

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

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Biologie Cellulaire

Présenté par

Pierre Lesimple

**Rôle des Peptides Trifoliés et des Mucines dans la
Régénération et la Différenciation de l'Epithélium
Respiratoire Humain**

Travail réalisé sous la direction du Docteur **Edith Puchelle**

Thèse soutenue publiquement le **14 Novembre 2006**, devant un jury composé de:

| | | |
|-----|---|---------------------------------|
| Mme | le Docteur Isabelle van Seuning (Lille) | Rapporteur |
| M. | le Docteur Frédéric Tournier (Paris) | Rapporteur |
| Mme | le Professeur Dominique Gaillard (Reims) | Examineur |
| Mme | le Docteur Christelle Coraux (Reims) | Examineur |
| M. | le Docteur Xavier Leroy (Lille) | Examineur |
| Mme | le Docteur Edith Puchelle (Reims) | Directeur de Thèse, examinateur |

Sommaire

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES..... | 7 |
| Tableaux..... | 7 |
| Figures..... | 7 |
| LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES..... | 11 |
| PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A L'ETUDE..... | 15 |
| A Présentation de l'étude..... | 20 |
| B Introduction..... | 22 |
| <i>B.I Rappels généraux.....</i> | <i>22</i> |
| <i>B.II Structure et fonctions de l'épithélium des voies aériennes supérieures et de l'arbre trachéobronchique humain.....</i> | <i>23</i> |
| B.II.1 L'épithélium respiratoire de surface..... | 24 |
| B.II.1.1 Histologie des voies respiratoires..... | 25 |
| B.II.1.2 Les différents types cellulaires de l'épithélium des voies aériennes de conduction..... | 26 |
| <i>Les cellules basales.....</i> | <i>26</i> |
| <i>Les cellules ciliées.....</i> | <i>26</i> |
| <i>Les cellules sécrétoires.....</i> | <i>27</i> |
| <i>Les cellules neuro-endocrines.....</i> | <i>28</i> |
| <i>Les autres types cellulaires.....</i> | <i>29</i> |
| B.II.1.3 Polarité et jonctionnalité de l'épithélium de surface..... | 29 |
| <i>Les jonctions serrées.....</i> | <i>30</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Les jonctions intermédiaires.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Les desmosomes.....</i> | <i>31</i> |
| <i>Les jonctions communicantes.....</i> | <i>31</i> |
| <i>Les hémidesmosomes.....</i> | <i>32</i> |
| B.II.2 La sous-muqueuse..... | 33 |
| B.II.2.1 Les cellules glandulaires séreuses..... | 33 |
| B.II.2.2 Les cellules glandulaires muqueuses..... | 33 |
| B.II.2.3 Les cellules du canal collecteur..... | 34 |
| B.II.2.4 Les cellules myoépithéliales..... | 34 |
| B.II.3 Les fonctions de défense de l'épithélium respiratoire adulte..... | 35 |
| B.II.3.1 Rôle de barrière physique..... | 35 |
| B.II.3.2 Défense antibactérienne innée..... | 35 |
| <i>Immunité innée de l'épithélium.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Défense par le système immunitaire inné.....</i> | <i>36</i> |
| B.II.3.3 Mucus et clairance mucociliaire..... | 37 |
| <i>Le battement ciliaire.....</i> | <i>38</i> |
| <i>Structure et composition du mucus.....</i> | <i>39</i> |
| Structure du mucus..... | 39 |
| L'équilibre ionique..... | 40 |
| <i>Force ionique et hydratation.....</i> | <i>40</i> |
| <i>L'équilibre du pH.....</i> | <i>42</i> |
| Les facteurs de défense..... | 43 |
| Les mucines..... | 43 |
| <i>Les mucines membranaires.....</i> | <i>44</i> |
| <i>Les mucines sécrétoires.....</i> | <i>45</i> |
| <i>Régulation de l'expression des mucines en physiopathologie respiratoire humaine.....</i> | <i>47</i> |
| Les peptides trifoliés..... | 52 |
| Structure..... | 52 |
| Expression et fonctions..... | 53 |
| Les autres composants du mucus..... | 56 |
| B.III Différenciation de l'épithélium respiratoire humain..... | 57 |

| | |
|--|-----------|
| B.III.1 Différenciation sécrétoire..... | 58 |
| B.III.2 Différenciation ciliée..... | 60 |
| <i>B.IV Lésion et réparation de l'épithélium respiratoire.....</i> | <i>63</i> |
| B.IV.1 Principales causes des lésions de l'épithélium respiratoire..... | 63 |
| B.IV.1.1 L'inhalation de xénobiotiques..... | 63 |
| B.IV.1.2 Les agents infectieux..... | 64 |
| B.IV.1.3 L'inflammation..... | 65 |
| B.IV.1.4 L'abrasion..... | 65 |
| B.IV.1.5 Aggravation par les défauts génétiques..... | 65 |
| B.IV.2 Modèles de restauration d'un épithélium de surface fonctionnel..... | 67 |
| B.IV.2.1 Les modèles in vivo..... | 67 |
| B.IV.2.2 Les modèles ex vivo..... | 68 |
| B.IV.2.3 Les modèles in vitro..... | 69 |
| B.IV.3 Mécanismes impliqués dans la réparation des lésions..... | 70 |
| B.IV.3.1 Détection de la lésion..... | 70 |
| B.IV.3.2 Migration..... | 71 |
| B.IV.3.3 Prolifération..... | 71 |
| B.IV.3.4 Différenciation..... | 71 |
| C Description de l'étude..... | 73 |
| D Matériel et méthodes..... | 75 |
| <i>D.I Obtention des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain.....</i> | <i>75</i> |
| <i>D.II Modèle de régénération in vivo: la xénogreffe bronchique humanisée en souris nude.....</i> | <i>76</i> |
| <i>D.III Modèle de régénération in vitro: la culture cellulaire à</i> | |

| | |
|--|-----------|
| <i>l'interface air / liquide.....</i> | <i>78</i> |
| <i>D.IV Western Blot.....</i> | <i>81</i> |
| <i>D.V Immunohistochimie et immunohistofluorescence.....</i> | <i>83</i> |
| <i>D.VI Analyse transcriptionnelle.....</i> | <i>86</i> |
| <i>D.VII Tests de migration cellulaire.....</i> | <i>90</i> |
| <i>D.VIII Tests de digestion enzymatique.....</i> | <i>90</i> |
| <i>D.IX Test de croissance bactérienne.....</i> | <i>91</i> |
| <i>D.X Résistance trans-épithéliale.....</i> | <i>92</i> |
| <i>D.XI Fréquence de battement ciliaire.....</i> | <i>92</i> |
| <i>D.XII Microscopie électronique à transmission.....</i> | <i>93</i> |
| <i>D.XIII Analyse d'image.....</i> | <i>93</i> |
| <i>D.XIV Analyse statistique.....</i> | <i>93</i> |

E Résultats.....95

| | |
|--|------------|
| <i>E.I Caractérisation du peptide TFF3 recombinant et sensibilité à la digestion par les protéases du polynucléaire neutrophile.....</i> | <i>95</i> |
| <i>E.II Le peptide recombinant humain TFF3 n'inhibe pas la croissance de S. aureus.....</i> | <i>97</i> |
| <i>E.III Le peptide recombinant humain TFF3 induit la migration des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain.....</i> | <i>98</i> |
| <i>E.IV Localisation des peptides trifoliés et des mucines dans l'épithélium respiratoire de surface humain.....</i> | <i>99</i> |
| <i>E.V Caractérisation des modèles de régénération et de différenciation.....</i> | <i>100</i> |

E.V.1 Régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans le modèle de xénogreffe bronchique humanisée.....100

| | |
|---|------------|
| <i>E.V.1.1 Stade 1: étalement, migration.....</i> | <i>100</i> |
|---|------------|

| | |
|---|------------|
| E.V.1.2 Stade 2: prolifération, stratification..... | 101 |
| E.V.1.3 Stade 3: différenciation mucociliaire..... | 102 |
| E.V.2 Régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide..... | 104 |
| E.V.2.1 Stade 1: étalement, migration..... | 104 |
| E.V.2.2 Stade 2: prolifération, stratification..... | 104 |
| E.V.2.3 Stade 3: différenciation mucociliaire..... | 105 |
| E.V.3 Expression des peptides trifoliés au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain . | 106 |
| E.V.4 Expression des mucines au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain . | 109 |
| E.V.4.1 Expression des mucines membranaires MUC1 et MUC4..... | 109 |
| E.V.4.2 Expression des mucines sécrétées MUC5AC et MUC5B..... | 111 |
| E.V.5 MUC5B est partiellement co-localisée avec le peptide TFF3..... | 114 |
| <i>E.VI Effet du peptide TFF3 recombinant dans le modèle de culture à l'interface air / liquide.....</i> | <i>116</i> |

| | |
|---|------------|
| E.VI.1 Quantification des cellules ciliées, basales et sécrétoires..... | 116 |
| E.VI.2 Observation des marqueurs ultrastructuraux de la ciliogenèse..... | 119 |
| E.VI.3 Paramètres fonctionnels: battement ciliaire, perméabilité..... | 120 |
| E.VI.4 Effet de l'inhibition du récepteur de l'EGF.... | 121 |
| F Discussion: implications des mucines et des TFF dans la physiologie et les pathologies de l'épithélium respiratoire..... | 123 |
| G Conclusions générales et perspectives.... | 132 |
| Références bibliographiques..... | 136 |
| H Article..... | 165 |

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Introduction:

Tableau 1: Fonctions des peptides trifoliés

Matériel et méthodes:

Tableau 2: Conditions de RT-PCR utilisées pour la détection des peptides trifoliés

Figures

Introduction:

Figure 1: L'appareil respiratoire humain

Figure 2: Différents types cellulaires au sein de l'arbre respiratoire humain

Figure 3: Histologie des voies aériennes de conduction

Figure 4: Structure des cils vibratiles de l'épithélium respiratoire

Figure 5: Battement ciliaire

Figure 6: Disposition des différents types de jonctions dans les cellules épithéliales

Figure 7: Structure des glandes de la sous-muqueuse des voies respiratoires

Figure 8: Structure des apomucines humaines

Figure 9: Rôles physiologiques des mucines membranaires et sécrétoires

Figure 10: Rôles de récepteurs ou de co-récepteurs des mucines membranaires

Figure 11: Structure du peptide TFF3

Figure 12: Rôles des TFF dans les épithéliums muqueux

Figure 13: Voies de signalisation empruntées par les TFF

Figure 14: Ciliogenèse

Figure 15: Rôle de FOXJ1 dans la ciliogenèse

Figure 16: Modèles d'étude *ex vivo*

Figure 17: Culture de cellules à l'interface air / liquide

Figure 18: Régénération de l'épithélium respiratoire

Matériel et méthodes:

Figure 19: Modèle de régénération en xéno greffe bronchique humanisée

Figure 20: Modèle de régénération en culture à l'interface air / liquide

Résultats:

Figure 21: Caractérisation du peptide TFF3 et digestion par les protéases du neutrophile

Figure 22: Effet de TFF3 sur la croissance de *Staphylococcus aureus*

Figure 23: Effet de TFF3 sur la migration des cellules de l'épithélium respiratoire humain

Figure 24: Localisation des mucines et des peptides trifoliés dans l'épithélium

respiratoire humain *in vivo*

Figure 25: Régénération dans le modèle de xéno greffe: stade 1 (jour 5)

Figure 26: Régénération dans le modèle de xéno greffe: stade 2 (jour 15)

Figure 27: Régénération dans le modèle de xéno greffe: stade 3 (jour 35)

Figure 28: Régénération de l'épithélium respiratoire humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide

Figure 29: Expression des peptides trifoliés en xéno greffe et en culture à l'interface air / liquide

Figure 30: Localisation et sécrétion du peptide TFF3 au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

Figure 31: Expression de MUC1 et de MUC4 au cours de la régénération de l'épithélium en xéno greffe

Figure 32: Transcription de MUC5AC et MUC5B au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

Figure 33: Localisation de MUC5AC et MUC5B au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

Figure 34: Sécrétion de MUC5AC et MUC5B au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

Figure 35: Co-localisation partielle de TFF3 et de MUC5B

Figure 36: Effet de TFF3 sur la différenciation des cellules ciliées au jour 15 en culture à l'interface air / liquide

Figure 37: Effet de TF3 sur la ciliogenèse au jour 15

Figure 38: Effets de TFF3 sur la fonctionnalité de l'épithélium au jour 15 en culture à l'interface air / liquide

Figure 39: Effet de l'inhibition de l'EGF-R sur l'action du peptide TFF3

Conclusions générales et perspectives:

Figure 40: Rôle de TFF3 et des mucines sécrétoires dans la régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

| | |
|-------------|---|
| °C | Degré Celsius |
| β-CAT | Caténine β |
| β-tub | Tubuline β |
| γ-tub | Tubuline γ |
| μg | Microgramme |
| μM | Micromole par litre |
| μm | Micromètre |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AE | Anion exchanger |
| APC | Adenomatous polyposis coli |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATP | Adénosine tri-phosphate |
| BAD | Bcl2 antagonist of cell death |
| BEBM | Bronchial epithelial cell basal medium |
| BPCO | Bronchopneumopathie chronique obstructive |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CaCC | Calcium sensitive chloride channel |
| CASP | Caspase |
| CFTR | Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| CG | Cathepsine G |
| CGRP | Calcitonin gene-related peptide |
| CK | Cytokératine |
| CREB | c-AMPresponse element binding protein |
| CYT-c | Cytochrome C |
| DAF | Decay accelerating factor |
| DAPI | 4',6'-diamino-2-phenylindole |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle's medium |
| dNTP | Désoxynucléotide triphosphate |
| D.O. | Densité optique |
| Cadhérine E | Cadhérine épithéliale |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |

| | |
|-------|--|
| EGF | Epidermal growth factor |
| EGF-R | Epidermal growth factor receptor |
| ENaC | Epithelial sodium channel |
| EN | Elastase du neutrophile |
| ERK | Extracellular signal regulated kinase |
| FAK | Focal adhesion kinase |
| Fox | Forkhead box protein |
| FOX | Forkhead box protein |
| g | Gramme |
| GAPDH | Glyceraldehyde phosphate deshydrogenase |
| GRP | Gastrin releasing peptide |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HER | Human EGF Receptor family |
| Hz | Hertz |
| I-TAC | IFN-inducible T cell alpha chemoattractant |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| IFN | Interféron |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | Interleukine |
| IP-10 | IFN-inducible protein of 10 dDa |
| J | Jour |
| JAM | Junctional adhesion molecule |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| kV | Kilovolt |
| L | Litre |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M | Molaire (mol/L) |
| mA | Milliampère |
| MAP | Mitogene-activated protein |
| MCP | Macrophage chemoattractant protein |
| MEK | MAP kinase / ERK kinase |
| MIG | Monokine induced by γ -interferon |
| mg | Milligramme |
| min | Minute |
| MIP | Macrophage inflammatory protein |
| mL | Millilitre |

| | |
|----------|--|
| MM | Masse moléculaire |
| mM | Millimole par litre |
| mm | Millimètre |
| MSK | Mitogen- and stress-activated kinase |
| MUC | Mucine |
| NF | Nuclear factor |
| ng | Nanogramme |
| nM | Nanomole par litre |
| nm | Nanomètre |
| OCT | Optimum cutting temperature compound |
| P3 | Protéinase 3 |
| <i>p</i> | Probabilité d'erreur |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| pH | Potentiel hydrogène |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| PKB | Protein kinase B |
| PLA2 | Phospholipase A2 |
| pp90rsk | 90-kDa ribosomal S6 kinase |
| Ras | Raspberry |
| Rho | Rhomboid |
| rpm | Rotations par minute |
| RT | Reverse transcription |
| RT-PCR | Reverse transcription- polymerase chain reaction |
| s | Seconde |
| S | Svedberg |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SEA | Sea urchin sperm protein – enterokinase - agrin |
| SLPI | Secretory leucoprotease inhibitor |
| SP | Surfactant protein |
| Smad | Sma / MAD related protein |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| SVF | Sérum de veau fœtal |
| Taq | Thermophilus aquaticus DNA polymérase |
| TFF | Trefoil factor family peptide |
| TGF | Transforming growth factor |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF | Tumor necrosis factor |

| | |
|-----|-----------------------------------|
| TSB | Trypticase soy broth |
| U | Unité |
| VIP | Vasoactive intestinal polypeptide |
| ZO | Zonula occludens |

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A L'ETUDE

Publications dans des revues à comité de lecture:

Pierre Lesimple, Marie-Pierre Buisine, Isabelle van Seuningen, Marie-Christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffmann, Rodolphe Hajj, Christelle Coraux et Edith Puchelle.

Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2006 (sous presse)

Rodolphe Hajj, Thomas Baranek, Richard Le Naour, Pierre Lesimple, Edith Puchelle et Christelle Coraux.

Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. Stem Cells 2006 (sous presse)

Rodolphe Hajj, Pierre Lesimple, Véronique Laplace, Edith Puchelle et Christelle Coraux. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis

J. Pathol. 2006 (sous presse)

Edith Puchelle, Pierre Lesimple, Rodolphe Hajj et Christelle Coraux.

Régénération de l'Epithélium Respiratoire Lésé.

Ann Pharm Fr. 2006 Feb;64(2):107-13

Christelle Coraux, Rodolphe Hajj, Pierre Lesimple et Edith Puchelle.

In Vivo Models of Human Airway Epithelium Repair and Regeneration.

Eu. Respir. Rev.,2005 Dec;14:131-136

Christelle Coraux, Rodolphe Hajj, Pierre Lesimple et Edith Puchelle

Réparation et Régénération de l'Epithelium Respiratoire.

Med Sci (Paris). 2005 Dec;21(12):1063-1069

Communications orales:

**P. Lesimple, Marie-Pierre Buisine, Isabelle van Seuningen, Marie-Christine Copin,
Margitta Hinz, Werner Hoffmann, Rodolphe Hajj, Christelle Coraux et Edith
Puchelle.**

The Trefoil Factor TFF3 Promotes Human Airway Epithelial Ciliary Differentiation.

102^{ème} *American Thoracic Society International Conference*, San Diego, Californie, USA, 19-24 Mai 2006

Pierre Lesimple, Christelle Coraux, Corinne Catusse, Marie-Pierre Buisine, Marie-Christine Copin, Isabelle van Seuningen, Nicole Porchet et Edith Puchelle.

Le Peptide Trifolié TFF3 Favorise la Différenciation Ciliée de l'Epithelium Respiratoire Humain.

Prix Boehringer aux *Journée Jeunes Chercheurs*, Reims, France, 26 Octobre 2005

Pierre Lesimple, Christelle Coraux, Xavier Leroy, Corinne Martinella-Catusse, Marie-Pierre Buisine, Andrew S. Giraud, Daniel K. Podolsky, Marie-Christine Copin, Nicole Porchet, Jean-Pierre Aubert and Edith Puchelle

Expression of Mucins and Trefoil Factors (TFFs) During Airway Epithelial Regeneration

Quatrième *International Conference on Trefoil Factors*, Illkich, France, 2-4 Décembre 2004

Communications par affiche:

Pierre Lesimple, Isabelle van Seuningen, Marie-Pierre Buisine, Marie-Christine

Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffmann, Rodolphe Hajj, Christelle Coraux et Edith Puchelle. TFF3 (Trefoil factor family 3) Promotes Human Airway Epithelial Ciliary Differentiation.

2006 North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, Colorado, USA, 2-5 Novembre 2006

Pierre Lesimple, Isabelle van Seuningen, Marie-Pierre Buisine, Marie-Christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffmann, Rodolphe Hajj, Steven L Brody, Christelle Coraux et Edith Puchelle,

Le Peptide Trifolié TFF3 Favorise la Différenciation Ciliée de l'Epithélium Respiratoire de Surface Humain.

Deuxièmes Journées de la Recherche Respiratoire, Tours, France, 13 et 14 Octobre 2006.

Pierre Lesimple Marie-Pierre, Buisine, Isabelle van Seuningen, Marie-Christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffmann, Rodolphe Hajj, Christelle Coraux et Edith Puchelle

Le Peptide Trifolié TFF3 Favorise la Ciliogenèse au Cours de la Régénération de l'Epithélium Respiratoire Humain.

Journées Jeunes Chercheurs Contre la Mucoviscidose, Nogent sur Marne, France, 6 et 7 Avril 2006

Pierre Lesimple, Christelle Coraux, Corinne Martinella-Catusse, Marie-Pierre Buisine, Marie-Christine Copin, Nicole Porchet et Edith Puchelle. Expression

Différentielle des Mucines et des Peptides Trifoliés (TFF) Durant la Régénération de l'Epithélium Respiratoire Humain

Journées de la Recherche Respiratoire, Reims, France, 14 et 15 Octobre 2005

Pierre Lesimple, Christelle Coraux, Xavier Leroy, Corinne Martinella-Catusse, Marie-Pierre Buisine, Andrew S. Giraud, Daniel K. Podolsky, Marie-Christine Copin, Nicole Porchet, Jean-Pierre Aubert et Edith Puchelle.

Expression des Mucines et des Peptides Trifoliés (TFF) au Cours de la Différenciation de l'Epithélium Respiratoire Humain Différencié.

Congrès des Jeunes Chercheurs de l'IFR 53, Reims, 28 Juin 2004

Présentation de l'étude

A Présentation de l'étude

L'épithélium respiratoire représente chez l'Homme la plus grande surface de contact avec l'environnement extérieur. Les mouvements respiratoires y font circuler chaque jour plus de cinq mille litres d'air, dans lequel on retrouve de nombreuses particules inorganique nocives et de nombreux contaminants viraux ou bactériens. Afin de protéger les parties distales de l'appareil respiratoire, qui sont responsables des échanges gazeux respiratoires, les contaminants inhalés sont piégés et éliminés au niveau des voies aériennes de conduction. L'épithélium de surface des voies aériennes est donc très fréquemment agressé et lésé, et sa régénération rapide est essentielle afin d'éviter que les contaminants inhalés ne puissent pénétrer à l'intérieur de l'organisme.

Du fait de la difficulté d'obtenir du matériel biologique d'origine humaine, les facteurs contrôlant la régénération complète de l'épithélium respiratoire de surface humain ont été relativement peu étudiés et restent mal connus.

Les travaux présentés ici visent à mieux comprendre l'implication des mucines et des peptides trifoliés dans les mécanismes de régénération et de différenciation de l'épithélium respiratoire humain.

Dans une introduction générale, nous rappellerons les aspects majeurs de la physiologie des voies aériennes et de l'épithélium respiratoire de surface humain. Nous décrirons également les caractéristiques principales et les rôles connus des mucines et des peptides trifoliés dans différents processus biologiques.

Les résultats seront organisés suivant le cheminement logique qui nous a amené à proposer un modèle décrivant les implications des facteurs étudiés dans la régénération de l'épithélium

respiratoire humain: nous décrirons tout d'abord les résultats obtenus *in vitro*, puis nous exposerons les données obtenues dans deux modèles de régénération de l'épithélium respiratoire. Une partie des résultats présentés dans cette partie a fait l'objet d'une publication (P. Lesimple *et al.*: Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2006, sous presse). Nous y avons ajouté de nombreux résultats qui nous semblent importants pour une vision plus complète des rôles des peptides trifoliés et des mucines dans les processus de régénération de l'épithélium respiratoire humain.

Une discussion générale nous permettra de décrire les implications des résultats obtenus dans la physiologie et les pathologies de l'épithélium respiratoire humain.

Enfin, nous résumerons les conclusions majeures de cette étude, et exposerons ses perspectives potentielles.

Introduction

B Introduction

B.1 Rappels généraux

L'appareil respiratoire est une vaste surface d'échange (80 à 100 m²) avec l'extérieur ; c'est la plus grande frontière existant entre l'homme et son environnement. L'état de l'appareil respiratoire est donc dépendante de la qualité de l'air inhalé et de ses capacités de défense. La fonction essentielle de l'appareil respiratoire est l'échange gazeux entre le milieu extérieur et le sang, l'entrée de l'oxygène et la sortie du gaz carbonique. Cette fonction est remplie au niveau des structures pulmonaires les plus profondes, les alvéoles, qui communiquent avec des canaux alvéolaires eux-mêmes connectés aux bronchioles respiratoires. Cette portion du système est appelée portion respiratoire. Une deuxième fonction, très importante, l'épuration mucociliaire, joue un rôle essentiel car elle assure la bonne qualité de l'air qui arrive dans l'alvéole pulmonaire en éliminant les aérocontaminants et les nombreux toxiques qui polluent l'air inhalé (air ambiant). Cette fonction est remplie par l'épithélium des voies aériennes de conduction, qui s'étendent des fosses nasales aux bronchioles, au sein desquelles on distingue les voies aériennes supérieures (fosses nasales, nasopharynx, pharynx et larynx) et inférieures (trachée, bronches et bronchioles).

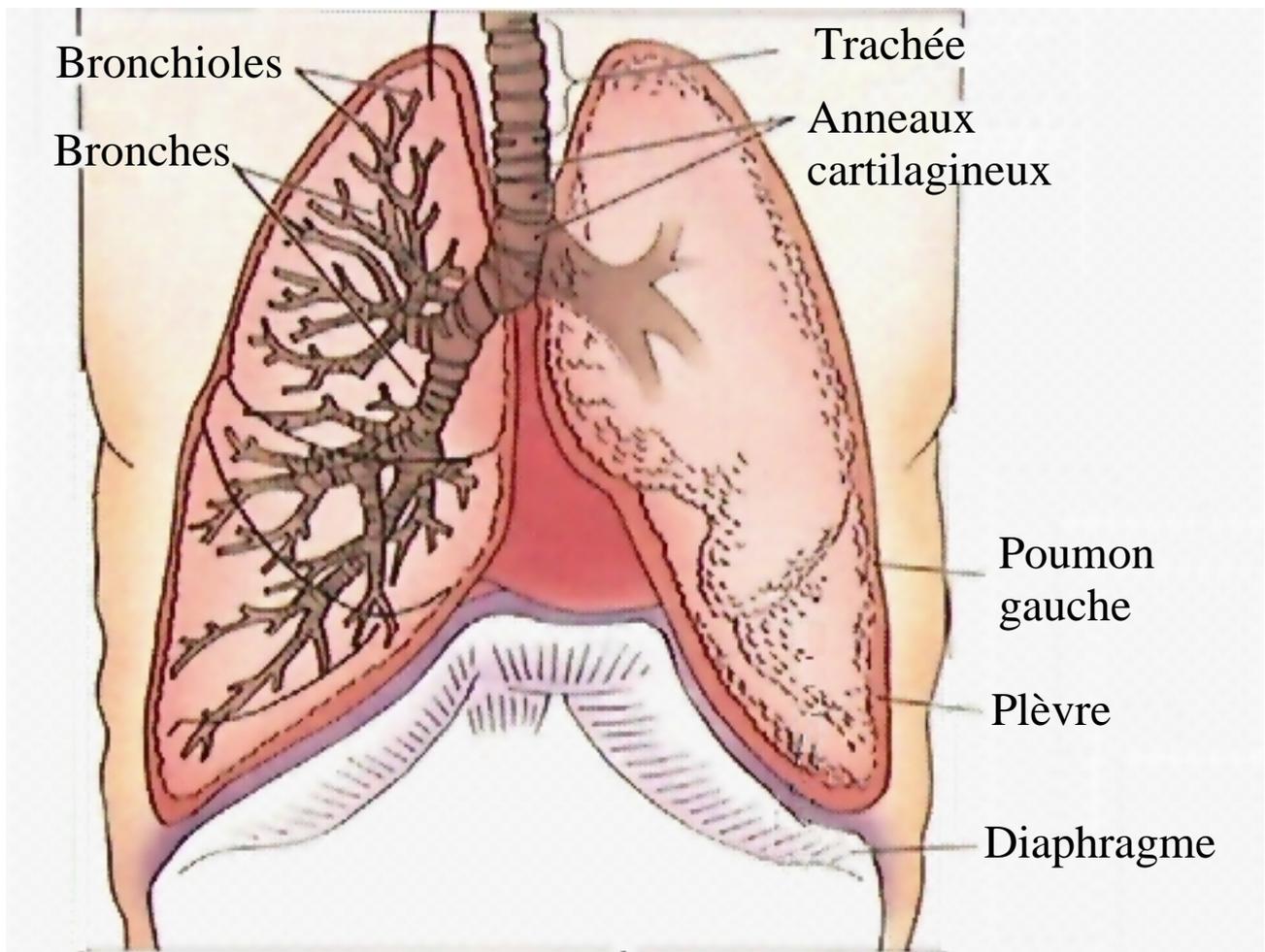


Figure 1: L'appareil respiratoire humain

B.II Structure et fonctions de l'épithélium des voies aériennes supérieures et de l'arbre trachéobronchique humain.

Les voies aériennes supérieures ainsi que l'arbre trachéobronchique permettent le passage de l'air et l'humidifient, le réchauffent, l'épurent des poussières les plus volumineuses et de nombreux germes. De plus, une partie de la muqueuse de ces territoires a des fonctions olfactives. Après les fosses nasales, le nasopharynx et le larynx, la trachée donne naissance aux bronches souches, de structure identique à la trachée, et qui pénètrent dans le poumon au niveau du hile. Celles-ci se divisent en bronches lobaires, trois à droite et deux à gauche, qui à leur tour se divisent par dichotomie inégale en bronches de plus en plus petites. Ces dernières se divisent en bronchioles intralobulaires, dont le diamètre n'excède pas quelques millimètres. La dernière partie de l'arbre bronchique, ayant pour seule fonction la conduction de l'air, est constituée des bronchioles terminales, qui mènent aux alvéoles au niveau desquelles se font les échanges gazeux (Figure 1).

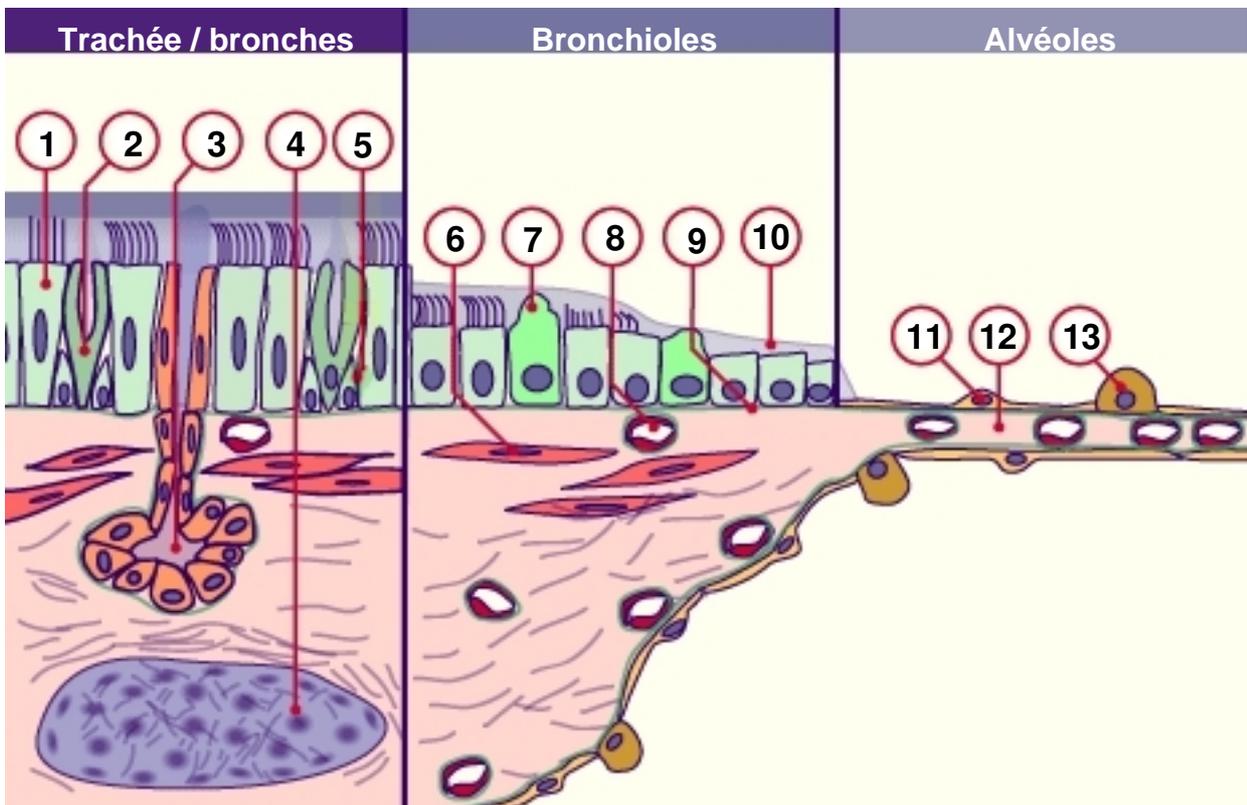
Les parois de la trachée et des bronches sont structurées en trois couches: la muqueuse, de type respiratoire, comporte un épithélium pseudostratifié avec principalement des cellules ciliées, des cellules caliciformes sécrétant du mucus, des cellules basales et des cellules neuro-endocrines; le chorion est conjonctivo-élastique, riche en glandes et en tissu lymphoïde, avec une vascularisation abondante. Cette muqueuse est soutenue par une tunique fibrocartilagineuse caractérisée par la présence de 15 à 20 anneaux incomplets en fer à cheval, les arceaux cartilagineux hyalins, dont les extrémités postérieures sont reliées par des faisceaux de fibres

musculaires lisses formant le muscle trachéal entouré de tissu conjonctif dense riche en fibres élastiques; entre les arceaux cartilagineux, la tunique moyenne est faite de tissu conjonctif fibro-élastique. Enfin, l'adventice est conjonctivo-adipeuse, riche en vaisseaux et en nerfs qui contrôlent la sécrétion glandulaire et la contraction des fibres musculaires lisses. L'épithélium respiratoire et les glandes du chorion sont en charge des principales fonctions de défense innée de l'appareil respiratoire humain, assurées par la cohésion épithéliale, la clairance mucociliaire et la sécrétion de nombreuses molécules de défense.

B.II.1 L'épithélium respiratoire de surface

A partir de la portion distale des fosses nasales et jusqu'aux bronchioles, les voies aériennes de conduction sont bordées par un épithélium pseudostratifié, chaque cellule étant ancrée à la lame basale mais toutes n'atteignant pas la lumière des voies respiratoires. Dans cette partie, l'épithélium de surface comporte principalement des cellules ciliées, des cellules sécrétoires, des cellules basales et des cellules neuroendocrines. Les cellules ciliées et les cellules caliciformes sont allongées, en contact à la fois avec la lame basale et la lumière de l'épithélium, et sont regroupées sous le vocable « cellules cylindriques ». Elles sont responsables du mécanisme de clairance mucociliaire ainsi que du maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et des caractéristiques physico-chimiques et antibactériennes du mucus tapissant la lumière. Les cellules basales et neuroendocrines sont respectivement chargées d'assurer le maintien d'une barrière épithéliale cohésive et la signalisation cellulaire.

Dans les bronchioles, l'épithélium acquiert progressivement une morphologie cuboïdale monostratifiée, les cellules caliciformes étant remplacées par des cellules de Clara. Dans les alvéoles, l'épithélium respiratoire est monostratifié, constitué de cellules très aplaties au rôle



- 1: Cellule ciliée
- 2: Cellule caliciforme
- 3: Glande
- 4: Cartilage
- 5: Cellule basale

- 6: Cellule musculaire lisse
- 7: Cellule de Clara
- 8: Capillaire sanguin
- 9: Membrane basale
- 10: Mucus

- 11: Pneumocyte de type I
- 12: Tissu conjonctif
- 13: Pneumocyte de type II

Figure 2: Différents types cellulaires au sein de l'arbre respiratoire humain

d'échange, les pneumocytes de type I, et de cellules cuboïdales ayant un rôle de défense, les pneumocytes de type II (Figure 2).

B.II.1.1 Histologie des voies respiratoires

L'épithélium de surface des voies respiratoires repose sur une membrane basale constituée essentiellement de collagène et de laminine. Sous cette membrane basale se trouve un chorion constitué de fibres élastiques, qui contient aussi de nombreuses cellules musculaires lisses dans la partie proximale. Le chorion est riche en cellules du système immunitaire, notamment des polymorphonucléaires, prêts à répondre aux infections fréquentes. On y trouve aussi de nombreuses glandes tubulo-acineuses, au sein desquelles on peut distinguer les cellules séreuses des cellules muqueuses sur la base de leurs sécrétions respectives. La tunique interne formée du chorion et de l'épithélium repose sur une tunique plus externe, formée principalement d'anneaux de cartilage hyalin en forme de fer à cheval, fermés par des fibres musculaires lisses. Dans la partie la plus proximale, les anneaux de cartilages sont complets, et la proportion de la circonférence occupée par les fibres musculaires augmente progressivement dans les parties plus distales. Ces anneaux cartilagineux qui permettent d'éviter l'effondrement des voies respiratoires de conduction sont eux-même entourés d'une adventice de tissu conjonctif lâche richement vascularisé et innervé (Figure 3).

