression of HCLCA1 in cystic fibrosis lungs is associated with mucus overproduction. *Eur Respir J* 2004;**23**:846-850.
- 9. Hovenberg HW, Davies JR, Carlstedt I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem J* 1996;**318**:319-324.
- 10. Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gelforming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998;**334**:685-693.
- 11. Davies JR, Herrmann A, Russell W, Svitacheva N, Wickstrom C, Carlstedt I. Respiratory tract mucins: structure and expression patterns. *Novartis Found Symp* 2002;**248**:76-88.
- 12. Groneberg DA, Eynott PR, Oates T, Lim S, Wu R, Carlstedt I, *et al.* Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med* 2002;**96**:81-86.
- 13. Groneberg DA, Peiser C, Dinh QT, Matthias J, Eynott PR, Heppt W, *et al.* Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa. *Laryngoscope* 2003;**113**:520-524.
- 14. Martinez-Anton A, Debolos C, Garrido M, Roca-Ferrer J, Barranco C, Alobid I, *et al.* Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:448-457.

- 15. Hubeau C, Le Naour R, Abely M, Hinnrasky J, Guenounou M, Gaillard D, *et al.* Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients. *Clin Exp Immunol* 2004;**135**:528-534.
- 16. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, Hinnrasky J, Jacquot J, Peault B, *et al.* Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;**23**:121-127.
- Schmitt-Grohe S, Naujoks C, Bargon J, Wagner TO, Schubert R, Hippe V, *et al.* Interleukin-8 in whole blood and clinical status in cystic fibrosis. *Cytokine* 2005;29:18-23.
- 18. Watanabe H, Iwase M, Ohashi M, Nagumo M. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2002;**38**:670-679.
- 19. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;**170**:3369-3376.
- 20. Mulayim N, Savlu A, Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Arici A. Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8. *Fertil Steril* 2004;**81**:904-911.
- 21. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;**92**:827-839.
- 22. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000;**46**:214-224.
- 23. Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 2000;6:391-407.
- Delacourt C, Le Bourgeois M, d'Ortho MP, Doit C, Scheinmann P, Navarro J, et al. Imbalance between 95 kDa type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:765-774.
- 25. Ratjen F, Hartog CM, Paul K, Wermelt J, Braun J. Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* 2002;**57**:930-934.
- 26. Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I. Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005;**39**:224-232.
- 27. Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, Wilson CL, Matrisian LM, Welgus HG, *et al.* Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest* 1998;**102**:1321-1331.
- 28. Coraux C, Martinella-Catusse C, Nawrocki-Raby B, Hajj R, Burlet H, Escotte S, *et al.* Differential expression of matrix metalloproteinases and interleukin-8 during regeneration of human airway epithelium in vivo. *J Pathol* 2005;**206**:160-169.
- 29. Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J, Mongodin E, de Bentzmann S, Copreni E, *et al.* Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;**278**:165-176.

- 30. Beju D, Meek WD, Kramer JC. The ultrastructure of the nasal polyps in patients with and without cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;**36**:155-165.
- 31. Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, *et al.* Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol* 2001;**124**:69-76.
- 32. Engelhardt JF, Schlossberg H, Yankaskas JR, Dudus L. Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development* 1995;**121**:2031-2046.
- 33. Maheshwari A, Lu W, Lacson A, Barleycorn AA, Nolan S, Christensen RD, *et al.* Effects of interleukin-8 on the developing human intestine. *Cytokine* 2002;**20**:256-267.
- 34. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Dore C, Sticherling M, Schroder JM. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res* 2000;**93**:41-54.
- 35. Wilson AJ, Byron K, Gibson PR. Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. *Clin Sci (Lond)* 1999;**97**:385-390.
- 36. Iba Y, Harada T, Horie S, Deura I, Iwabe T, Terakawa N. Lipopolysaccharide-promoted proliferation of endometriotic stromal cells via induction of tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 expression. *Fertil Steril* 2004;**82**:1036-1042.
- 37. Harrell PC, McCawley LJ, Fingleton B, McIntyre JO, Matrisian LM. Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells. *Exp Cell Res* 2005;**303**:308-320.
- 38. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;**298**:29-32.
- 39. Roger P, Puchelle E, Bajolet-Laudinat O, Tournier JM, Debordeaux C, Plotkowski MC, *et al.* Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of Pseudomonas aeruginosa to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 1999;**13**:1301-1309.
- 40. de Bentzmann S, Roger P, Dupuit F, Bajolet-Laudinat O, Fuchey C, Plotkowski MC, *et al.* Asialo GM1 is a receptor for Pseudomonas aeruginosa adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1996;**64**:1582-1588.
- 41. Hassid S, Degaute MP, Dawance S, Rombaut K, Nagy N, Choufani G, *et al.* Determination of proliferative activity in nasal polyps. *J Clin Pathol* 1997;**50**:923-928.
- 42. Polosukhin VV. Ultrastructural of the bronchial epithelium in chronic inflammation. *Ultrastruct Pathol* 2001;**25**:119-128.
- 43. Gallagher AM, Gottlieb RA. Proliferation, not apoptosis, alters epithelial cell migration in small intestine of CFTR null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;**281**:681-687.
- 44. Larson JE, Delcarpio JB, Farberman MM, Morrow SL, Cohen JC. CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;**279**:333-341.
- 45. Ye L, Chan S, Chow YH, Tsui LC, Hu J. Regulated expression of the human CFTR gene in epithelial cells. *Mol Ther* 2001;**3**:723-733.

- 46. Bedrossian CW, Greenberg SD, Singer DB, Hansen JJ, Rosenberg HS. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum Pathol* 1976;7:195-204.
- 47. Danel C, Erzurum SC, McElvaney NG, Crystal RG. Quantitative assessment of the epithelial and inflammatory cell populations in large airways of normals and individuals with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;**153**:362-368.
- 48. Hubeau C, Puchelle E, Gaillard D. Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**108**:524-529.
- 49. Sturgess J, Imrie J. Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am J Pathol* 1982;**106**:303-311.
- 50. Escotte S, Danel C, Gaillard D, Benoit S, Jacquot J, Dusser D, *et al.* Fluticasone propionate inhibits lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in human cystic fibrosis airway grafts. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**302**:1151-1157.
- 51. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;**291**:218-230.
- 52. Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, *et al.* Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 1996;**166**:413-426.
- 53. Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, *et al.* Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol* 1999;**146**:517-529.
- 54. Parks WC, Lopez-Boado YS, Wilson CL. Matrilysin in epithelial repair and defense. *Chest* 2001;**120**:36-41.
- 55. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;**28**:12-24.
- 56. Lee MM, Yoon BJ, Osiewicz K, Preston M, Bundy B, van Heeckeren AM, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 regulates resistance to infection. *Infect Immun* 2005;**73**:661-665.



Step I

Step II

Step II / III

Step IV

Histology of the non-CF and CF surface epithelium during the regeneration process. Grafts were removed at the indicated days below and all airway sections were stained with haematoxylin and eosin. After 4 days of engraftment, non-CF (A) and CF (E) epithelial cells adhered and migrated to form a monolayer of airway epithelial cells (step I). At day 13, the majority of the host rat trachea was covered by stratified non-CF and CF epithelial cell layers (B,F) (step II). However, in some areas an undifferentiated pseudostratified epithelium characteristic of step III was observed in several non-CF xenografts (B'). At day 25, the non-CF epithelium (C) became fully-differentiated (step IV), whereas the histology of the CF epithelium resembled that of step II (G) or step III (G'). At day 35, the non-CF epithelium (D) was similar to that observed at day 25, and the CF epithelium (H) became completely well-differentiated (step IV). m: mesenchyme, Lu: lumen. Bars =  $50\mu$ m.



Cell proliferation during non-CF and CF epithelial regenerations. Cell proliferation was assessed by Ki-67 immunostaining. All sections were counter-stained with haematoxylin and Ki-67-positive cells were counted at steps I, II, III and IV. Ki-67-positive cells were detected near the basal lamina of non-CF (A,A') and CF (B,B') epithelia at step II. C: no cell proliferation was observed at step I in non-CF and CF epithelia while it increased drastically at step II (p = 0.04 and 0.01 respectively), with a higher (3.6-fold) Ki-67-positive cell number in CF than in non-CF grafts (p = 0.02). Then, cell proliferation decreased significantly until step IV of non-CF and CF regenerations (step II/step III: p = 0.04 and 0.01 respectively). Bars = 50µm.



Quantification of basal, goblet and ciliated cells in the regenerated and well-differentiated epithelia. The number of basal, goblet and ciliated cells was assessed by CK13 (A,B), MUC5AC (D,E) and  $\beta$ -tubulin (H,I) immunostaining respectively. Sections were counterstained with haematoxylin. Basal cells (A,B) were significantly more numerous in CF grafts (C, p = 0.002). Images of MUC5AC- and MUC5B-positive cells were acquired and overlayed (D,E). The number of MUC5AC-positive cells (green) was not different between CF and non-CF grafts (F), whereas MUC5B-positive cells (red, yellow after overlay) were significantly less numerous in CF grafts (G, p = 0.009). The number of ciliated cells was not different in CF and non-CF epithelia (J). Bars = 50 µm.



Analyses of human IL-8, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 mRNA expression profiles by RT-PCR during regeneration. The mRNA level of IL-8, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 was normalized to the mRNA level of the housekeeping gene GAPDH. The levels of IL-8 mRNA were significantly higher in CF than in non-CF grafts (Step I: p = 0.01; Step II: p = 0.004; Step III: p = 0.005; Step IV: p = 0.005), and the transcript expression decreased progressively in both types of epithelium throughout the regenerative steps (Non-CF: step I/step III, p =0.04; CF: step I/step IV, p = 0.001). At steps I and II, significant higher MMP-7 mRNA levels were detected in CF grafts by comparison to non-CF grafts (p = 0.03 and p = 0.005respectively). Interestingly, MMP-7 expression did not change in CF grafts, whereas it increased in non-CF grafts during regeneration (Step I/step IV: p = 0.03). MMP-9 was significantly higher in CF than in non-CF grafts at steps II and III (p = 0.006 and p = 0.005respectively), but lower in CF epithelia at step IV (p = 0.01). The expression of MMP-9 mRNA did not change during the first three steps of non-CF regeneration, but increased at step IV (Step I/step IV: p = 0.03; step III/step IV: p = 0.02). In contrast, its expression increased at step II of CF regeneration (p = 0.0009), then progressively decreased from step II to step IV (Step II/step III, p = 0.01; step III/step IV, p = 0.002). TIMP-1 was higher in CF than non-CF grafts during the regeneration process (Step I: p = 0.01; Step II: p = 0.002; Step III: p = 0.005; Step IV: p = 0.005). No changes of TIMP-1 mRNA expression were observed during non-CF regeneration. In contrast, during CF regeneration, TIMP-1 expression increased at step II (p = 0.0009) and then gradually decreased between step II and step IV (Step II/step IV: p = 0.0001).



IL-8, MMP-7 and MMP-9 protein secretion during non-CF and CF regenerations. IL-8 secretions, analysed by ELISA, were significantly higher in CF than non-CF grafts at steps I (p = 0.05) and III (p = 0.02). During non-CF regeneration, IL-8 protein secretion decreased at step II (Step I/step II: p = 0.04), then remained constant at steps II, III and IV. In CF grafts, IL-8 secretion did not change during the first three steps of airway epithelial regeneration, but decreased between step III and step IV (Step III/step IV: p = 0.02). Values are expressed as pg of IL-8 / mg of total proteins. At step I, MMP-7 secretion was low in CF grafts (p = 0.04), but sharply increased at step II (p = 0.04) by comparison to non-CF grafts. In non-CF grafts, after an initial decrease from step I to step II, densitometric analysis found that MMP-7 protein level increased during regeneration (Step I/step III: p = 0.04). In CF grafts, MMP-7 secretion increased during the first three steps of regeneration (Step I/step II: p = 0.04; Step II/step III: p= 0.04). Overall, MMP-9 secretions were higher at steps I, II and III (p = 0.03, p = 0.02 and p= 0.04 respectively), but lower at step IV (p = 0.04) in CF when compared to non-CF grafts. MMP-9 secretion progressively increased along the non-CF regeneration process (Step II/step III: p = 0.04; step III/step IV: p = 0.04). In contrast, during CF regeneration, MMP-9 secretion increased at step II (Step I/step II: p = 0.01) then progressively decreased until step IV (Step III/step IV: p = 0.04).



Chemical inhibition of MMP-7 and MMP-9 during CF regeneration. MMP-7 and -9 inhibitors were added at day 0 and maintained until day 35 in 3 CF grafts, then these were removed, cut and 5- $\mu$ m sections were counter-stained with haematoxylin. At day 35, the inhibition of MMP-9 led to an immature (C, arrowhead) or monostratified epithelium composed predominantly of goblet cells (C, arrows), while the blockade of MMP-7 led to the generation of a hyperplasic epithelium (B), when compared to the control pseudostratified mucociliary CF epithelium (A). Scale bars = 50 $\mu$ m.

# ARTICLE 2

# Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transitamplifying cell properties

Running Head: Human airway basal cells are TAC

Rodolphe Hajj,<sup>a</sup> Thomas Baranek,<sup>b</sup> Richard Le Naour,<sup>b</sup> Pierre Lesimple,<sup>a</sup> Edith Puchelle,<sup>a</sup> Christelle Coraux <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM) UMRS-514, Institut Fédératif de Recherche (IFR53), CHU Maison Blanche, Reims, France.

<sup>b</sup>Equipe Associée (EA) 3796, IFR53, Reims, France.

## **Corresponding author:**

Christelle Coraux INSERM UMRS-514 CHU Maison Blanche 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims cédex - France. Phone: (33) 3 26 78 77 70, Fax: (33) 3 26 06 58 61 E-mail: <u>christelle.coraux@univ-reims.fr</u>

Supported by the French Association Vaincre la Mucoviscidose (AVLM), "Région Champagne-Ardenne" and Adult Stem Cells Thematic Concerted Action (INSERM, Association Française Contre les Myopathies and the French Ministry of Research).

**Key Words:** Human airway epithelium, Basal cells, Transit-amplifying cells, CD151, Tissue factor.

# ABSTRACT

In numerous airway diseases, such as cystic fibrosis, the epithelium is severely damaged and must regenerate to restore its defense functions. Although the human airway epithelial stem cells have not been identified yet, we have suggested recently that epithelial stem/progenitor cells exist among both human fetal basal and suprabasal cell subsets in the tracheal epithelium. In this study, we analyzed the capacity of human adult basal cells isolated from human adult airway tissues to restore a well-differentiated and functional airway epithelium. To this end, we used human specific basal cell markers, tetraspanin CD151 and tissue factor (TF), to separate positive basal cells from negative columnar cells with a FACSAria cell sorter. Sorted epithelial cells were seeded into epithelium-denuded rats' tracheae that were grafted subcutaneously in nude mice, and on collagen-coated porous membranes where they were grown at the air-liquid interface. Sorted basal and columnar populations were also analyzed for their telomerase activity, a specific transit-amplifying cell marker, by the telomeric repeat amplification protocol assay. After cell sorting, the pure and viable CD151/TF-positive basal cell population proliferated on plastic and adhered on epitheliumdenuded rats' tracheae as well as on collagen-coated porous membranes where it was able to restore a fully-differentiated mucociliary and functional airway epithelium, while viable columnar negative cells did not. Telomerase activity was detected in the CD151/TF-positive basal population, but not in CD151/TF-negative columnar cells. These results demonstrate that human adult basal cells are at least airway surface transit-amplifying epithelial cells.