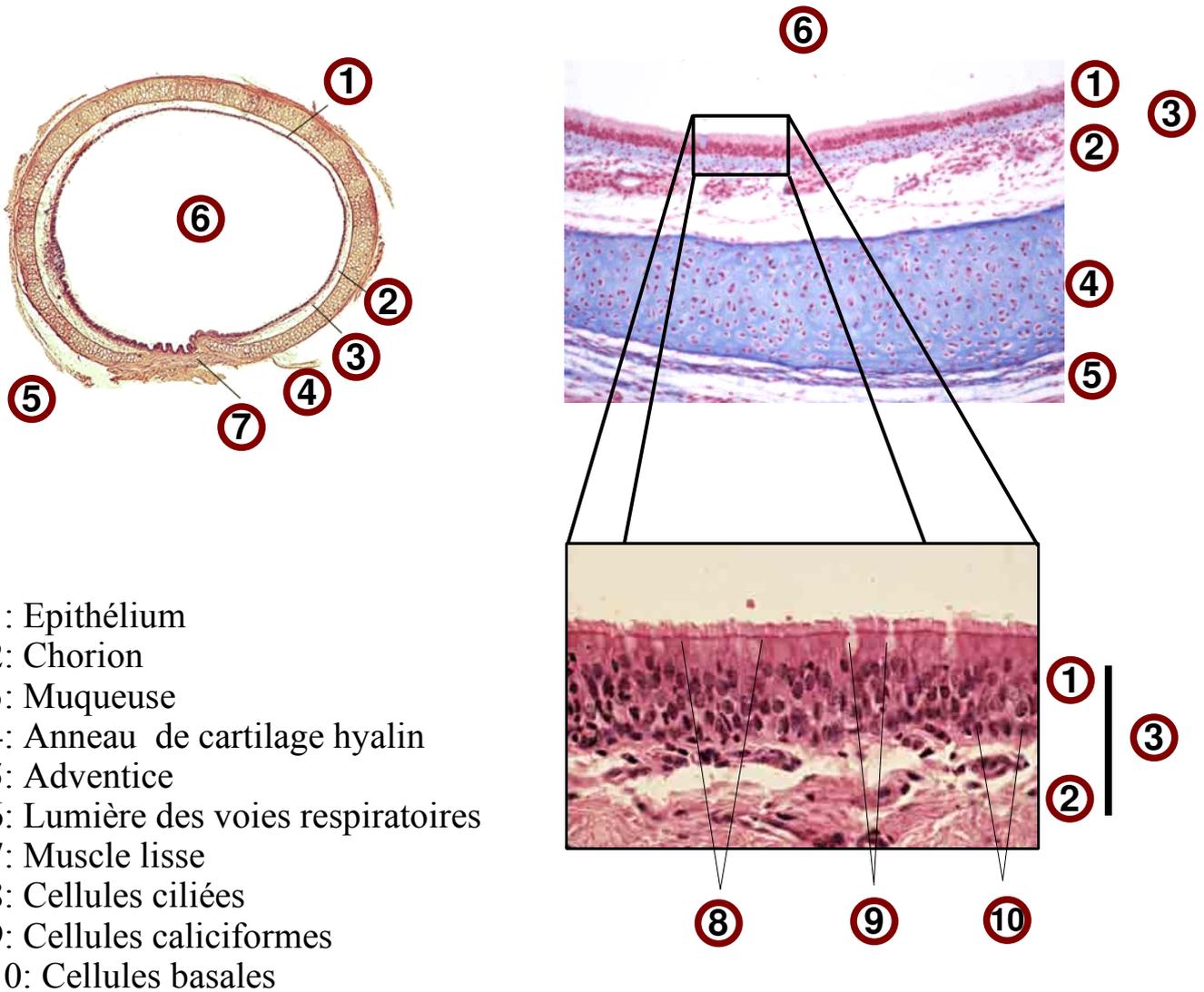


Figure 3: Histologie des voies aériennes de conduction

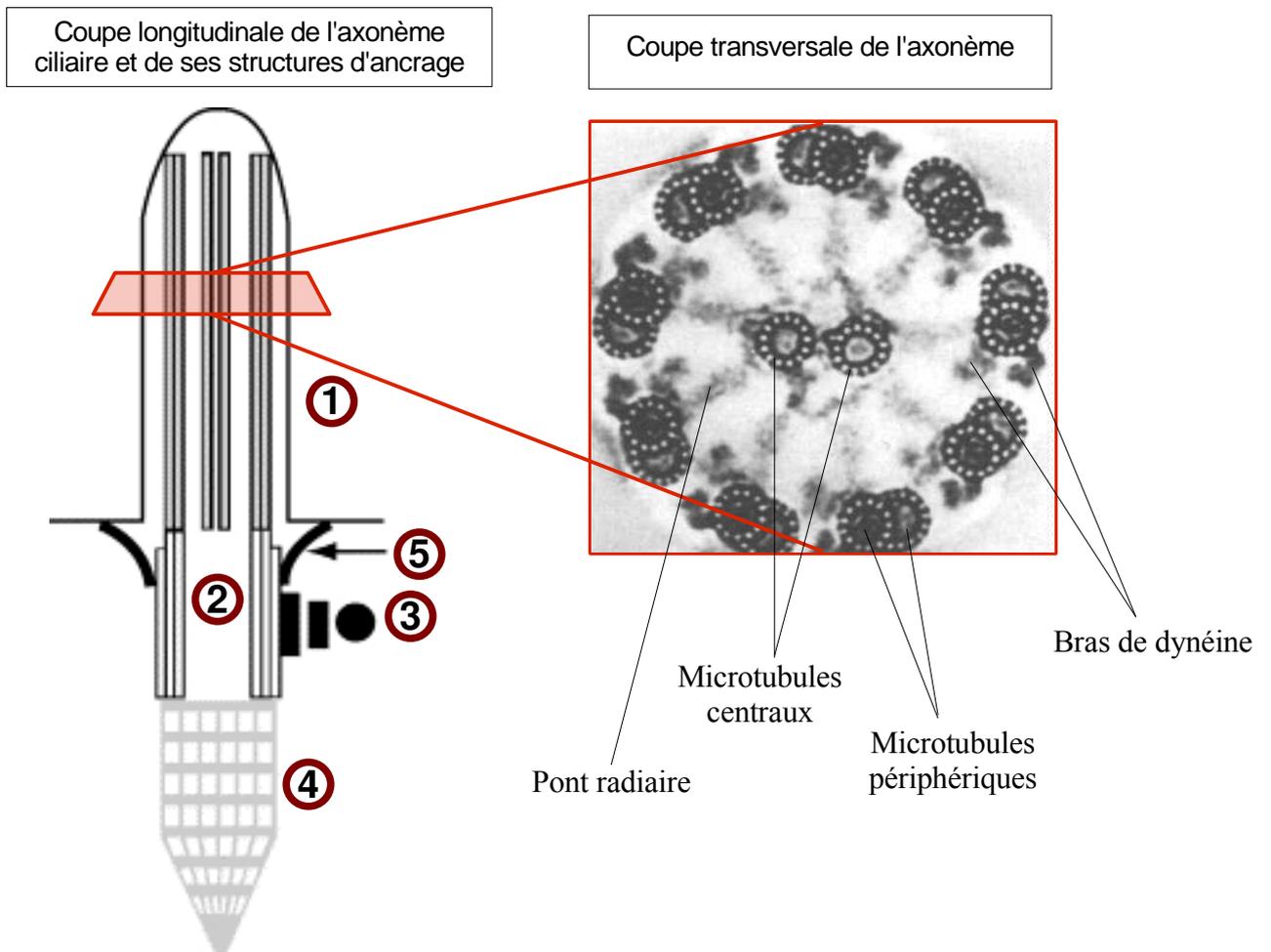
B.II.1.2 Les différents types cellulaires de l'épithélium des voies aériennes de conduction

Les cellules basales

Les cellules basales sont des petites cellules de forme arrondie ou pyramidale, de rapport nucléo-cytoplasmique élevé, ancrées à la lame basale mais sans contact avec la lumière des voies respiratoires. Ces cellules sont généralement considérées comme peu différenciées et leurs capacités de prolifération et de régénération *in vivo*, *ex vivo* dans des modèles de régénération épithéliale en trachée de rat dénudée et *in vitro* dans des modèles de culture à l'interface air / liquide en font les cellules progénitrices principales de l'épithélium respiratoire de surface (Avril-Delplanque *et al.*, 2005; Hajj *et al.*, 2006a). Dans l'épithélium intact, leurs nombreuses jonctions intercellulaires et leur ancrage fort à la lame basale par l'intermédiaire de nombreux hémidesmosomes leur permettent de garantir la cohésion épithéliale. En effet, bien qu'elles ne représentent qu'un tiers du nombre total de cellules de l'épithélium trachéal, elles occupent plus de 90% de la surface de la lame basale. Les cellules basales se raréfient dans les parties plus distales de l'appareil respiratoire, et sont complètement absentes à partir des bronchioles terminales.

Les cellules ciliées

Les cellules ciliées sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium respiratoire de surface. Leur rôle principal est d'assurer l'évacuation du mucus et des particules qui y sont piégées, grâce au battement coordonné de leurs cils apicaux. Elles sont aussi responsables du maintien des caractéristiques physico-chimiques du mucus (hydratation, pH, ...) car ce sont principalement elles qui régulent les échanges ioniques et hydriques entre la sous-muqueuse et



- 1: Cil
- 2: Corps basal
- 3: Pied basal
- 4: Racine striée
- 5: Fibres d'ancrage

Figure 4: Structure des cils vibratiles de l'épithélium respiratoire

la lumière des voies respiratoires. Les cellules ciliées sont caractérisées par la présence à leur pôle apical de cils vibratiles constitués d'un squelette de doublets de microtubules sur le schéma « 9+2 », 9 doublets disposés de façon circulaire à la périphérie du cil encadrant deux microtubules centraux. Les doublets de microtubules, encadrés de bras internes et externes de dynéine, sont ancrés dans la zone sous-membranaire grâce à des structures nommées corps basaux, qui sont eux-mêmes reliés au cytosquelette par un pied basal et une racine striée et à la membrane par des fibres d'ancrage (Figure 4). Chaque cellule ciliée porte une centaine de cils qui battent à la manière de fouets (Figure 5) grâce au glissement relatif des doublets assuré par le déplacement des bras de dynéine, dépendant de l'ATP (**Sanderson, 1997**).

Les cellules sécrétoires

Il existe dans l'épithélium de surface plusieurs types de cellules sécrétoires: dans les parties proximales, la sécrétion de mucus est assurée par les cellules caliciformes, ainsi nommées en raison de leur forme en gobelet ou calice. Ces cellules contiennent de nombreux et volumineux granules de sécrétion, qui occupent la majeure partie de l'espace intracellulaire et contiennent la plupart des constituants protéiques et glycoprotéiques du mucus (mucines et différents peptides). Il est communément admis que la sécrétion du mucus s'effectue par exocytose, après fusion de la membrane des granules de sécrétion avec la membrane apicale de la cellule. Il semblerait cependant que le mucus soit au moins partiellement relargué grâce à un phénomène de sécrétion apocrine, au cours duquel les grains de sécrétion sont expulsés de la cellule dans leur intégralité, avec leur membrane. Ce n'est qu'une fois à l'extérieur de la cellule que les mucines qu'ils contiennent s'hydratent, ce qui entraîne le gonflement du granule et son éclatement, permettant la libération du mucus dans la lumière bronchique (**Puchelle et al., 1991; Rogers, 1994**). Elles

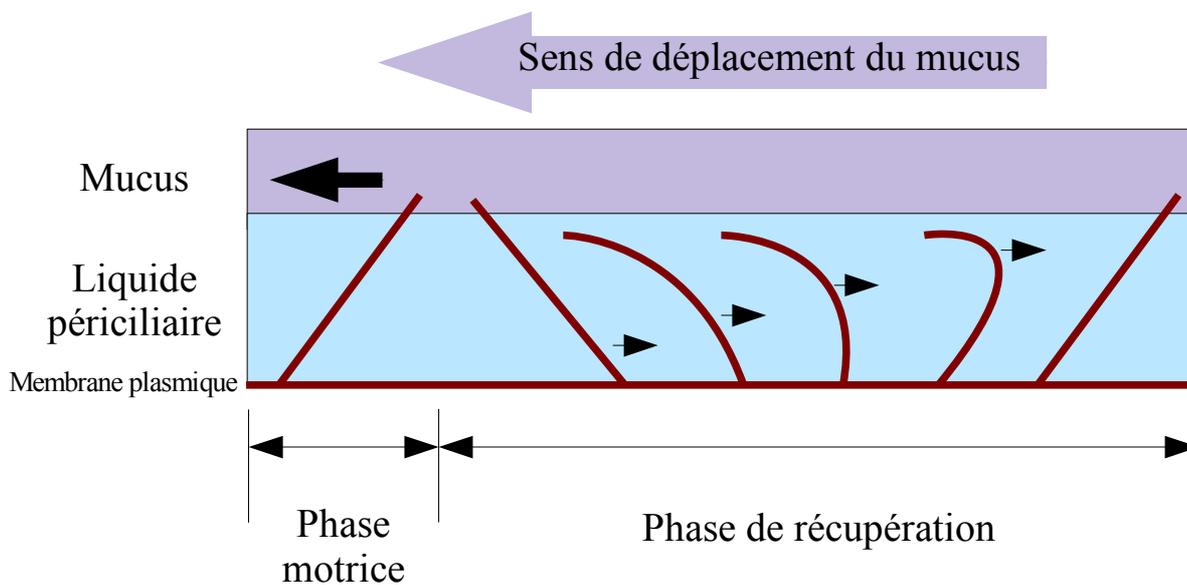


Figure 5: Battement ciliaire

Schéma de l'entraînement du mucus par le battement des cils. Les cils de l'épithélium respiratoire battent de manière asymétrique: durant la phase motrice, le cil est allongé, son extrémité rigide est plongée dans les plaques de mucus, qu'elle entraîne vers le carrefour oeso-pharyngé. Au cours de la phase de récupération, le cil se recourbe pour être entièrement dans le liquide périciliaire et peut ainsi reprendre sa position initiale sans entraîner le mucus.

sont présentes à raison d'environ une cellule caliciforme pour 5 cellules ciliées, soit 6 à 7 000 cellules par mm². Dans les bronchioles, les cellules caliciformes sont remplacées par des cellules de Clara, qui sécrètent des peptides de défense et non des mucines. Les cellules de Clara et les cellules caliciformes ont des capacités de prolifération et de trans-différenciation (**Boers et al., 1999; Trump et al., 1978**). Elles sont capables de se multiplier de façon limitée et de donner naissance à des cellules ciliées. Ces cellules seraient donc potentiellement des cellules progénitrices, permettant une réponse rapide aux agressions (**Avril-Delplanque et al., 2005**). Cependant, bien qu'il ne soit pas rare d'identifier, dans le tissu respiratoire humain, des cellules mixtes (cellules ciliées présentant des granules de sécrétion), le rôle progéniteur des cellules sécrétoires *in vivo* n'est pas actuellement clairement démontré.

Les cellules neuro-endocrines

Les cellules neuro-endocrines sont surtout présentes dans la partie distale des bronches, souvent sous forme d'îlots. Elles appartiennent au système neuroendocrine diffus et sont principalement situées aux bifurcations des voies respiratoires, ce qui, ajouté à leur ressemblance avec les bourgeons du goût et à leur innervation supérieure à celle du reste de l'épithélium, a conduit à leur attribuer un rôle sensoriel. Cette hypothèse a été confirmée par leur capacité à sécréter du GRP (*Gastrin-Releasing Peptide*) (**Jaramillo MA, 1995**) mais aussi de la calcitonine (**Azzadin A, Kasacka I, Sawicki B, Malla H, Dadan J & Buczko W, 2001**), de la sérotonine, de l'endothéline, de la leu-enképhaline, du CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) (**Cadioux et al., 1986**), de la cholecystokinine ou encore de la substance P (**Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Franz P, Albegger K & Dietze O, 1997**) et de la bombésine (**Adriaensen D, Scheuermann DW, Timmermans JP & De Groodt-Lasseel MH, 1991; Beorlegui C, 1994;**

Gillan JE, 1986), en fonction des conditions physiologiques, notamment de la pression partielle en oxygène (**Montuenga et al., 2003**).

Les autres types cellulaires

Il existe aussi dans l'épithélium des voies respiratoires des types cellulaires plus atypiques représentant sans doute des intermédiaires de différenciation. C'est dans cette catégorie qu'il convient de classer les cellules intermédiaires, ancrées à la lame basale, allongées mais n'atteignant pas la lumière des voies respiratoires, ou encore les cellules mixtes, cellules cylindriques présentant à la fois des cils et des grains de sécrétion (**Jeffery et Li, 1997**). Sur la base des capacités de division et de différenciation des différents types cellulaires, il a été supposé que les cellules intermédiaires (ou cellules parabasales) correspondaient à des cellules issues de la division des cellules caliciformes, au cours du processus de stratification (**Jeffery et Li, 1997**). De même, les cellules mixtes pourraient correspondre à des cellules ciliées en cours de différenciation à partir de précurseurs sécrétoires ou de cellules basales (**Jeffery et Li, 1997**).

B.II.1.3 Polarité et jonctionnalité de l'épithélium de surface

L'épithélium des voies aériennes s'oppose physiquement à la pénétration des particules contaminantes grâce à sa cohésion et son imperméabilité. Ceci est permis grâce aux quatre principaux complexes jonctionnels intercellulaires constitués par les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les desmosomes, les jonctions communicantes, tous symétriques et basés sur des interactions protéiques homophiliques, ainsi que les hémidesmosomes,

Lumière

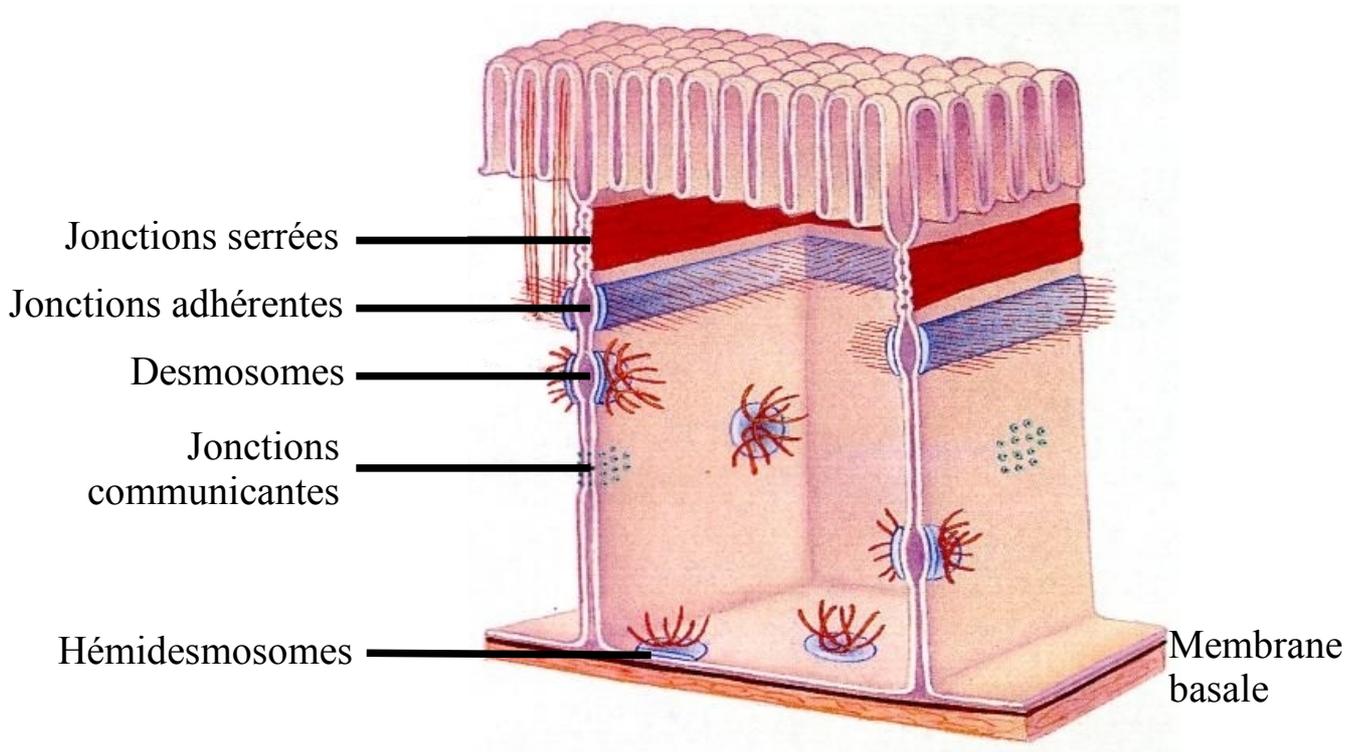


Figure 6: Disposition des différents types de jonctions dans les cellules épithéliales.

L'étanchéité de l'épithélium est assurée par la ceinture constituée par les jonctions serrées, qui sépare le pôle apical du pôle basolatéral. Les jonctions adhérentes et les desmosomes assurent la cohésion de l'épithélium, et les jonctions communicantes permettent un couplage physiologique entre les cellules adjacentes. Les hémidesmosomes assurent l'ancrage des cellules épithéliales à la membrane basale.

asymétriques, établis entre les cellules épithéliales et la membrane basale. La distribution cellulaire des complexes jonctionnels est strictement contrôlée et permet le maintien de la polarité et de la cohésion de l'épithélium (Figure 6).

Les jonctions serrées

Les jonctions serrées forment un complexe appelé *zonula occludens*, qui marque la frontière entre le pôle apical de la cellule et sa membrane basolatérale. La *zonula occludens*, responsable de l'étanchéité de l'épithélium, est constituée d'un réseau protéique dense au niveau duquel les feuillettes externes des membranes plasmiques des cellules adjacentes fusionnent grâce aux claudines, à l'occludine et à JAM (*Junctional Adhesion Molecule*), membranaires, rassemblées par une plaque cytoplasmique formée des protéines péri-membranaires ZO (*Zonula Occludens*)-1, -2 et -3, elles-mêmes reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la cinguline et la caténine α (Feldman *et al.*, 2005).

Les jonctions intermédiaires

Les jonctions intermédiaires ont pour principale fonction de communiquer les contraintes physiques, produites ou répercutées par le cytosquelette d'actine, d'une cellule à l'autre. Elles sont donc principalement observées au niveau du plateau d'actine sous-apical des cellules cylindriques, où elles forment la *zonula adherens*. Les jonctions intermédiaires sont formées par l'interaction dépendante du calcium entre les cadhérines transmembranaires des cellules adjacentes. ces cadhérines sont à leur tour regroupées et ancrées aux filaments d'actine par une plaque cytoplasmique composée des caténines, de vinculine et d'actinine α .

ZO1 peut aussi être présente (Nagafuchi, 2001). Les jonctions adhérentes jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire; elles sont notamment responsable de la perception des

contacts intercellulaires (**Brembeck et al., 2006**).

Les desmosomes

Les desmosomes sont responsables de la cohésion épithéliale, en maintenant les cellules fermement fixées les unes aux autres. Leur rôle est particulièrement important pour l'ancrage des cellules cylindriques, qui n'ont qu'un contact très limité avec la lame basale et sont donc maintenues principalement par les desmosomes qu'elles partagent avec les cellules basales. Les desmosomes sont présents tout au long des membranes au niveau des contacts intercellulaires, regroupés en *macula adherens*. Ils sont constitués des desmoplakines, de la plakoglobine et des plakophilines, toutes trois cytoplasmiques, reliant les cadhérines responsables des propriétés d'adhérence (appelées desmogléines et desmocollines) aux filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette (**Kottke et al., 2006**)

Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes permettent le passage d'eau et de petits solutés d'une cellule à l'autre. Elles permettent ainsi le couplage métabolique et électrique des cellules adjacentes. Ce rôle est particulièrement important, car le battement coordonné des cils des cellules ciliées, qui en résulte, est indispensable à l'évacuation correcte du mucus et des contaminant qui y sont piégés. Les jonctions communicantes sont formées de protéines transmembranaires appelées connexines, qui s'assemblent en homo- ou hétéro-hexamères appelés connexons. Lorsque les connexons de deux cellules adjacentes s'associent, il se forme un pore: la jonction communicante. Les jonctions communicantes de l'épithélium respiratoires permettent la

propagation de « vagues calciques », essentielles à la régulation coordonnée des voies de signalisation des cellules voisines (**Koval, 2002**).

Les hémidesmosomes

Les cellules épithéliales sont ancrées à la lame basale grâce à de nombreuses jonctions, les hémidesmosomes, de structure similaire à celle des desmosomes, si ce n'est que les liaisons homophiliques cadhérine-cadhérine du desmosome sont remplacées dans l'hémidesmosome par des liaisons hétérophiliques intégrine-matrice extracellulaire. En plus de leur rôle dans le maintien de la cohésion épithéliale, les hémidesmosomes peuvent moduler la prolifération cellulaire en réponse à l'EGF (**Nievers *et al.*, 1999**).

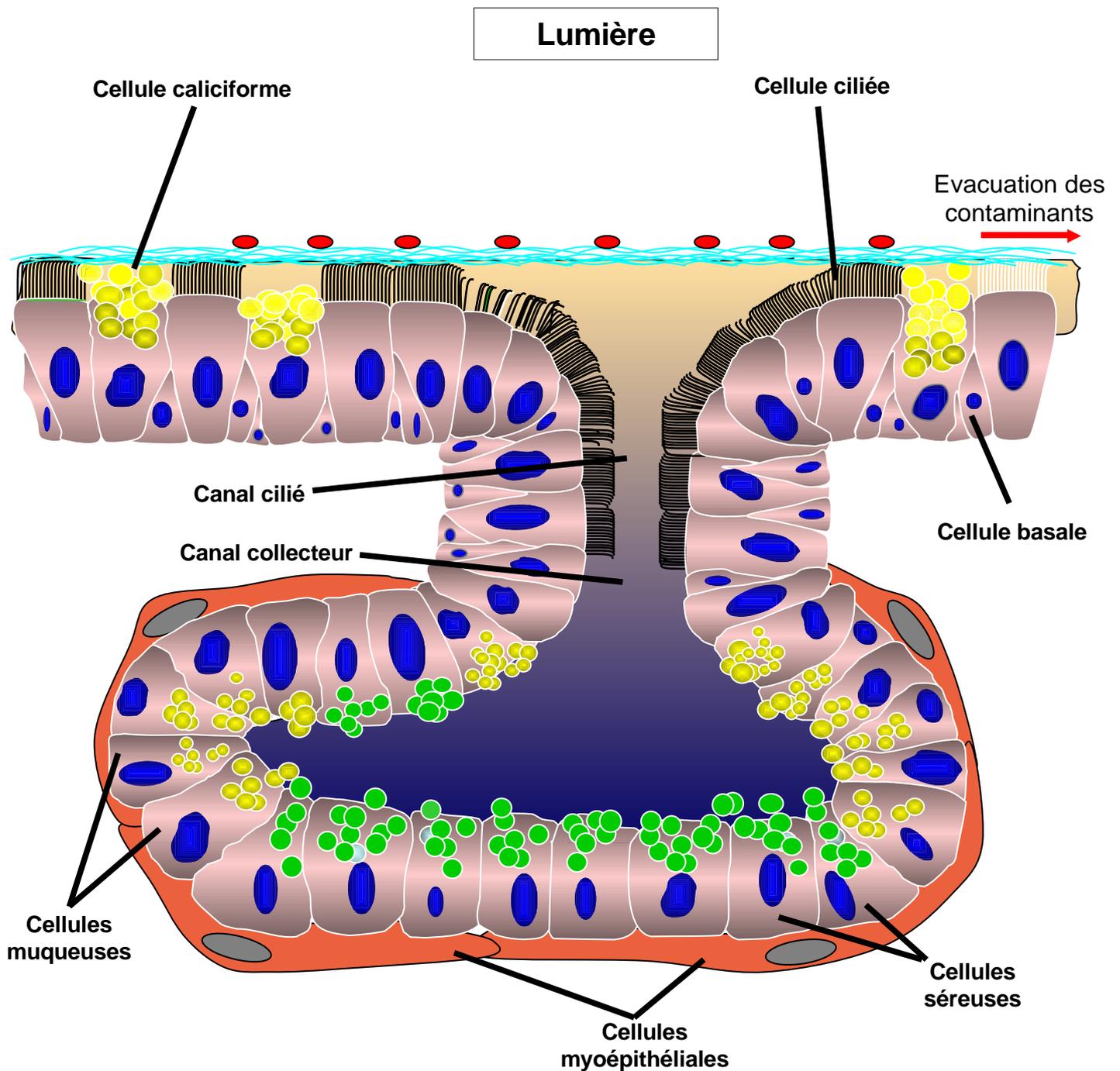


Figure 7: Structure des glandes de la sous-muqueuse des voies respiratoires

Les cellules séreuses (distales) et muqueuses (proches du canal collecteur) déversent leurs sécrétions dans la lumière de la glande. La contraction des cellules myoépithéliales environnantes et le battement des cils des cellules du canal cilié entraînent ce mucus vers la lumière des voies respiratoires.

B.II.2 La sous-muqueuse

Le chorion, ou sous-muqueuse, des voies aériennes supérieures est riche en glandes séro-muqueuses (Figure 7), responsables de la majeure partie de la sécrétion des facteurs de défense ou des composants du mucus, respectivement. La vascularisation dense permet aussi le réchauffement de l'air inspiré.

B.II.2.1 Les cellules glandulaires séreuses

Les cellules glandulaires séreuses sont les principales sources de protéines de défense dans l'épithélium respiratoire (**Finkbeiner, 1999**). Les cellules séreuses sont de forme pyramidale, avec un noyau rond basal organisées autour d'une lumière centrale, reliée à l'épithélium de surface par un canal cilié. Elles sécrètent principalement des protéines de défense antibactériennes, anti-oxydantes et anti-protéasiques telles que le lysozyme, la lactoferrine et l'inhibiteur bronchique de leucoprotéase (*Secretory LeucoProtease Inhibitor, SLPI*).

B.II.2.2 Les cellules glandulaires muqueuses

Les cellules glandulaires muqueuses sont responsables de la plus grande part de la sécrétion de mucus dans les conditions physiologiques. La plus grande partie de leur cytoplasme est occupée par des granules de sécrétion, et le noyau est donc aplati contre la lame basale. Ces cellules sécrètent des mucines, principalement MUC5AC mais aussi MUC5B ou MUC2, particulièrement en cas d'inflammation (**Davies et al., 2002**). Les cellules glandulaires

muqueuses produisent aussi le peptide trifolié TFF3 en grande quantité (**Wiede et al., 1999**), et pourraient aussi produire le peptide trifolié TFF1 en cas d'inflammation (**dos Santos Silva et al., 2000**). En plus des mécanismes d'exocytose classiques, les granules de sécrétion des glandes muqueuses peuvent être excrétés dans leur totalité, membrane comprise, puis s'hydrater et éclater, de la même façon que ceux des cellules muqueuses de surface (cellules caliciformes). Le mucus est ensuite évacué vers la lumière des voies respiratoires par la contraction des cellules myoépithéliales qui entourent les glandes puis par le battement coordonné des cils des cellules du canal cilié.

B.II.2.3 Les cellules du canal collecteur

Les cellules du canal collecteur sont principalement responsables de l'homéostasie ionique et hydrique des produits de sécrétion glandulaires, et contrôlent également la sécrétion du mucus (**Breeze RG & Wheeldon EB, 1977**). Leur noyau, central, est ovoïde. Elles ne présentent pas de cils, et ne sécrètent pas de mucus.

B.II.2.4 Les cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales tapissent l'extérieur des glandes de la sous-muqueuse. Leur contraction permet la réduction du volume de la lumière glandulaire et propulse les sécrétions glandulaires vers le canal cilié puis vers la lumière des voies respiratoires.

B.II.3 Les fonctions de défense de l'épithélium respiratoire adulte

B.II.3.1 Rôle de barrière physique

L'épithélium respiratoire a un premier rôle de défense de par sa cohésion et son imperméabilité: en effet, il empêche les particules inhalées de pénétrer à l'intérieur de l'organisme et régule strictement les échanges de liquides et d'ions entre la sous muqueuse et la lumière des voies respiratoires. Les échanges asymétriques d'ions à travers cette barrière semi-perméable sont responsables de l'établissement d'une différence de potentiel de l'ordre de 30 mV chez le chien (**Boucher, 1980**) et chez l'homme (**Knowles et al., 1981**), la lumière étant électronégative par rapport à l'intérieur de l'organisme.

B.II.3.2 Défense antibactérienne innée

En cas d'agression de l'épithélium respiratoire, les cellules épithéliales répondent en sécrétant dans la lumière de nombreux facteurs antimicrobiens et dans la sous-muqueuse des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires pour recruter les phagocytes et les cellules de la défense immunitaire adaptative.

Immunité innée de l'épithélium

L'épithélium respiratoire sécrète de nombreux facteurs antimicrobiens participant à la défense immunitaire innée. Cette défense est principalement assurée par la sécrétion de peptides

antibactériens à large spectre, comme le lysozyme ou la lactoferrine, le SLPI, l'élafine, les défensines α et β , les cathélicidines, la phospholipase A2 (PLA2) les collectines (dont les protéines A et D du surfactant: SP-A et SP-D), des peroxydases et des peptides cationiques riches en résidus aspartate. Certains constituants de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, ont aussi une activité de défense. L'activité de la plupart de ces peptides dépend de la concentration en sels; c'est notamment le cas des défensines et des cathélicidines. Ces facteurs ont des modes d'action très différents: les défensines, le lysozyme, la lactoferrine et les cathélicidines sont directement toxiques pour les bactéries, alors que les collectines ou la fibronectine agissent en neutralisant les micro-organismes et en favorisant leur élimination par les cellules du système immunitaire. Certains facteurs ont plusieurs modes d'action, comme les défensines, qui sont capables d'augmenter l'efficacité des polymorphonucléaires et d'activer le complément, en sus de leur activité antibactérienne (**Zhang *et al.*, 2000**). De même, le SLPI et l'élafine, identifiés à l'origine comme inhibiteurs de protéases, possèdent une activité antibactérienne due à leur extrémité N-terminale très cationique qui leur permet de désorganiser les membranes biologiques. Dans le cas de l'élafine, l'extrémité C-terminale possède aussi une activité antibactérienne forte (**Fitch *et al.*, 2006**).

Les cellules épithéliales sont aussi capables de sécréter des dérivés réactifs de l'oxygène, comme le monoxyde d'azote (NO), qui permettent la lyse des contaminants mais peuvent aussi se révéler toxiques pour l'épithélium (**Flak et Goldman, 1996**).

Défense par le système immunitaire inné

La sous-muqueuse est riche en cellules dendritiques, cellules sentinelles du système immunitaire; par ailleurs, en cas d'agression, les cellules épithéliales sont capable de sécréter

des monokines, comme l'IP-10 (*IFN-inducible Protein of 10 kDa*), MIG (*Monokine Induced by Gamma-IFN*) ou I-TAC (*IFN-inducible T-cell Alpha-Chemoattractant*), qui vont spécifiquement recruter les lymphocytes T activés sur le lieu de l'agression (**Sauty et al., 1999**). L'épithélium peut aussi sécréter de nombreuses cytokine pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 (**Flak et Goldman, 1996**), l'interleukine 8 (**Nakamura et al., 1992**), l'interleukine 6 (**Carter et al., 1997**) qui attirent rapidement de nombreux leucocytes sur le lieu de l'agression. En effet, même en l'absence d'agression aigüe, le poumon est le plus grand réservoir de polymorphonucléaires neutrophiles du corps humain. Ces cellules, recrutées par l'inflammation due à une agression, traversent l'épithélium pour combattre l'infection. Ils sécrètent des facteurs qui détruisent directement les contaminants inhalés, comme l'élastase, la cathepsine G, la protéinase 3, la myéloperoxydase, le lysosyme ou les oxydants de type peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et superoxyde (O_2^-) (**Ely et al., 1995**). Ces facteurs ont cependant aussi un effet néfaste sur l'intégrité de l'épithélium car elles agressent les cellules épithéliales au même titre que les contaminants extérieurs. En cas de réaction modérée, cette réponse permet de tuer les bactéries, d'augmenter la sécrétion de mucus, et même la desquamation des cellules épithéliales peut être en partie bénéfique en favorisant l'élimination rapide des bactéries internalisées et des virus. Cependant, la réaction inflammatoire peut altérer la clairance mucociliaire par ralentissement du battement des cils (**Chen et al., 2000**), et en cas de réaction excessive, les dommages causés à l'épithélium peuvent dépasser ses capacités de régénération altérant ainsi de façon durable sa fonction de protection (**Lappalainen et al., 2005**).