### **INTRODUCTION**

In numerous airway diseases such as asthma, obliterans bronchiolitis, chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis, the pseudostratified airway surface epithelium composed of basal, secretory and ciliated cells is severely damaged and must regenerate to restore its defense functions. This regeneration process involves stem and/or transit-amplifying cells (TAC). Despite the slow cell turnover observed in lung epithelia, much evidence supports the presence of stem/TAC in the airways that are activated after injury. When mature or immature human fetal tracheal cells [1], or human adult surface epithelial cells isolated by enzymatic dissociation from human airway tissues [2] are seeded into rats' tracheae depleted of their own epithelia and grafted in SCID or nude mice, a fully-differentiated mucociliary epithelium is restored with glandular structures. Stem/TAC have been underlined by lineage tracking in bronchial epithelial cells in other organs, such as bone marrow and intestine, Borthwick *et al.* have demonstrated a label-retaining cell expansion at submucosal gland ducts in mouse following BrdU labeling, thus supporting the notion that this region may be a stem cell niche in the proximal airways [4].

Of the three main airway surface epithelial cell types, basal [5-7] and secretory [7, 8] cells are known to divide, while ciliated cells are considered as terminally differentiated [9]. Using different methods such as elutriation, fluorescence-activated cell sorting (FACS) and bitransgenic mice, several in vitro and in vivo investigations strongly suggest that adult basal cells should be the stem/TAC type [10-15], while others suggest that adult secretory cells can proliferate and regenerate a mucociliary surface epithelium [16, 17]. However, all these studies have been carried out on animals so far. Recently, we have shown that epithelial stem/TAC exist among both basal and suprabasal cell subsets in the human fetal airways [18]. Despite all these findings, the nature of human airway epithelial stem/TAC is still unclear. It is currently thought that stem cells and TAC express specific surface and intracellular markers that distinguish them from other somatic cell types. A TAC derives from a stem cell and is committed to differentiate into one or more lineages by active and limited divisions. Initially, it may not be committed and may retain self-renewal properties [19]. Telomerase activity has been shown to be low in quiescent stem cells, but high in proliferative cells and undetectable in most differentiated somatic cells [20]. Thus, a detectable telomerase activity in a cell population would predict the presence of TAC.

The aim of our study was to identify the population of the human adult airways that retains TAC properties capable of restoring a fully-differentiated mucociliary and functional epithelium. In this perspective, we focused our work on human airway basal cells previously described as the stem/TAC population in animals. We used the tetraspanin CD151 and tissue factor (TF) to separate basal cells from secretory and ciliated cells by FACS. CD151 is a major component of pre-hemidesmosomal structures and plays a role in the formation and the stability of hemidesmosomes [21], and is broadly expressed by a variety of cells [22] including those of the airways [23]. TF is the cell surface receptor of factor VII/VIIa expressed on the surface of several cell types including airway basal cells [24]. Using an *in vivo* humanized nude mouse xenograft model and an *in vitro* air-liquid interface culture model, we studied the capacity of sorted basal and columnar cells to reconstitute a differentiated functional epithelium and analyzed their telomerase activity.

# MATERIALS AND METHODS

# Antibodies

All antibodies used were from mouse species. Purified TF and TF FITC-conjugated antihuman monoclonal antibodies (IgG1, 1:75 and  $3\mu L/10^6$  cells respectively) were purchased from American Diagnostica (Stamford, USA). Purified CD151 and PE-conjugated antihuman monoclonal antibodies (IgG1 $\kappa$ , clone 14A2.H1, 1:50 and 6 $\mu$ L/10<sup>6</sup> cells respectively) as well as PE-conjugated non-immune IgG1 $\kappa$  isotype control (clone MOPC-21, 6 $\mu$ L/10<sup>6</sup> cells) were from BD Biosciences (San Diego, USA). Anti-cytokeratin (CK)-13 (IgG1, clone KS-1A3, 1:1000), anti-CK18 (IgG1, clone CY-90, 1:1000) monoclonal antibodies, non-immune IgG (dilution adjusted to the primary antibody concentration), 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI, 200ng/mL) and Griffonia simplicifolia isolectin B<sub>4</sub>-FITC (GSI-B4, 4µg/mL) came from Sigma Aldrich (St Louis, USA). Rabbit anti-aquaporin 3 polyclonal antibody (AQP3, 1:100) was from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Anti-MUC5AC monoclonal antibody (IgG1, clone CLH2, 1:50) was from Novocastra (Newcastle, UK). Anti-human βtubulin monoclonal antibody (IgG2b, clone KMX-1, 1:15000) was from Chemicon (Temecula, USA). Anti-zonula occludens (ZO)-1 monoclonal antibody (IgG1k, clone ZO1-1A12, 1:20) was from Zymed Laboratories (San Francisco, USA). Anti-human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) monoclonal antibody (IgG2a, clone 24-1, 1:20) was from R&D Systems (Minneapolis, USA). Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (IgG H+L, 1:200) secondary antibodies were from Molecular Probes (Eugene, USA). FITC-conjugated goat anti-mouse secondary polyclonal antibody (F(ab')<sub>2</sub>, 1:500) and non-immune IgG1 isotype control (clone DAK-GO1, 1:500) were from DakoCytomation (Carpinteria, USA). The blocking goat anti-mouse IgG Fab fragments (H+L, 1:50) as well as FITC-conjugated non-immune IgG1 isotype control  $(3\mu L/10^6 \text{ cells})$ came from Jackson Immunoresearch (Pennsylvania, USA).

# Human airway tissues

The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the Public Health Code, with a written consent from the patients. Human airway tissues were collected after nasal polypectomy of 9 patients who did not suffer from any other disease. Fresh human tissues were immediately transferred to the laboratory in RPMI 1640 medium supplemented with 25mM HEPES, 200U/mL penicillin and 200µg/mL streptomycin (Gibco BRL, Paisley, UK), and washed with cold RPMI 1640. A portion of each tissue was embedded in optimum cutting temperature (O.C.T.) compound (Tissue-Tek, Zoeterwoude, The Netherlands), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for histology and immunohistochemistry.

# **Epithelial cell isolation and FACS**

Human airway surface epithelial cells were isolated from nasal tissues by incubation with 0.1% type XIV collagenase (Sigma Aldrich) in RPMI 1640 medium supplemented with 200U/mL penicillin and 200µg/mL streptomycin overnight at 4°C. Cell-denuded tissues were assessed by histology and showed a denuded basal lamina with intact glandular and duct cells. Isolated epithelial cells were washed, suspended in RPMI 1640 culture medium and counted. Cells were sieved with a 70-µm nylon BD Falcon cell strainer (BD Biosciences) and washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS; Gibco BRL) without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> supplemented with 2mM of EDTA (Sigma Aldrich). Cells were centrifuged and suspended in PBS-EDTA containing 5% of bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich) for 30min.
For CK13 analyses,  $2x10^6$  cells were treated with saponin 0.1% (Sigma Aldrich) in PBS for 10min at 4°C, incubated with anti-CK13 antibody for 25min at 4°C and then with FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody for 25min at 4°C. Non-immune mouse IgG1 was used as isotype control.  $3x10^4$  events were recorded and CK13 analyses were performed on FACSCalibur (BD Biosciences) to distinguish marked basal cells from the unmarked columnar cell population (secretory and ciliated cells).

For cell sorting,  $22.5\pm 5.8\times 10^6$  cells (range  $12-34\times 10^6$ ) were treated in each experiment. Cells were incubated with both anti-CD151-PE and anti-TF-FITC antibodies diluted in PBS for 20min at 4°C. Non-immune IgG1 $\kappa$ -PE and IgG1-FITC diluted in PBS were used as isotype controls. Cells were then washed twice and suspended in PBS-EDTA. DAPI was added to stain dead cells. Cell sorting was performed with a FACSAria cell sorter (BD Biosciences) equipped with blue, red and violet lasers. Dead cells were excluded from basal and columnar cells by DAPI vs. FSC dot plots. Doublets were excluded from the basal cell population by SSC-W vs. SSC-H and FSC-W vs. FSC-H dot plots. Finally, bright basal cells (CD151+/TF+) and negative columnar cells (CD151-/TF-) were selected and sorted using the cell sorter's purity option at a rate of 5000 events/s. Sorted populations were reanalyzed ( $3\times 10^4$  events recorded) for purity and viability, and  $1\times 10^5$  cells of each population were cytopun on gelatin-coated slides for CK and MUC5AC staining cell count performed as described below. Nonsorted control cells that followed the same procedure described above, without any antibody addition, were stained with DAPI to assess for dead cells. Viable non-sorted cells were then seeded on plastic, on porous membranes and into xenografts as described below.