B.II.3.3 Mucus et clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est le mécanisme par lequel les particules inhalées sont piégées et

éliminées vers les voies digestives. C'est en effet le battement coordonné et orienté des cils qui entraîne le mucus vers la trachée et le pharynx. Les nombreuses particules inhalées, d'un diamètre égal ou supérieur au micron, sont piégées par le mucus puis transportées vers l'oropharynx où elles sont dégluties ou expectorées. L'efficacité de ce système dépend du mouvement correct des cils mais aussi des qualités viscoélastiques du mucus, dont la présence est indispensable aux mouvements ciliaires; en son absence, les cils s'arrêtent de battre et dégènèrent. Il existe un équilibre idéal entre la qualité et la quantité de mucus et le nombre de cellules ciliées, et les propriétés chimiques et rhéologiques du mucus influencent le fonctionnement du système mucociliaire (**Luk et Dulfano, 1983; Puchelle *et al.*, 1987**).

Le battement ciliaire

Le battement coordonné des cils des cellules ciliées est responsable de l'évacuation du mucus et des contaminant inhalés qui y sont piégés. Les cils, d'une longueur approximative de 7 μm , baignent principalement dans le liquide périciliaire dont l'épaisseur est sensiblement égale. Les cils ont un mouvement asymétrique, composé d'une phase de rétraction et d'une phase de propulsion: au cours de la première phase, le cil se courbe tout en se déplaçant vers l'arrière, et baigne donc totalement dans la phase liquide du mucus; il se redresse ensuite pour se déplacer vers l'avant (**Sanderson, 1997**). A chaque battement, l'extrémité rigide du cil pénètre donc dans la phase gel, supérieure, du mucus, l'entraînant vers les parties proximales de l'épithélium jusqu'au carrefour oeso-pharyngé (Figure 5).

Structure et composition du mucus

L'efficacité de la clairance mucociliaire dépend d'une part du battement coordonné des cils des cellules ciliées, et d'autre part de la structure et des propriétés rhéologiques du mucus couvrant l'épithélium. Ce mucus contient par ailleurs de nombreux facteurs antimicrobiens, qui sont aussi essentiels au maintien de la stérilité des voies respiratoires.

Structure du mucus

Le mucus recouvrant l'épithélium respiratoire est composé de deux couches principales, différenciées principalement par leur viscosité. La couche directement en contact avec l'épithélium est fluide, d'épaisseur constante dans les conditions physiologiques ($\sim 7 \mu\text{m}$). Cette phase liquidienne est appelée liquide périciliaire, et est surmontée d'une mince couche de surfactant qui joue le rôle de séparateur. Au dessus, une couche plus visqueuse, la phase gel, organisée en plaques, intervient directement dans la reconnaissance bactérienne et permet l'élimination des particules inhalées qu'elle piège. C'est en effet l'entraînement de ce gel par les battements ciliaires qui permet l'évacuation des contaminants respiratoires. L'épaisseur de cette couche est variable ($0,5$ à $2 \mu\text{m}$ dans les conditions physiologiques). Elle augmente notamment en cas d'inflammation en raison de l'augmentation de la sécrétion par les cellules mucipares et de la stagnation liée à la diminution de la fréquence de battement des cils causée par les facteurs inflammatoires (Veale *et al.*, 1993; Gaillard *et al.*, 1994; Allen-Gipson *et al.*, 2004). Les compositions respectives des deux phases du mucus, sont difficilement évaluables en raison de la difficulté de les recueillir séparément. Il est communément admis que le liquide périciliaire est riche en protéines de défense alors que la phase gel contient notamment les mucines sécrétoires sous forme de polymères. Cependant, il a été démontré que la seule présence de

mucines en solution ne suffit pas à obtenir une viscosité importante (**Raynal *et al.*, 2002**). Il est donc probable que des mucines soient aussi présentes dans le liquide périciliaire. La différence de viscosité entre les deux phases du mucus serait alors principalement due à une différence d'organisation du réseau de mucines (**Perez-Vilar et Boucher, 2004**).

L'équilibre ionique

Le maintien de la composition ionique du mucus est un élément primordial de la fonction de l'épithélium respiratoire. En effet, la polymérisation des mucines sécrétées, qui a lieu principalement après leur sécrétion, dépend en partie de l'acidité extracellulaire. De plus, l'activité de la plupart des peptides antibactériens sécrétés par les cellules épithéliales dépend des concentrations en différents ions, notamment le sodium. De l'équilibre ionique dépend aussi l'équilibre hydrique, donc la viscosité du mucus et le bon fonctionnement de la clairance mucociliaire. La membrane apicale des cellules ciliées couvre la majeure partie des voies respiratoires; ce sont donc les canaux ioniques présents dans ces membranes qui régulent à la fois la concentration ionique et le pH du mucus.

Force ionique et hydratation

Si la phase liquidienne est trop épaisse, les cils n'atteignent plus la phase gel et ne peuvent plus l'évacuer; à l'inverse, si elle est trop fine, les cils s'engluent dans la phase gel et ne peuvent plus battre correctement. L'équilibre hydrique de la couche de mucus est donc primordial. Dans les conditions physiologiques, les variations locales d'hydratation sont compensées par les échanges entre les deux phases du mucus, la phase gel servant de réserve pour maintenir une phase

liquide d'épaisseur constante, mais ce mécanisme de compensation est limité. Un équilibre précis des flux hydriques est donc nécessaire. La régulation est réalisée grâce à l'équilibre entre l'efflux d'ions chlorure (Cl⁻) par l'intermédiaire du canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), entraînant un efflux d'eau, et l'absorption d'ion sodium (Na⁺), principalement par le canal ENaC (*Epithelial Na⁺ Channel*), entraînant une réabsorption d'eau. Il est couramment admis que les échanges hydriques à travers l'épithélium respiratoire se font partiellement par voie paracellulaire, mais principalement par l'intermédiaire de canaux spécialisés, les aquaporines (AQP), et particulièrement AQP3, AQP4 et AQP5 dans l'épithélium respiratoire (**Donaldson et al., 2006**). Cependant, des données récentes montrent que leur absence n'altère pas l'équilibre hydrique de la surface de l'épithélium respiratoire, suggérant l'existence d'autres mécanismes (**Levin et al., 2006; Song et al., 2001**). Il existe peu de données concernant l'osmolarité du mucus dans les conditions physiologiques chez l'homme, à cause de la difficulté à le recueillir en l'absence d'induction de la sécrétion ou d'ajout de soluté. Historiquement, deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la régulation de l'hydratation de la surface épithéliale. La première décrit le mucus comme hypo-osmotique par rapport au sérum, et suppose que la régulation de l'hydratation est réalisée grâce au contrôle des concentrations ioniques. La seconde hypothèse décrit le mucus comme iso-osmotique par rapport au sérum, et suppose un contrôle de l'hydratation par régulation du volume du liquide de surface. Les mesures de concentration ionique du mucus réalisées chez des patients atteints de mucoviscidose, pathologie dans laquelle la clairance mucociliaire est gravement altérée, et dans un modèle murin de mucoviscidose, montrent l'absence de variations de ces concentrations ioniques, favorisant l'hypothèse « iso-osmotique » (**Knowles et al., 1997; Grubb et al., 2002**). Le mécanisme impliqué semble être indépendant de la présence de cils, suggérant un mécanisme de détection directe du volume du liquide périciliaire (**Tarran et al., 2006**).

L'équilibre du pH

L'acidité du mucus joue un rôle primordial dans la polymérisation du gel de mucines; une hyperacidité a été décrite dans des maladies comme la mucoviscidose et pourrait être en partie responsable des problèmes de rhéologie associés à la maladie (**Poschet et al., 2002**). Le mucus des bronches a dans les conditions normales un pH avoisinant 6,6 (**Bodem et al., 1983**), et est étroitement régulé par l'épithélium respiratoire (**Jayaraman et al., 2001**) sans que les mécanismes mis en jeu ne soient complètement élucidés. Les cellules épithéliales expriment des canaux à protons dans leur membrane apicale, et des pompes Na^+/H^+ dans leur membrane basolatérale; l'export du sodium réabsorbé par les cellules à partir de la lumière pourrait ainsi acidifier le cytoplasme; de même, les canaux échangeurs d'anions (AE, *Anion Exchangers*) basolatéraux permettent l'entrée dans la cellule des ions chlore sécrétés par l'épithélium en échange de la sortie basolatérale d'ions HCO_3^- , acidifiant ainsi le cytoplasme. Les ions H^+ diffuseraient ensuite vers la lumière par l'intermédiaire des canaux H^+ apicaux. Les ions HCO_3^- utilisés pour éviter une acidification excessive pourraient quant à eux être sécrétés par le canal CFTR et les canaux CaCC (*Calcium-activated Chlore Channels*). Une régulation paracellulaire, qui tendrait à équilibrer les pH apical et basolatéral, est aussi à envisager (**Ng et al., 2004**). Le mucus lui-même a un fort effet tampon (**Holma et Hegg, 1989**), ce qui contribue probablement au maintien du pH au niveau de la muqueuse respiratoire; cependant, l'absorption ou le relargage d'ion H^+ par le mucus peut conduire à des variations de sa rhéologie: en effet, la polymérisation finale des mucines a lieu à l'extérieur de la cellule et est dépendante du pH; de plus la disponibilité d'ions H^+ influence l'établissement de liaisons hydrogène entre les différents composants du mucus. Ceci limite évidemment son rôle de tampon dans les

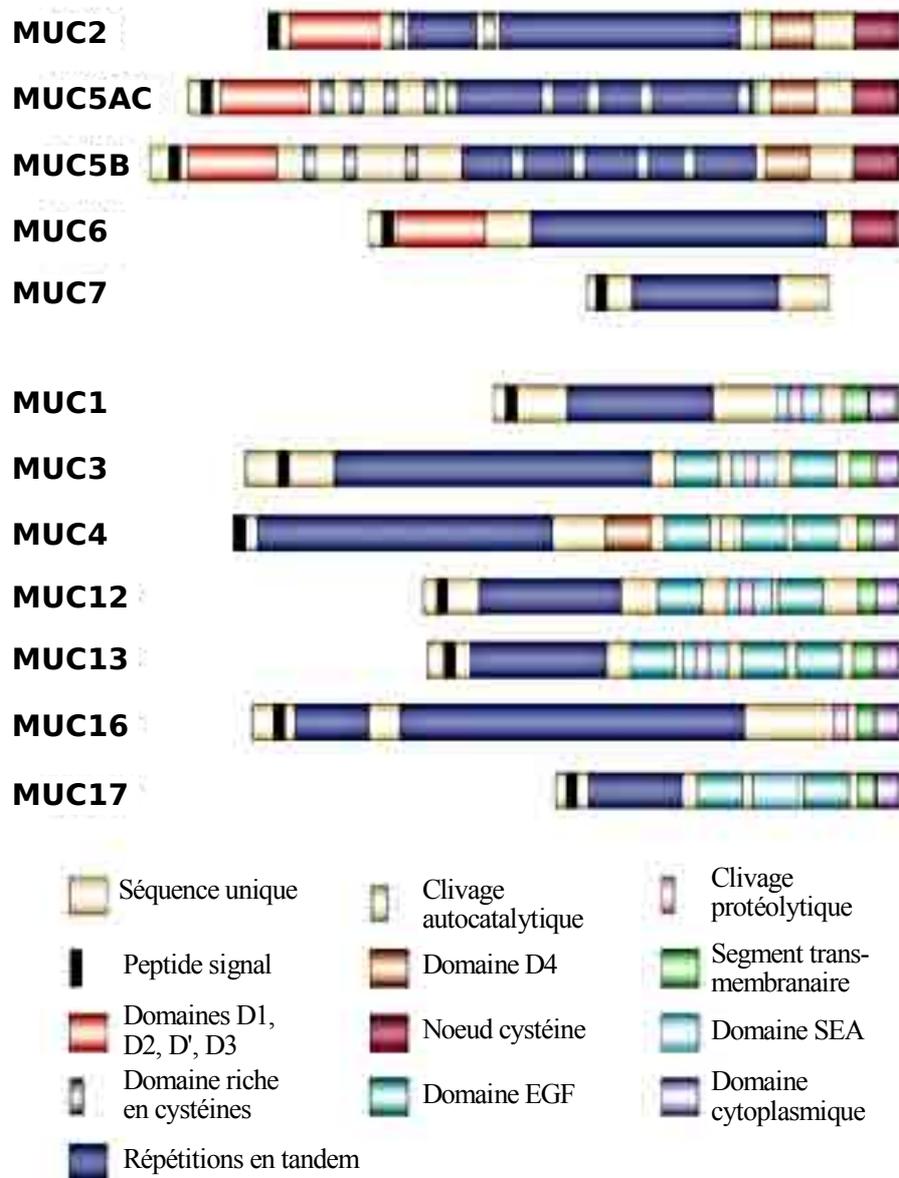


Figure 8: Structure des apomucines humaines

La famille des mucines peut être divisée en deux classes: les mucines sécrétées (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC7) et les mucines membranaires (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16 et MUC17). Toutes les mucines contiennent une ou plusieurs zones de répétitions en tandem caractéristiques de cette famille. De nombreux autres domaines, notamment des domaines d'interaction, sont identifiables (voir texte) (d'après Hollingsworth et Swanson, 2004).

conditions physiologiques.

Les facteurs de défense

Le mucus contient une grande variété de facteurs anti-microbiens de structures variées, ce qui permet d'éviter l'émergence trop rapide de mécanismes de résistance. Les peptides de défense sécrétés par l'épithélium mucociliaire en font bien sûr partie, avec des facteurs produits par les glandes séreuses, les pneumocytes de type II, les fibroblastes, les lymphocytes, les macrophages alvéolaires, les polymorphonucléaires résidents ou encore des sources non pulmonaires. Ces facteurs comprennent les acteurs de l'immunité innée de l'épithélium, comme le lysozyme ou la lactoferrine, le SLPI, l'élafine, les défensines α et β , les cathélicidines, la phospholipase A2 (PLA2) les collectines (dont les protéines A et D du surfactant: SP-A et SP-D), des peroxydases et des peptides cationiques riches en résidus aspartate. Il convient d'ajouter à cette liste les facteurs provenant des cellules du système immunitaire, comme les immunoglobulines de classe A, ou les protéases des polynucléaires neutrophiles (élastase du neutrophile, cathepsine G, protéinase 3), qui sont produits en grandes quantités en cas d'inflammation et participent aux propriétés antibactériennes du mucus.

Les mucines

La famille des mucines est composée de longues glycoprotéines fortement glycosylées de très haute masse moléculaire. Le squelette peptidique des mucines présente de nombreuses répétitions en tandem d'une séquence caractéristique bien conservée, riche en sérines, thréonines et prolines, qui constituent la cible de nombreuses O-glycosylations (Figure 8). Les chaînes glycaniques peuvent ainsi représenter de 50 à 80% de la masse des mucines et sont

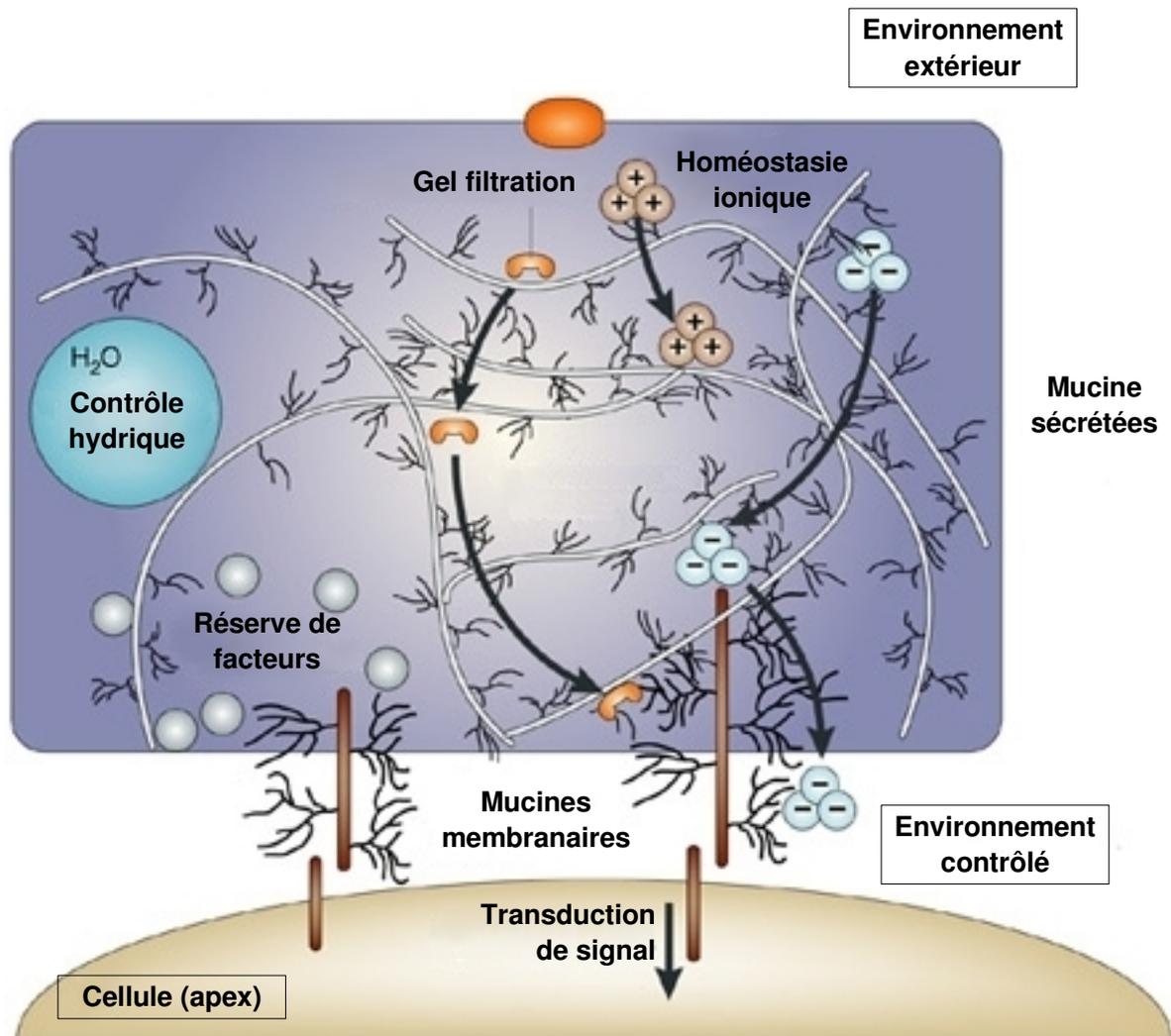


Figure 9: Rôles physiologiques des mucines membranaires et sécrétoires.

Les mucines, de par leur capacité à former un réseau macromoléculaire dense, constituent un filtre capable de freiner la diffusion des particules et solutés, et peuvent servir de réserve de facteurs bioactifs. Grâce à leurs nombreuses glycosylations, elles régulent l'hydratation de la surface épithéliale et la viscosité du mucus. Elles sont chargées négativement, ce qui permet de réguler les échanges ioniques.

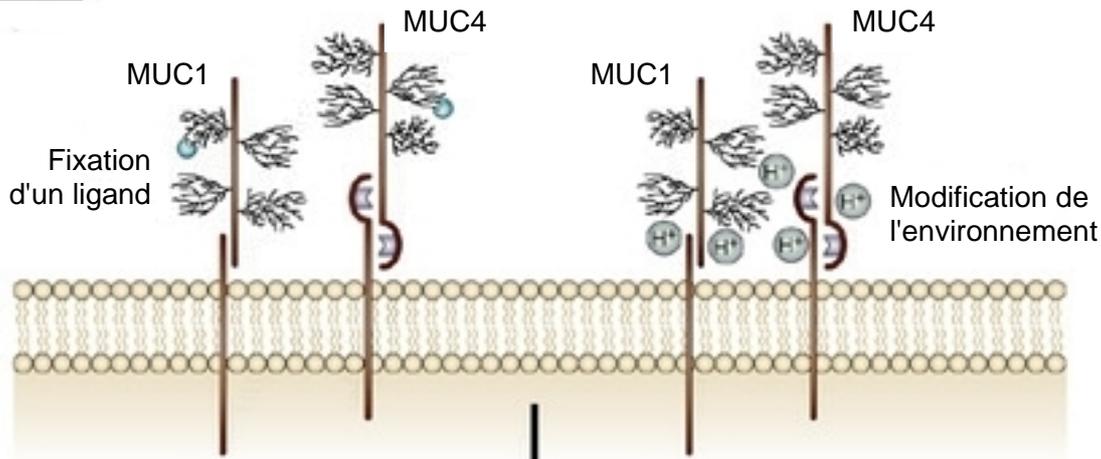
Ces rôles combinés permettent aux mucines de contrôler l'environnement cellulaire. Les mucines membranaires sont également capables d'intervenir dans la signalisation cellulaire. (d'après Hollingsworth et Swanson, 2004).

variables selon l'environnement et l'état physiologique de la cellule: leur nombre et leur longueur varient, et elles peuvent être modifiées par sulfatation. Elles sont aussi remodelées après synthèse, à l'extérieur de la cellule, en fonction de l'environnement extracellulaire. La famille des mucines se divise en deux classes, les mucines membranaires et les mucines sécrétées: les premières sont ancrées dans la membrane cytoplasmique et se projettent loin à l'extérieur de la cellule, alors que les secondes sont sécrétées pour former le mucus (Figure 9). Les mucines sont historiquement les plus anciens composants identifiés dans le mucus couvrant l'épithélium respiratoire, et sont les principales responsables de ses caractéristiques rhéologiques. De nombreux nouveaux gènes codant pour des protéines semblables ont été récemment identifiés par analyse bioinformatique des séquences génomiques; leur classification dans la famille des mucines fait encore débat (**Porchet et Aubert, 2004**).

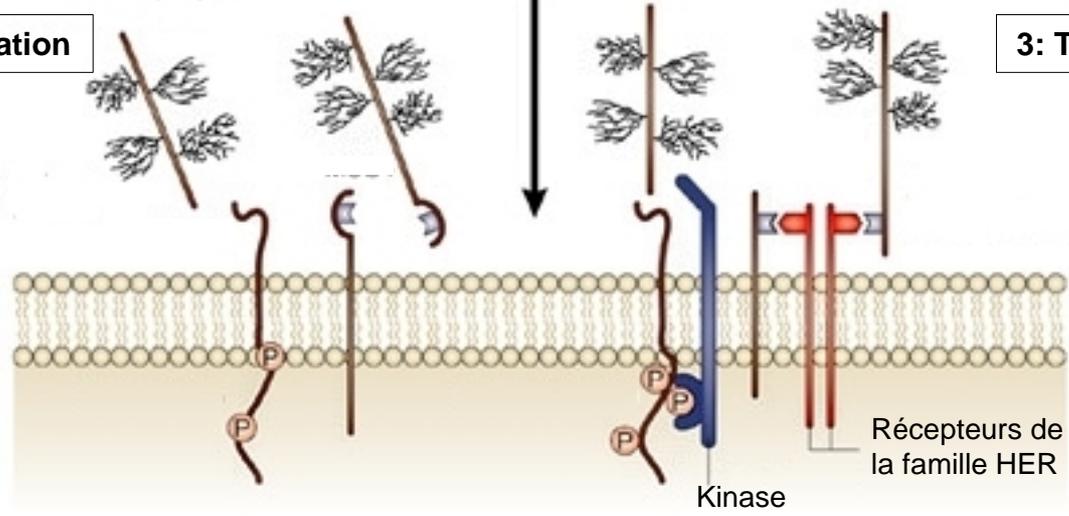
Les mucines membranaires

Les mucines membranaires (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC 11, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17 et MUC20) sont ainsi nommées en raison de la présence dans leur squelette peptidique d'une séquence transmembranaire. Elles contiennent également des zones d'homologie avec le récepteur de l'EGF. Elles peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire, grâce à des mécanismes d'épissage alternatif ou par clivage protéolytique, bien que les mucines clivées puissent rester associées à la membrane par liaison non covalente avec leur partie transmembranaire. Des données récentes suggèrent que ces mucines pourraient avoir un rôle dans de nombreux processus comme la migration et la différenciation cellulaires, la réponse immunitaire (**Chan et al., 1999; Chang et al., 2000**) ou la cancérogenèse (**Alos et al., 2005; Andrianifahanana et al., 2001; Arai et al., 2005; Baldus et al., 2004; Leroy et al.,**

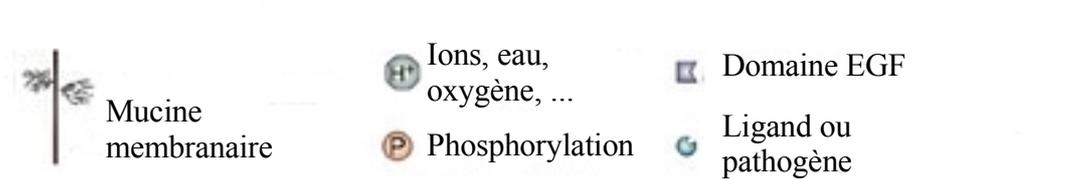
1: Détection



2: Activation



3: Transduction



- Mucine membranaire
- Ions, eau, oxygène, ...
- Phosphorylation
- Domaine EGF
- Ligand ou pathogène

Figure 10: Rôles de récepteurs ou de co-récepteurs des mucines membranaires

Détection: Les mucines membranaires peuvent lier de façon spécifique des lectines, sélectines, molécules d'adhésion, bactéries ou autres facteurs (dont les TFF). Elles sont également sensibles aux variations physico-chimiques de l'environnement.

Activation: Ces signaux peuvent modifier la structure des mucines, notamment par clivage ou dissociation.

Transduction: Les fragments membranaires des mucines peuvent ensuite être phosphorylés et activer des voies de signalisation, ou se lier à des récepteurs membranaires. D'après Hollingsworth et Swanson, 2004.

2002), par effet anti-adhésif (**Hilkens et al., 1992; Kohlgraf et al., 2003; Meseguer et al., 1998**) ou par leur association spécifique avec des protéines cellulaires comme ICAM1 (**Rahn et al., 2004**), la caténine β (**Wen et al., 2003**), APC (**Hattrup et al., 2004**) (pour MUC1), ou le récepteur HER2/Neu (**Komatsu et al., 2001**) (pour MUC4). La surexpression de MUC1 est ainsi retrouvée dans 90% des cancers du sein, cette surexpression étant en partie responsable de la tumorigenèse (**Schroeder et al., 2004**). La grande variabilité inter-individuelle de la longueur des mucines membranaires (**Fowler et al., 2001**) et de la séquence des motifs répétés, particulièrement pour MUC1 (**Fowler et al., 2003**), joue probablement un rôle dans le développement de certaines pathologies comme le carcinome gastrique (**Carvalho et al., 1997**). Leur long domaine extracellulaire et leurs capacités d'interaction ont conduit à les considérer comme de potentiels récepteurs ou co-récepteurs (**Hollingsworth et Swanson, 2004**). Dans l'épithélium respiratoire, les principales mucines membranaires sont MUC1 et MUC4 (Figure 10).

Les mucines sécrétoires

Les mucines sécrétoires peuvent être séparées en deux groupes: les mucines « vraies », identifiées par leur rôle dans les épithéliums muqueux, dont les gènes sont situés en 11p15 dans le génome humain (MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6) (**Pigny et al., 1996**), qui sont les principales responsables des propriétés rhéologiques des mucus biologiques, et les gènes découverts plus récemment, qui ont été classés dans cette famille par analogie de structure (MUC7, MUC8, MUC9 et MUC19). Les mucines sécrétoires principalement exprimées dans les voies aériennes sont MUC5AC et MUC5B, mais la présence de MUC2 a aussi été mise en évidence, notamment dans des pathologies caractérisées par une inflammation chronique,

comme la mucoviscidose (**Davies et al., 1999; Kirkham et al., 2002**). Ces mucines sont produites par les cellules muqueuses des glandes et de l'épithélium de surface. La longueur du squelette protéique de MUC5AC et MUC5B est variable selon les individus, mais est supérieure à 5000 résidus. Des implications de ces variations dans les processus pathologiques, comme l'asthme, ont été suggérés chez l'homme (**Fowler et al., 2001; Vinall et al., 2000**). Les mucines sécrétées partagent une structure caractéristique: elles possèdent une région riche en cystéines à leur extrémité carboxy-terminale, appelée noeud cystéine, homologue des noeuds cystéine du facteur von Willebrandt et du TGF- β . Plusieurs domaines homologues au domaine de dimérisation du facteur von Willebrandt sont appelés domaines D. Le domaine D4 mérite d'être distingué car il contient également un site auto catalytique. Il est notamment présent chez MUC2 et MUC5AC. Les mucines sécrétées contiennent aussi, comme toutes les mucines, une région de répétitions caractéristique de la famille des mucines, avec de nombreux sites accepteurs de glycosylation. La grande hétérogénéité dans la longueur du squelette protéique des mucines est due au nombre variable de répétition des motifs « mucine » (**Fowler et al., 2001**). Les mucines sécrétoires forment un réseau macromoléculaire tridimensionnel très complexe par établissement de ponts di-sulfures intermoléculaires. Cette polymérisation s'effectue en plusieurs étapes: dans le réticulum endoplasmique granuleux, les monomères s'associent deux à deux grâce à l'établissement de ponts di-sulfures entre les noeuds cystéine de leur extrémité carboxy-terminale (**van Klinken et al., 1998; Asker et al., 1998**). Les dimères sont ensuite glycosylés dans l'appareil de Golgi, puis s'assemblent, toujours grâce à des ponts di-sulfure, pour former des complexes de très haute masse moléculaire (**Sheehan et al., 2004**). Le compartiment hébergeant cette dernière étape est encore inconnu, mais elle peut avoir lieu de façon spontanée (**Bromberg et Barr, 2000**), et il est probable que des remaniements importants de la structure de ce réseau aient lieu à l'extérieur de la cellule, après sécrétion (**Perez-Vilar et**

Boucher, 2004). Par ailleurs, leur implication dans des processus de tumorigénèse a été suggérée (**Byrd et Bresalier, 2004; Perrais et al., 2001**), et elles ont été associées à une activité antibactérienne (**Kawakubo et al., 2004**).

Le rôle des mucines sécrétoires ne s'arrête pas à la rhéologie du mucus: les charges négatives qu'elles portent leur permettent de participer à l'homéostasie ionique de l'épithélium, et les structures glycaniques qu'elles portent leur permettent de fixer les bactéries avant qu'elles n'entrent en contact avec les cellules épithéliales (**Middleton et al., 2004**). L'importance de leur rôle dans le maintien de l'intégrité des muqueuses est mise en évidence par l'apparition d'ulcères du colon dans la souris déficiente pour MUC2 (**Van der Sluis et al., 2006**).

Régulation de l'expression des mucines en physiopathologie respiratoire humaine.

Les mucines sont régulées de façon très précise au cours du développement et en cas d'inflammation ou de tumorigénèse, ce qui suggère leur implication dans ces processus physiopathologiques (**Van Seuning et al., 2001; Rose et Voynow, 2006**).

La quantité de mucines sécrétoires libérée à la surface de l'épithélium respiratoire est modulée selon trois mécanismes: premièrement, la réponse la plus rapide (quelques secondes à quelques minutes) est permise grâce à la modulation de la sécrétion des mucines stockées dans les granules des cellules muqueuses. Chez l'Homme, il a été suggéré que la régulation de la sécrétion du mucus par la sécrétion d'agonistes cholinergiques, d'agonistes adrénergiques ou de

neuropeptides comme la substance P par le système nerveux périphérique se fait au niveau des sécrétions glandulaires (**Jackson, 2001**), alors que les cellules caliciformes répondent aux nucléotides tri-phosphates (**Lethem et al., 1993**) mais sont peu sensibles à d'autres sécrétagogues (**Labat et al., 1999**).

Deuxièmement, la régulation de la transcription et de la traduction permet une adaptation de la synthèse des mucines par les cellules caliciformes mais requiert plusieurs heures. De nombreux signaux extracellulaires peuvent augmenter la transcription des mucines sécrétées. Les molécules d'origine bactérienne, comme le lipopolysaccharide (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* sont capables d'augmenter la transcription de *MUC2* et *MUC5AC* par l'épithélium respiratoire humain (**Dohrman et al., 1998**), ce qui favorise probablement l'élimination des contaminants bactériens par la clairance mucociliaire *in vivo*. De même, les médiateurs de l'inflammation, comme le $\text{TNF}\alpha$ (**Borchers et al., 1999**) ou l'interleukine 1 β (**Song et al., 2003b**) ou les composés irritants inhalés (**Longphre et al., 2000**) peuvent augmenter la transcription des mucines sécrétées, favorisant l'élimination des contaminants. L'activation de la transcription des mucines sécrétées par ces différents facteurs est déclenchée par des voies de signalisation très variées: ainsi, l'activation de la transcription de *MUC2* par le LPS implique l'activation $\text{NF-}\kappa\text{B}$ par l'intermédiaire de c-Src-Ras-Raf-1 puis de la kinase MEK (MAP kinase / ERK kinase) 1/2, de la phosphorylation de ERK (*Extracellular signal Regulated*

Kinase 1/2 et de la kinase pp90rsk (*90-kDa ribosomal S6 kinase*) (Li et al., 1998). L'activation de la transcription de *MUC5AC* par *P. aeruginosa* et de *MUC2* par *Staphylococcus aureus* passe par la même voie, déclenchée par l'activation du récepteur à l'EGF (EGF-R) (Kohri et al., 2002a; Lemjabbar et Basbaum, 2002).

Les voies déclenchées par *Haemophilus influenzae* sont différentes, puisque cette bactérie peut augmenter la transcription de *MUC2* grâce à l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire du récepteur du TGF- β (*Transforming Growth Factor* β) et de Smad (*Smad/MAD related protein*)^{3/4} mais aussi par l'intermédiaire de l'activation du récepteur TLR (*Toll-Like Receptor*)-2 (Jono et al., 2002).

H. influenzae active la transcription de *MUC5AC* de façon plus complexe, en activant plusieurs activateurs et inhibiteurs de la voie des MAP kinases et en inhibant la phosphatidylinositol-3 kinase et Akt (Wang et al., 2002). Les mécanismes d'activation de la transcription des mucines sécrétoires par les cytokines pro-inflammatoires impliquent l'activation des MAP kinases, qui agissent ensuite par activation de la cyclooxygénase 2 (Kim et al., 2002), du récepteur de l'acide rétinoïque (Koo et al., 2002) ou de MSK (*Mitogen- and Stress-activated Kinase*)-1 et CREB (*c-AMP Response Element-Binding protein*) (Song et al., 2003a). Les protéases comme l'élastase peuvent également augmenter la transcription et augmenter la stabilité des ARN messagers de

MUC5AC (**Fischer et Voynow, 2002**) et de *MUC4* (**Fischer et al., 2003**) par induction de production d'espèces réactives de l'oxygène et par activation du récepteur à l'EGF (**Kohri et al., 2002b**). Les ligands de l'EGF sont également capables d'augmenter la transcription de *MUC5AC* et *MUC2* par activation de la voie des MAP kinases (**Perrais et al., 2002**), ce qui pourrait jouer un rôle dans les processus de tumorigenèse, comme le suggère la surexpression de *MUC2* dans les cancers du larynx (**Jeannon et al., 2001**).

Troisièmement, en cas de stimulations chroniques ou répétées des voies de signalisation de l'EGF ou de l'infiltration leucocytaire, la régulation du nombre de cellules caliciformes permet de moduler à une plus grande échelle la quantité de mucus produite et sécrétée (**Burgel et al., 2000; Kim et al., 2004**). Dans l'épithélium respiratoire de surface des patients atteints de pathologies respiratoires induisant une inflammation chronique, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme ou la mucoviscidose, les cellules caliciformes sont généralement beaucoup plus nombreuses que dans l'épithélium respiratoire sain.