# Cell culture

Non-sorted control cells as well as sorted CD151+/TF+ and CD151-/TF- populations were seeded on plastic in 6-well BD Falcons (BD Biosciences) for cell proliferation at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in the proliferation medium DMEM/F-12 (Gibco BRL; 3/1 vol/vol) supplemented with 0.87µM bovine insulin, 65nM human transferrin, 1.6nM recombinant human EGF, 1.38µM hydrocortisone, 30nM retinyl acetate, 9.7µM 3,3',5-triiodo-L-thyronin, 2.7µM (-)epinephrine, 35µg/ml bovine pituitary extract, 5µM ethanolamine, 5µM O-phosphorylethanolamine, 30nM sodium selenite, 1nM manganese chloride tetrahydrate, 0.5µM sodium metasilicate nonahydrate, 1nM ammonium molybdate tetrahydrate, 5nM ammonium vanadate, 1nM nickel sulfate hexahydrate, 0.5nM stannous chloride dihydrate (Sigma Aldrich), 100U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin. To improve cell adhesion, 10% of fetal calf serum (Gibco BRL) was added for the first 24h.

For cell differentiation, sorted populations were seeded on collagen IV-coated (Sigma Aldrich) 12mm Costar Transwell porous polyester membranes ( $0.4\mu$ m pore size) (Corning Inc., New York, USA) at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured up to confluency in proliferation medium. Then, the medium was definitively removed from the upper compartment and replaced in the basal one by BEBM (Cambrex Bio Science, Walkersville, USA) /DMEM high glucose (Gibco BRL) medium (1/1 vol/vol) (supplemented with 0.5ng/mL EGF,  $5\mu$ g/mL insulin,  $0.5\mu$ g/mL hydrocortisone,  $10\mu$ g/mL transferrin,  $0.5\mu$ g/mL epinephrine,  $6.5\mu$ g/mL triiodothyronin, 0.13mg/mL bovine pituitary extract (Cambrex),  $1.5\mu$ g/mL BSA,  $0.1\mu$ M retinoic acid (Sigma Aldrich), 100U/mL penicillin and  $100\mu$ g/mL streptomycin) and cells were grown at the air-liquid interface. All cultures were incubated at  $37^{\circ}$ C in a 100% humidified incubator in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Membranes were processed for histological and immunohistochemical analyses when homogenous cilia beating was observed after 25 to 35 days. Six human airway tissues were used for cell proliferation studies and three out of these were used for air-liquid interface cultures. All experiments were performed in triplicate.

### Airway epithelial secretion collection from air-liquid interface cultures

When homogenous cilia beating was observed in air-liquid interface cultures, surface epithelia were washed with PBS and then  $100\mu$ L of this latter were added to the apical surface of regenerated epithelia to collect airway epithelial secretions. After incubation for 7h at  $37^{\circ}$ C, supernatants were collected and stored at -80°C until use.

# Airway xenografts

All experiments and procedures were performed in compliance with the French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation. Humanized xenografts were prepared as described previously [2]. Briefly, tracheae of adult Whistar rats (Charles Rivers, Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France) were frozen at -80°C and thawed to remove the rat surface epithelium. Rats' tracheae were then tied aseptically at their ends to sterile polyethylene tubing and stored at -80°C until use. Non-sorted control cells as well as sorted CD151+/TF+ and CD151-/TFhuman airway populations  $(5 \times 10^5 \text{ cells}/80 \mu \text{L in proliferation medium})$  were seeded into epithelium-denuded rats' tracheae that were grafted subcutaneously into the flanks of 7 weekold female nude mice anaesthetized with an intramuscular injection of pentobarbital sodium (40mg/Kg) (Centravet, Gondreville, France). Nude mice were housed under pathogen-free conditions. Tracheal xenografts were flushed twice a week with serum-free DMEM/F-12 medium supplemented with 200U/mL penicillin, 200µg/mL streptomycin, 50µg/mL gentamicin, 2.5µg/mL amphotericin and 420U/mL colimvcin to wash and remove dead cells and accumulated mucus from the lumen. Animals were sacrificed with an overdose of pentobarbital sodium after 35 days of engraftment, and tracheal xenografts were removed for histological and immunohistochemical analyses. Three human airway tissue samples were used for xenograft experiments that were performed in triplicate.

### Histology

Human airway tissues, air-liquid interface membranes and xenografts were embedded in O.C.T. and frozen in liquid nitrogen. 5- $\mu$ m frozen sections were cut with a microtome, collected on gelatin-coated slides and were either stained with haematoxylin-eosin using Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit (Shandon, Pittsburg, USA) and mounted in Eukitt (Kindler, Freiburg, Germany) for histology, or frozen at -20°C for immunohistochemistry. Images of plastic cultures were acquired on a Nikon microscope (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France), and images of airway tissue, air-liquid interface membrane and xenograft sections were acquired on an Axiophot microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### Immunohistochemistry

Slides were removed from -20°C and sections were fixed with cold acetone at -20°C for 10min, washed with PBS and blocked with PBS-BSA 3% for 30min at room temperature (RT) to prevent unspecific bindings. Sections were then incubated with the primary antibody diluted in PBS-BSA 1% for 1h at RT, washed with PBS, incubated with the Alexa Fluor 488 secondary antibody diluted in PBS-BSA 1% for 1h at RT, washed with PBS, incubated with PBS, incubated with DAPI diluted in PBS for 10min, washed with PBS, counter-stained with Harris haematoxylin (Shandon) for 5s, washed with PBS and finally mounted in Aquapolymount solution (Polysciences, Warrington, USA). Green, red or violet fluorescence was observed and images acquired were on an AxioImager Z1 microscope (Zeiss). Negative controls were performed

by replacing primary antibodies with mouse non-immune IgG fractions and with PBS-BSA 1% alone. For dual staining, sections were incubated with primary antibody and Alexa Fluor 488 secondary antibody as described above. After washing with PBS, sections were exposed to goat anti-mouse Fab (H+L) fragments for 1h to block free sites of the mouse primary antibody. Then, sections were washed with PBS and proceeded for an other staining following the same procedure described above by using the Alexa Fluor 594 secondary antibody. Three samples were used for each staining.

#### Antibacterial activity of airway epithelial secretions

Bactericidal activity of airway epithelial secretions collected from air-liquid interface cultures was performed as described previously [25]. Briefly, wild type laboratory *Staphylococcus aureus* strain 8325-4 (generous gift from Dr T.J. Foster, Department of Microbiology, Dublin, Ireland) was cultured in trypticase soy (TS) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for 2h at 37°C under agitation (120 rpm) to obtain log-phase bacterial cultures. Then, bacteria were washed twice in sterile PBS and water respectively, and diluted in sterile water to a final concentration of 250 colony-forming units (CFU)/ $\mu$ L. To assess for antibacterial activity, 2 $\mu$ L of bacterial suspension (500 CFU) were mixed with 30 $\mu$ L of collected airway epithelial secretions, incubated for 2h 30min at 37°C under low agitation (70 rpm) and seeded on TS agar plates (bioMérieux). As control, 500 CFU of *S. aureus* were incubated with 30 $\mu$ L of sterile PBS and seeded on agar. After overnight incubation at 37°C, survived bacteria were counted and expressed as percentage of PBS-grown control bacteria referenced as 100%. Logarithmic scale was used to represent the percentage axis. Epithelial secretions of the three air-liquid interface cultures realized above, from non-sorted cells (NSC) and CD151+/TF+ sorted cells (SC), were used and experiments were performed in duplicate.

### **Telomerase activity**

Telomerase activity was assessed by the Telomeric Repeat Amplification Protocol assay (TRAP). Sorted CD151+/TF+ and CD151-/TF- were centrifuged and pellets were stored at -80°C until use. Proteins were extracted in ice-cold CHAPS 1X buffer (1% CHAPS, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM Benzamidine, 10% glycerol, 5mM βmercaptoethanol) (Sigma Aldrich) and quantified with the Quick Start BioRad Assay Kit (BioRad, Hercules, USA) following the manufacturers' instructions. Absorbance was read on a Xenius microplate spectrophotometer (SAFAS, MC, Monaco). PCR was performed in a final 25-µL reaction volume composed of 5µL of distilled water containing 800ng of CD151+/TF+ or CD151-/TF- protein extract, and 20µL of the reaction mix containing 20mM Tris pH 8.0, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 63mM KCl, 1mM EGTA, 0.005% Tween 20, 20µg/mL BSA (Sigma Aldrich), 50µM dNTP (Takara, Shiga, Japan), 9pmol of TS primer (5'primer AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 6.2pmol CXext (5'of (5'-GTGCCCTTACCCTTACCCTAA-3'). 4.6pmol of NT primer ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'), 0.5yoctomol of TSNT internal control (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3') (Eurogentec, Seraing. Belgium) and 1 unit of Taq DNA polymerase (Takara). 5µL of distilled water were added to the reaction mix without or with Taq polymerase for negative controls. 200ng of A549 cell extract diluted in 5µL of distilled water constituted the positive control. Tubes were incubated in the thermocycler for 20min at 30°C, then 1min at 90°C followed by 30 cycles of 30s/92°C, 30s/52°C and 30s/72°C. After amplification, PCR products were separated on a 12% nondenaturing acrylamide gel at 200V for 55min and then stained with SYBR Gold (Molecular probes). Bands were acquired under UV on a LAS-1000 equipped by a Fuji camera (Fuji, Stamford, USA).

### Statistical analyses

Values were expressed as the mean $\pm$ SD. The non-parametric Mann and Whitney test was used for statistical analyses that were performed on StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, USA). Significant differences were defined for p < 0.05.

# RESULTS

# CD151 and TF are basal cell-specific markers

In order to separate human adult airway epithelial basal cells from airway columnar cells, we identified two membrane basal cell specific markers. The tetraspanin molecule CD151 as well as TF were specific for all basal cells -as confirmed by CK13 (a cytoplasm-specific basal cell marker) co-labeling (Figure 1A-D and 1E-H respectively)- on which they were co-localized as well (Figure 1I-L). CD151 and TF were also specifically expressed on human bronchial epithelial basal cells (data not shown). Moreover, CD151 and TF epitopes were still intact after enzymatic cell dissociation as assessed by immunohistochemistry on cytospun cells (data not shown). In addition to CD151 and TF, we tested GSI-B4, which has been shown to be specific for basal cells in animals [26] and in human blood B group subjects [27], but in our study this marker was not expressed on human airway epithelial basal cells (data not shown). Furthermore, AQP3 that has been described either as specific for an airway epithelial population [30], recognized all surface epithelial cells in our human airway tissues (data not shown). Thus, these results encouraged us to use CD151 and TF as markers of all basal cells for epithelial cell sorting.

### Identification of the basal cell population in isolated cells by flow cytometry

Human airway epithelial cells were isolated from tissues, sieved and stained with anti-CK13 antibody. When we proceeded to flow cytometry analyses, FSC vs. SSC dot plot representation (Figure 2A) suggested that cells gated on R1 should be basal cells based on their physical shape. The CK13 analyses confirmed our suggestion as shown in figure 2C. Cells gated on R2 were negative to CK13 (Figure 2E) and represented then the columnar cell population. Thus, the identification of the basal and columnar cell populations allowed us to proceed to cell sorting.

### Fluorescence-activated cell sorting

Cells were sieved and double-stained with anti-CD151-PE and anti-TF-FITC antibodies. In a FSC vs. SSC dot plot, basal and columnar populations were circumscribed (Figure 3Aa) and cells that were positive to DAPI were excluded. Cell sorting was performed as described in materials and methods by excluding doublets from basal cells and gating the bright positive CD151+/TF+ basal cell population (Figure 3Ad) and the negative CD151-/TF- columnar cell population (Figure 3Ae). The number of collected cells was  $5.4\pm1.9\times10^6$  and  $1.1\pm0.6\times10^6$  cells for positive (CD151+/TF+) and negative (CD151-/TF-) populations respectively. By reference to the original total isolated cell population, their percentage was  $25\pm9\%$  and

4.8±3.1% respectively. The low percentage obtained for the CD151-/TF- population is likely due to the exclusion of dead cells and columnar cell aggregates (Figure 3Ae). The reanalysis by DAPI of sorted populations for viability showed that  $99.2\pm0.4\%$  of CD151+/TF+ cells and  $98.9\pm0.6\%$  of CD151-/TF- cells were viable. Purity was  $99.5\pm0.3\%$  for CD151+/TF+ sorted basal cells (Figure 3Ba, Bb) and  $97.9\pm0.7\%$  for CD151-/TF- sorted columnar cells (Figure 3Bc, Bd). We further characterized sorted positive and negative populations, cytospun on gelatin-coated slides, by immunohistochemistry with MUC5AC and CK13 (data not shown). Positive CD151+/TF+ population contained  $0.04\pm0.03\%$  of MUC5AC-positive contaminating secretory cells, and negative CD151-/TF- population contained  $1.2\pm0.2\%$  of CK13-positive contaminating basal cells, which was in agreement with purity results obtained by FACS analyses. Moreover, the negative CD151-/TF- population showed that  $23.5\pm6.1\%$  of total cells were positive for MUC5AC, and that  $60.5\pm5.8\%$  were ciliated cells as judged by their morphology. Sorted CD151+/FT+ basal cells were also all positive for CK13, except the 0,04% of contaminating cells positive for MUC5AC.

### Capacity of sorted cells to proliferate and reconstitute a fully-differentiated epithelium

The ability of sorted basal and columnar cell populations to proliferate and restore a pseudostratified mucociliary airway epithelium was assessed in vitro and in vivo. The reproducibility of the results was excellent, which means that seeded cells from all donors were able to repopulate air-liquid interface cultures and xenografts. Moreover, no variations between donor-tissue samples were noted. All high pure and viable CD151+/TF+ basal cells seeded on plastic were able to proliferate (Figure 4D) as did non-sorted control cells (Figure 4A), whereas seeded viable CD151-/TF- columnar cells did not adhere (Figure 4G). In all airliquid interface cultures and xenografts, CD151+/TF+ basal cells were able to reconstitute a pseudostratified mucociliary epithelium composed of basal, ciliated and secretory cells (Figure 4E, F) as did non-sorted control cells (Figure 4B, C), whereas CD151-/TF- columnar cells were not able to (Figure 4H, I). Regenerated epithelia in air-liquid interface cultures and in xenografts were further analyzed for markers generally expressed on well-differentiated airway surface epithelia in vivo. Regenerated epithelia from CD151+/TF+ basal cells as well as control regenerated epithelia stained positively, in the same way, for CK13 (basal cells) (Figure 5A-D), CK18 (columnar cells) (Figure 5E-H), MUC5AC (secretory cells) (Figure 5I-L), β-tubulin (ciliated cells) (Figure 5M-P), ZO-1 (a tight junction-associated protein that characterizes the epithelial barrier integrity) (Figure 5Q-T) and CFTR (a chloride channel expressed on the apical membrane of ciliated cells) (Figure 5U-X). Of note, MUC5AC stains all differentiated secretory cells as described previously [31], and as assessed by Alcian Blue/PAS (periodic Schiff acid) staining of differentiated airway epithelial xenograft sections (data not shown). Moreover, during the human airway epithelial regeneration, MUC5AC is only expressed and secreted when the epithelium is fully-differentiated (unpublished observations). CD151 and TF, similarly to controls, were also found co-localized on basal cells in CD151+/TF+ regenerated epithelia (Figure 5A'-D'). No staining was observed in sections treated with non-immune IgG or with PBS-BSA 1% alone. In addition, no statistically significant differences in the percentage of basal (CK13-positive), secretory (MUC5AC-positive) and ciliated (\(\beta-tubulin-positive)) cells were observed between CD151+/TF+ regenerated epithelia and controls as described in table 1. Of note, intermediate cells were not quantified because they lack the expression of specific markers. In table 1, the sum of the percentages of basal, secretory and ciliated cells was therefore less than 100%, the lacking percentage being that of intermediate cells. Nevertheless, our results regarding these percentages in differentiated xenografts agree with the data of Mercer et al. and Soderberg et

*al.* [32, 33] who quantified the numbers of basal, secretory and ciliated cells in the human large airways.