Tous ces mécanismes de régulation sont stimulés de façon excessive dans les pathologies respiratoires avec inflammation et infection chroniques, ce qui cause un dysfonctionnement du mécanisme de clairance mucociliaire en créant un déséquilibre entre le nombre de cellules ciliées et la quantité de mucus sécrétée, menant à une obstruction partielle ou totale des voies

respiratoires. Dans l'asthme, une surproduction de MUC2 a été démontrée (**McNamara et al., 2004**), et il a été suggéré qu'une dérégulation de la production de mucines par l'intermédiaire de la suractivation des voies décrites ci-dessus pourrait jouer un rôle majeur dans la morbidité et la mortalité associées à cette pathologie (**Morcillo et Cortijo, 2006**). Dans la mucoviscidose, l'hyperplasie des cellules caliciformes (**Groneberg et al., 2002**) participe à la diminution de l'efficacité de la clairance mucociliaire, sans doute plus par la diminution de la densité des cellules ciliées qu'elle induit que par une surproduction de mucines, car la sécrétion de MUC5AC et MUC5B semble diminuée chez les patients atteints de mucoviscidose (**Henke et al., 2004**). Dans cette même pathologie, il a été avancé que des modifications de la glycosylation des mucines pourrait participer à l'altération de la rhéologie du mucus et au défaut de clairance mucociliaire (**Xia et al., 2005**) mais ce point reste discuté car une autre équipe a montré que la glycosylation des mucines sécrétées par les glandes de la sous-muqueuse n'est pas altérée dans la mucoviscidose (**Schulz et al., 2005**). La viscosité excessive du mucus dans cette pathologie (**Lethem et al., 1990**) est donc probablement due à un déficit d'hydratation de la surface épithéliale et/ou à des modifications de la structure du réseau tridimensionnel formé par les mucines sécrétoires plutôt qu'à une surproduction ou à une glycosylation excessive des mucines. A l'inverse, la suractivation des voies de signalisation de l'EGF est impliquée dans la surproduction de MUC5AC associée à l'obstruction des voies respiratoires dans la

bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (**Takeyama et al., 2001**). Dans la BPCO, les voies de régulation de la synthèse de MUC5AC par les médiateurs de l'inflammation peuvent également être responsables de la surabondance de mucus et du défaut de la clairance mucociliaire (**Baginski et al., 2006**). Enfin, il a été proposé que l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans les voies respiratoires, capables d'activer la dégranulation des cellules caliciformes et de déclencher l'expression et l'activation du récepteur à l'EGF, pourrait elle aussi participer à la sécrétion excessive de mucus dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (**Kim et Nadel, 2004**).

Les peptides trifoliés

La famille des peptides trifoliés, ou TFF (*Trefoil Factor Family*) comprend trois membres chez les mammifères, TFF1, TFF2 et TFF3. Chez l'homme, les gènes correspondants sont situés dans la même région du chromosome 21, bras q, région 22.3 (**Gott et al., 1996**). Ils sont impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques, comme le maintien de l'intégrité des muqueuses du système digestif (**Mashimo et al., 1996; Tomasetto et Rio, 2005**) mais leur rôle a aussi été évoqué dans des processus tumoraux (**Emami et al., 2004**).

Structure

La famille des peptides trifoliés est caractérisée par un domaine conservé contenant trois ponts

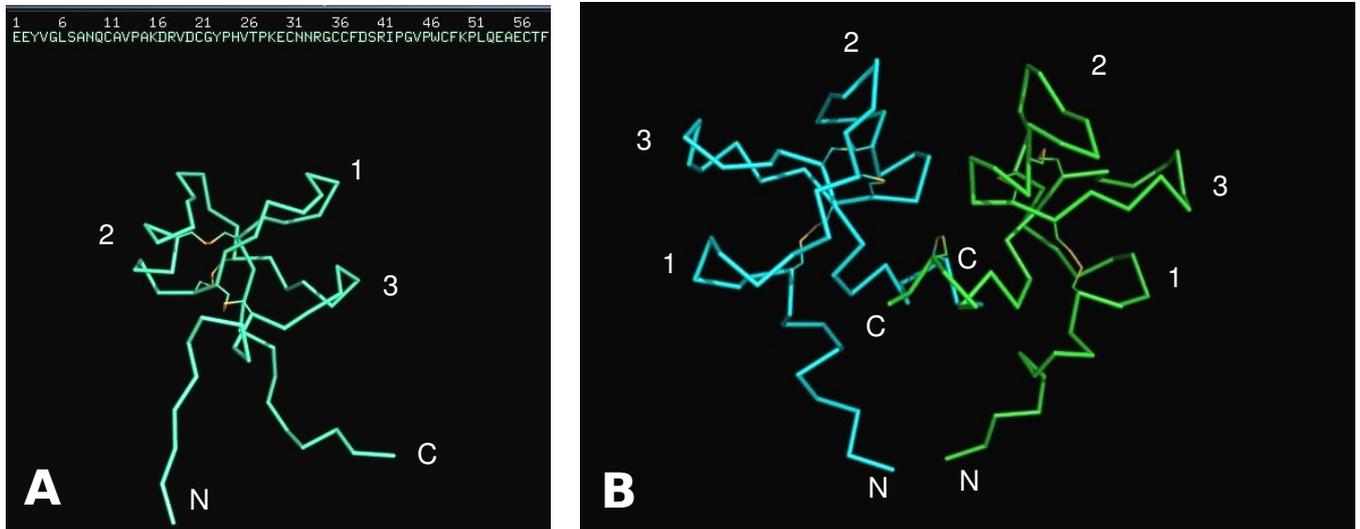


Figure 11: Structure du peptide TFF3

A: une des 85 conformations possibles de TFF3 établies par Lemercinier *et al.*, 2001

B: une des 47 conformations possibles de l'homodimère de TFF3 établies par Muskett *et al.*, 2003

Les ponts di-sulfures sont représentés par les fines lignes orangées. Les différences entre les différentes conformations portent essentiellement sur la disposition des extrémités libres (carboxy- et amino-terminales pour le monomère, amino-terminales pour le dimère)

1, 2, et 3: boucles formées par les ponts di-sulfures.

N,C: extrémités amino- et carboxy-terminales, respectivement.

| Fonction | Conditions / observations | Modèle | Peptide |
|---|-------------------------------------|--|------------------------|
| Cytoprotection | anti-inflammatoires non-stéroïdiens | Estomac de souris | TFF2 |
| | | Intestin de souris | TFF1 et TFF3 |
| | | Estomac de rat | TFF1 et TFF3 |
| | Ethanol | Estomac de rat | TFF2 et TFF3 |
| | Stress | Estomac de rat | TFF1 et TFF2 |
| | Salicylates | Estomac de rat | TFF2 |
| Réparation de lésion | Ulcération gastrique | Estomac de rat | TFF2 |
| | Dextran | Colon de rat | TFF3 |
| | Acide acétique | Rectum de rat | TFF3 |
| | Dinitrobenzène, acide sulphonique | Rectum de rat | TFF2 |
| Diminution de l'apoptose | | Colon de souris, cellules HT29 et AGS | TFF3 |
| | | Cellules IEC18, HCT116 et AGS | TFF1 |
| | | Cellules MCF-7 | TFF2 |
| Diminution de la prolifération cellulaire | | Cellules IEC18, HCT116 et AGS | TFF1 |
| | | Cellules HT29 | TFF3 |
| Augmentation de la migration cellulaire | | Cellules IEC6, HT-29 et CaCO-2 | TFF1, TFF2 et TFF3 |
| | | Cellules de la muqueuse gastrique de chien | TFF2 et TFF3 |
| | | Cellules BEAS-2B | TFF2 et TFF3 |
| | | Cellules de la cornée humaine | TFF2 et TFF3 |
| | | Monocytes humains | TFF2 et TFF3 |
| Morphogenèse | | Cellules MCF-7 | TFF2 |
| Angiogenèse | | Membrane chorio-allantoïque de poulet et cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. | TFF1 |
| Interaction avec le mucus et les mucines | | Cellules de rat et cellules humaines | TFF2, TFF3 |
| | | Cellules T84 | TFF2 et TFF3 |
| | | Solution de mucines de porc | TFF2 |
| | | Tests « double hybride » chez la levure | TFF1 |
| | | Mucines de porc et de boeuf purifiées | TFF2 et dimère de TFF3 |
| Activation de la transcription de peptides gastro-intestinaux | TFF | Estomac de souris | TFF1 |
| | TFF | Lignées cellulaires gastriques humaines | TFF2 et TFF3 |
| | DAF | Cellules HT-29, T84 et IEC-6 | TFF3 |
| Trans-activation des voies de signalisation cellulaires | HER-1 | Cellules HT-29 | TFF3 |
| | | Cellules AGS | TFF3 |
| | HER-2 | Cellules HT-29 | TFF3 |
| | Caténine β | Cellules HT-29 | TFF3 |
| | Akt/PKB | Cellules HCT116 et IEC-6 | TFF3 |
| | | Cellules KATO-III et AGS | TFF3 |
| | ERK/ MAPK 1 et 2 | Cellules IEC-6 | TFF3 |
| | | Cellules BEAS-2B | TFF2 |
| Fixation de NF- κ B sur l'ADN | Cellules HT-29 | TFF3 | |

Tableau 1: Fonctions des peptides trifoliés (d'après Taupin et Podolsky, 2003)

di-sulfures selon le schéma 1-5 2-4 3-6, identifié à l'origine chez une grenouille africaine, *Xenopus laevis*. Ce domaine possède une grande résistance à la digestion protéolytique ainsi qu'à l'hydrolyse acide (**Jorgensen et al., 1982; Kinoshita et al., 2000**). Chez les mammifères cette famille compte trois membres, TFF1 à 3, dont les gènes sont groupés sur le chromosome 21 (**Gott et al., 1996; Seib et al., 1997**). TFF1 est synthétisé sous forme d'un précurseur de 84 acides aminés, et le peptide mature, après clivage du peptide signal comporte 60 acides aminés et un domaine en trèfle. De même, le propeptide TFF3 comprend 74 acides aminés et le peptide mature en compte 59. TFF3 ne contient également qu'un seul domaine en trèfle (Figure 11). Une cystéine libre proche de l'extrémité carboxy-terminale permet l'homodimérisation de TFF1 et de TFF3. TFF2 est traduit sous forme d'un précurseur de 129 acides aminés, et le peptide mature contient 106 acides aminés et deux domaines en trèfle, mais pas de cystéine libre (**De et al., 1994; Muskett et al., 2003; Williams et al., 2001**). Les données concernant la nécessité d'une dimérisation de TFF1 ou de TFF3 pour leur activité biologique sont contradictoires, certaines études ayant démontré la nécessité d'une dimérisation (**Marchbank et al., 1998; Prest et al., 2002**) alors que d'autres ont montré une efficacité comparable du monomère et du dimère (**Carrasco et al., 2004**).

Expression et fonctions

Les peptides trifoliés sont sécrétés par les cellules muqueuses (Figure 12) de nombreux épithéliums muqueux (tableau 1) dans lesquels ils exercent de nombreuses fonctions (**Taupin et Podolsky, 2003**). Ils sont capables de modifier les propriétés rhéologiques du mucus *in vitro* grâce à leur interaction avec les mucines (**Thim et al., 2002**). TFF1 est aussi capable d'induire la migration dans la lignée cellulaire tumorale mammaire MCF-7 (**Prest et al., 2002**), et sa

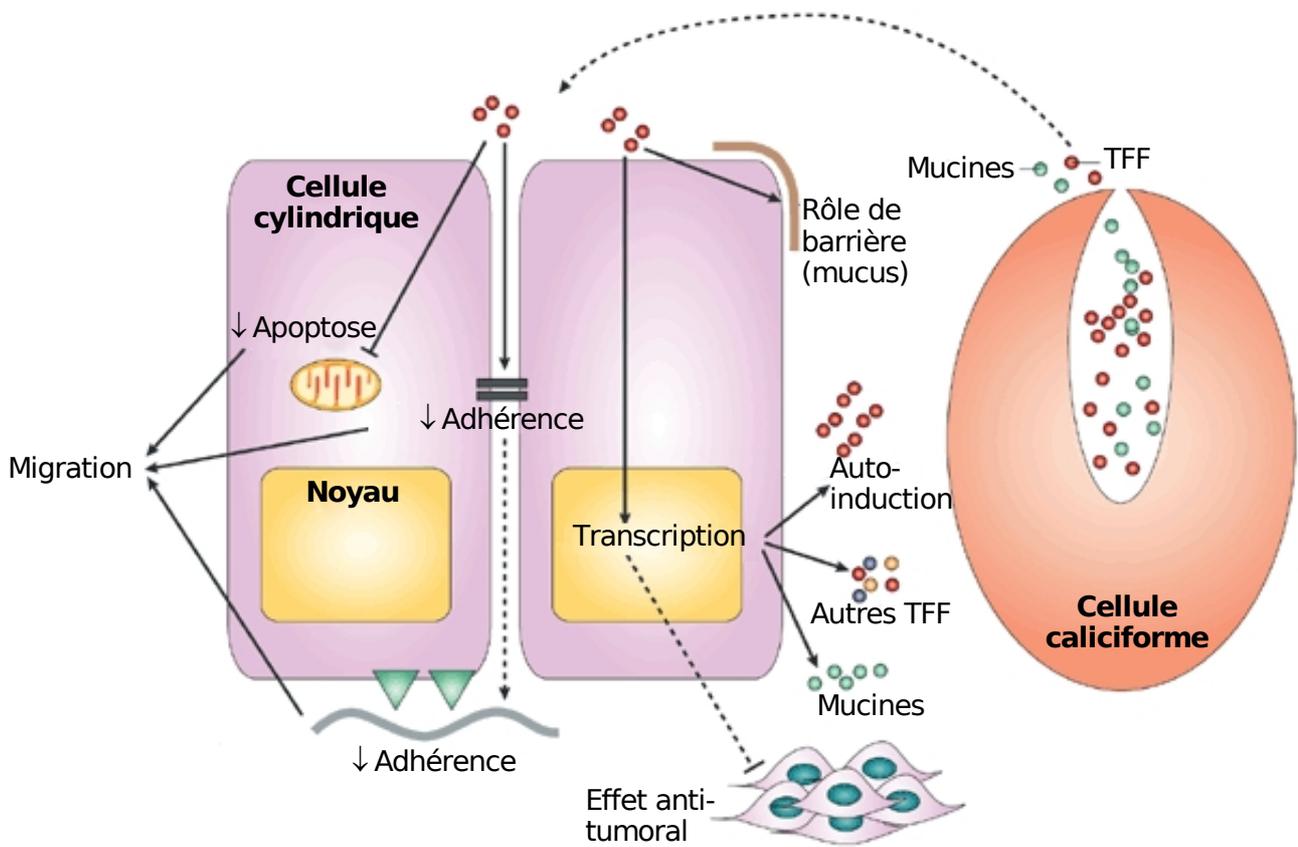


Figure 12: Rôles des TFF dans les épithéliums muqueux

Les fonctions démontrées sont représentées par des traits pleins, et les rôles supposés par des pointillés. La sécrétion coordonnée des mucines et des TFF par les cellules muqueuses (cellules caliciformes) permet la mise en place de la barrière de mucus. Les TFF affectent aussi la signalisation cellulaire: la migration résulte de la diminution de l'adhérence intercellulaire et cellule-matrice, et de l'inhibition de l'apoptose par anoïkis. Les TFF sont capables d'induire leur propre expression (auto-induction), ainsi que l'expression des autres TFF et des mucines. L'inhibition de la tumorigenèse passerait également par la modulation de la transcription. D'après Taupin et Podolsky, 2003.

surexpression dans le cancer du sein chez l'Homme a été démontrée (**Crosier et al., 2001**). Cependant, certains auteurs ont démontré que TFF1 serait un marqueur des tumeurs peu différenciées, et prédirait donc une bonne sensibilité à la thérapie et serait associé à un bon pronostic (**Corte et al., 2005; Sanchez Salmon et al., 2005**). TFF1 est aussi surexprimé dans certains carcinomes de la peau (**Hanby et al., 1998**) et de la thyroïde (**Wang et al., 1998**), mais réprimé dans les cancers gastriques (**Kirikoshi et Katoh, 2002**), et sa suppression cause l'apparition de lésions pré-cancéreuses dans l'estomac (**Berr et al., 2003; Saukkonen et al., 2003**). Dans les conditions physiologiques, TFF1 est fortement exprimé dans l'estomac, où il joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse (**Marchbank et al., 1998**) et dans la différenciation cellulaire (**Bossenmeyer-Pourie et al., 2002; Karam et al., 2004**). Ses effets combinés ont conduit à le présenter comme un gardien essentiel de l'intégrité de la muqueuse gastrique (**Tomasetto et Rio, 2005**). Certains auteurs ont rapporté la transcription de TFF1 dans l'épithélium des voies aériennes proximales (**Lee et al., 2001; dos Santos Silva et al., 2000**) mais le peptide est indétectable dans l'épithélium bronchique (**Wiede et al., 1999**). Il reste possible que son expression dans certaines conditions joue un rôle dans la physiologie de l'épithélium respiratoire.

Certains auteurs ont montré que TFF2 peut augmenter la migration des lignées MCF-7 et MDA-MB231 (**May et al., 2004**), alors que d'autres ont démontré une absence d'effet motogène mais un effet anti-apoptotique et morphogène (**Lalani et al., 1999**). Les effets de TFF2 ont aussi été étudiés dans des lignées cellulaires d'origine respiratoire: il induit la migration des cellules BEAS-2B en synergie avec l'EGF (**Chwieralski et al., 2004; Oertel et al., 2001**), et cet effet a été confirmé sur des cultures primaires de cellules bronchiques humaines (**Oertel et al., 2001**). Bien ce peptide ne soit pas exprimé dans l'appareil respiratoire humain (**Lee et al., 2001; Wiede**

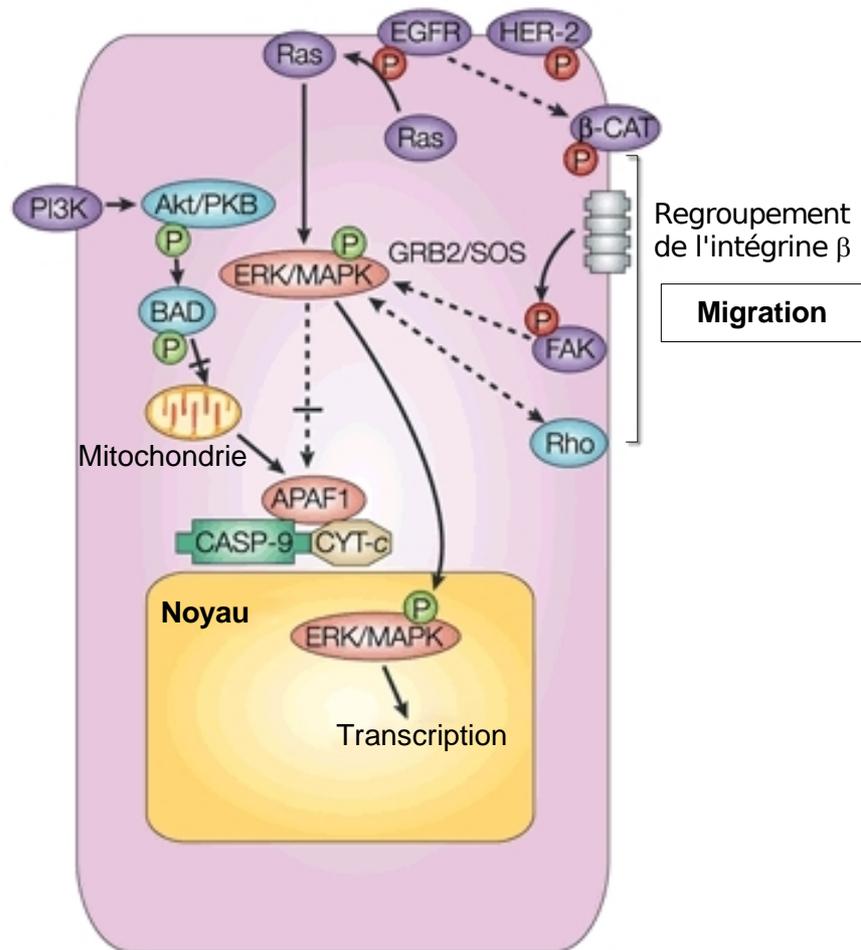


Figure 13: Voies de signalisation empruntées par les TFF

Les voies dont l'implication est démontrée sont représentées par des traits pleins, et les voies supposées par des pointillés. Les cercles rouges représentent des phosphorylations sur des tyrosines, et les cercles verts des phosphorylations sur des sérines ou des thréonines. D'après Taupin et Podolsky, 2003.

et al., 1999; dos Santos Silva *et al.*, 2000), il pourrait y jouer un rôle dans certaines pathologies, notamment l'asthme: son expression a en effet été observée dans un modèle murin de cette pathologie (Nikolaidis *et al.*, 2003).

TFF3 est par ailleurs indispensable au maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale (Taupin et Podolsky, 2003). L'expression de TFF3 dans l'hypothalamus et la glande pituitaire a même conduit à lui attribuer un rôle de neuropeptide (Probst *et al.*, 1996; Schwarzberg *et al.*, 1999; Jagla *et al.*, 2000). TFF3, dont les structures monomériques et dimériques ont été déterminées par résonance magnétique nucléaire (Lemerclinier *et al.*, 2001; Muskett *et al.*, 2003), est exprimé constitutivement par l'épithélium respiratoire; c'est le peptide trifolié majoritairement retrouvé dans les voies aériennes, ou il est produit par les glandes muqueuses et par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface (Wiede *et al.*, 1999; dos Santos Silva *et al.*, 2000). Il est capable d'induire la migration des cellules BEAS-2B (Oertel *et al.*, 2001), de potentialiser l'effet de l'EGF (Chinery et Cox, 1995), de provoquer l'activation du récepteur à l'EGF et de la caténine β (Liu *et al.*, 1997), d'activer la voie akt, la phosphatidylinositol 3-kinase et la voie des *Mitogen Activated Protein* kinases (MAP kinases) (Figure 13). Ces deux derniers effets sont retenus par le peptide tronqué de son extrémité carboxy-terminale et sont donc indépendants de la dimérisation (Kinoshita *et al.*, 2000). Bien que nombre de ses effets soient dépendants du récepteur à l'EGF ou synergiques avec l'EGF, TFF3 semble incapable de se fixer directement au récepteur de l'EGF et n'a aucun récepteur connu (Otto et Thim, 2005).

Certains auteurs ont avancé que des co-localisations spécifiques entre TFF et mucines pourraient jouer un rôle dans la protection et/ou la régénération des épithéliums muqueux (Wright, 2001), ce qui pourrait expliquer leurs effets parfois contradictoires. Leur surexpression

en cas d'inflammation et en bordure de lésion, notamment dans l'estomac (**Taupin et al., 2001**), suggère un effet paracrine: leur sécrétion par les cellules environnant la lésion permettrait la régénération rapide des zones lésées. Cependant, le rôle des TFF, et en particulier de TFF3, dans la protection ou la régénération de l'épithélium respiratoire n'est pas connu.

Les autres composants du mucus

Le mucus peut aussi contenir d'autres éléments selon les conditions physiologiques, notamment des lipides (**Widdicombe, 1987**) et de l'ADN, particulièrement en cas d'infection et/ou d'inflammation. Ces composants sont capables d'augmenter la viscosité du mucus. Ils sont présents en grande quantité dans le mucus des patients atteints de mucoviscidose. Ils participent au défaut de clairance mucociliaire dans cette pathologie (**Galabert et al., 1987; Puchelle et al., 2002**) et peuvent être des cibles pour la correction d'anomalies de la clairance mucociliaire (**Harms et al., 1998**).

B.III Différenciation de l'épithélium respiratoire humain

L'appareil respiratoire humain se forme à partir de la cinquième semaine de gestation. La trachée se forme à partir de l'endoderme laryngo-trachéal, puis, par dichotomies inégales successives, donne naissance aux 16 premières générations de bronches, qui sont achevées à la seizième semaine de gestation. Cette première étape est très reproductible, signe de sa programmation génétique stricte. Les sept divisions suivantes, qui vont donner naissance aux vingt-trois générations finales, suivent, elles, des schémas variables, et se poursuivent jusqu'à la vingt-quatrième semaine.

L'alvéolisation, phase finale de la morphogenèse pulmonaire, commence entre 28 et 30 semaines de gestation et n'est complète que chez l'enfant de sept ans, au plus tôt. L'organogenèse pulmonaire n'est complétée que longtemps après la naissance, mais les mécanismes de défense doivent, eux, être opérationnels dès le contact avec les contaminants de l'air ambiant, c'est-à-dire dès la naissance. C'est pour cela que la différenciation ciliée des voies aériennes commence dès la septième semaine de gestation, la différenciation de la trachée commençant à 11 ou 12 semaines (**Gaillard *et al.*, 1989; Moscoso *et al.*, 1988**). La différenciation des cellules caliciformes et des cellules de Clara commence aux treizième et dix-neuvième semaines de gestation, respectivement (**Jeffery *et al.*, 1992**).

B.III.1 Différenciation sécrétoire

La différenciation des cellules de phénotype sécrétoire commence à la dixième semaine de gestation, avec les cellules neuroendocrines (**Jeffery et al., 1992**). Les cellules mucosécrétrices apparaissent plus tard, probablement sous l'influence de divers facteurs, dont des cytokines pro-inflammatoires. Au cours du développement, les cellules de Clara apparaissent plus tard que les cellules caliciformes; cependant, chez l'adulte, une hyperplasie des cellules caliciformes peut apparaître à partir de cellules de Clara, notamment sous l'influence de l'EGF (**Nadel, 2001**). De même, chez la souris, les cellules de Clara ne produisent-elles des mucines qu'en cas d'inflammation (**Evans et al., 2004**). La différenciation des cellules caliciformes est aussi influencée par la réponse immunitaire (**Ahlstedt et Enander, 1987**). En culture, la présence d'une matrice basale adéquate est indispensable à la différenciation des cellules muqueuses (**Chevillard et al., 1993; Wu et al., 1990**), de même que la présence d'acide rétinolique (**Koo et al., 1999; Wu et al., 1990; Million et al., 2001**) Chez le singe, une forte concentration en calcium favorise l'apparition de cellules sécrétoire muqueuses (**Martin et al., 1991**).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des cellules sécrétoires de l'épithélium respiratoire humain sont mal connus. Chez la souris, le facteur de transcription FoxA1 α (Forkhead bOX A1 α) favorise la différenciation des cellules de Clara durant l'embryogenèse, mais les effets de son absence disparaissent après la naissance (**Besnard et al., 2005**). L'absence de FoxA2 semble nécessaire à la différenciation correcte des cellules sécrétoires, sa présence orientant la différenciation vers un phénotype cilié (**Wan et al., 2004**). De même, les médiateurs de l'inflammation, comme l'IL13, favorisent la différenciation sécrétoire au détriment de la différenciation ciliée, ce qui pourrait jouer un rôle dans certaines

pathologies respiratoires, comme l'asthme (**Laoukili et al., 2001**).

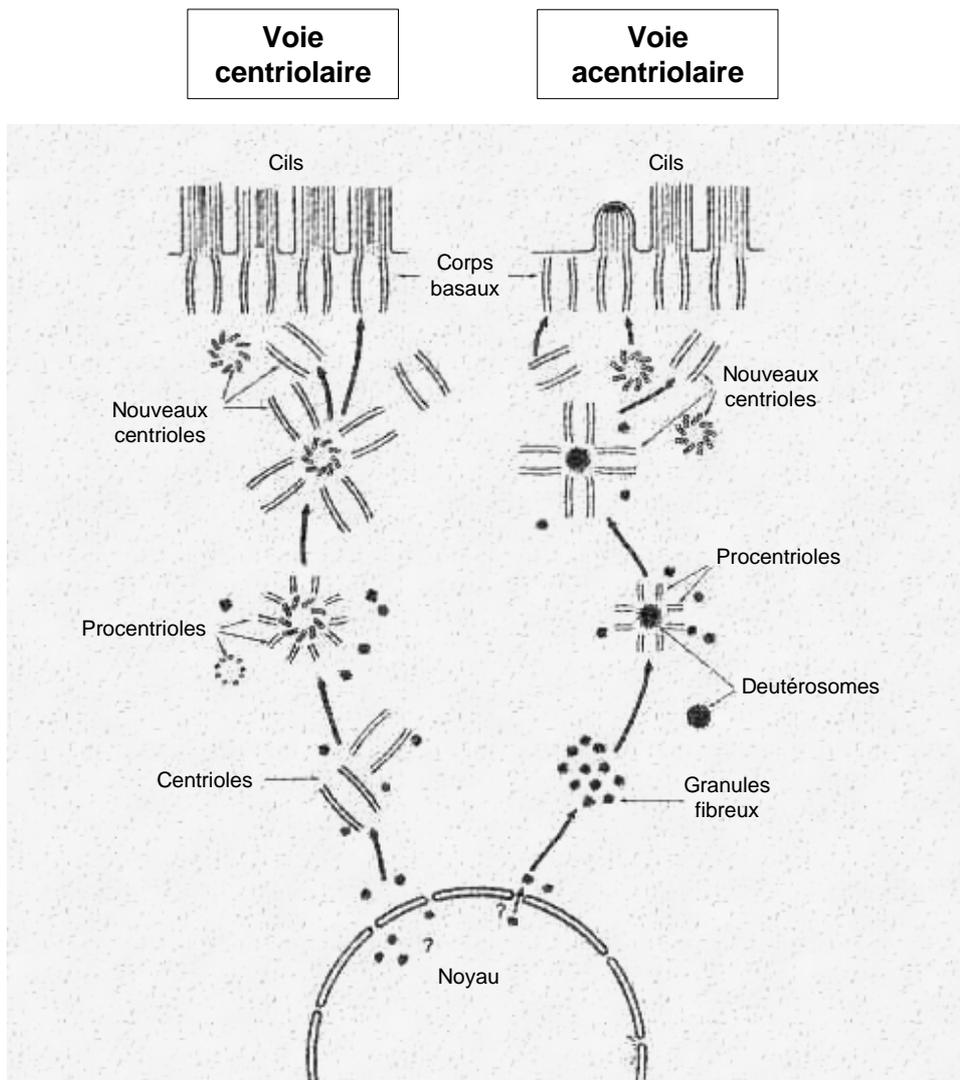


Figure 14: Ciliogenèse

Les cils se développent à partir de corps basaux, qui sont des structures centriolaires ancrées à la membrane plasmique. Les corps basaux s'assemblent majoritairement *de novo* autour de corps denses, les deuterosomes, qui se condensent dans des zones fibrogranuleuses (voie acentriolaire). Environ 5 % des corps basaux s'assemblent à partir de centrioles pré-existants (voie centriolaire). D'après Lemullois *et al.*, 1988

B.III.2 Différenciation ciliée

La différenciation des cellules épithéliales ciliées, ou ciliogenèse, est un processus de différenciation terminale. Il est caractérisé par la mise en place de structures hautement spécialisées à la surface apicale de la cellule, les cils. Ces structures se développent à partir de cinétosomes, ou corps basaux, composés de neuf triplets de microtubules dans leur partie basale, donnant naissance aux neuf doublets de la partie proximale, comme les centrioles centrosomiaux. Les corps basaux sont situés à la base des cils, et sont associés à des structures secondaires d'ancrage: le pied basal, qui relie la bases du cil au réseau de microtubules, et la racine striée du côté opposé. Chaque triplet proximal du cinétosome donne naissance à l'un des doublets de la partie proximale, l'un des trois microtubules se terminant à l'intérieur du corps basal. Les cinétosomes peuvent se former selon deux mécanismes: à partir d'un centriole (cinétosome) préexistant (mode centriolaire) ou *de novo* (mode acentriolaire) (**Anderson et Brenner, 1971**).

Le mode acentriolaire est largement prédominant puisqu'il est à l'origine de 95% des cinétosomes (**Anderson et Brenner, 1971**). Les cinétosomes créés de cette manière naissent dans la région supranucléaire des cellules épithéliales, autour de structures condensées, les deutérosomes, qui émergent au sein d'amas fibro-granulaires. Les cinétosomes migrent ensuite dans le cytoplasme jusqu'à la région sous-membranaire apicale, et s'ancrent à la membrane plasmique pour donner naissance au cil (Figure 14). Ce processus est bien décrit au niveau structurel grâce à de nombreuses études en microscopie électronique (**Hagiwara et al., 2004**). Les corps basaux en migration sont facilement identifiables en microscopie électronique en transmission, du fait de leur structure particulière et de leur grande densité aux électrons. Une

fois ancré à la membrane apicale, chaque corps basal va donner naissance à un cil, par extension des doublets de microtubules de la partie proximale.

Plus récemment, les mécanismes moléculaires à la base de la ciliogenèse ont été étudiés, notamment à l'aide de modèles de souris transgéniques et grâce et à l'émergence de nouvelles techniques de culture. On sait ainsi que la présence d'acide rétinoïque (**Gray et al., 1996; Million et al., 2001**) et d'une matrice basale adéquate (**Wu et al., 1990; Chevillard et al., 1993**) sont essentielles à la différenciation ciliée de l'épithélium respiratoire, et il apparaît que le récepteur erbB2, de la famille des récepteurs à l'EGF, peut aussi être impliqué (**Vermeer et al., 2006**). L'activation de la caténine beta semble aussi essentielle à la différenciation des cellules ciliées (**Mucenski et al., 2005**). L'environnement physique joue probablement aussi un grand rôle dans la différenciation ciliée de l'épithélium respiratoire; en effet, s'il est possible d'obtenir des cellules sécrétrices en culture classique, les cellules ciliées se dédifférencient rapidement dans de telles conditions; seules les cultures organotypiques en trois dimensions (**Chevillard et al., 1993; Hanamura et al., 1994; Neugebauer et al., 2003; Castillon et al., 2004**) ou la culture à l'interface air / liquide (**Gray et al., 1996; Rhee et al., 2001**) permettent de conserver un phénotype cilié. Les modèles organotypiques permettent aussi une ciliogenèse et une redifférenciation limitées, alors que le modèle de culture à l'interface air / liquide permet d'obtenir un épithélium respiratoire pleinement différencié à partir de cellules complètement dédifférenciées.

Le facteur de transcription à boîte Forkhead FoxA2 est crucial dans la détermination entre différenciation ciliée et différenciation sécrétoire (**Wan et al., 2004**). D'autres gènes plus spécifiques ont été identifiés, comme celui du facteur de transcription FOXJ1 (**Brody et al., 2000**), essentiel pour l'ancrage correct des corps basaux à la membrane apicale (**You et al.,**

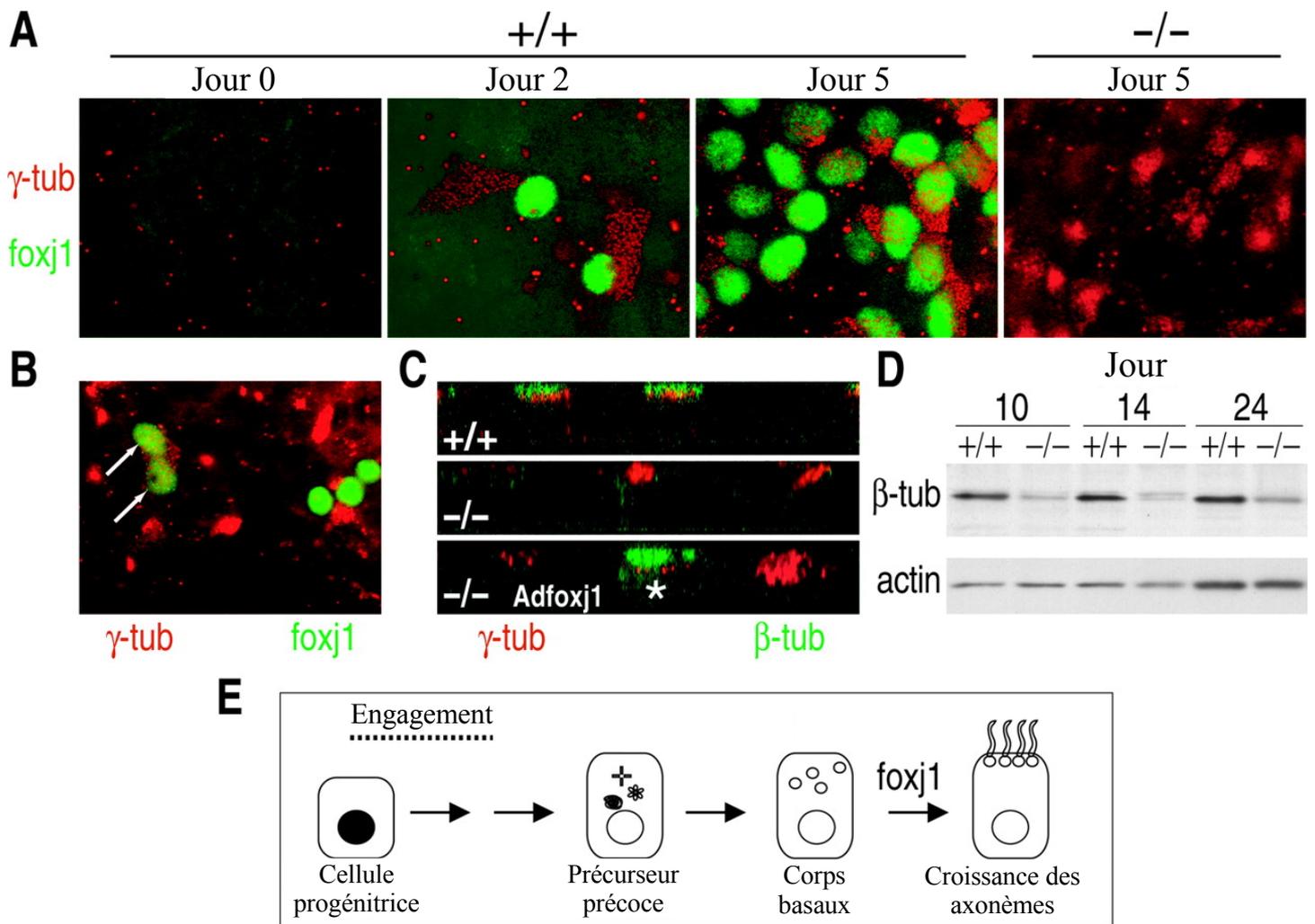


Figure 15: Rôle de FOXJ1 dans la ciliogenèse

La ciliogenèse a été étudiée dans des cellules épithéliales de souris sauvages (+/+) ou déficientes pour le facteur de transcription FOXJ1 (-/-) dans un modèle de culture cellulaire à l'interface air / liquide. Le marquage de la tubuline γ (γ -tub) est utilisé pour identifier les corps basaux, celui de la tubuline β (β -tub) permet de visualiser les cils.

A: Les cellules de souris sauvage expriment FOXJ1 (vert) et la tubuline γ (rouge) dès le deuxième jour de culture. Au jour 5, de très nombreuses cellules expriment ces deux marqueurs. Dans les souris déficientes pour FOXJ1, la tubuline γ est exprimée dans de nombreuses cellules au jour 5, mais FOXJ1 est absent.

B: Les cellules des souris déficientes pour FOXJ1 transfectées par un vecteur permettant l'expression de FOXJ1 (**Adfoxj1**) présentent un marquage FOXJ1 nucléaire au jour 5.

C: L'observation en microscopie confocale (plan Y/Z) permet d'identifier la présence de cils (vert) associés aux corps basaux (rouge) dans les cellules de souris sauvages au jour 5. Les cellules de souris déficientes pour FOXJ1 contiennent des corps basaux (rouge) désorganisés, mais pas de cils. La ciliogenèse (*) est rétablie dans les cultures de cellules déficientes complétée par FOXJ1 (**Adfoxj1**)

D: L'analyse du contenu protéique des cellules montre que l'absence de FOXJ1 inhibe la production de tubuline β .

E: Ces résultats indiquent que FOXJ1 est essentiel pour les étapes tardives de la ciliogenèse que sont l'organisation des corps basaux au pôle apical de la cellule et la synthèse des cils (d'après **You et al., 2004**).

2004) (Figure 15). En l'absence de FOXJ1, la calpastatine est moins exprimée, la calpaïne est donc plus active, et elle dégrade alors l'eitrine (**Gomperts et al., 2004**), une protéine connue pour être impliquée l'organisation des domaines apicaux des cellules épithéliales polarisées en servant d'adaptatrice entre le cytosquelette d'actine et de nombreuses protéines membranaires (notamment CFTR et les récepteurs adrénérgiques, (**Bretscher, 1999; Castillon et al., 2002**)).

Les processus moléculaires présidant à l'assemblage des corps basaux sont mal connus, et la majorité des quelques 250 protéines impliquées dans leur structure n'est pas encore caractérisée (**Dutcher, 1995**). Certaines d'entre elles pourraient intervenir dans la régulation de la ciliogenèse, comme le montre la découverte récente de l'inhibition de la ciliogenèse par l'inflammation à travers la protéine structurale ICIS-1 (**Ponsard et al., sous presse**).

B.IV Lésion et réparation de l'épithélium respiratoire

Du fait de sa grande surface et des volumes importants d'air qui y transitent, l'épithélium respiratoire est très fréquemment agressé et lésé.

B.IV.1 Principales causes des lésions de l'épithélium respiratoire

B.IV.1.1 L'inhalation de xénobiotiques

L'inhalation de polluants inorganiques est l'une des principales causes de lésion de l'épithélium respiratoire dans les populations humaines qui y sont exposées; les principales causes en sont la pollution atmosphérique (trafic automobile et pollution industrielle) ou le tabagisme. La fumée de cigarette contient de nombreux agents chimiques toxiques, mais sa complexité et sa réactivité rendent difficile l'évaluation des rôles respectifs de chacun (**Borgerding et Klus, 2005**). Les principaux polluants atmosphériques toxiques pour l'épithélium respiratoire sont le dioxyde d'azote, les particules (fines et ultrafines) et l'ozone. Le dioxyde d'azote et les particules sont formés par combustion (gaz d'échappements, cigarette, ...) et l'ozone par irradiation ultra-violet du dioxyde d'azote. Le dioxyde d'azote et l'ozone sont très peu solubles, donc peu absorbés, mais ils sont très réactifs et vont générer des radicaux libres dégradant la muqueuse. Les particules exogènes inhalées sont quand à elles responsables d'une inflammation chronique des voies respiratoires et vont donc indirectement avoir un puissant effet délétère (**Brunekreef et Holgate, 2002**). De plus, l'inhalation combinée de plusieurs types d'agents polluants conduit à

des dommages plus sévères: l'exposition à l'ozone aggrave par exemple la toxicité des particules ultrafines (**Oberdorster, 2001**).

B.IV.1.2 Les agents infectieux

La clairance mucociliaire permet d'éliminer les bactéries et les virus avant qu'ils n'entrent en contact avec les cellules épithéliales. Dans le cas d'une altération de l'efficacité de ce mécanisme, les bactéries se multiplient, et, en phase stationnaire, vont être capables de sécréter des toxines, ou facteurs de virulence, qui vont altérer la cohésion de l'épithélium par destruction des jonctions intercellulaires, altération de l'intégrité membranaire des cellules et finalement desquamation partielle ou totale de l'épithélium. Ceci cause un remaniement important de l'épithélium, avec notamment une hyperplasie mucipare qui aggrave le défaut d'activité mucociliaire, et l'exposition de récepteurs basolatéraux qui favorisent l'adhérence bactérienne (**Avadhanula et al., 2006**), permettant à une infection durable de s'installer.

De même, en cas de stase du mucus, des virus peuvent accéder aux cellules épithéliales, les infecter et causer leur desquamation (**Whiteman et al., 2003**), laissant la lame basale exposée, ce qui favorise encore l'adhérence bactérienne (**de Bentzmann et al., 1996b**).

Durant les processus de régénération, quelle que soit la cause de la lésion, l'épithélium est également plus vulnérable aux infections bactériennes, ce qui peut dans certaines pathologies comme la mucoviscidose conduire à des lésions chroniques de l'épithélium respiratoire (**de Bentzmann et al., 1996a**).

B.IV.1.3 L'inflammation

En cas d'agression, les leucocytes, (macrophages, polymorphonucléaires neutrophiles et éosinophiles) sécrètent de grandes quantités de facteurs antimicrobiens: oxydants, protéases et cytokines. S'ils sont généralement très efficaces contre les agents infectieux, ces facteurs ont l'inconvénient d'attaquer aussi les cellules épithéliales, au point que dans de nombreuses pathologies les symptômes les plus graves sont causés par la réponse immunitaire de l'hôte et non par les contaminants inhalés. L'exemple le plus flagrant est bien entendu l'asthme, pathologie dans laquelle la réponse immunitaire disproportionnée est largement responsable de la maladie. Les bronchites chroniques causées par les particules inhalées sont aussi représentatives de ce risque (**Brunekreef et Holgate, 2002**).

B.IV.1.4 L'abrasion

L'abrasion mécanique, bien que plus rare, peut aussi être une des causes de lésion de l'épithélium respiratoire. Elle est en général causée par une intervention médicale, notamment l'intubation trachéale (lors d'une anesthésie générale par exemple), ou la trachéotomie. Ces interventions peuvent causer une desquamation de l'épithélium de surface, laissant la lame basale sans protection (**Streitz et Shapshay, 1991**).

B.IV.1.5 Aggravation par les défauts génétiques

De nombreux défauts génétiques peuvent altérer les capacités de défense et/ou de régénération de l'épithélium respiratoire, le rendant ainsi plus vulnérable aux agressions extérieures. C'est par exemple le cas des dyskinésies ciliaires primaires, maladies qui sont caractérisées par une

anomalie du battement ciliaire généralement causée par une malformation ultrastructurale des cils (**Greenstone et al., 1988; Stannard et al., 2004**). Ces pathologies altèrent l'évacuation du mucus par le battement coordonné des cils et permettent donc le développement de microorganismes et l'installation d'infections chroniques (**Geremek et Witt, 2004; Kennedy et Ostrowski, 2006**). Dans la mucoviscidose, principale maladie génétique dans la population caucasienne, la fonctionnalité du canal CFTR est génétiquement altérée, conduisant entre autres à une dérégulation de l'équilibre hydrique du mucus et donc également à une altération dramatique de la clairance mucociliaire et au développement d'infections chroniques (**Boucher, 2002**).

B.IV.2 Modèles de restauration d'un épithélium de surface fonctionnel

Afin d'étudier les mécanismes de régénération de l'épithélium respiratoire, de nombreux modèles de lésion, réparation ou de différenciation ont été développés, *in vivo* chez des animaux, *ex vivo* à partir de tissus humains ou animaux, et enfin des modèles *in vitro* permettant une manipulation plus facile.

B.IV.2.1 Les modèles in vivo

De nombreux modèles de lésions chez l'animal (rat, hamster, cochon d'inde, souris, furet) ont été développés afin de mimer les différents types de lésions naturelles et les défauts génétiques. Ces modèles permettent d'étudier la régénération dans les conditions physiologiques, et ainsi d'étudier l'implication de différents facteurs comme l'inflammation ou le polymorphisme génétique. Ces modèles ont permis de mimer l'exposition aux xénobiotiques, comme le nickel chez le hamster (**Adalis et al., 1978**), le NO₂ chez le rat et le hamster (**Gordon, 1985**), l'ozone chez le macaque (**Wilson et al., 1984**), ou l'acétaldéhyde chez le rat, ou encore d'étudier la régénération de l'épithélium après métaplasie malpighienne chez le rat (**Bootz et Reuter, 1992**). Plus récemment, les progrès de la transgénèse chez la souris ont permis l'émergence de modèles de maladies génétiques, comme la mucoviscidose, permettant de tester diverses thérapies, particulièrement les différentes techniques de thérapie génique (**Bragonzi et Conese, 2002; Hyde et al., 1993; Manson et al., 1997**). Ces modèles sont les plus proches de la réalité physiologique, mais ils sont difficiles d'accès et limitent l'étude dynamique des mécanismes de

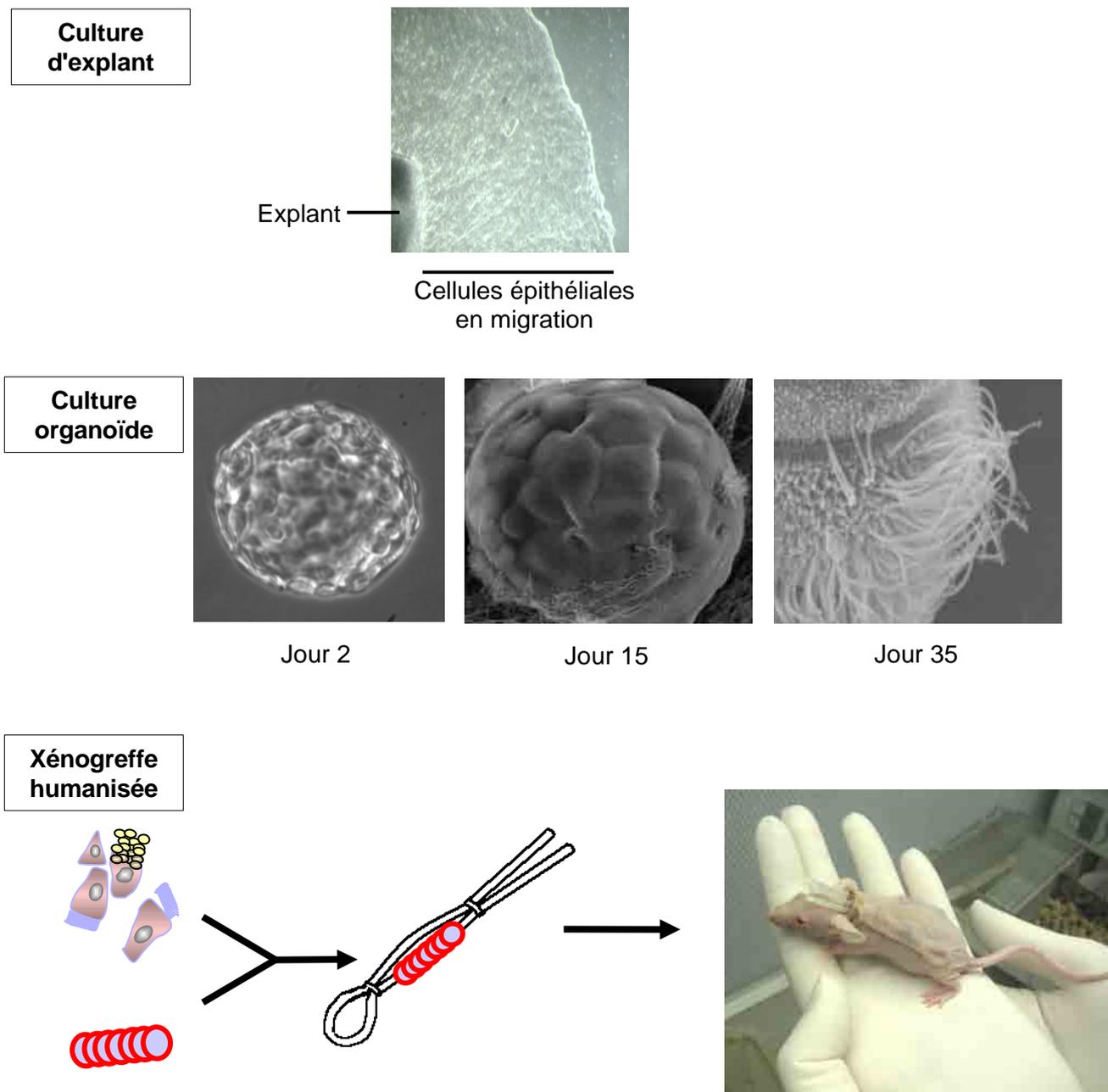


Figure 16: Modèles d'étude *ex vivo*.

Culture d'explant: un fragment de tissu respiratoire est mis en culture. Les cellules épithéliales en contact avec la surface de culture s'étalent et migrent. Ce modèle permet de mimer la phase précoce de la régénération (d'après Zahm *et al.*, 1991).

Culture organoïde: des cellules dissociées de l'épithélium respiratoire sont cultivées en suspension, sous agitation. Elles forment alors des sphéroïdes, au sein desquels elle se différencient. Ce modèle permet l'étude de la différenciation (d'après Castillon *et al.*, 2001).

Xénogreffe humanisée: des cellules dissociées de l'épithélium respiratoire sontensemencées dans des trachées de rat dénudées de leur propre épithélium, puis greffées sous la peau de souris immunodéficientes (ici, une souris *nude*). Ce modèle permet de reproduire toutes les étapes de la régénération de l'épithélium respiratoire (d'après Dupuit *et al.*, 2000).

régénération. De plus, de grandes différences dans l'organisation de l'épithélium respiratoire existent entre les différentes espèces couramment utilisées, et l'extrapolation à l'Homme des résultats obtenus dans ces modèles peut s'avérer hasardeuse.

B.IV.2.2 Les modèles ex vivo

L'organisation de l'appareil respiratoire est très variable selon l'espèce, ce qui rend difficile l'extrapolation à l'homme des données obtenues dans les modèles animaux *in vivo*. De plus, la complexité des modèles *in vivo* peut parfois se révéler gênante lorsqu'il s'agit de disséquer plus précisément l'un ou l'autre des facteurs impliqués. Enfin, la mesure de certains paramètres physiologiques, comme la fréquence de battement ciliaire, ne peut s'effectuer qu'à l'extérieur du système respiratoire.

Des modèles *ex vivo* (culture organoïde, xénogreffe, culture d'explants) ont donc été utilisés, à partir de prélèvements de tissus humains (**Bacconnais et al., 1999; Castillon et al., 2004; Dupuit et al., 2000; Gamarra et al., 2006**) ou animaux (**Levrier et al., 1989; Pool-Zobel et al., 1990**) (Figure 16).

Ces modèles permettent notamment l'étude de matériel humain dans des conditions éthiques acceptables, et, chez l'animal, des études toxicologiques s'affranchissant des effets systémiques des molécules utilisées. Certains paramètres dynamiques restent difficilement accessibles avec ces techniques, notamment l'établissement de la jonctionnalité épithéliale (résistance trans-épithéliale, imperméabilité au nitrate de lanthane) ou de la différence de potentiel trans-épithéliale.

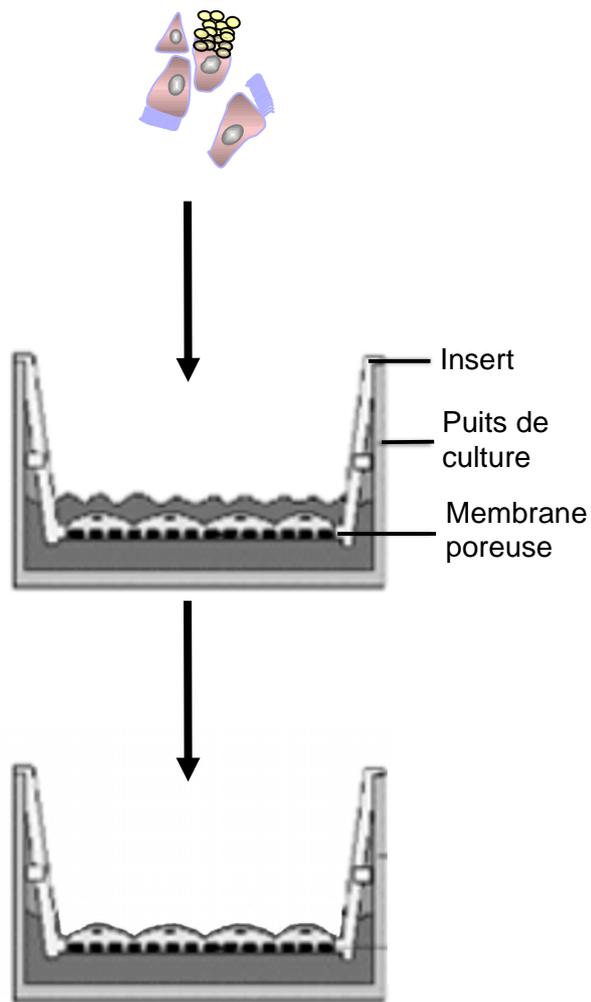


Figure 17: Culture de cellules à l'interface air-liquide.

Des cellules dissociées de l'épithélium respiratoire sont cultivées sur membrane poreuse dans un milieu adapté. Lorsqu'elles atteignent la confluence, le milieu apical est éliminé pour permettre aux cellules de se différencier au contact de l'air. Ce modèle permet de reproduire toutes les étapes de la régénération de l'épithélium respiratoire et permet un accès total à l'épithélium en cours de régénération ou de différenciation.

B.IV.2.3 Les modèles in vitro

Afin de suivre plus précisément les mécanismes impliqués dans la réparation de lésions et la régénération épithéliale, des modèles de lésion *in vitro* ont été développés: lésion chimique (**Buisson et al., 1996; Zahm et al., 1997**) ou mécanique (**Garat et al., 1996; Zahm et al., 1991**) d'une couche cellulaire pour étudier la phase de migration.

Avec le développement des techniques de culture cellulaire sont apparus des modèles permettant de mimer la régénération de l'épithélium respiratoire jusqu'à sa différenciation complète *in vitro*, dans des environnements complètement contrôlés et encore plus accessibles.

Ces modèles sont basés sur la culture des cellules sur membrane poreuse en double chambre, à l'interface air / liquide (Figure 17). Ils permettent de mesurer de nombreux paramètres physiologiques, comme la résistance trans-épithéliale (**Rowe et al., 2004**), la fréquence de battement ciliaire (**Rhee et al., 2001**), de façon dynamique au cours de la régénération.

Malgré leur grande accessibilité, ces modèles ont un défaut majeur: ils sont incapables d'intégrer la réponse de l'organisme à la lésion, et certains facteurs essentiels, comme la participation du mésenchyme ou de l'inflammation, en sont absents.

B.IV.3 Mécanismes impliqués dans la réparation des lésions

La régénération de l'épithélium respiratoire lésé fait intervenir de nombreux processus, comme la migration et la prolifération cellulaires, et la perception par chaque cellule de son environnement immédiat permettant l'établissement des jonctions intercellulaire et enfin la différenciation. Tous ces mécanismes doivent être bien coordonnés afin de permettre le rétablissement correct et rapide des fonctions de protection de l'épithélium respiratoire (**Puchelle et al., 2006**).

B.IV.3.1 Détection de la lésion

Afin d'initier les processus de régénération, il est évident que les cellules épithéliales doivent percevoir la nécessité de la réparation de l'épithélium. Les mécanismes de détection des lésions de l'épithélium respiratoire sont encore mal connus; en cas de desquamation totale d'une zone, la levée des inhibition de contact joue probablement un rôle.

En cas de desquamation partielle, le relâchement des contraintes mécaniques pourrait être détecté par l'intermédiaire des jonctions intermédiaires (**Waters et al., 2002**). Le relargage de molécules pro-inflammatoires et de facteurs de croissance par les cellules lésées est cependant certainement l'un des signaux majeurs, avec le démasquage de récepteurs basolatéraux rendus accessibles aux ligands apicaux par la rupture des jonctions serrées et la perte de l'intégrité de l'épithélium

B.IV.3.2 Migration

Une fois les signaux appropriés perçus, les cellules bordant la lésion s'étalent pour couvrir le maximum de surface, en utilisant leurs microvillosités comme réservoirs de membrane pour augmenter rapidement leur surface. Dans le cas d'une lésion étendue, elles migrent jusqu'à recouvrir et protéger la totalité de la lame basale dénudée. Ceci s'accompagne d'une dédifférenciation, avec acquisition de caractères mésenchymateux.

Cette étape permet de restaurer une protection limitée: la monocouche cellulaire ainsi formée est toujours perméable aux petites molécules solubles, mais les sites d'ancrage des bactéries à la lame basale sont masqués.

B.IV.3.3 Prolifération

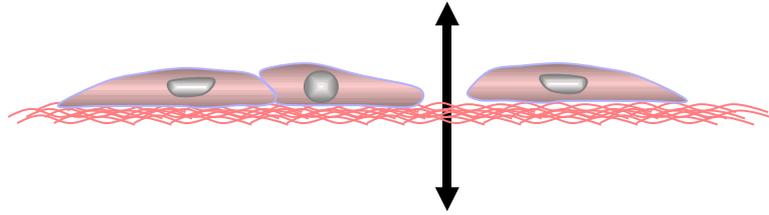
Les cellules prolifèrent ensuite pour former un épithélium stratifié composé de plusieurs couches de cellules cuboïdales couvertes d'une couche de cellules étalées malpighiennes.

A ce stade, l'épithélium est étanche et protège efficacement l'organisme contre les agressions. Cependant, en l'absence de cellules sécrétoires ou ciliées, il est incapable d'éliminer les contaminants inhalés.

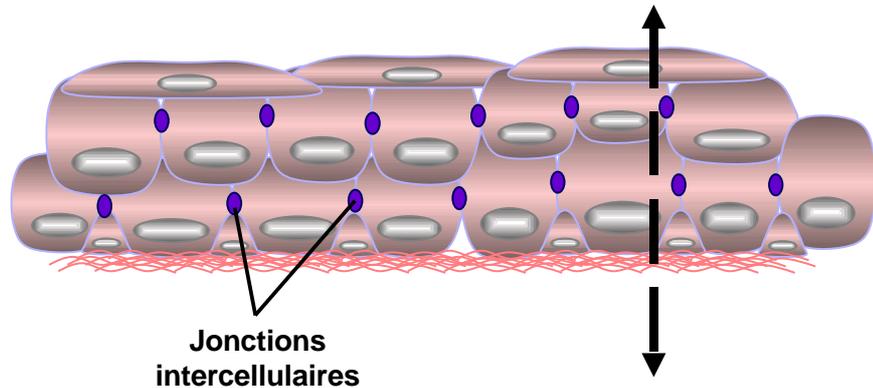
B.IV.3.4 Différenciation

Afin de recouvrer toutes ses fonctions de protection, l'épithélium doit ensuite se différencier en un épithélium respiratoire pseudostratifié mucocilié mature. Les mécanismes impliqués dans

Migration



Prolifération



Différenciation

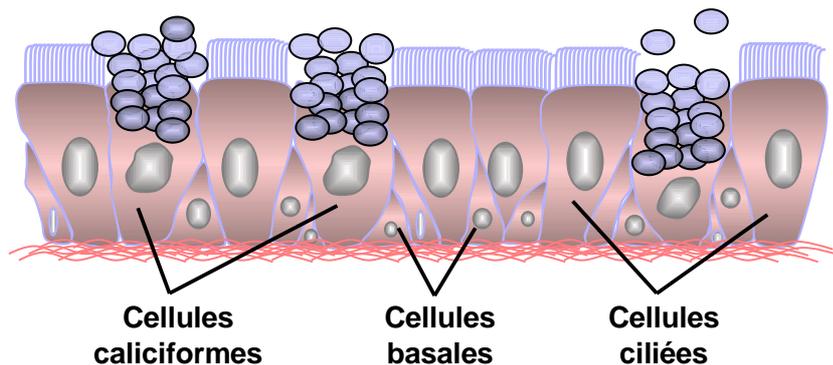


Figure 18: Régénération de l'épithélium respiratoire

Etapes de la régénération de l'épithélium respiratoire de surface:

Migration: Les cellules bordant la lésion s'étalent et migrent afin de couvrir la surface dénudée, protégeant ainsi la lame basale. A ce stade, l'épithélium est complètement perméable (double flèche).

Prolifération: Les cellules prolifèrent et forment un épithélium transitoire stratifié composé de cellules cuboïdales couvertes par une couche de cellules épithéliales de type malpighien. Les nombreuses jonctions intercellulaires assurent l'étanchéité de l'épithélium (flèche discontinue)

Différenciation: Les cellules se différencient pour former un épithélium respiratoire pseudostratifié comportant des cellules caliciformes, des cellules basales et des cellules ciliées. A ce stade, la fonction de clairance mucociliaire est restaurée.

cette transition sont complexes et induisent un remodelage complet de l'épithélium, avec probablement mort de certaines cellules, et migration, et différenciation des autres, comme le montre l'implication des métalloprotéases matricielles dans cette étape (**Coraux et al., 2005**). La différenciation ciliée et la différenciation sécrétoires se déroulent de la même façon que lors du développement foetal, mais, sans doute en raison du contexte inflammatoire, la proportion de cellules sécrétoires est bien supérieure. Ceci pourrait être un moyen d'accélérer le nettoyage des voies respiratoires. En effet, en cas d'excès de mucus par rapport à l'évacuation par le battement ciliaire, un mécanisme alternatif se met en place: la toux, qui permet d'évacuer l'excès de mucus et les contaminants associés même en l'absence de cils fonctionnels. Ainsi, l'hyperplasie sécrétoire suivant la régénération serait un mécanisme permettant d'évacuer rapidement les contaminants résiduels et éventuellement les débris cellulaires avant le rétablissement d'une fonction mucociliaire normale (**Bootz et Reuter, 1992**) (Figure 18).

Description de l'étude

C Description de l'étude

Le but de ce travail est d'élucider les rôles des peptides trifoliés (TFF) et des mucines dans la régénération de l'épithélium humain. En effet, leurs fonctions connues dans l'épithélium respiratoire restent limitées à leur participation dans la défense épithéliale, principalement à travers leur participation aux propriétés rhéologiques du mucus. Au vu des rôles importants qu'ils jouent dans la régénération et le maintien de l'intégrité de nombreux épithéliums muqueux et dans certains processus de cancérogenèse, notamment dans le système digestif, il est probable que leurs fonctions ne se limitent pas, dans l'épithélium respiratoire, à un rôle physique dans la rhéologie du mucus. Une meilleure compréhension de leur participation à la physiologie de l'épithélium respiratoire pourrait permettre de mieux caractériser certaines affections respiratoires, conduisant à une meilleure prise en charge des patient ou même au développement de nouvelles thérapies.

Afin de mieux appréhender les rôles potentiels des TFF et des mucines, nous avons tout d'abord étudié leur expression au cours de la régénération et de la différenciation de l'épithélium respiratoire de surface humain.

Nous avons pour cela utilisé un modèle de xénogreffe bronchique humanisée dans la souris *NUDE*, qui mime la régénération complète de l'épithélium respiratoire humain dans des conditions proches des conditions physiologiques grâce à la contribution de l'hôte (vascularisation, facteurs inflammatoires). Nous avons dans ce modèle isolé trois stades, qui correspondent chacun à une étape de la restauration des fonctions de protection et de défense de l'épithélium respiratoire de surface (protection de la lame basale, imperméabilité et clairance mucociliaire). A chacun de ces stades, nous avons étudié la transcription et la localisation des

peptides trifoliés, des mucines membranaires MUC1 et MUC4 et des mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B.

Nous avons ensuite développé un modèle de régénération *in vitro* grâce à une technique de culture à l'interface air / liquide dans lequel les cellules épithéliales sont en contact avec le milieu de culture par leur pôle basal, alors que leur pôle apical est exposé à l'air, mimant ainsi l'environnement physiologique de l'épithélium respiratoire de surface. Ce modèle est plus accessible, permettant notamment les traitements pharmacologiques ou la mesure en temps réels des caractéristiques de l'épithélium au cours de la régénération, mais ne prend pas en compte les relations complexes existant entre l'épithélium, la sous-muqueuse, le système immunitaire et la circulation sanguine.

Malgré cela, nous avons pu caractériser dans ce modèle trois stades de régénération correspondant aux stades observés dans le modèle de xéno greffe et au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire de surface *in vivo*. Nous avons utilisé ce modèle pour étudier l'expression, la localisation et la sécrétion des peptides trifoliés et des mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B.

Nous avons ensuite mis à profit l'accessibilité de la technique de culture à l'interface air / liquide pour examiner plus spécifiquement les effets du peptide trifolié TFF3 sur la régénération et la différenciation de l'épithélium respiratoire de surface humain.

Nous avons enfin commencé l'étude des voies de signalisation responsables de l'effet de ce peptide.

Matériel et méthodes

D Matériel et méthodes

D.1 Obtention des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain.

Les cellules de l'épithélium respiratoire ont été obtenues à partir de résections bronchiques et de polypes nasaux. Les pièces chirurgicales, obtenues auprès d'oto-rhino-laryngologiste et de chirurgiens selon les dispositions prévues à l'article 1245-2 du Code de la Santé Publique modifié par la loi Bioéthique 94-654, sont rincées soigneusement dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 tamponné par addition d'HEPES (4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid) et additionné de pénicilline (200 UI/mL) et de streptomycine (200 µg/mL). Les cellules de l'épithélium de surface sont dissociées par agitation après incubation en présence de collagénase de type XIV (Pronase E, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluée à 0,1% dans du milieu RPMI 1640-HEPES, pendant 10 heures, à 4 °C. Les cellules dissociées sont ensuite comptées sur cellule de Mallassez et utilisées dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, ou amplifiées sur plastique en flacon de culture dans du milieu de prolifération, constitué d'un mélange *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) / *Ham's medium* (HAM)-F12 (3/1) (Gibco BRL) additionné d'insuline sérique bovine (0,87 µM), de transferrine (65 nM), d'EGF humain recombinant (1,6 nM), d'hydrocortisone (1,38 µM), d'acétate de rétinyl (30 nM), de 3,3',5-triiodo-L-thyronine, d'épinéphrine (2,7 µM), d'extrait de glande pituitaire bovine (35 µG.mL⁻¹), de l'éthanolamine (5 µM), d' O-phosphorylethanolamine (5 µM), de sélénite de sodium (30 nM), de chlorure de manganèse tétrahydraté (1nM), du vanadate d'ammonium (5 nM), de sulfate de nickel hexahydraté (1nM), de chlorure d'étain dihydraté (0,5 nM), de pénicilline (200 U.mL⁻¹) et de streptomycine (200 mg.L⁻¹) (Sigma Aldrich).

D.II Modèle de régénération in vivo: la xénogreffe bronchique humanisée en souris nude.

Des trachées de rats Wistar mâles pesant 220 à 250 grammes (Charles River France, Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France) sont prélevées et dénudées de leur épithélium par deux cycles successifs de congélation-décongélation. Elles sont ensuite rincées avec du DMEM - HAM-F12, montées sur des cathéters en polyéthylène stériles, et stockées à -80 °C jusqu'à utilisation.

Après amplification, les cellules épithéliales humaines sont rincées avec du PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 0,1 M, pH 7,2, dépourvu de Ca^{++} et de Mg^{++} et détachées du support de culture par incubation en présence de trypsine-EDTA 1X (Gibco BRL) à 37 °C pendant 5 minutes. L'action de la trypsine est stoppée par addition de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et les cellules sont comptées, resuspendues dans du milieu de prolifération additionné de 10% de SVF à raison de $1,25 \cdot 10^6$ cellules par millilitre. 80 μL (soit 1.10^6 cellules) sontensemencée dans chaque trachée dénudée. Des contrôles sont réalisés en utilisant le milieu de prolifération seul, sans cellules.

Les trachées sont ensuite greffées en sous-cutané sur les flancs de souris *nude* femelles de 7 semaines (Charles River), à raison de 2 greffes par souris (Figure 19), sous anesthésie au pentobarbital sodique (40 mg/kg) (Centravet, Gondreville, France). Les souris greffées sont élevées en conditions stériles avec accès libre à l'eau et à la nourriture, et les greffes sont rincées deux fois par semaine avec du milieu DMEM – HAM-F12 (GIBCO BRL) sans sérum, additionné de pénicilline (200 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), de streptomycine (200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), de gentamycine (50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), d'amphotéricine (2,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) et de colimycine (420 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) afin d'éliminer les débris cellulaires. Les souris greffées sont euthanasiées par administration d'une dose létale de

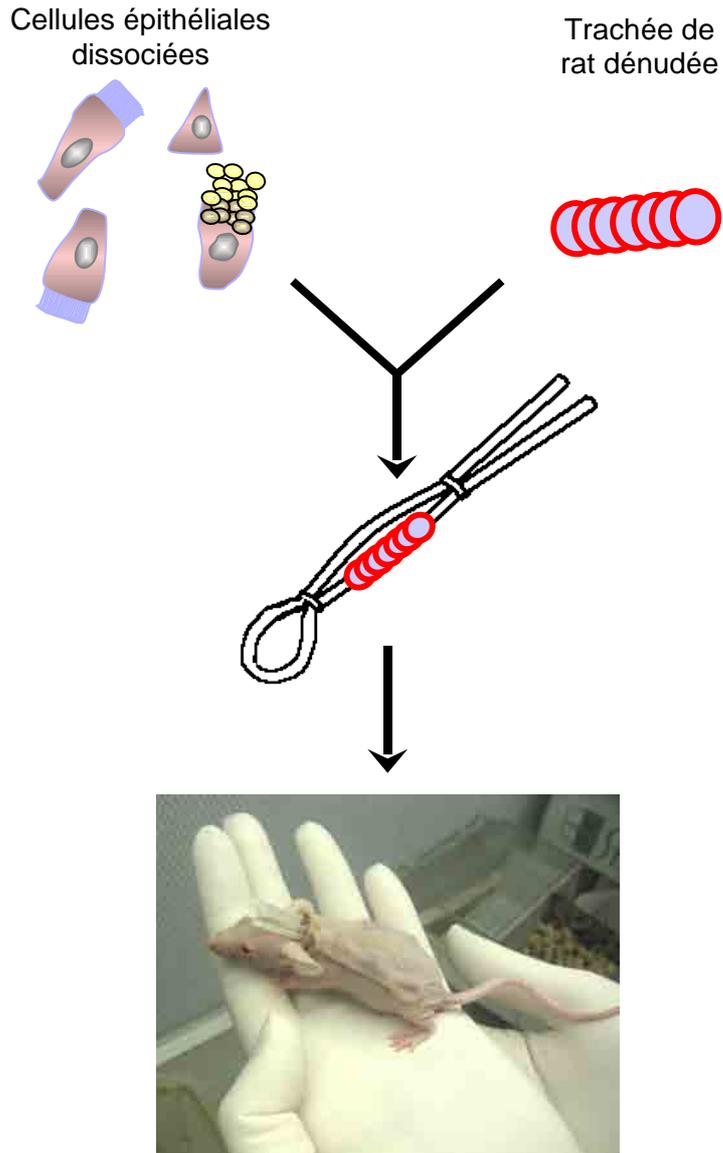


Figure 19: Modèle de régénération en xénogreffe bronchique humanisée

Les cellules dissociées de l'épithélium respiratoire sont ensemencées dans une trachée de rat dénudée de son propre épithélium, qui est montée sur un cathéter flexible. L'ensemble est greffé en sous-cutané sur les flancs d'une souris *nude* (2 greffes par souris). Les extrémités du montage sont à l'air libre, ce qui permet le lavage régulier des greffes. 5, 15 ou 35 jours après la greffe, les souris sont sacrifiées et les trachées repeuplées sont recueillies et analysées.

pentobarbital sodique (400 mg.kg^{-1}) après 4, 15 ou 35 jours et les greffes sont prélevées. Une partie de chaque xéno greffe est utilisée pour l'extraction d'ARN et l'analyse par RT-PCR et l'autre partie est analysée fixée pour analyse histologique et immunohistochimique.