# Functionality of regenerated epithelia

After underlining the differentiated state of generated epithelia from CD151+/TF+ basal cells and non-sorted control cells, we sought to determine whether these epithelia exhibited any functional activity. Therefore, the capacity of generated epithelia in air-liquid interface cultures to secrete factors that kill bacteria was tested. After incubation with *S. aureus*, we observed that culture-airway surface epithelial secretions significantly killed over 99% of bacteria. In fact, when mixtures of bacteria and epithelial secretions of control (NSC) and CD151+/TF+ (SC) regenerated epithelia were seeded on agar, bacterial recovery was 0.32% and 0.26% respectively, with regard to bacterial growth in PBS alone (Figure 6). No statistical difference was found between bactericidal activities of secretions collected from control and CD151+/TF+ regenerated epithelia.

### Assessing for TAC presence

Sorted CD151+/TF+ basal cells and CD151-/TF- columnar cells were subjected to telomerase activity using the TRAP assay. The telomere ladder located above the primer dimers in the positive control lane corresponds to the telomerase activity, which was detectable in the CD151+/TF+ basal cell population, but not in CD151-/TF- columnar cells (Figure 7).

# DISCUSSION

In this study, we demonstrated that human adult airway surface epithelial basal cells expressing CD151 and TF were capable of reconstituting a fully-differentiated mucociliary and functional airway epithelium *in vivo* in xenografts and *in vitro* in air-liquid interface cultures. Moreover, the telomerase activity indicates the presence of TAC in sorted basal cells.

CD151 has been shown to be involved in oncogenesis, in the control of metastasis and in the modulation of cell motility both *in vitro* and *in vivo* [34]. In addition to its coagulation activity, TF has been implicated in tumor growth, angiogenesis, metastasis [35] and cell migration [36], and has also been shown to mediate inflammation [37]. Despite all the implications of CD151 and TF, they have never been described as markers of TAC and their role in the airway basal cell layer is still unknown, unless a possible function of TF in basal-basal and basal-columnar cell adhesion forasmuch as it has been involved in cardiomyocytes intercellular adhesion in the cardiac muscle [38]. Moreover, we noticed that the antibodies used against CD151 and TF did not block cell adhesion to plastic and collagen. Therefore, we used these two protease-resistant markers to separate human adult CD151+/TF+ basal cells from CD151-/TF- columnar cells.

Contradictory results have been published on whether basal or secretory cells are stem/TAC of the airway surface epithelium. In addition, all the studies were performed on animals, such as rabbits and rats, using separation techniques based on cell density (elutriation) [11, 39] or on cell shape (flow cytometry) [16, 17], leading to relatively poor purities. Recently, we have proceeded to the separation of human fetal airway basal cells, expressing AQP3 on their surface, from columnar AQP3- cells and found that both AQP3+ and AQP3- populations were

able to repopulate the host epithelium-denuded rats' tracheae grafted in SCID mice [18]. The difference observed may be due to the fact that human fetal cells may still retain more proliferative or "TAC capacities" than adult cells. Furthermore, due to the different methodological procedure used in our previous study, we cannot exclude the possibility that the fraction of AQP3- fetal columnar cells could still contain a small percentage of basal contaminating cells that may be partly responsible for regenerating a differentiated epithelium. In the present study, we used a cell sorter possessing an option that is capable of excluding all contaminating cells. We were able to obtain a high pure population of positive CD151+/TF+ basal cells that reached 99.96%, and a negative CD151-/TF- population that reached 98.8% as assessed by immunohistochemical analyses. In addition, the percentage of the sorted basal cell population was in agreement with the percentage of basal cells *in situ* described in previous studies [32, 33], emphasizing then the use of FT and CD151 as panbasal cell markers.

When sorted basal cells were seeded, they adhered on plastic and had the capacity to proliferate and to restore a fully-differentiated epithelium in air-liquid interface cultures and xenografts, while columnar cells did not have this ability. Moreover, differentiated epithelia reconstituted from CD151+/TF+ basal cells were functional as assessed by the capacity of their secretions to kill bacteria. When the functionality of the airway epithelium is altered, which is the case in several diseases such as cystic fibrosis (pathology due to mutations in the *cftr* gene encoding the CFTR chloride channel), there is inactivation of some secreted antibacterial factors such as  $\beta$ -defensins [40] generally released by normal airway surface epithelium [41].

Pure CD151+/TF+ basal cells were able to divide and generate other basal cells as well as secretory and ciliated cells, which strongly suggests their self-renewal potential as it has been emphasized that the capacity for self-renewal decreases as committed TAC differentiate [42]. The evidence that surface secretory cells are stem/TAC is not abundant [18, 43-45], while it becomes more convincing that animal basal cells retain the stem/TAC potential in the proximal airways [10-15]. However, little is known about the potential of basal cells in the distal part of the airways [46], probably due to their low number in this region where Clara cells are well-known to retain stem cell properties [47]. It would be interesting, as a first attempt, to test whether the described markers could be used to isolate purified basal cells from the distal airways.

In this study, we used the xenograft model in which we have previously described the regeneration dynamics of the human airway epithelium and showed the generation of glandular structures as well [2]. We observed here the initiation of these structures in xenografts seeded with purified CD151+/TF+ basal cells (data not shown) suggesting their role in gland formation as described previously [48]. A more orientated work would be very interesting in order to study the dynamics of gland development in grafts seeded with pure basal cells.

In each experiment, the same number of sorted basal and columnar cells was seeded *in vitro* and *in vivo*, but the negative columnar population never adhered. Forasmuch as the sorted CD151-/TF- population contained 24% of secretory cells, we further seeded four times the amount of the original number of columnar cells on collagen-coated porous membranes, in order to equalize the number of basal and secretory cells. Despite the elevated number of seeded secretory cells, they did not adhere. This could be related to the fact that secretory cells may lose their capacity to adhere to extracellular matrix molecules when isolated. In

addition, the attachment of columnar cells to the basal lamina occurs mainly *via* desmosomal attachment to basal cells *in situ* [49]. Hence, columnar cells may not possess the receptors that enable them to adhere to the adequate ligands of the basal lamina. Ciliated cells that have always been considered as terminally differentiated have been shown recently to transdifferentiate *in situ* into other epithelial cell types during repair of the airway epithelium [50]. In our study, ciliated cells did adhere neither *in vitro* nor *in vivo*.

In order to demonstrate the existence of a potential TAC population among human basal cells, we analyzed sorted CD151+/TF+ and CD151-/TF- cells for their telomerase activity. Telomerase is highly active in human embryonic tissues and cells [51], but its activity in adult stem cells is still controversial [52, 53]. Its transduction has been implicated in the immortalization of many human cell types, such as small airway epithelial cells [54]. Telomerase has been detected in human fetal lungs during gestation [55] where it was concentrated in epithelial cells near the basal lamina [56], as well as detected in human adult bronchial basal cells [57]. We found that sorted CD151+/TF+ basal cells had a clearly-detectable telomerase activity, whereas sorted CD151-/TF- columnar cells did not exhibit any sign of its activity. Thus, we could speculate that adult basal cells are at least TAC of the human airways inasmuch as to date, it is admitted that telomerase activity is widely upregulated in TAC and is therefore a marker of that type of cells [52, 53, 58-62].

# CONCLUSION

Our data strongly support the concept that human adult airway basal cells retain TAC properties as they are capable of proliferating and reconstituting a fully-differentiated mucociliary and functional epithelium. Further studies, such as clonogenicity tests, will define whether subpopulations of stem cells are likely to exist within human airway basal cells. In addition, the markers defined in this study would be of interest in order to isolate basal cells of high purity allowing their phenotyping (e.g. transcriptome and proteomic studies) to define "stemness" markers that will help for the identification of airway epithelial stem cells. Another interesting perspective of this work would be the transduction of isolated basal cells with a reporter gene that allows identifying new subpopulations within basal cells that retain stem cell properties.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all the ENT and surgeons who provided us human airway tissues: Pr J-M. Klossek, Hôpital Jean Bernard (Poitiers, France), Dr C. Ruaux, Clinique Mutualiste de la Sagesse (Rennes, France), Dr P. Corlieu, Hôpital Tenon (Paris, France), Dr I. Durieu, Centre Hospitalier Lyon Sud (Lyon, France). We are also grateful for Dr J-F. Riou (IFR53, Reims, France) for providing us the TRAP procedure.