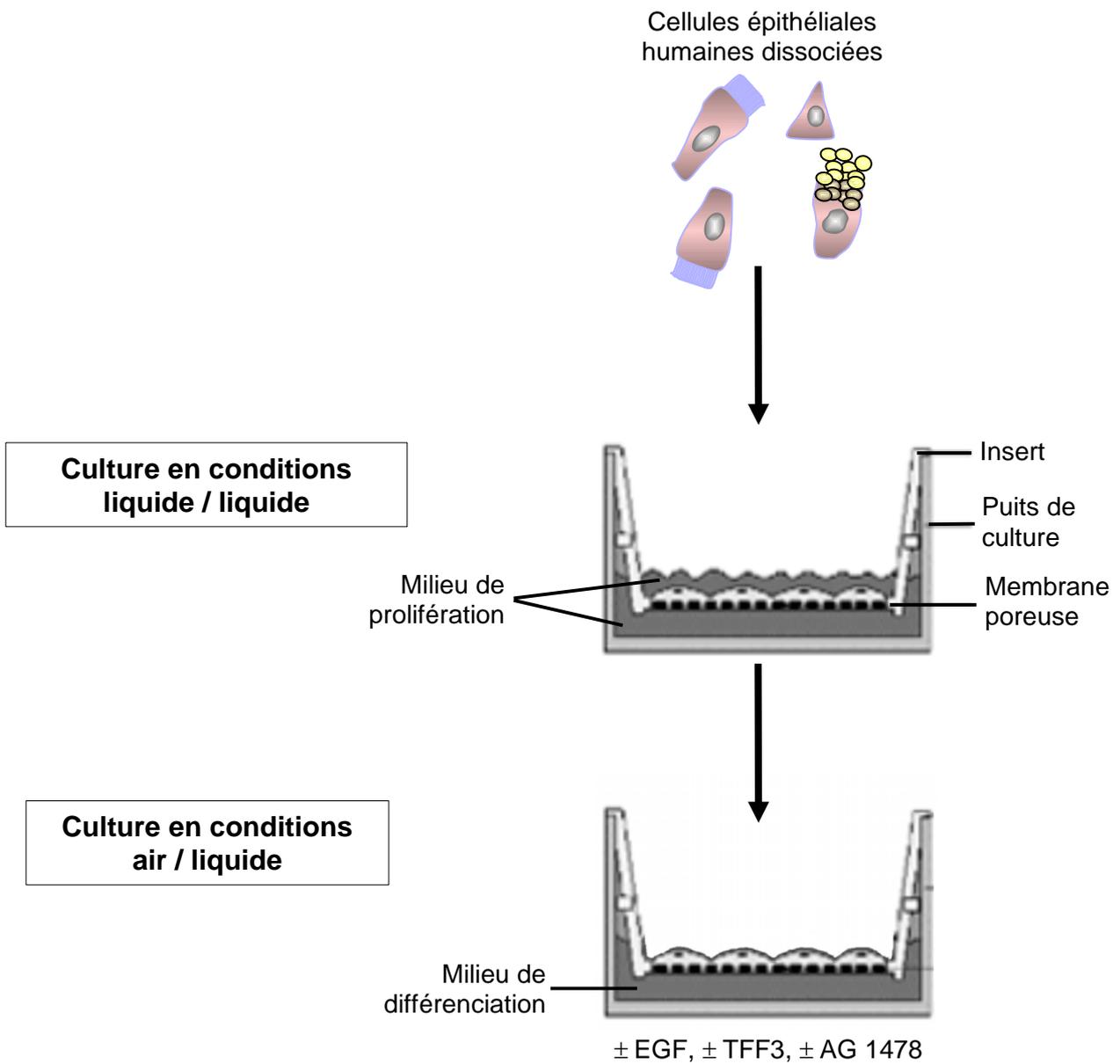


Figure 20: Modèle de régénération en culture à l'interface air / liquide.

Des cellules dissociées de l'épithélium respiratoire sont cultivées sur membrane poreuse dans le milieu de prolifération. Lorsqu'elles couvrent la totalité de la membrane, le milieu apical est éliminé et le milieu basal est remplacé par le milieu de différenciation supplémenté ou non avec de l'EGF, du TFF3 recombinant ou de la Tyrphostine AG 1478 (inhibiteur de l'EGF-R). Les cultures sont récoltées et analysées au jour de passage en interface air / liquide (jour 0, stade 1), au jour 10 (stade 2), au jour 15 ou au jour 30 (stade 3).

D.III Modèle de régénération in vitro: la culture cellulaire à l'interface air / liquide.

La régénération de l'épithélium respiratoire humain est aussi reproduite *in vitro* dans des inserts de culture définissant un compartiment basal et un compartiment apical séparés par une membrane poreuse en polyester transparent (Transwell-clear, diamètre 12 mm, pores de 0,4 μm) (Figure 20). Les membranes sont recouvertes d'une fine couche de collagène de type IV (Sigma Aldrich) par incubation pendant 2 heures en présence de collagène placentaire dilué à 0,2 g.L^{-1} dans une solution d'acide acétique (0,02 %) et d'éthanol (30 %) à température ambiante. Après rinçage au PBS, les membranes sontensemencées avec les cellules de l'épithélium de surface humain fraîchement dissociées, à raison de 3.10^4 cellules par membrane. Les cellules sont cultivées dans le milieu de prolifération en condition liquide / liquide jusqu'à ce qu'elles recouvrent la totalité de la membrane, puis le milieu du compartiment apical est éliminé et le milieu du compartiment basal est remplacé par du milieu de différenciation (Figure 18). Le milieu utilisé pour la différenciation *in vitro* de l'épithélium respiratoire humain est un mélange de DMEM (Gibco BRL) et de *Bronchial Epithelial cell Basal Medium* (BEBM) (Clonetics, Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) (1/1) additionné des suppléments fournis par Clonetics pour l'EGF humain recombinant (0,5 mg.L^{-1}), l'épinéphrine, (5 mg.L^{-1}), la BPE (0,13 g.L^{-1}), l'hydrocortisone (0,5 mg.L^{-1}), l'insuline (5 mg.L^{-1}), la triiodothyronine (6,5 mg.L^{-1}) et la transferrine (0,5 mg.L^{-1}), auquel ont été ajoutés de la pénicilline (200 U.mL^{-1}), de la streptomycine (200 mg.L^{-1}), de l'acide rétinoïque (0,1 nM) et de l'albumine sérique bovine (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (1,5 mg.L^{-1}) (Sigma Aldrich). La régénération et la

différenciation de l'épithélium ont été analysées par histologie sur cultures fixées et mesure de la résistance trans-épithéliales, et trois stades successifs bien distincts ont été identifiés. Les cultures ont donc été analysées le jour de passage en interface air / liquide (appelé jour 0, ou J 0, correspondant au stade 1), après 10 jours en interface air / liquide (J 10, stade 2) et après 30 jours de culture en interface air / liquide (J 30, stade 3).

Pour étudier les effets du peptide TFF3 recombinant, les cellules issues de trois patients différents ont été cultivées en présence du milieu de différenciation avec ou sans addition de TFF3 recombinant (2 μ M) dans le compartiment baso-latéral, à partir du passage en condition air / liquide. L'activation du récepteur à l'EGF et les voies de signalisation qu'elle active sont impliquées dans certains des effets décrits pour TFF3. Afin d'isoler le rôle de ce peptide, nous avons éliminé toute interférence potentielle avec l'EGF en cultivant les cellules de quatre patients différents en présence de milieu de différenciation sans EGF, avec ou sans addition de TFF3 recombinant (2 μ M), à partir du passage en condition air / liquide. Afin de suivre le processus de différenciation, il a été nécessaire d'étudier la transition du stade 2 au stade 3. Ces cultures ont donc été analysées à une étape intermédiaire, après 15 jours de culture à l'interface air / liquide (J 15).

Dans ces conditions, nous avons quantifié les cellules basales (identifiées par immunomarquage de la cytokératine 13), les cellules caliciforme (marquage de MUC5AC), les cellules ciliées (marquage de la tubuline β) et les cellules en cours de ciliogenèse (marquage nucléaire FOXJ1). Nous avons aussi analysé ces cultures par microscopie électronique à balayage afin de mettre en évidence les mécanismes de ciliogenèse à l'échelle sub-cellulaire.

Nous avons également étudié l'implication du récepteur de l'EGF (EGF-R, ou HER1) dans l'action du peptide TFF3 recombinant. Pour cela, les cultures à l'interface air / liquide de cellules

provenant de trois patients ont été cultivées en absence d'EGF, avec ou sans addition de TFF3 (2 μ M), en inhibant ou non l'activation du récepteur de l'EGF par addition (dès le jour 0) de l'inhibiteur spécifique tyrophostine AG-1478 (100 nM) (Sigma-Aldrich). Les cultures effectuées à partir du jour 0 dans ces quatre conditions (-EGF, -EGF+AG-1478, -EGF+TFF3 et -EGF+TFF3+AG-1478) ont été analysées après quinze jours de culture par quantification du nombre de cellules ciliées par millimètre de lame basale, grâce à l'immunomarquage de la tubuline β .

A chaque stade, les sécrétions apicales ont été collectées: après rinçage des cultures au PBS, 100 μ L de milieu de différenciation non complémenté ont été ajoutés dans le compartiment apical. Après 14 heures d'incubation, le milieu apical a été recueilli, centrifugé 5 secondes à 10000 tours par minutes et conservé à -20 °C avant analyse par western blot. Les membranes ont été séparées de l'insert à l'aide d'une lame de bistouri, et une partie est utilisée pour l'extraction d'ARN et l'analyse par RT-PCR alors que l'autre partie est analysée par des procédures histologiques et immunohistochimiques.

D.IV Western Blot

Pour la détection des mucines, les sécrétions apicales des cultures ont été décongelées et dénaturées pendant 5 minutes à 95 °C dans du tampon de charge (tampon de Laemmli supplémenté de 5 % de β -mercaptoéthanol, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Après passage sur glace et brève centrifugation, 80 μ L de chaque échantillon sont déposés sur un gel d'agarose à 2 % dans du tampon TRIS (2-amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol) / HCl, pH 8,8 (Bio-Rad Laboratories). Les protéines ont été séparées par électrophorèse (7 heures à 100 V) dans un tampon TRIS (25 mM) / Glycine (192 mM), additionné de 0,1 % de dodécyl sulfate de sodium (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS), pH 8,3 (TGS, Bio-Rad Laboratories) puis transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) par transfert passif par capillarité dans un tampon TRIS / Glycine (TG, Bio-Rad Laboratories) additionné de 20 % de méthanol. La membrane a ensuite été saturée par incubation avec une solution de PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (Bio-Rad Laboratories) et 5% de lait écrémé pendant 1 heure, sous agitation. L'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 5 % de lait écrémé a été appliqué pendant deux heures à température ambiante en sacs thermosoudés, sous agitation. Anticorps monoclonal de souris anti-MUC5AC: NCL-MUC5AC (Novocastra, clone CLH2) dilué au 1/100; anticorps monoclonal de souris anti-MUC5B: anticorps monoclonal fourni par l'unité INSERM 560 (Lille), dilué au 1/100. La membrane a ensuite été lavée trois fois au PBS / Tween 20 pendant 5 minutes. L'anticorps secondaire (immunoglobulines de classe G de chèvre anti-souris couplées à la peroxidase de raifort, Dako cytomation, 1/1000) a été appliqué pendant 1 heure, puis la membrane a été lavée trois fois au PBS/Tween pendant 5 minutes. La révélation a été effectuée grâce au kit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) selon les instruction du fournisseur. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide

à une caméra Las-1000 (Fujifilm, Tokyo, Japon).

La détection de TFF3 dans les sécrétions apicales des épithéliums régénéré *in vitro* a été réalisée au sein de l'*Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie* (Prof. Werner Hoffmann), à Magdeburg, Allemagne. 45 µL de chaque échantillon sont déposés sur gel de polyacrilamide à 15 %, et les protéines ont été séparées par électrophorèse, avant d'être transférées sur membrane de polyacrylamide, par transfert électrique. Après fixation des protéines sur la membrane par incubation dans une solution de glutaraldéhyde à 0,2 %, la présence de TFF3 a été détectée par incubation avec un anticorps polyclonal de lapin purifié par chromatographie d'affinité et dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale du peptide ou en présence d'un anticorps monoclonal dirigé contre son extrémité amino-terminale (TFF315C6, nanoTools Antikörpertechnik, Teningen, Allemagne). La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, dilution 1/2000) ou un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (Vector Laboratories). La révélation a été réalisée grâce au système ECL et à un film photographique BioMax Light Film (Kodak Industries, Châlons-sur-Saône, France).

Pour tous les Western Blots, le milieu BEBM / DMEM non incubé avec les cultures a été utilisé comme contrôle négatif, et un extrait protéique de polype nasal humain a été utilisé comme témoin positif.

D.V Immunohistochimie et immunohistofluorescence

Les xénogreffes et les membranes de culture ont été soit cryofixées en OCT (*Optimun Cutting Temperature compound*, Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Pays-Bas), soit fixées au Lillie (Formaldéhyde 5 %, pH 7) puis inclus en paraffine. Les blocs obtenus ont été coupés à une épaisseur de 5 µm, et les coupes en paraffine ont été déposées sur des lames de microscopie SuperFrost Plus (O. Kindler GmbH, Germany) alors que les coupes en OCT ont été déposées sur des lames tannées par une solution d'alun de chrome (K₂Cr(SO₄)₂, Fluka, Buchs, Allemagne) à 0,4 % (poids/volume) et de gélatine de peau de poisson (Prolabo, Paris, France) à 0,5 % (poids/volume). Les lames ont ensuite été préparées pour l'immunohistochimie: les coupes en paraffine ont été déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de Xylène, éthanol 100%, éthanol 95% puis eau distillée. Elles ont ensuite subi un traitement au four à micro-ondes (4x5minutes à 350 W dans un tampon citrate pH 6) suivi d'un refroidissement de 20 minutes à température ambiante. Les coupes en OCT ont été fixées au méthanol glacé (-20 °C, 10 minutes).

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés: anti-MUC1: 1/100 (anticorps monoclonal de souris, clone M8, dirigé contre les répétitions en tandem, (**McIlhinney et al., 1985**)) MUC4: 1/400 (anticorps monoclonal de souris dirigé contre les répétitions en tandem, (**Swartz et al., 2002**)), MUC5AC: 1/1600 (anticorps polyclonal de lapin, sérum LUM5-1, dirigé contre l'extrémité carboxyterminale et deux région flanquant une répétition (**Hovenberg et al., 1996**)) et 1/100 (anticorps monoclonal de souris NCL-MUC5AC, Novocastra, clone CLH2, dirigé contre les répétitions en tandem), MUC5B: EU-MUC5Bb, 1/100, Consortium Européen, clone BMH4-CT98-3222 (anticorps monoclonal de souris), TFF1: 1/100, TEBU, réf. sc-7842 (pS2 C20) (anticorps polyclonal de chèvre), TFF2: 1/100 (anticorps polyclonal de lapin) TFF3: 1/200

(anticorps polyclonal de lapin), Caténine beta: 1/500, BD Transduction Laboratories, clone 14 (anticorps monoclonal de souris), Vimentine: 1/40, DAKO, clone V9 (anticorps monoclonal de souris) Ki-67: 1/10, DAKO-Cytomation, clone MIB-1 (anticorps monoclonal de souris), Cadhérine E: 1/100, R&D Systems, clone HECD-1 (anticorps monoclonal de souris), Tubuline beta: 1/10000, Chemicon, clone KMX-1 (anticorps monoclonal de souris), FOXJ1: 1/200, clones 1A4 et 2A5 (anticorps monoclonal de souris), Cytokératine 13 (CK 13): 1/1000, clone KS-1A3, Sigma (anticorps monoclonal de souris). Les anticorps dirigés contre les mucines (sauf NCL-MUC5AC) nous ont été gracieusement fournis par l'unité INSERM 560 (Lille), et les anticorps anti-TFF2 et anti-TFF3 par les équipes d'Andrew Giraud (Université de Melbourne, Australie) et de Daniel Podolsky (Unité gastro-intestinale, Hôpital général de Boston, Etats-Unis). Les anticorps dirigés contre FOXJ1 nous ont été aimablement fournis par l'équipe de Steven Brody (Washington University School of medicine, St Louis, MO, Etats-Unis) Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés selon un protocole indirect avec des anticorps secondaires biotinilés. La révélation a été effectuée grâce à des fluorochromes ALEXA couplés à la streptavidine (Interchim, Eugene, USA) ou grâce à la peroxidase de raifort couplée à la streptavidine et au substrat AEC (système Envision+ Dual link peroxydase/AEC, DAKO-Cytomation). Les témoins négatifs correspondant à chaque marquage ont été réalisés en utilisant des anticorps non immuns (produits dans l'espèce correspondante) à la place des anticorps primaires, et les témoins positifs ont été effectués par marquage de tissus respiratoires adultes (bronches et polypes nasaux). Des témoins positifs supplémentaires ont été utilisés pour TFF1 et TFF2, sur des coupes de muqueuse gastrique. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Harris (marquages fluorescents) ou à l'hématoxyline de Mayer (marquages à la peroxydase).

Les co-immunomarquages FOXJ1/Tubuline beta ont été réalisés en appliquant successivement

le protocole décrit ci-dessus pour chaque anticorps, et contre-colorés au 4', 6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), 300 nM pendant 10 minutes à température ambiante (DAKO-Cytomation).

Après montage sous lamelle à l'aide de GEL/MOUNT (Biomedex, Foster City, CA, USA) (marquages fluorescents) ou d'Aquatex (Merck, Darmstadt, Allemagne) (marquages à la peroxydase), les coupes ont été observées sous microscope optique à fluorescence, en l'épifluorescence ou en lumière transmise avec interférence différentielle (Nomarski).

Les co-marquages TFF3/Mucines ont été réalisés en ajoutant d'abord les deux anticorps primaires, puis deux anticorps secondaires directement couplés aux fluorochromes ALEXA (Interchim, Eugene, USA). Les co-marquages MUC1/MUC4 et MUC4/Calnexine ont été réalisés en appliquant successivement le protocole décrit plus haut pour chaque anticorps. Ces co-marquages ont été analysés en microscopie confocale (Biorad MRC 1024 avec lasers krypton/argon et argon, sur un microscope Olympus IX70), en réalisant des coupes optiques tous les 0,2 μm .

Toutes les images obtenues en microscopie classique et en microscopie confocales ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ (développé au *National Institute of Health*, Etats-Unis) avec des additions développées au laboratoire.

Les marquages de la Tubuline β , de MUC5AC et de la Cytokératine 13 pour la quantification des cellules ciliées, basales et sécrétoires ont été réalisés avec le système peroxydase (DAKO-Cytomation). Deux coupes distantes ont été entièrement photographiées au microscope, en réalisant de prises de vues successives, ne se recoupant pas, et couvrant la totalité de la membrane. Les photographies ont ensuite été analysées en aveugle, puis les données ont été regroupées et soumises à une analyse statistique. Les résultats obtenus avec les différents traitements ont été normalisés par rapport à la culture témoin réalisée avec des cellules provenant de la même pièce chirurgicale, sans traitement par le TFF3 ni par la tyrphostine.

D.VI Analyse transcriptionnelle

La transcription des TFF et des mucines a été étudiée par transcription inverse et amplification en chaîne (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR).

Les ARN totaux ont été extraits des échantillons grâce au kit High Pure RNA isolation kit (Roche) selon les instructions du fournisseur. Les ARN ont ensuite été dosés par spectrofluorométrie (lecteur de plaque Xénus, Safas) en utilisant le kit Ribogreen RNA Quantification kit (Molecular Probes) selon les indications du fabricant.

Pour l'analyse de la transcription des peptides trifoliés dans les xénogreffes, les RT-PCR TFF1, TFF2 et TFF3 ont été effectuées à partir de 10 ng d'ARN avec le kit RTth DNA Polymerase (Applied Biosystem) selon les indications du fournisseur, en utilisant la GAPDH comme gène de ménage de référence. Des ARN totaux extraits d'échantillons de muqueuse gastrique ont été utilisés comme témoins positifs pour TFF1, TFF2 et TFF3. Des ARN extraits de xénogreffes non ensemencées ont été utilisées comme témoins négatifs.

La transcription inverse a été effectuée pendant 15 minutes à 70°C avec une amorce spécifique (amorce antisens de la PCR), et pour l'amplification les conditions suivantes ont été utilisées: après une dénaturation de 2 minutes à 95°C les cycles commencent par une dénaturation de 20 secondes à 90°C, puis les amorces sont hybridées pendant 30 secondes à 65°C, et enfin vient la phase d'élongation: 30 secondes à 72°C. Après les cycles, une phase finale d'élongation (2 min. à 72°C) est appliquée. (voir tableau 2).

| | Dénaturation | Hybridation | Elongation | |
|--------------|--|-------------|-------------|---------------|
| 2 min à 95°C | 20 s à 90°C | 30 s à 65°C | 30 s à 72°C | 2 min. à 72°C |
| | 13 cycles pour l'ARN 28S, 24 cycles pour la GAPDH, 35 cycles pour les TFF | | | |

Tableau 2: Conditions de RT-PCR utilisées pour la détection des peptides trifoliés

24 cycles ont été effectués pour la GAPDH, 35 cycles pour les TFF. Après migration (gel de polyacrylamide 12%), les produits de PCR ont été révélés au SybR Gold (Molecular probes) et analysés par densitométrie grâce à une caméra Las-1000 (Fujifilm). Les résultats ont été rapportés à l'intensité de la bande GAPDH, puis soumis une analyse statistique. Dans les cultures à l'interface air / liquide, la transcription de TFF1 et de TFF2 n'a pas été recherchée. Les PCR TFF3 ont été réalisées selon le même protocole que pour les xénogreffes, mais l'ARN de la sous-unité ribosomale 28S, et non la GAPDH, est utilisé comme gène de ménage pour la standardisation.

L'analyse de l'expression des mucines dans les xénogreffes a été réalisée à l'unité INSERM 560 (Lille) par l'équipe de Nicole Porchet. La transcription inverse a été réalisée à partir de 50 ng d'ARN en utilisant une amorce générique (amorce oligo-dT, reconnaissant la polyadénylation des ARN messagers) et le système *Advantage RT-for-PCR* (Clontech). L'amplification a été réalisée avec la polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Taq, Roche) avec le programme suivant: dénaturation pendant 4 minutes à 94 °C, puis 35 cycles (MUC5B ou 40 cycles (MUC5AC) commençant par une dénaturation pendant 30 secondes à 94 °C, suivie d'une phase

d'hybridation de 30 secondes à 94 °C et enfin d'une élongation d'une minute à 72 °C. Ces cycles sont suivis d'une étape unique d'élongation à 72 °C pendant 7 minutes. Après migration sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium, les produits d'amplification ont été analysés avec le logiciel GelAnalyst GelSmart (ClaraVision, Orsay, France) et l'intensité des bandes a été normalisée au signal obtenu pour la GAPDH.

L'analyse de l'expression des mucines dans le modèle de culture à l'interface air / liquide a été réalisée à l'unité INSERM 560 (Lille) par l'équipe d'Isabelle van Seuningen selon le même protocole, mais la transcription inverse a été effectuée à partir de 0,5 µg d'ARN avec la transcriptase inverse M-MLV (Promega, Charbonnières, France) et l'ARN de la sous-unité ribosomale 28S a été utilisée pour la normalisation.

Les amorces suivantes sont utilisées pour la détection des TFF:

TFF1 sens: 5'-CTGGGGTCCTGGTGTCCATGCT-3'

TFF1 antisens: 5'-CTCCTCTTCTGGAGGGACGT-3'

TFF2 sens: 5'-CTGGAATCACCAGGTGGACCAGTGTT-3'

TFF2 antisens: 5'-CCAGGGCACTTCAAAGATGAAGTT-3'

TFF3 sens: 5'-GCTGCTGCTTTGACTCCAGGAT-3'

TFF3 antisens: 5'-CGTTAAGACATCAGGCTCCAGAT-3'

GAPDH sens: 5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTA-3'

GAPDH antisens: 5'-GAGGGGATCTCGCTCCTGGAAGGA -3'

28S sens: 5'-GTTACCCACTAATAGGGAACGTGA-3'

28S antisens: 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3'

Les amorces suivantes sont utilisées pour la détection des mucines:

MUC1 sens : 5'-GAACTACGGGCAGCTGGACATC-3'

MUC1 antisens: 5'-GCTCTCTGGGCCAGTCCTCCTG-3'

MUC4 sens: 5'-CGCGGTGGTGGAGGCGTTCTT-3'

MUC4 antisens : 5'-GAAGAATCCTGACAGCCTTCA-3'

MUC5AC sens: 5'-TGATCATCCAGCAGCAGGGCT-3'

MUC5AC antisens: 5'-CCGAGCTCAGAGGACATATGGG-3'

MUC5B sens: 5'-CTGCGAGACCGAGGTCAACATC-3'

MUC5B antisens: 5'-TGGGCAGCAGGAGCACGGAG-3'

GAPDH sens: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT

GAPDH antisens: CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC

D.VII Tests de migration cellulaire

Les seuls tests existant à ce jour pour vérifier l'activité des peptides trifoliés sont des tests d'induction de la migration cellulaire. Nous avons donc testé l'effet du peptide recombinant TFF3 sur la migration des cellules de l'épithélium respiratoire humain dans un système d'anneaux de restriction.

Les cellules fraîchement dissociées sontensemencées dans des anneaux de silicone placés dans des puits de plaque de culture (plaques 12 puits), à une densité de 350 000 cellules par cm². Elles sont laissées pendant la nuit dans du milieu DMEM/BEBM contenant 10% de sérum pour leur permettre d'adhérer, puis les anneaux sont retirés, les cellules sont rincées au PBS pour éliminer les débris et les cellules n'ayant pas adhéré, et placées dans du milieu DMEM/BEBM seul (témoin) ou contenant soit de l'EGF humain recombinant à 10 ng,mL⁻¹, soit du TFF3 recombinant (aimablement fourni par l'équipe de Daniel Podolsky, Unité gastro-intestinale, Hôpital général de Boston, Etats-Unis) à 2 µM. La circonférence des cultures traitées est mesurée 72 heures plus tard et comparée à celle des cultures n'ayant reçu ni le peptide TFF3 recombinant, ni l'EGF. Au moins cinq cultures sont analysées pour chaque condition.

D.VIII Tests de digestion enzymatique

Il a été décrit que les peptides trifoliés ont une grande résistance à la digestion protéolytique et à l'hydrolyse acide, ce qui leur permettrait de résister aux conditions agressives régnant dans l'appareil digestif. De telles propriétés de résistance seraient également très importantes pour permettre au peptide TFF3 de résister aux protéases sécrétées par les polynucléaires

neutrophiles en cas d'inflammation de l'appareil respiratoire. Nous avons donc testé la sensibilité de ce peptide à la digestion par l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3.

Le peptide recombinant TFF3 fourni par l'équipe du Dr Podolsky a été analysé par migration sur gel puis coloration au bleu de Coomassie, avant et après incubation en présence des protéases du polynucléaire neutrophile.

1 µg ou 2 µg du peptide recombinant TFF3 ont respectivement été mis en présence de 1 µg ou 2 µg d'élastase, de cathepsine G, de protéinase 3 ou de PBS (contrôle négatif) dans un volume final de 20 µL. Le mélange réactionnel a été incubé sur la nuit à 37 °C, puis placés à -20 °C. L'efficacité des protéases est vérifiée par incubation d'1 µg de fibronectine en présence d'1 µg de chaque protéase ou de PBS, dans 20 µL, pendant 1 heure à 37 °C.

Les échantillons ont ensuite été dénaturés dans le tampon de dépôt (tampon de Laemmli + 5 % de β-mercaptoéthanol) pendant 5 minutes à 95 °C, passés sur la glace, brièvement centrifugés et déposés dans leur totalité sur gel de polyacrylamide à 12 % (fibronectine) ou 15 % (TFF3). Les protéines ont été séparées par électrophorèse (40 mA, 3h30) et les gels ont été révélés au bleu de Coomassie.

D.IX Test de croissance bactérienne

L'effet de TFF3 humain recombinant sur *Staphylococcus aureus* (souche 8325-4) a été étudié par suivi de croissance; *S. aureus* a été mis en culture dans du milieu riche issu de digestion tryptique de soja (TSB, AES laboratories) en présence de différentes concentrations de TFF3 recombinant à 0 nM (témoin), 10 nM, 100 nM ou 1 µM. La croissance bactérienne a été suivie pendant 7 heures par mesures régulières de la turbidité des cultures (mesures de densité optique à une longueur d'onde de 650 nm).

D.X Résistance trans-épithéliale

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, la fonction de barrière de l'épithélium reconstitué a été suivie par mesure de la résistance trans-épithéliale. 500 μ L de milieu DMEM/BEBM ont été ajoutés dans le compartiment apical, à la surface de l'épithélium, et la résistance au passage du courant entre le compartiment apical et le compartiment basal a été mesurée à l'aide d'un ohmmètre équipé d'une sonde adaptée (Millicell).

D.XI Fréquence de battement ciliaire

La fonction de clairance mucociliaire de l'épithélium régénéré dans le modèle de culture à l'interface air / liquide a été étudiée par mesure de la fréquence de battement des cils. Les cultures ont été rincées au PBS et placées dans une chambre de culture à 37 °C avec 5 % de CO² sous un vidéomicroscope. Le battement des cils a été enregistré à l'aide d'une caméra CCD (JAI PULNIX T-760, San Jose, CA, USA) et un enregistreur DVD. Les films obtenus ont été visualisés sur un moniteur, et les variations de luminosité causés par le battement des cils ont été enregistrées par un capteur photosensible placé sur l'écran du moniteur. Le signal a été numérisé et analysé par transformation de Fourier pour donner un spectre de fréquences permettant de calculer une fréquence de battement moyenne. Les mesures ont été effectuées sur au moins 5 cellules ciliées par culture, et 10 cultures issues des cellules de deux patients différents ont été analysées pour chaque traitement.

D.XII Microscopie électronique à transmission

Les processus de ciliogenèse dans le modèle de culture à l'interface air / liquide ont été observés à l'échelle sub-cellulaire par microscopie électronique à transmission. A une étape précoce de la différenciation (jour 15), les cultures ont été fixées par incubation à 4 °C pendant une heure en présence de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich) en solution à 2,5 % dans du PBS. Une post-fixation par 1 % de tétra-oxyde d'osmium a été réalisée (2 heures, 4 °C) puis les cultures ont été déshydratées par passage dans des bain d'éthanol de concentration croissante à température ambiante et enfin découpées et incluses en résine Agar 100 (Agar Scientific, Stansed, Royaume-Uni). Des coupes ultrafines ont été réalisées et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi 300 (Elexience, Verrière-le-Buisson, France) à 75 kV.

D.XIII Analyse d'image

Le traitement des images obtenues par les différentes techniques d'analyse histologique, immunologique ou moléculaire a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ, développé au NIH, avec des additions développées au laboratoire par l'équipe du professeur Noël Bonnet. La reconstitution en volume des images de microscopie confocale a été réalisée à l'aide de l'addition VolumeJ, développée pour ImageJ par Mickael Abramoff, et vérifiée à l'aide du logiciel ConfocalAssistant (Bio-Rad).

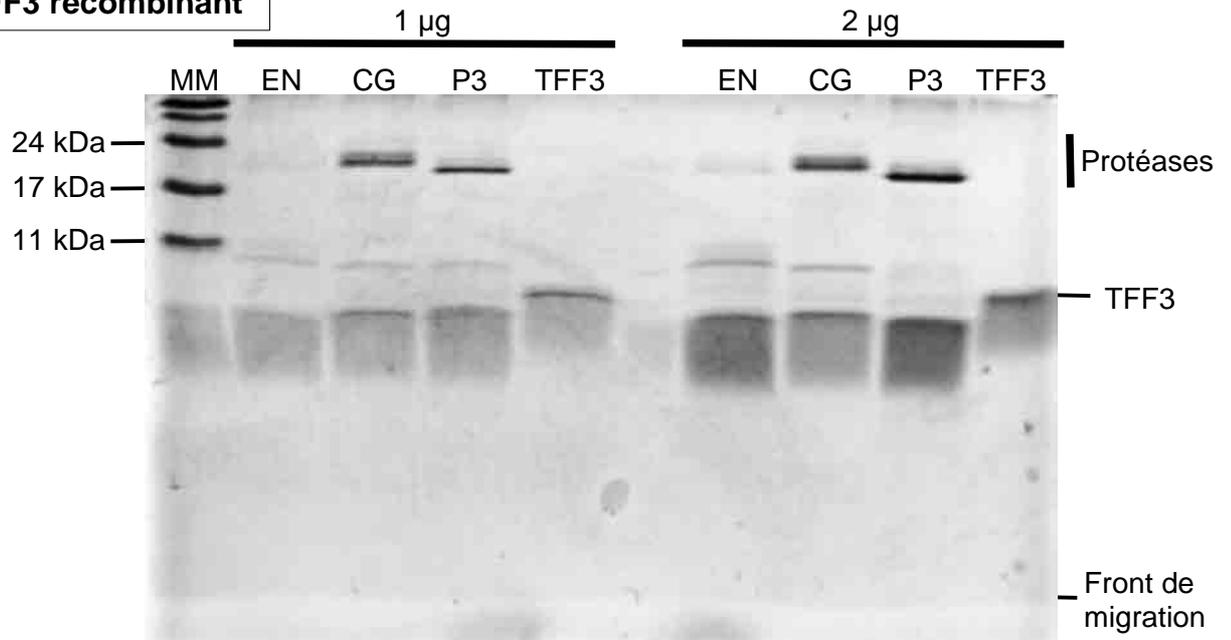
D.XIV Analyse statistique

Les données chiffrées obtenues par les différentes techniques employées ont été soumises au

test non paramétrique de Mann et Whitney. Une probabilité d'erreur inférieure à 5 % ($p < 0,05$) a été considérée comme révélatrice d'une différence significative. Tous les résultats ont été exprimés sous la forme **médiane (Quartile 1;Quartile 3)** à l'exception des mesures de résistance trans-épithéliales au cours de la régénération dans le modèle de culture à l'interface air / liquide en l'absence de traitement, qui ont été exprimés sous la forme **moyenne \pm écart-type** en raison du grand nombre de mesures effectuées.

Résultats

Profils de digestion du peptide TFF3 recombinant



Profils de digestion de la fibronectine recombinante

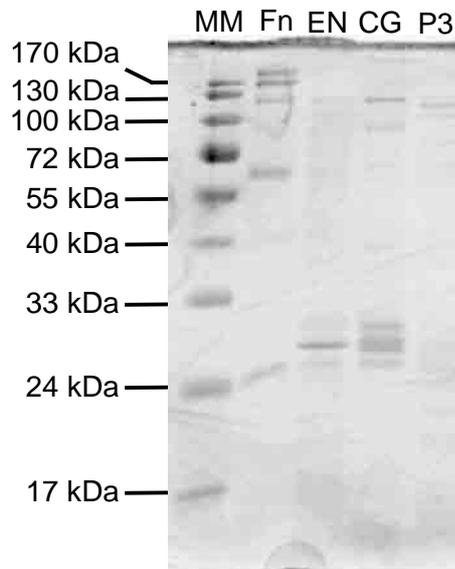


Figure 21: Caractérisation du peptide TFF3 et digestion par les protéases des neutrophiles.

Le peptide recombinant TFF3 est incubé pendant une nuit à 37 °C en présence de l'élastase du neutrophile (**EN**), de la cathepsine G (**CG**) ou de la protéinase 3 (**P3**). L'activité des protéases est vérifiée par digestion de la fibronectine pendant une heure à 37 °C. Les puits **TFF3** et **Fn** correspondent au peptide TFF3 ou à la fibronectine incubés en présence de PBS seul. Une heure d'incubation suffit aux protéases pour dégrader presque totalement la fibronectine, alors que le peptide TFF3 reste visible sur le gel après une nuit d'incubation, indiquant une grande résistance à la protéolyse.

1 µg, 2 µg: dépôts correspondant à 1 µg de TFF3 et 1 µg de protéase, ou 2 µg de TFF3 et 2 µg de protéase, respectivement. **MM**: marqueurs de masse moléculaire.

E Résultats

E.1 Caractérisation du peptide TFF3 recombinant et sensibilité à la digestion par les protéases du polynucléaire neutrophile

Le peptide TFF3 recombinant employé dans cette étude a été produit par l'équipe du Dr Podolsky dans un modèle de levure et purifié par chromatographie d'affinité. Nous avons étudié ses propriétés de migration sur gel et de sensibilité à la digestion par les protéases du polynucléaire neutrophile, après avoir testé l'activité des protéases employées par digestion de la fibronectine (Figure 21).

L'analyse des produits de digestion de la fibronectine pendant une heure démontre la haute activité protéolytique des enzymes employées: la piste ayant reçu la fibronectine incubée en présence de PBS présente plusieurs bandes de haut poids moléculaire, dont deux au-dessus du marqueur de 170 kDa, représentant les sous-unités α et β complètes de la fibronectine. Après digestion par l'élastase, quelques faibles bandes sont observables entre 100 et 130 kDa mais la majeure partie de la fibronectine a été dégradée et n'est plus visible sur le gel. Après digestion par la cathepsine G, deux faibles bandes sont visibles aux alentours de 100 et de 130 kDa, et on observe de nombreuses bandes entre 24 et 33 kDa. La digestion par la protéinase 3 produit une bande principale entre 24 et 33 kDa.

La migration du peptide TFF3 incubé en présence de PBS révèle une bande principale située plus bas que le marqueur de masse moléculaire de 11 kDa, ce qui est cohérent avec la masse moléculaire théorique du peptide recombinant, de 6,5 kDa. Sous cette bande, une trainée est

observée, représentant probablement des fragments incomplets du peptide. Dans les pistes contenant le peptide TFF3 incubé en présence d'élastase, de cathepsine G ou de protéinase 3, on observe des bandes correspondant aux protéases entre les marqueurs de 17 kDa et de 24 kDa. Plus bas, aux environs de 11 kDa, des bandes plus légères représentent des fragments de ces protéases, produits par digestion autocatalytique. Enfin, à une position correspondant à une masse moléculaire plus faible que celle du peptide TFF3 intact, on peut observer les produits de digestion du peptide TFF3 sous forme d'une trainée comportant une bande plus intense dans sa partie haute. Cette bande plus intense se détache plus nettement pour la digestion par la cathepsine G que par les deux autres enzymes. Dans les pistes ayant reçu le produit de la digestion de 2 µg de TFF3 par 2 µg de chaque protéase, on remarque également une faible bande à la masse moléculaire correspondant à celle du peptide TFF3 intact. Cette bande est plus intense après incubation avec la protéinase 3 qu'avec les deux autres protéases.

L'absence de bandes à des masses moléculaires élevées dans les pistes ayant reçu le peptide TFF3 seul confirme la bonne pureté du peptide recombinant utilisé dans cette étude.

Il est intéressant de noter que malgré la durée importante de l'incubation en présence des protéases, le peptide TFF3 digéré par les protéases des polynucléaires neutrophiles est détectable à une masse moléculaire inférieure à celle du peptide TFF3 intact mais est toujours clairement visible sur le gel, très nettement au-dessus du front de migration. De plus, une bande légère correspondant au peptide intact est toujours visible. Ceci indique une résistance importante de ce peptide à la digestion par les protéases sécrétées par les polynucléaires neutrophiles. La diminution de la masse moléculaire du peptide pourrait correspondre à la digestion de l'extrémité carboxy-terminale, non impliquée dans le motif en trèfle et donc probablement moins protégée.

Effet de TFF3 sur la croissance de *S. Aureus*

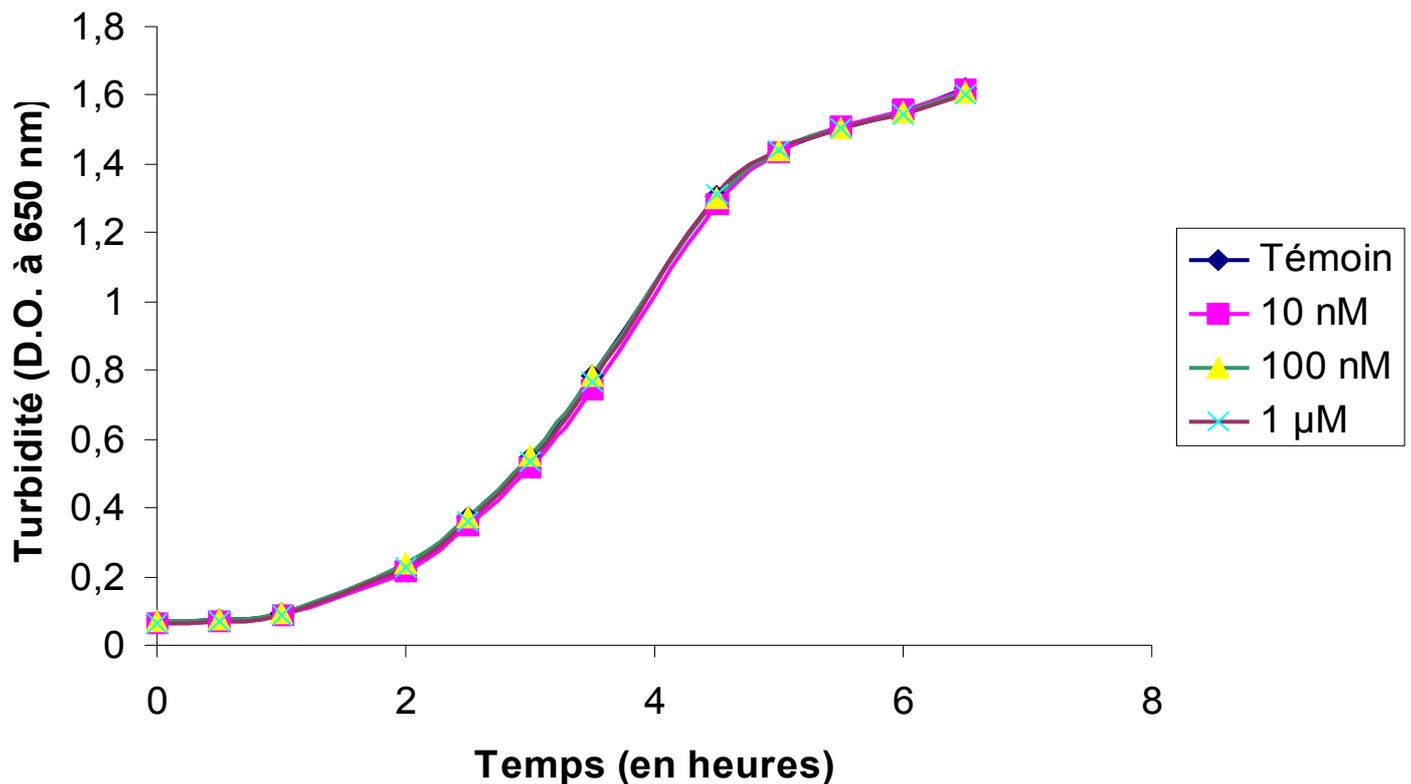


Figure 22: Effet de TFF3 sur la croissance de *Staphylococcus aureus*

Le peptide recombinant TFF3 est ajouté à des cultures de *Staphylococcus aureus* en milieu riche TSB, aux concentrations de 0 (Témoin), 10 nM, 100 nM et 1 µM. La densité optique des cultures à 650 nm a été mesurée à des temps réguliers afin de suivre la croissance bactérienne. Toutes les courbes obtenues sont superposables.

E.II Le peptide recombinant humain TFF3 n'inhibe pas la croissance de S. aureus

Le peptide TFF3 est sécrété par des épithéliums fréquemment exposés aux infections bactériennes. Il a été suggéré qu'il pourrait jouer un rôle anti-bactérien. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé son action sur la croissance de la souche de *Staphylococcus aureus* 8325-4.

La croissance de *S. aureus* dans le milieu TSB seul (témoin) se décompose en trois phases: pendant 1h30 après l'ensemencement, la turbidité de la culture augmente très faiblement, signe d'une croissance bactérienne très lente. Il s'agit de la phase de latence, nécessaire à la bactérie pour s'acclimater au milieu. Entre 2h et 4h30 après l'ensemencement, la turbidité de la culture augmente rapidement, indiquant une multiplication rapide des bactéries. Il s'agit de la phase de croissance exponentielle, durant laquelle les bactéries se divisent très activement, tirant parti de la richesse du milieu. Enfin, après 5 heures de culture, la densité optique de la culture n'augmente plus que faiblement, signe d'une augmentation faible de la population bactérienne. Il s'agit de la phase stationnaire, pendant laquelle la densité bactérienne élevée régule négativement la croissance.

La turbidité des cultures bactériennes effectuées en présence de TFF3, quelle que soit la concentration, évolue de façon identique à celle de la culture témoin (Figure 22).

Le peptide TFF3 recombinant n'inhibe donc pas la croissance de *Staphylococcus aureus* dans du milieu TSB.

Effets de TFF3 et de l'EGF sur la migration cellulaire

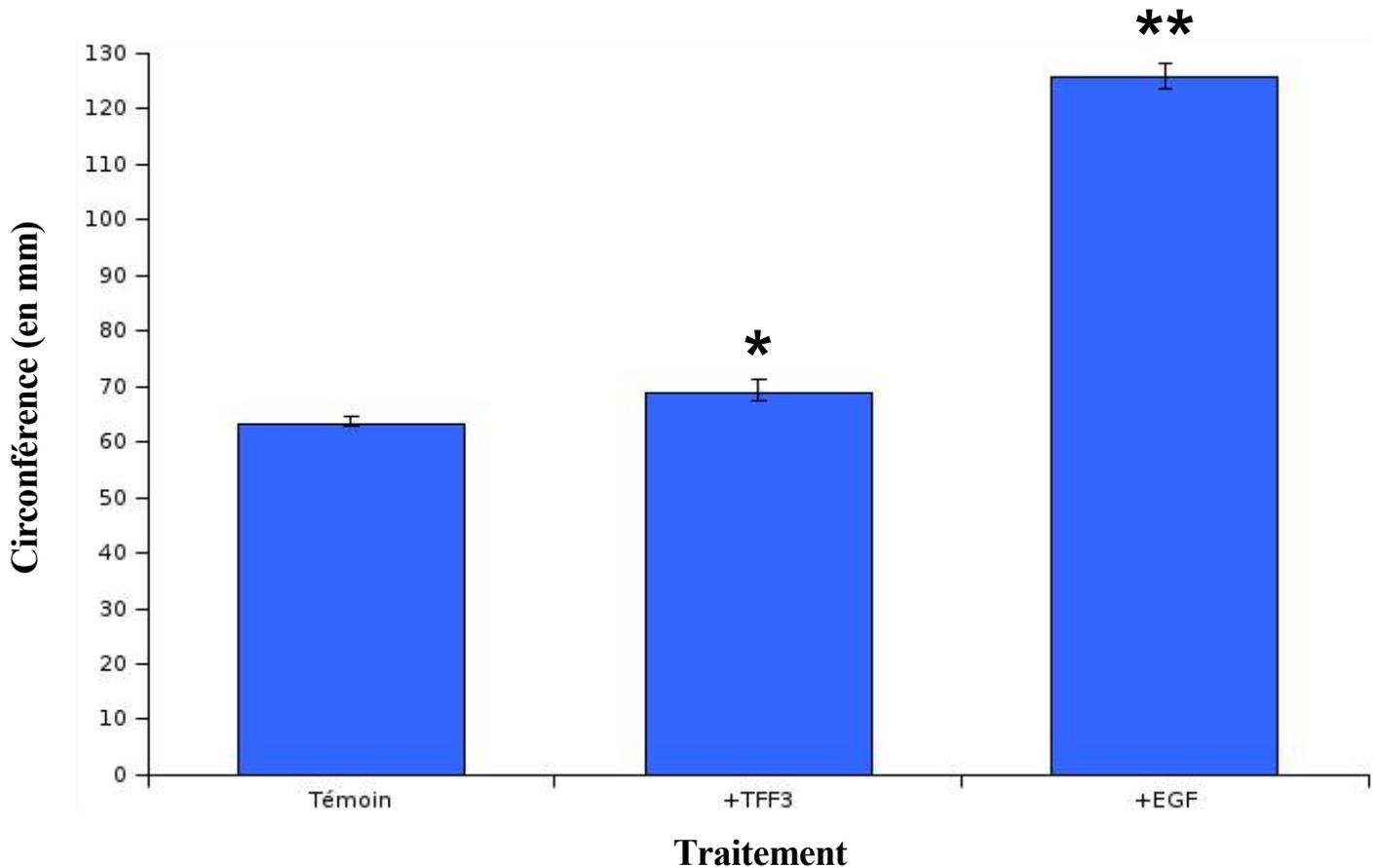


Figure 23: Effet de TFF3 sur la migration des cellules de l'épithélium respiratoire humain

Les cellules de l'épithélium respiratoire humain sont ensemencées en anneaux de silicone et traitées avec 2 μM du peptide TFF3 recombinant (**+TFF3**) ou avec 10 ng/mL d'EGF (**+EGF**). 72 heures après le retrait des anneaux, la circonférence de la zone colonisée est mesurée. L'EGF induit un doublement des capacités migratoires des cellules, alors que l'augmentation induite par le TFF3 est de 10% environ.

Les colonnes représentent la médiane des résultats obtenus sur cinq cultures au moins.

Les barres d'erreurs représentent les premier et troisième quartiles.

*: $p < 0.05$ par rapport au témoin.

** : $p < 0.001$ par rapport aux deux autres conditions.

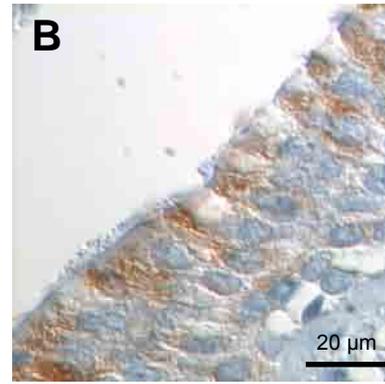
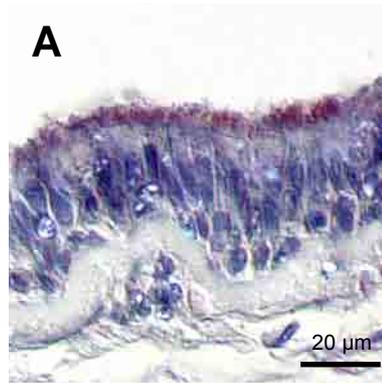
E.III Le peptide recombinant humain TFF3 induit la migration des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain.

Le peptide TFF est capable d'induire la migration des cellules d'origine respiratoire BEAS-2B (Oertel *et al.*, 2001). Un effet motogène sur les cellules de l'épithélium respiratoire humain pourrait favoriser la régénération *in vivo* en permettant l'établissement précoce de l'épithélium indifférencié, première étape de la restauration des fonctions de défense de l'épithélium. Nous avons testé cette hypothèse en examinant l'effet du peptide TFF3 recombinant sur la migration de cellules épithéliales humaines.

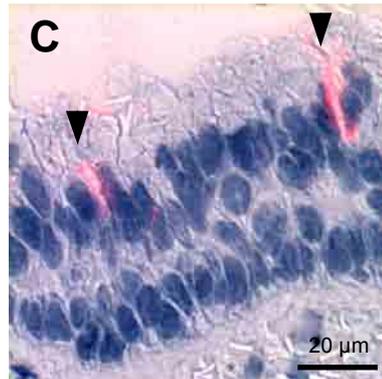
Dans le modèle de culture en anneaux de restriction, les cellules fraîchement dissociées de l'épithélium respiratoire de surface humain colonisent, 72 heures après retrait des anneaux, une zone dont la circonférence est de 63,2 mm (62,86;64,54). Lorsque le peptide recombinant TFF3 est ajouté dans le milieu, la circonférence de la zone colonisée est de 68,9 mm (67,5;71,3). A titre de comparaison, lorsque le peptide TFF3 est remplacé par de l'EGF, la circonférence des zones de migration passe à 125,8 mm (123,8;128,3). L'augmentation des capacités de migration induite par le peptide TFF3 est statistiquement significative ($p < 0,05$). La circonférence des zones de migration obtenues en présence de l'EGF est significativement plus grande que pour les cultures témoins et pour les cultures ayant été incubées en présence du peptide TFF3 (2 μ M) ($p < 0,05$).

Ces résultats indiquent que le peptide TFF3 recombinant est capable d'induire la migration des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain. Cependant, cet effet est faible comparé à l'activité motogène de l'EGF (Figure 23).

**Mucines
membranaires**



**Mucines
sécrétoires**



TFF3

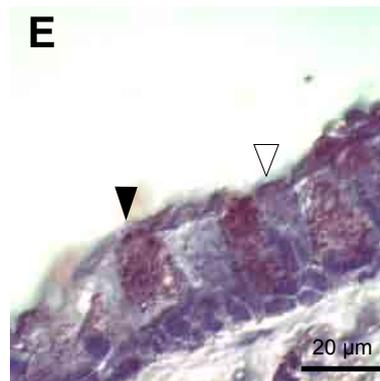


Figure 24: Localisation des mucines et des peptides trifoliés dans l'épithélium respiratoire humain *in vivo*.

La localisation des mucines et des TFF a été examinée sur des coupes de bronche humaine adulte.

A: MUC1 forme un liseré à la membrane apicale des cellules cylindriques.

B: MUC4 marque le cytoplasme de toutes les cellules de l'épithélium.

C: MUC5AC est détectée dans toutes les cellules caliciformes (flèches noires).

D: MUC5B est présente dans les cellules caliciformes (flèche noire). Certaines cellules caliciformes ne présentent pas de marquage MUC5B (flèche blanche).

E: TFF3 marque les cellules caliciformes (flèche noire). Certaines cellules caliciformes ne contiennent pas de TFF3 (flèche blanche).

TFF1 et TFF2 ne sont pas détectables.

E.IV Localisation des peptides trifoliés et des mucines dans l'épithélium respiratoire de surface humain

Avant de nous intéresser au rôle des peptides trifoliés et des mucines dans les modèles de régénération *ex vivo* (xénogreffe bronchique humanisée) ou *in vitro* (culture à l'interface air / liquide), nous avons vérifié leur expression et leur localisation dans l'épithélium respiratoire de surface humain adulte (Figure 24).

Nous avons pour cela analysé par immunohistochimie des coupes de polypes nasaux (n=4) et de bronches (n=3). Dans tous les tissus examinés, la distribution des mucines et des peptides trifoliés est identique. Le marquage MUC1 forme un liseré à l'apex des cellules cylindriques. MUC4 est détectable dans le cytoplasme de toutes les cellules de l'épithélium.

Les mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B sont observées dans les cellules caliciformes, mais avec une différence notable: MUC5AC est détectable dans toutes les cellules caliciformes, alors que certaines de ces cellules ne présentent pas de marquage MUC5B. Le peptide trifolié TFF3 présente une localisation similaire à celle de MUC5B: il est observable dans certaines cellules caliciformes, mais pas dans toutes.

Les peptides trifoliés TFF1 et TFF2 ne sont détectable dans aucun des tissus examinés.

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, et nous ont servi de référence pour valider les modèles de régénération et de différenciation de l'épithélium respiratoire humain que nous avons ensuite utilisés.

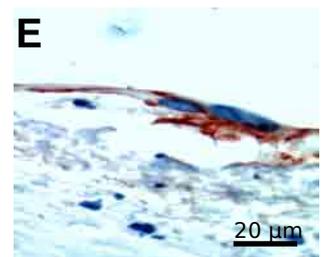
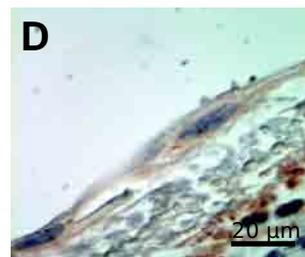
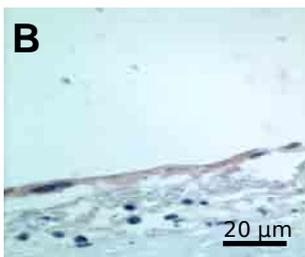
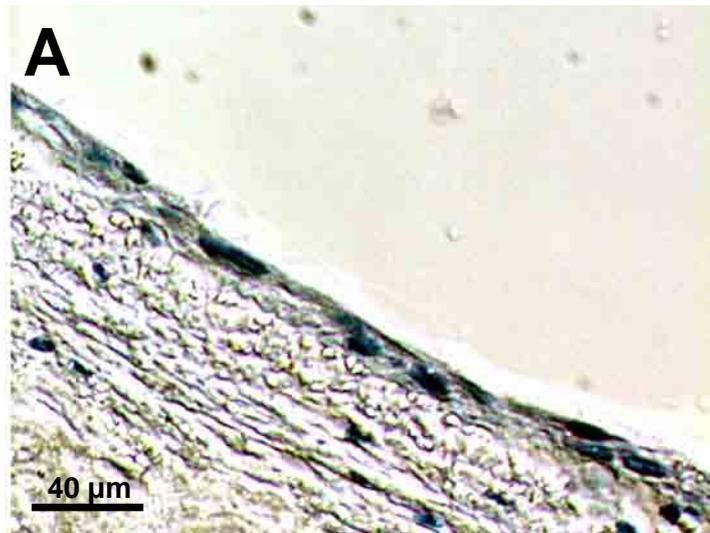


Figure 25: Régénération dans le modèle de xénogreffe: stade 1 (jour 5)

A: Après cinq jours de greffe, l'épithélium est constitué d'une simple couche de cellules étalées.

B: A ce stade, aucun noyau n'est marqué par l'anticorps KI-67, indiquant l'absence de prolifération.

C: Un fort marquage vimentine indique une migration cellulaire importante.

D: Le marquage diffus de la cadhérine E indique une cohésion imparfaite.

E: Dans certaines zones, la caténine β est membranaire au niveau des contacts intercellulaires, indiquant une mise en place partielle des jonctions intercellulaires.

E.V Caractérisation des modèles de régénération et de différenciation

Nous avons étudié la régénération de l'épithélium respiratoire humain dans les modèles de xéno greffe bronchique humanisée et de culture à l'interface air / liquide, au cours du temps. Sur des bases histologiques et immunologiques, nous avons identifié différentes phases distinctes correspondant aux stades de la régénération de l'épithélium respiratoire *in vivo*.

E.V.1 Régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans le modèle de xéno greffe bronchique humanisée

E.V.1.1 Stade 1: étalement, migration

Le premier stade identifié dans le modèle de xéno greffe est observable après 5 jours de greffe (Jour 5).

A ce stade, les cellules adhèrent à la membrane basale dénudée de la trachée de rat et s'étaient afin de couvrir toute la surface disponible. Les cellules sont donc très étalées, et par endroits le cytoplasme est si fin qu'on ne le distingue qu'à peine. Les noyaux sont ovoïdes, aplatis le long de la membrane basale (Figure 25 A).

A ce stade, les cellules expriment la vimentine, qui est un marqueur de cellules en migration,

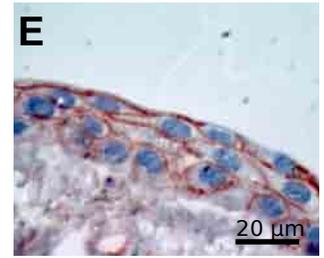
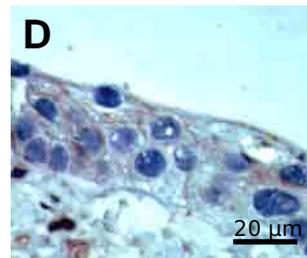
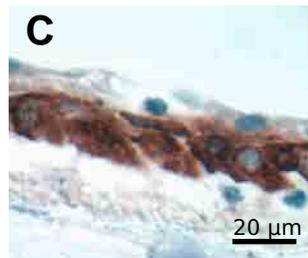
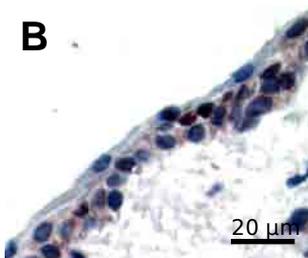
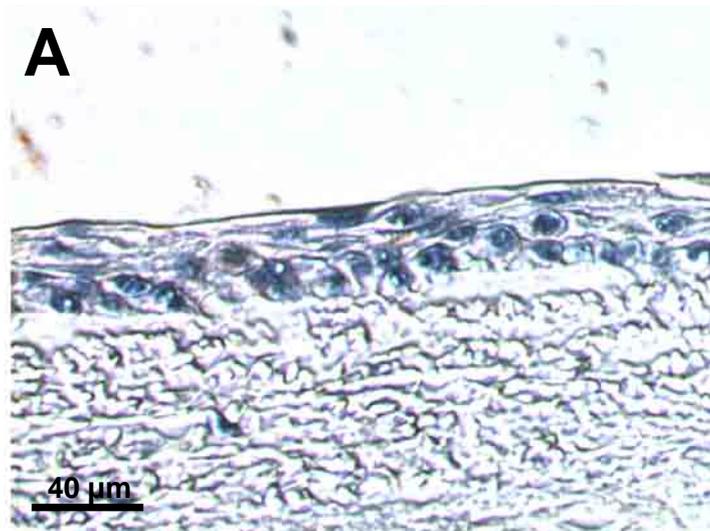


Figure 26: Régénération dans le modèle de xénogreffe: stade 2 (jour 15)

A: Après quinze jours de greffe, l'épithélium est stratifié. On observe quelques couches de cellules cuboïdales couvertes d'une couche de cellules allongées.

B: A ce stade, de nombreux noyaux sont positifs pour le KI67, indiquant une prolifération cellulaire importante.

C: Les cellules cuboïdales sont fortement marquées par l'anticorps anti-vimentine, indiquant des processus de remaniement.

D: La cadhérine E est membranaire.

E: La caténine β est membranaire.

D,E: La localisation de la cadhérine E et de la caténine β au niveau des contacts intercellulaires indique une bonne cohésion épithéliale.

mais pas le KI-67, indiquant l'absence de prolifération cellulaire. La cohésion intercellulaire est imparfaite, comme le montre le marquage diffus pour la cadhérine E, mais dans certaines zones de contact intercellulaire un marquage membranaire est détecté pour la caténine β , indiquant un début d'organisation des jonctions intercellulaires (Figure 25 B-E).

Ces données indiquent que ce stade correspond à la mise en place d'une couche cellulaire de protection, assurant un rôle de barrière imparfait.

E.V.1.2 Stade 2: prolifération, stratification

La deuxième étape de la régénération est observable dans les xénogreffes au jour 15.

A ce stade, la trachée de rat est couverte par un épithélium stratifié, présentant plusieurs couches de cellules cuboïdales (généralement deux ou trois) recouvertes d'une couche de cellules aplaties. Les noyaux des cellules cuboïdales sont ronds alors que ceux des cellules superficielles sont aplatis parallèlement à l'épithélium. (Figure 26 A)

De nombreux noyaux de cellules cuboïdales sont marqués par l'anticorps KI-67, signe d'une prolifération cellulaire importante au sein de ces couches. L'existence de remodelages importants est mise en évidence par le fort marquage vimentine visible dans le cytoplasme de toutes les cellules cuboïdales. A ce stade, la forte cohésion de l'épithélium est démontrée par la présence de la cadhérine E et de la caténine β au niveau de toutes les membranes aux contacts intercellulaires. (Figure 26 B-E)

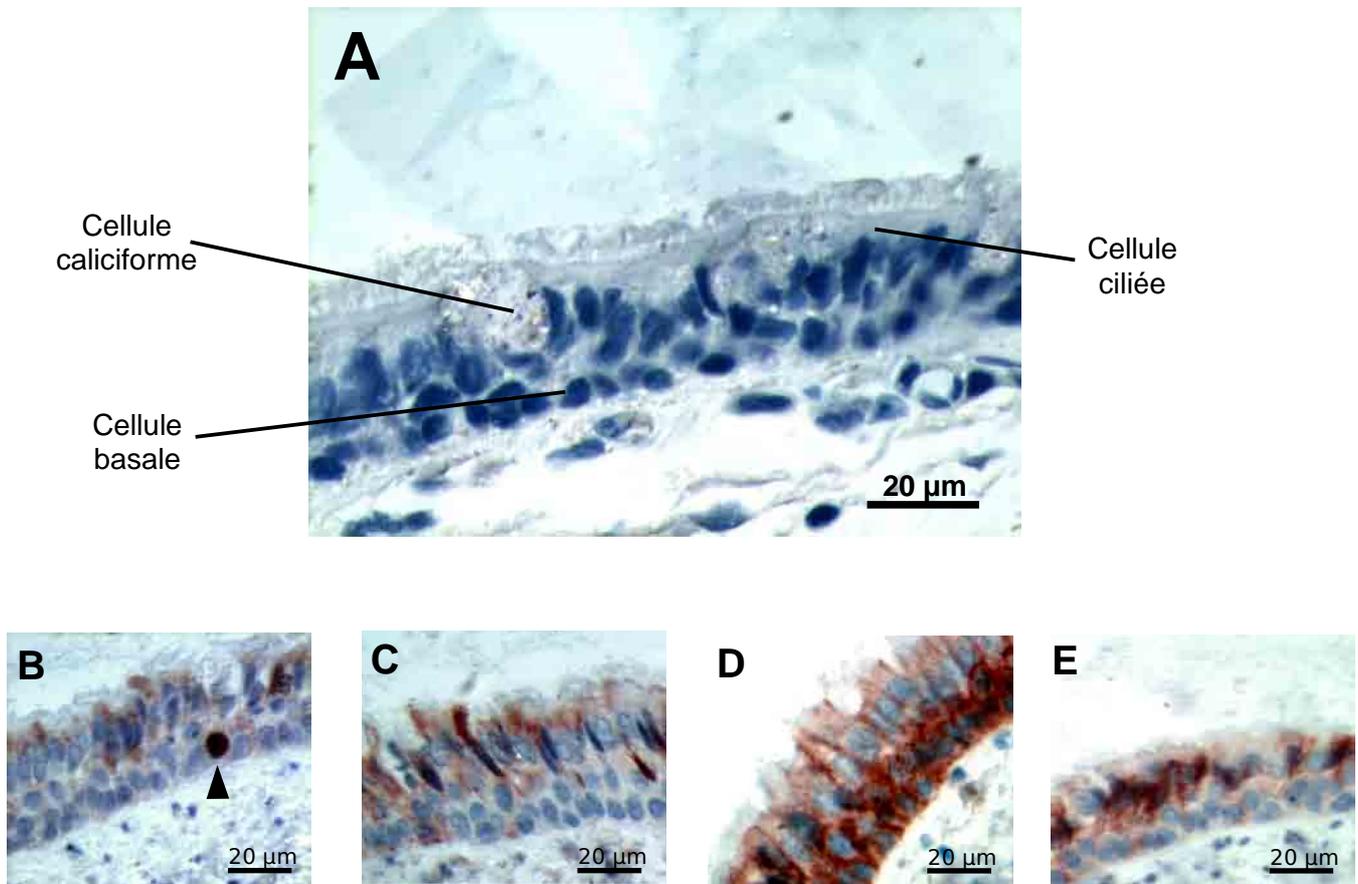


Figure 27: Régénération dans le modèle de xélogreffe: stade 3 (jour 35)

A: Après trente-cinq jours de greffe, l'épithélium est pseudostratifié. On peut ici identifier des cellules basales, des cellules ciliées et des cellules sécrétoires.

B: On observe quelques rares noyaux positifs pour le KI-67, exclusivement au sein des cellules basales (flèche).

C: Quelques cellules très allongées présentent un marquage vimentine, suggérant la persistance de phénomènes de remaniement.

D: Le marquage de la cadhérine E est situé au niveau membrane basolatérale des cellules cylindriques.

E: La caténine β est localisée au niveau de membrane basolatérale des cellules cylindriques.

Ces résultats indiquent qu'à ce stade l'épithélium constitue une barrière physique efficace. Les remaniements en cours, mis en évidence par la présence de la vimentine, préfigurent les transformations nécessaires à l'établissement d'un épithélium mature pseudostratifié. La couche de cellules étalées couvrant l'épithélium ne présente pas de signe de prolifération ou de migration; elle joue donc vraisemblablement un rôle de protection.

E.V.1.3 Stade 3: différenciation mucociliaire

Le troisième et dernier stade de la régénération de l'épithélium respiratoire humain dans le modèle de xéno greffe est observé après 35 jours. Il correspond à l'établissement d'un épithélium pseudostratifié mature de type mucociliaire.

L'épithélium est pseudostratifié, composé principalement de cellule cylindriques allongées et de cellules basales plus compactes. Toutes ces cellules sont ancrées au niveau de la lame basale, mais seules les cellules cylindriques atteignent la lumière de la trachée. Il s'agit de cellules ciliées et des cellules caliciformes, semblables à celles observables dans l'épithélium respiratoire humain adulte. L'épithélium ainsi reconstitué est donc typiquement un épithélium pseudostratifié de type respiratoire (Figure 27 A).

A ce stade, les cellules prolifèrent peu, mais quelques noyaux marqués par l'anticorps KI-67 sont visible au sein des cellules basales. Quelques cellules, de morphologie très allongée, et situées entre les cellules basales et les cellules cylindriques, sont marquées pour la vimentine. La cadhérine E et la caténine β sont détectées à la membrane basolatérale des cellules cylindriques. La cadhérine E est également présente aux contacts entre cellules basales et

cellules cylindriques (Figure 27 B-E).

La présence de cellules ciliées et de cellules caliciformes est caractéristique du rétablissement de la fonction de clairance mucociliaire, alors que les jonctions intercellulaires assurent la cohésion et le rôle de barrière de l'épithélium. A ce stade, l'épithélium est donc un épithélium respiratoire de surface pleinement différencié et fonctionnel.

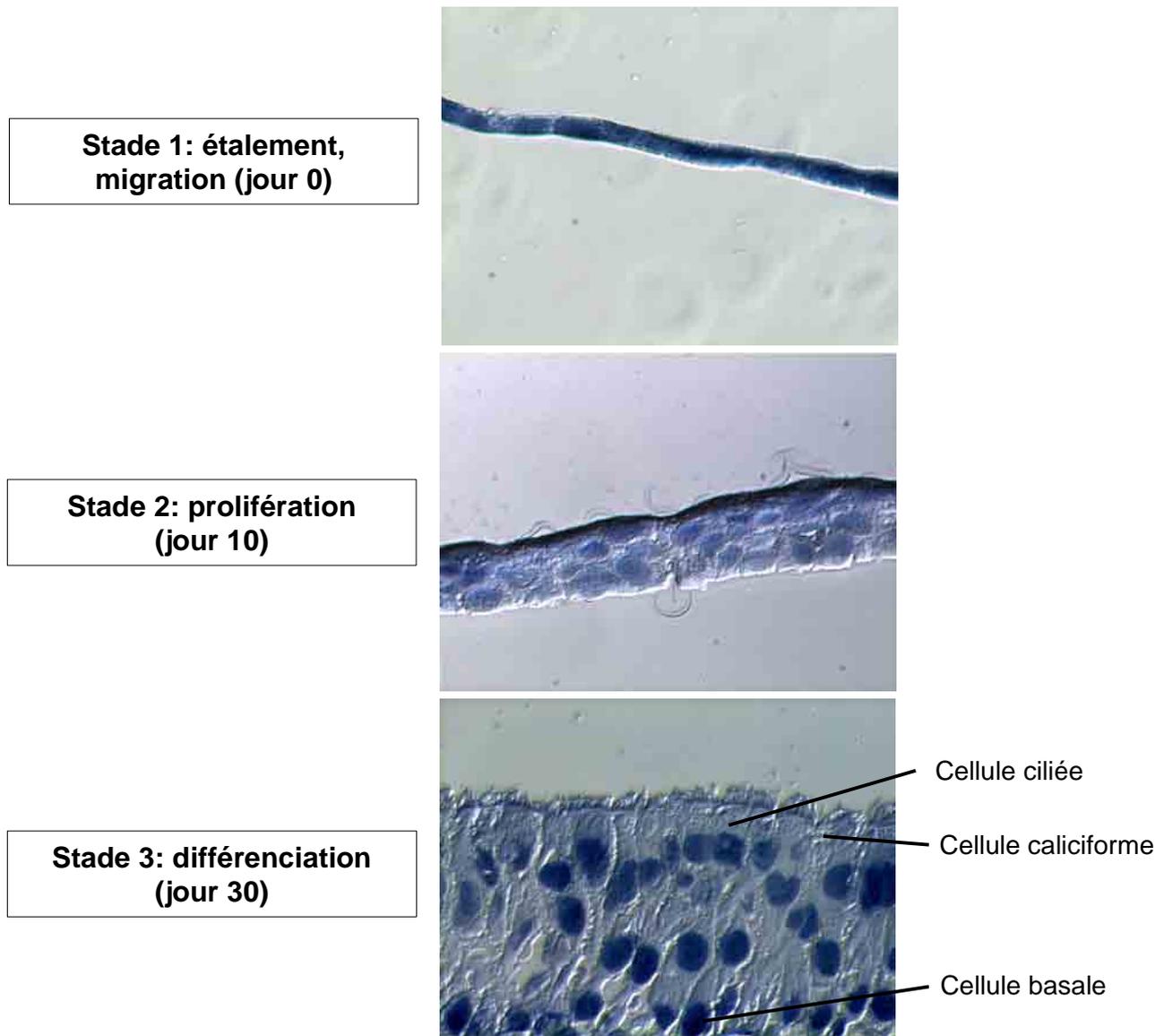


Figure 28: Régénération de l'épithélium respiratoire humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, la régénération se fait en trois étapes:

Stade 1: au jour 0, les cellules couvrent la surface de culture, formant une monocouche de cellules étalées. Par analogie avec stade 1 observé dans le modèle de régénération en xélogreffe, il s'agit probablement d'une étape de migration.