#### REFERENCES

- 1 Delplanque A, Coraux C, Tirouvanziam R et al. Epithelial stem cell-mediated development of the human respiratory mucosa in SCID mice. J Cell Sci 2000;113:767-778.
- 2 Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J et al. Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;278:165-176.
- 3 Zepeda ML, Chinoy MR, Wilson JM. Characterization of stem cells in human airway capable of reconstituting a fully differentiated bronchial epithelium. Somat Cell Mol Genet 1995;21:61-73.
- 4 Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT et al. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;24:662-670.
- 5 Donnelly GM, Haack DG, Heird CS. Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. Cell Tissue Kinet 1982;15:119-130.
- 6 Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:2000-2006.
- 7 Breuer R, Zajicek G, Christensen TG et al. Cell kinetics of normal adult hamster bronchial epithelium in the steady state. Am J Respir Cell Mol Biol 1990;2:51-58.
- 8 Evans MJ, Shami SG, Cabral-Anderson LJ et al. Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO2. Am J Pathol 1986;123:126-133.
- 9 Mason RJ, Williams MC, Moses HL et al. Stem cells in lung development, disease, and therapy. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:355-363.
- 10 Inayama Y, Hook GE, Brody AR et al. The differentiation potential of tracheal basal cells. Lab Invest 1988;58:706-717.
- 11 Nettesheim P, Jetten AM, Inayama Y et al. Pathways of differentiation of airway epithelial cells. Environ Health Perspect 1990;85:317-329.
- 12 Ford JR, Terzaghi-Howe M. Basal cells are the progenitors of primary tracheal epithelial cell cultures. Exp Cell Res 1992;198:69-77.
- 13 Ford JR, Terzaghi-Howe M. Characteristics of magnetically separated rat tracheal epithelial cell populations. Am J Physiol 1992;263:568-574.
- 14 Hong KU, Reynolds SD, Watkins S et al. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:643-649.
- 15 Schoch KG, Lori A, Burns KA et al. A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:631-642.
- 16 Johnson NF, Wilson JS, Habbersett R et al. Separation and characterization of basal and secretory cells from the rat trachea by flow cytometry. Cytometry 1990;11:395-405.
- 17 Johnson NF, Hubbs AF. Epithelial progenitor cells in the rat trachea. Am J Respir Cell Mol Biol 1990;3:579-585.

- 18 Avril-Delplanque A, Casal I, Castillon N et al. Aquaporin-3 expression in human fetal airway epithelial progenitor cells. Stem Cells 2005;23:992-1001.
- 19 Smith A. A glossary for stem-cell biology. Nature 2006;441:1060-1060.
- 20 Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. Differentiation 2002;69:188-197.
- 21 Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC et al. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. J Cell Biol 2000;149:969-982.
- 22 Ashman LK, Aylett GW, Mehrabani PA et al. The murine monoclonal antibody, 14A2.H1, identifies a novel platelet surface antigen. Br J Haematol 1991;79:263-270.
- 23 Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK. Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. J Histochem Cytochem 1997;45:515-525.
- 24 Imokawa S, Sato A, Hayakawa H et al. Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:631-636.
- 25 da Silva MC, Zahm JM, Gras D et al. Dynamic interaction between airway epithelial cells and Staphylococcus aureus. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:543-551.
- 26 Shimizu T, Nettesheim P, Mahler JF et al. Cell type-specific lectin staining of the tracheobronchial epithelium of the rat: quantitative studies with Griffonia simplicifolia I isolectin B4. J Histochem Cytochem 1991;39:7-14.
- 27 Bals R, Welsch U. Lectins and antibodies to blood group antigens as markers for the basal cells of the human respiratory epithelium. Microsc Res Tech 1997;38:505-511.
- 28 Sato K, Kobayashi K, Aida S et al. Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema. Pflugers Arch 2004;449:106-114.
- 29 Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA et al. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;24:224-234.
- 30 Tsang KW, Leung JC, Tipoe GL et al. Down-regulation of aquaporin 3 in bronchiectatic airways in vivo. Respir Med 2003;97:59-64.
- 31 Groneberg DA, Eynott PR, Oates T et al. Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. Respir Med 2002;96:81-86.
- 32 Mercer RR, Russell ML, Roggli VL et al. Cell number and distribution in human and rat airways. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;10:613-624.
- 33 Soderberg M, Hellstrom S, Sandstrom T et al. Structural characterization of bronchial mucosal biopsies from healthy volunteers: a light and electron microscopical study. Eur Respir J 1990;3:261-266.
- 34 Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N et al. Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2001;7:4109-4114.
- 35 Forster Y, Meye A, Albrecht S et al. Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. Clin Chim Acta 2006;364:12-21.

- 36 Muller M, Albrecht S, Golfert F et al. Localization of tissue factor in actin-filament-rich membrane areas of epithelial cells. Exp Cell Res 1999;248:136-147.
- 37 Chu AJ. Tissue factor mediates inflammation. Arch Biochem Biophys 2005;440:123-132.
- 38 Luther T, Dittert DD, Kotzsch M et al. Functional implications of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium. J Pathol 2000;192:121-130.
- 39 Inayama Y, Hook GE, Brody AR et al. In vitro and in vivo growth and differentiation of clones of tracheal basal cells. Am J Pathol 1989;134:539-549.
- 40 Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED et al. Human beta-defensin-1 is a saltsensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell 1997;88:553-560.
- 41 Bals R, Wang X, Wu Z et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. J Clin Invest 1998;102:874-880.
- 42 Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. Respir Res 2004;5:6.
- 43 Liu JY, Nettesheim P, Randell SH. Growth and differentiation of tracheal epithelial progenitor cells. Am J Physiol 1994;266:296-307.
- 44 Halbert CL, Aitken ML, Miller AD. Retroviral vectors efficiently transduce basal and secretory airway epithelial cells in vitro resulting in persistent gene expression in organotypic culture. Hum Gene Ther 1996;7:1871-1881.
- 45 Randell SH, Comment CE, Ramaekers FC et al. Properties of rat tracheal epithelial cells separated based on expression of cell surface alpha-galactosyl end groups. Am J Respir Cell Mol Biol 1991;4:544-554.
- 46 Hong KU, Reynolds SD, Watkins S et al. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. Am J Pathol 2004;164:577-588.
- 47 Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A et al. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;24:671-681.
- 48 Engelhardt JF, Schlossberg H, Yankaskas JR et al. Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. Development 1995;121:2031-2046.
- 49 Shebani E, Shahana S, Janson C et al. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. Tissue Cell 2005;37:145-152.
- 50 Park KS, Wells JM, Zorn AM et al. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34:151-157.
- 51 Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Dev Genet 1996;18:173-179.
- 52 Bickenbach JR, Vormwald-Dogan V, Bachor C et al. Telomerase is not an epidermal stem cell marker and is downregulated by calcium. J Invest Dermatol 1998;111:1045-1052.
- 53 Ramirez RD, Wright WE, Shay JW et al. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. J Invest Dermatol 1997;108:113-117.

- 54 Piao CQ, Liu L, Zhao YL et al. Immortalization of human small airway epithelial cells by ectopic expression of telomerase. Carcinogenesis 2005;26:725-731.
- 55 Ulaner GA, Giudice LC. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. Mol Hum Reprod 1997;3:769-773.
- 56 Kong XY, An J, Tao SH et al. [Expression of telomerase reverse transcriptase and its significance in human fetal lung development]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 2004;24:566-568.
- 57 Yashima K, Litzky LA, Kaiser L et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. Cancer Res 1997;57:2373-2377.
- 58 Umemoto T, Yamato M, Nishida K et al. Limbal Epithelial Side-Population Cells Have Stem Cell-Like Properties, Including Quiescent State. Stem Cells 2006;24:86-94.
- 59 Sarin KY, Cheung P, Gilison D et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. Nature 2005;436:1048-1052.
- 60 Marshall CT, Guo Z, Lu C et al. Human adult olfactory neuroepithelial derived progenitors retain telomerase activity and lack apoptotic activity. Brain Res 2005;1045:45-56.
- 61 Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV et al. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. Mol Vis 2005;11:816-824.
- 62 Harle-Bachor C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis inhuman skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:6476-6481.

	Air-liquid interface cultures (%)			Xenografts (%)		
	CK13+ cells	MUC5AC+ cells	β-tubulin+ cells	CK13+ cells	MUC5AC+ cells	β-tubulin+ cells
Non-sorted control regenerated epithelia	32.3±0.4	0.8±0.2	53.2±8.7	27.5±2.5	8.9±4.3	39.2±4.9
CD151+ / TF+ regenerated epithelia	32.2±1.9	0.8±0.2	55±2.4	26.2±2.8	9.6±1.2	40.5±5.9
<i>p</i> value (n=3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

+ = positive, ns = non-significant.

#### Table 1

Percentage of the different cell populations (cell type/total cells) using the differentiation markers CK13 (basal cells), MUC5AC (secretory cells) and  $\beta$ -tubulin (ciliated cells) after complete epithelial regeneration from CD151+/TF+ cells and non-sorted control cells in airliquid interface cultures and xenografts.



CD151 and TF localization on human nasal epithelia. Sections were dual-stained with anti-CD151 and anti-CK13 (B-D), anti-TF and anti-CK13 (F-H) or anti-CD151 and anti-TF (J-L) antibodies. Staining of CD151 and TF was specific for basal cells (B, F, J, K, L) and co-localized with CK13 as shown in D and H. DNA was visualized with DAPI (A, E, I). Lu=lumen, m=mesenchyme. Bars= $25\mu m$ .



Identification of the basal cell population by FACS. The whole population of epithelial cells (A) was exposed to the anti-CK13 antibody, and then to the FITC secondary antibody. Staining was bright when cells were gated on R1 (C, basal cell population), but negative when they were gated on R2 (E, columnar cell population). B and D show the same isotype control adjusted either on R1 or on R2 gate.



Sorting of human airway epithelial cells. A: The whole population (a) was double-stained with anti-CD151-PE and anti-TF-FITC antibodies. Viable CD151+/TF+ basal cells (d) and CD151-/TF- columnar cells (e) were derived from P1 and P2 respectively (a), and sorted using the sorter's yield and purity options. (b,c): FITC and PE isotypes adjusted on both P1 (b) and P2 (c) gates. B: Purity analyses of sorted CD151+/TF+ cells (a, b) and CD151-/TF- cells (c, d).



Histology of 2D cultures and reconstituted epithelia from sorted CD151+/TF+ positive basal cells. A-C: control 2D cultures, air-liquid interface cultures and xenografts respectively. D-F: CD151+/TF+ basal cells adhered and proliferated on plastic (D) and reconstituted a fully-differentiated epithelium in air-liquid interface cultures (E) and in xenografts (F). G-I: CD151-/TF- columnar cells neither adhered (G) nor reconstituted airway epithelia in air-liquid interface cultures (I). ac=apical compartment, bc=basal compartment, Lu=lumen, m=mesenchyme. Original magnification=x400 for A, D, G. Bars=25 $\mu$ m.



Characterization of regenerated epithelia from CD151+/TF+ basal cells in air-liquid interface cultures and xenografts. Epithelial differentiation markers CK13 (A-D), CK18 (E-H), MUC5AC (I-L),  $\beta$ -tubulin (M-P), ZO-1 (Q-T) and CFTR (U-X) were expressed similarly on CD151+/TF+ and control regenerated epithelia. A'-D': CD151 (red) and TF (green) were co-localized (yellow) on basal cells in CD151+/TF+ and control regenerated epithelia. ac=apical compartment, bc=basal compartment, Lu=lumen, m=mesenchyme. Bars=25µm.



Effect of airway epithelial cell secretions collected from air-liquid interface welldifferentiated cultures on *S. aureus* growth. Sterile PBS was used as control of bacterial growth and referenced as 100%.  $0.32\pm0.2\%$  and  $0.26\pm0.2\%$  of incubated bacteria survived after their exposal to secretions of regenerated epithelia from non-sorted cells (NSC) and sorted CD151+/TF+ cells (SC) respectively. No statistical difference was found between antibacterial activities of both types of secretions.



Telomerase activity in sorted CD151+/TF+ and CD151-/TF- cells. 800ng of CD151+/TF+ and CD151-/TF- cell extracts were added to the reaction tubes. Telomerase activity, which corresponds to the telomere ladder located above the primer dimers, was positive in CD151+/TF+ basal cells, but negative in CD151-/TF- columnar cells. Internal controls correspond to the TSNT fragment amplification added to all tubes. No protein extracts were added to the negative controls without (-) or with (+) Taq polymerase. 200ng of A549 protein extract were added to positive control tubes.

La mucoviscidose (CF) est caractérisée, par une infection et une inflammation qui sont associées à un remodelage et à des lésions de l'épithélium respiratoire de surface. Cependant, l'association de ces remaniements à l'infection ou à un processus anormal de régénération après lésion épithéliale reste mal définie. De plus, la réparation des lésions de l'épithélium de surface humain nécessite l'implication des cellules souches/progénitrices qui ne sont actuellement pas identifiées.

Nos résultats montrent en utilisant le modèle de xénogreffe dans la souris nude, que la régénération de l'épithélium respiratoire CF, en dehors de toute infection bactérienne, est retardée et caractérisée par une hyperprolifération cellulaire, ainsi qu'un déséquilibre de certains médiateurs protéiques. De plus, des anomalies morphologiques sont observées au niveau de l'épithélium CF différencié.

Afin d'identifier les cellules épithéliales respiratoires responsables de la régénération et de la réparation des lésions survenant au cours de la CF, nous avons identifié deux marqueurs des cellules basales, le CD151 et le facteur tissulaire, avec lesquels nous avons isolé ces cellules par cytométrie en flux. Comme le confirme leur activité de la télomérase, nous montrons que les cellules basales humaines adultes sont des progéniteurs capables de générer un épithélium différencié mucociliaire *in vitro* et *in vivo*.

Notre travail constitue un premier pas dans la compréhension des anomalies survenant au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire CF, ainsi que dans l'identification des cellules souches de l'épithélium respiratoire humain adulte.

**Mots clés :** Mucoviscidose, Régénération, Epithélium respiratoire, Cellules progénitrices, Xénogreffe trachéale, Cytométrie en flux.

Cystic Fibrosis (CF) is the most frequent genetic disease among Caucasians characterized by airway epithelial injury and remodelling. It is still debated whether this remodelling is related to the CF-associated infection and/or inflammation or due to an abnormal regeneration process after injury. Moreover, the repair process requires the involvement of stem or progenitor cells that are still not clearly identified yet.

Using a humanized xenograft mouse model, our results show for the first time that, in the absence of bacterial infection, the regeneration of the human CF airway epithelium is delayed and characterized by a cell hyperproliferation as well as by a dysregulation of several mediators, such as IL-8, MMP-7, MMP-9 and TIMP-1. In addition, the regenerated and differentiated CF epithelium is morphologically abnormal with regards to the normal one.

On the other hand, in order to identify the airway cell population responsible for repairing of lesions that occur in the CF airway surface epithelium, we identified two specific-basal cell markers, tissue factor and tetraspanin CD151, with which we isolated these cells by flow cytometry. As confirmed by their telomerase activity, we show that human adult basal cells are progenitors capable of restoring a fully-differentiated mucociliary airway surface epithelium *in vitro* and *in vivo*.

Our study constitutes an advance in the comprehension of abnormalities occurring during human CF airway regeneration, as well as in the identification of airway epithelial stem cells.

**Key Words:** Cystic fibrosis, Airway epithelium, Progenitor cells, Tracheal xenografts, Flow cytometry.