Stade 2: au jour 10, un épithélium transitoire stratifié se forme. On observe quelques couches de cellules cuboïdales, recouvertes d'une couche de cellules malpighiennes. Ce stade est semblable au stade 2 observé en xélogreffe: il s'agit d'un stade de prolifération.

Stade 3: après 30 jours de culture à l'interface air / liquide, l'épithélium humain est complètement régénéré et différencié. Des cellules ciliées, caliciformes et basales sont clairement identifiables.

E.V.2 Régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide

La régénération dans le modèle de culture à l'interface air / liquide suit les mêmes étapes que dans le modèle de xénogreffe et dans la régénération épithéliale *in vivo* (Figure 28). Les propriétés de l'épithélium ont pu être déterminées à chaque étape par observation directe au microscope inversé et par mesure de la résistance trans-épithéliale.

E.V.2.1 Stade 1: étalement, migration

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, les cellules adhèrent et couvrent la membrane poreuse pendant la phase de culture en conditions liquide / liquide. Le premier stade de la régénération est donc atteint au jour de passage en interface air / liquide, soit jour 0. A cette étape, la membrane est entièrement recouverte d'un tapis de cellules étalées, parfois si fines qu'elles sont à peine visibles en coupe transversale. Les noyaux sont aplatis le long de la membrane de culture. A ce stade, la résistance trans-épithéliale est relativement faible ($614 \pm 784 \Omega$, n=186), signe du rétablissement incomplet du rôle de barrière de l'épithélium (Figure 28 A).

E.V.2.2 Stade 2: prolifération, stratification

Le deuxième stade de la régénération de l'épithélium est atteint après 10 jours de culture à

l'interface air / liquide. Il est caractérisé par un épithélium stratifié composé d'une ou plusieurs couches de cellules cuboïdales couverte d'une couche de cellules étalées. L'épithélium à ce stade est moins épais que dans le modèle de xéno greffe, et comporte généralement une ou deux couches de cellules cuboïdales seulement. A ce stade, l'épithélium est très cohésif comme le montrent les valeurs élevées de la résistance trans-épithéliale: $1876 \pm 999 \Omega$ (n=75). Ce stade correspond donc à la mise en place d'un épithélium transitoire, étanche et donc assurant pleinement sa fonction de défense physique (Figure 28 B).

E.V.2.3 Stade 3: différenciation mucociliaire

Ce troisième et dernier stade de la régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide est atteint après 30 jours. A ce stade l'épithélium est composé principalement de cellules basales, de cellules ciliées et de quelques cellules caliciformes. La résistance trans-épithéliale est plus faible qu'au stade 2 mais reste élevée: $983 \pm 542 \Omega$ (n=44), ce qui est compatible avec le rôle de barrière sélective de l'épithélium respiratoire de surface. La présence de cellules caliciformes et de nombreuses cellules ciliées dont la fonctionnalité en terme de battement ciliaire a pu être vérifiée par observation au microscope inversé indique que l'épithélium régénéré a rétabli sa fonction de clairance mucociliaire.

Il s'agit donc bien d'un épithélium respiratoire de surface pleinement différencié et fonctionnel. A la différence de l'épithélium régénéré dans les modèles de xéno greffe bronchique humanisée, l'épithélium différencié obtenu dans le modèle de culture à l'interface air / liquide ne présente que peu de cellules caliciformes, et ces cellules sont plus petites que celles que l'on peut observer dans les xéno greffes au même stade (Figure 28 C).

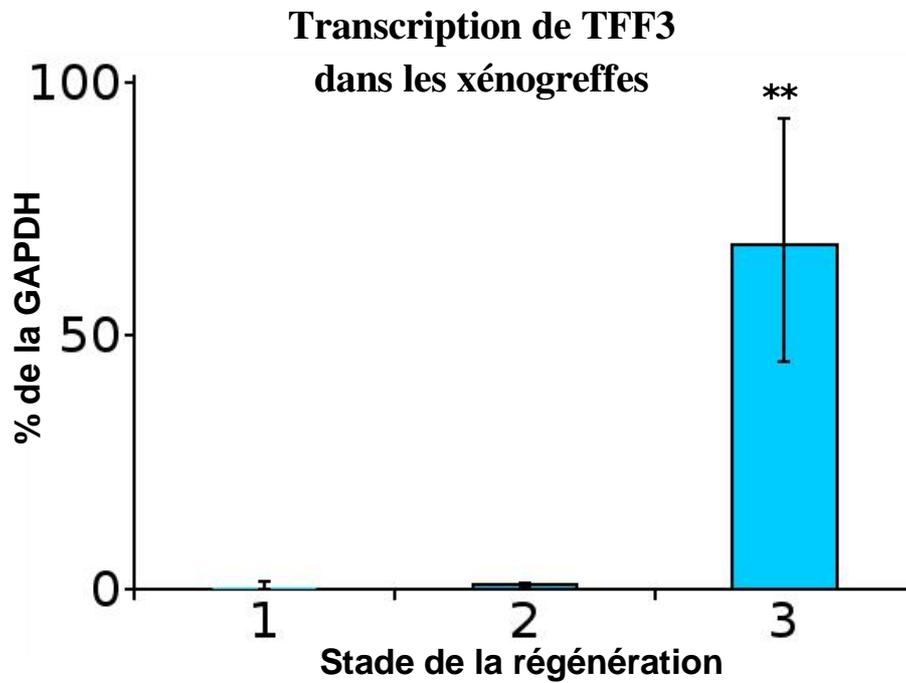
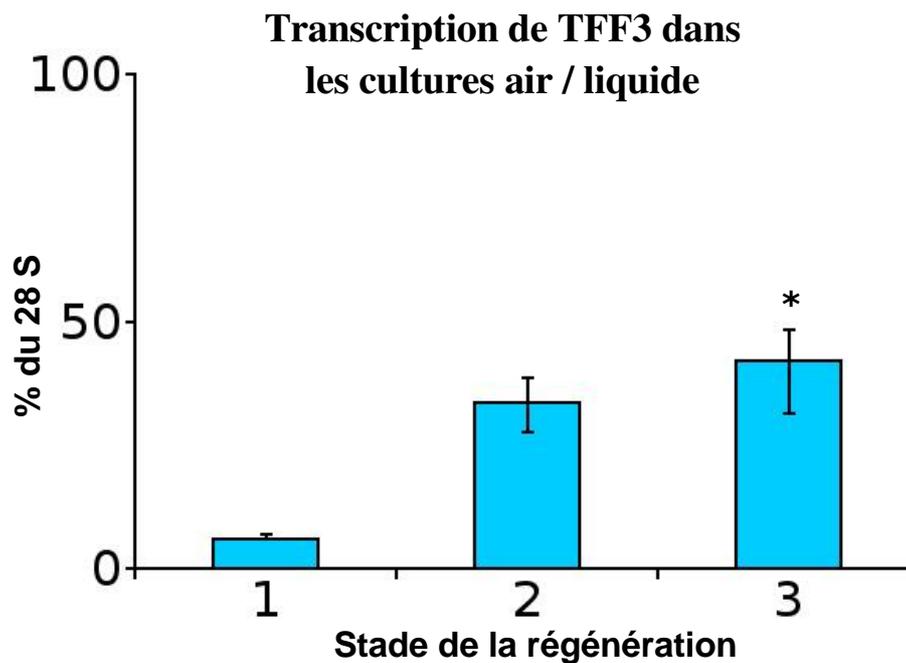
A**B**

Figure 29: Expression des peptides trifoliés en xénogreffe et en culture à l'interface air / liquide

A: Dans le modèle de xénogreffe, la transcription de TFF3 est très faible au stade 1 et au stade 2 de la régénération. Elle augmente significativement dans l'épithélium bien différencié (stade 3).

B: Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, la transcription de TFF3 est faible au stade 1, plus forte au stade 2 et elle atteint son maximum au stade 3.

*: $p < 0,05$ par rapport au stade 1

** : $p < 0,005$ par rapport au stade 1

E.V.3 Expression des peptides trifoliés au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

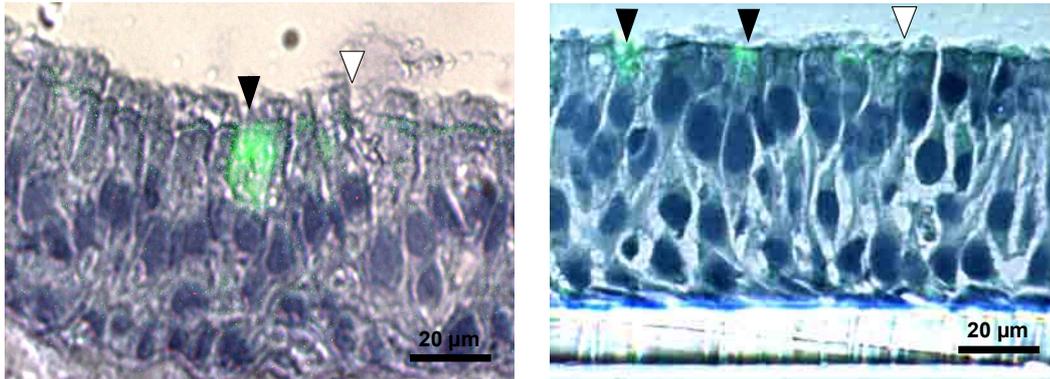
Afin de déterminer le rôle potentiel des peptides trifoliés dans la régénération de l'épithélium respiratoire humain, nous avons étudié leur expression aux différents stades de la régénération et de la différenciation dans les modèles de xéno greffe bronchique humanisée et de culture à l'interface air / liquide, reproduisant tous deux les étapes de la régénération de l'épithélium respiratoire de surface *in vivo*. Nous avons tout d'abord recherché la présence des ARN messagers codant pour ces peptides, au cours de la régénération et de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain. Dans le modèle de xéno greffe, les ARN messagers de TFF1 et de TFF2 n'ont pas pu être détectés, quel que soit le stade. L'ARN messager codant pour TFF3 est très faiblement exprimé au stade 1 (épithélium indifférencié) et au stade 2 (épithélium transitoire), mais présent en grande quantité au stade 3, dans l'épithélium complètement différencié (Figure 29 A).

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, l'ARN codant pour TFF3 est transcrit très faiblement au stade 1, et la transcription augmente ensuite au stade 2 pour être maximale au stade 3, dans l'épithélium pleinement différencié (Figure 29 B).

L'augmentation de la transcription de TFF3 est statistiquement significative au stade 3 dans les deux modèles.

A

Localisation du peptide TFF3 au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire

**Xénogreffe****Culture air / liquide****B**

Sécrétion du peptide TFF3 par les cultures à l'interface air / liquide

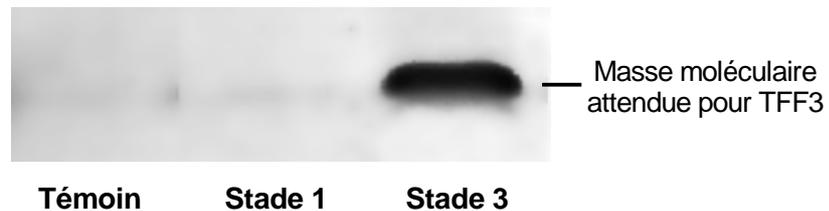
**Témoin****Stade 1****Stade 3**Masse moléculaire
attendue pour TFF3

Figure 30: Localisation et sécrétion du peptide TFF3 au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

A: Dans les modèles de xénogreffe et de culture à l'interface air / liquide, le peptide TFF3 n'est pas détectable par immunohistochimie au stade 1 ni au stade 2. Au stade 3 (épithélium pseudostratifié bien différencié), TFF3 est présent dans certaines cellules caliciformes (flèches noires). On remarque que certaines cellules caliciformes ne contiennent pas de TFF3 (flèches blanches).

B: Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, le peptide trifolié TFF3 est détecté par Western Blot dans les sécrétions apicales de l'épithélium bien différencié (stade 3). **Stade 1, Stade 3:** sécrétions apicales provenant de cultures aux stades 1 et 3 de la régénération, respectivement. **Témoin:** milieu DMEM / BEBM seul.

La production des peptides trifoliés a ensuite été étudiée par immunohistochimie au cours des processus de régénération et de différenciation dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide.

Les peptides TFF1 et TFF2 ne sont détectables ni dans le modèle de xéno greffe, ni dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, quel que soit le stade examiné.

Dans le modèle de xéno greffe, TFF3 est indétectable par immunomarquage dans l'épithélium indifférencié (stade 1) et dans l'épithélium intermédiaire stratifié (stade 2). Dans l'épithélium mature différencié (stade 3), il est détecté dans certaines cellules caliciformes, mais pas toutes (Figure 30 A).

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, les résultats obtenus sont similaires: TFF3 est détecté dans certaines des cellules sécrétoires de l'épithélium respiratoire de surface différencié (stade 3), mais n'est pas détectable au stade 1 ni au stade 2 (Figure 30 A).

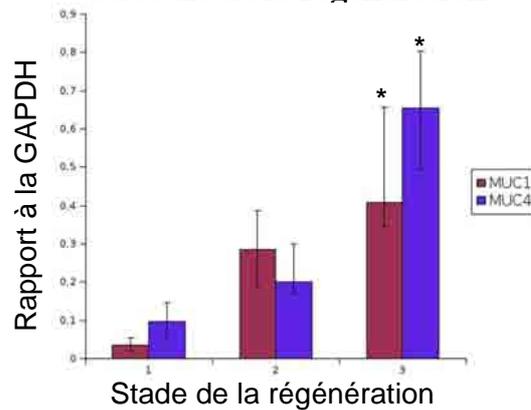
Nous avons ensuite étudié les sécrétions apicales de l'épithélium aux différents stades de la régénération dans le modèle de culture à l'interface air / liquide afin de déterminer si le peptide TFF3 produit au stade 3 peut être sécrété (Figure 30B). Le peptide TFF3 est absent des sécrétions de l'épithélium non différencié (stade 1), mais on le détecte dans les sécrétions apicales de l'épithélium mature différencié (stade 3) (Figure 30 B).

Ces résultats indiquent que les peptides TFF1 et TFF2 ne sont pas exprimés au cours des processus de régénération de l'épithélium respiratoire humain. Le peptide TFF3 est exprimé et sécrété par les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire humain différencié, mais il est

absent des étapes précoces de la régénération. Au stade 3, le peptide TFF3 est détecté seulement dans certaines cellules sécrétoires, ce qui suggère l'existence de sous-classes de cellules caliciformes.

A

Transcription de MUC1 et MUC4 au cours de la régénération

**B**

Localisation de MUC1 et MUC4 au cours de la régénération

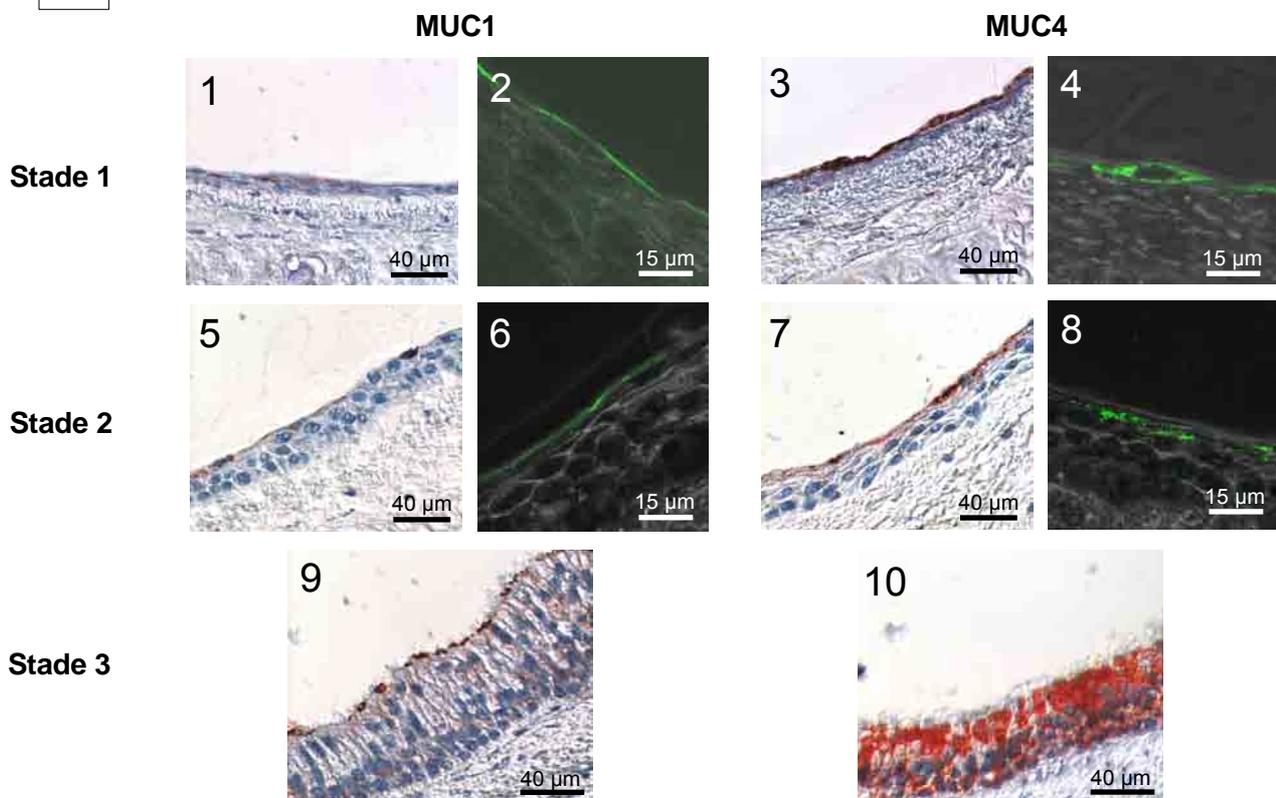


Figure 31: Expression de MUC1 et MUC4 au cours de la régénération de l'épithélium en xénogreffe

A: La transcription des mucines MUC1 et MUC4 est faible au stade 1. Elle augmente régulièrement au long de la régénération et de la différenciation de l'épithélium.

*: $p < 0,05$ par rapport au stade 1.

B: MUC1 et MUC4 sont présentes dans l'épithélium indifférencié (stade 1, **1** et **3**). La microscopie confocale (plan X/Z) montre une localisation membranaire pour MUC1 (**2**) et cytoplasmique pour MUC4 (**4**). Au stade 2, MUC1 et MUC4 sont présentes dans les cellules aplaties couvrant l'épithélium (**5** et **7**). MUC1 est localisée dans la membrane luminale de ces cellules (**6**), et MUC4 dans le cytoplasme (**8**). Dans l'épithélium bien différencié, MUC1 est présente à la membrane apicale des cellules cylindriques (**9**) et MUC4 dans le cytoplasme de toutes les cellules (**10**).

E.V.4 Expression des mucines au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

E.V.4.1 Expression des mucines membranaires MUC1 et MUC4

Nous avons tout d'abord examiné la transcription des mucines membranaires MUC1 et MUC4 au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain dans le modèle de xéno greffe bronchique humanisé (Figure 31 A).

Les ARN messagers des mucines membranaires MUC1 et MUC4 sont détectables dès le stade 1 (épithélium indifférencié). Leur transcription augmente au stade 2 (épithélium transitoire stratifié) et est maximale dans l'épithélium différencié (stade 3). L'augmentation de la transcription de ces mucines est régulière au cours des processus de régénération et de différenciation.

Nous avons ensuite examiné la localisation des glycoprotéines MUC1 et MUC4 par immunohistochimie (Figure 31 B).

Au stade 1, le marquage MUC1 forme un liseré le long de l'épithélium indifférencié. L'observation au microscope confocal montre que ce liseré correspond à la membrane luminale des cellules étalées.

Au stade 2, l'anticorps MUC1 forme un liseré à la surface luminale de l'épithélium. Aucun marquage n'est visible dans les cellules cuboïdales des couches sous-jacentes. L'observation en microscopie confocale montre que ce marquage est localisé à la membrane luminale des cellules

malpighiennes de surface.

Au stade 3, MUC1 marque l'apex des cellules cylindrique, notamment celui des cellules ciliées.

Au stade 1, le marquage MUC4 est plus diffus que le marquage MUC1. L'observation au microscope confocal montre que MUC4 est présente dans le cytoplasme des cellules étalées. Aucun marquage membranaire n'est visible.

Au stade 2, MUC4 est détectable dans le cytoplasme des cellules malpighiennes de l'épithélium stratifié. Elle est absente des couches de cellules cuboïdales sous-jacentes.

De même, au stade 3, le cytoplasme de toutes les cellules de l'épithélium différencié est marqué par l'anticorps MUC4.

Ces données indiquent que les mucines membranaires MUC1 et MUC4 sont exprimées dès la première étape de la régénération de l'épithélium respiratoire humain. Alors que MUC1 est toujours localisée dans les membranes exposées vers la lumière de l'épithélium, MUC4 semble être présente dans le cytoplasme de toutes les cellules épithéliales. Aucune localisation de cette glycoprotéine à la membrane plasmique n'a été mise en évidence.

Les propriétés anti-adhésives de MUC1 pourraient jouer un rôle dans la mise en place de l'épithélium transitoire stratifié. Elle pourrait également jouer un rôle dans la défense de l'épithélium en diminuant l'adhérence des contaminants inhalés, notamment pendant les premières étapes de la régénération, au cours desquelles le mécanisme de clairance mucociliaire n'est pas encore opérationnel.

MUC4 pourrait être présente dans la membrane d'organites cytoplasmiques. Son rôle dans la

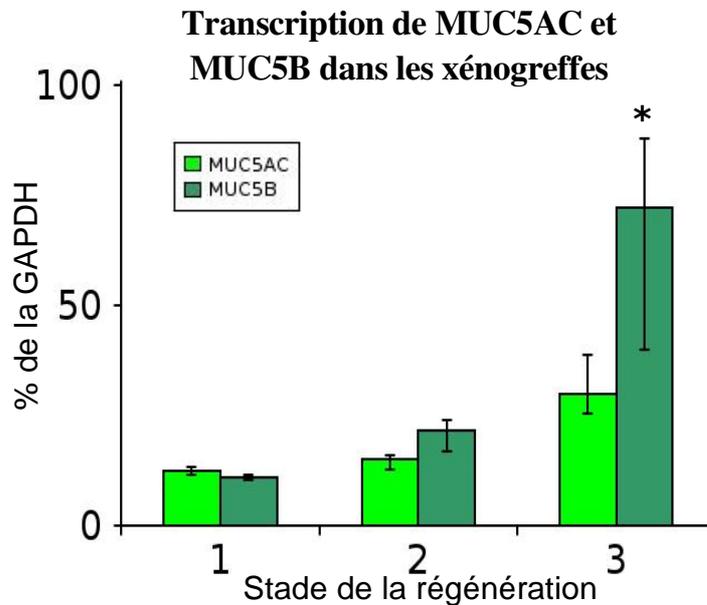
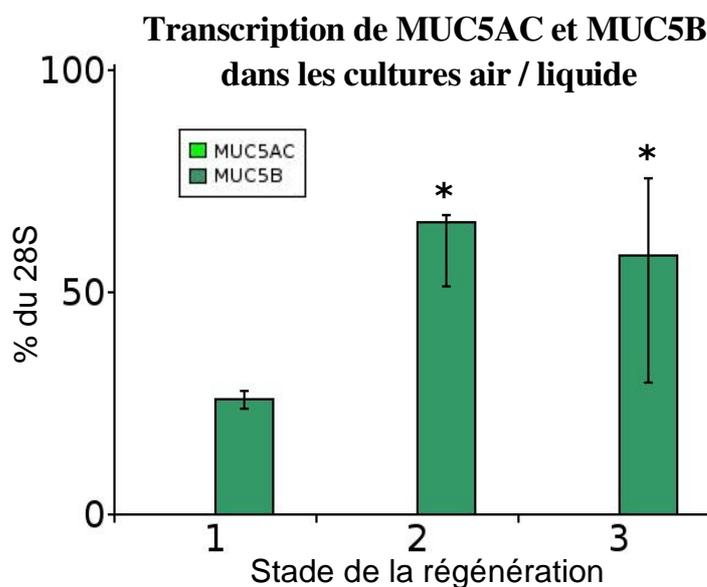
A**B**

Figure 32: Transcription de MUC5AC et MUC5B au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

A: Dans le modèle de xénogreffe, la transcription de MUC5AC est faible dans l'épithélium plat indifférencié (stade 1) et dans l'épithélium stratifié transitoire (stade 2). Elle augmente légèrement dans l'épithélium bien différencié (stade 3). MUC5B est faiblement transcrite au stade 1 et au stade 2, et sa transcription augmente de façon significative dans l'épithélium pseudostratifié bien différencié (stade 3).

B: Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, les ARN messagers de MUC5AC sont indétectables quel que soit le stade de régénération examiné. La transcription de MUC5B est faible au stade 1 et augmente dans l'épithélium stratifié transitoire (stade 2). Elle se maintient ensuite au même niveau dans l'épithélium bien différencié (stade 3).

*: $p < 0,05$ par rapport au stade 1

régénération et la différenciation reste difficile à évaluer.

E.V.4.2 Expression des mucines sécrétées MUC5AC et MUC5B

Nous nous sommes ensuite intéressés à la transcription des mucines sécrétées au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain dans les modèles de xénotransplante et de culture à l'interface air / liquide, que nous avons étudiée par RT-PCR.

Dans le modèle de xénotransplante, les gènes codant pour MUC5AC et MUC5B sont faiblement transcrits dans l'épithélium indifférencié (stade 1) et dans l'épithélium stratifié transitoire (stade 2). Leur transcription est significativement augmentée dans l'épithélium pseudostratifié bien différencié (stade 3), mais cette augmentation est relativement faible pour MUC5AC (Figure 32 A).

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, l'ARN messager de MUC5AC n'est pas détectable, quel que soit le stade examiné. L'ARN MUC5B est présent en faible quantité au stade 1. Son expression augmente dans l'épithélium stratifié (stade 2) et est maintenue au stade 3 (épithélium bien différencié) (Figure 32 B).

Nous avons vérifié la localisation des glycoprotéines MUC5AC et MUC5B par marquage immunocytochimique (Figure 33).

Dans le modèle de xénotransplante, MUC5AC et MUC5B ne sont pas détectables dans l'épithélium indifférencié ni dans l'épithélium stratifié transitoire (stades 1 et 2). Dans l'épithélium

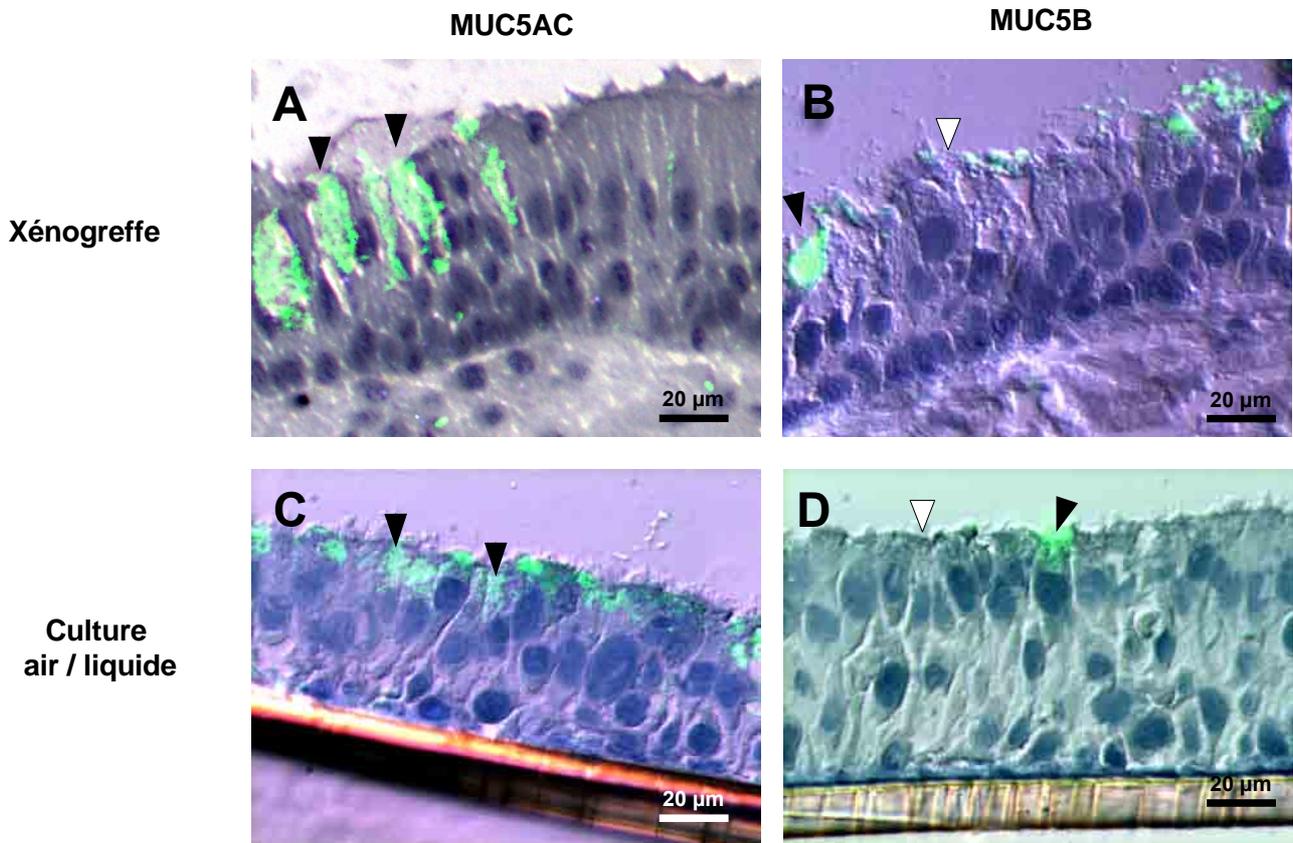


Figure 33: Localisation de MUC5AC et MUC5B au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

Dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide, les mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B ne sont pas détectables par immunohistochimie dans l'épithélium indifférencié (stade 1) ni dans l'épithélium stratifié (stade 2).

Au stade 3 (épithélium pseudostratifié bien différencié), MUC5AC est présente dans toutes les cellules caliciformes dans les deux modèles (**A** et **C**, flèches noires).

A ce stade, MUC5B est également détectée dans les cellules caliciformes (**B** et **D**, flèches noires). On remarque cependant que certaines cellules caliciformes ne sont pas marquées par l'anticorps MUC5B (**B** et **D**, flèches blanches).

complètement régénéré et différencié, l'anticorps MUC5AC marque toutes les cellules caliciformes (Figure 33 A). A ce même stade, la mucine MUC5B est détectée dans certaines cellules caliciformes, mais pas dans toutes (Figure 33 B).

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, MUC5AC et MUC5B sont également absentes des épithéliums indifférencié et transitoire (stade 1 et stade 2). Dans l'épithélium pseudostratifié mature (stade 3), MUC5AC est présente dans toutes les cellules caliciformes (Figure 33 C). Comme dans le modèle de xéno greffe, MUC5B est détectée seulement dans une sous-population de cellules caliciformes (Figure 33 D).

Nous avons également étudié par western blot la sécrétion des mucines MUC5AC et MUC5B dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, aux différentes étapes de la régénération épithéliale.

Ces deux mucines sécrétoires ne sont pas détectables dans les sécrétions apicales de l'épithélium plat indifférencié (stade 1) ou de l'épithélium stratifié transitoire (stade 2). MUC5AC et MUC5B sont par contre présentes dans les sécrétions apicales de l'épithélium pseudostratifié mature (stade 3) (Figure 34).

Ces résultats indiquent que les mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B sont exprimées par l'épithélium pseudostratifié bien différencié dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide. Elles sont sécrétées dans le compartiment apical par l'épithélium différencié dans le modèle de culture à l'interface air / liquide. Dans ce modèle, la transcription de MUC5B est faible et précoce: le gène codant pour cette mucine est en effet transcrit au même niveau dans l'épithélium stratifié transitoire et dans l'épithélium pseudostratifié mature. La

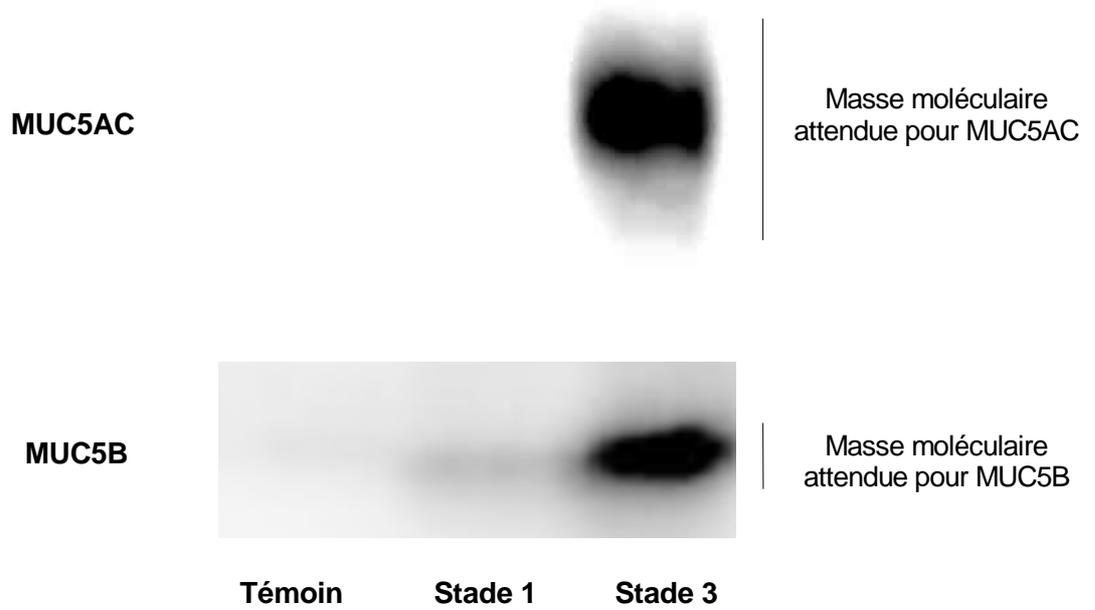


Figure 34: Sécrétion de MUC5AC et MUC5B au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire humain

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, les mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B sont détectées par western blot dans les sécrétions apicales de l'épithélium bien différencié (stade 3), mais sont absentes des sécrétions de l'épithélium plat indifférencié (stade 1). **Stade 1, Stade 3**: sécrétions apicales provenant de cultures aux stades 1 et 3 de la régénération, respectivement. **Témoin**: milieu DMEM / BEBM seul.

protéine correspondante est absente au stade 2 (épithélium stratifié transitoire) malgré une transcription détectable. La transcription du gène codant pour MUC5AC n'est détectable à aucun stade dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, or la protéine correspondante est correctement produite et sécrétée par les cellules caliciformes de l'épithélium bien différencié (stade 3) dans ce même modèle. De plus, dans le modèle de xénogreffe, l'application d'un grand nombre de cycles d'amplification (40) a été nécessaire afin de détecter l'ARN messenger MUC5AC. Ceci indique que le gène codant pour MUC5AC est transcrit de façon précoce (stade 2) et à un faible niveau. Les ARN messagers produits sont vraisemblablement stockés pour être traduits de façon très efficace dans l'épithélium bien différencié (stade 3). Le faible niveau de transcription associé à une traduction très efficace expliquerait que l'ARN messenger MUC5AC soit sous le seuil de détection des techniques employées dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, dans lequel les cellules caliciformes sont rares et de petite taille, bien que la protéine correspondante soit détectable.

La forte augmentation de la transcription de MUC5B observée dans le modèle de xénogreffe au stade 3, que l'on ne retrouve pas dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, suggère de même une transcription précoce (stade 2) de cette mucine pour créer un stock d'ARN messagers transcrits plus tardivement (stade 3). Dans le modèle de xénogreffe, où les cellules caliciformes sont nombreuses et volumineuses, une production supplémentaire d'ARN messagers serait nécessaire.

L'expression de MUC5AC dans toutes les cellules caliciformes alors que MUC5B n'est détectée que dans certaines d'entre elles, ainsi que les différences de profils de transcription pour ces mucines, suggèrent que l'expression de MUC5AC et de MUC5B est régulée de façon différente.

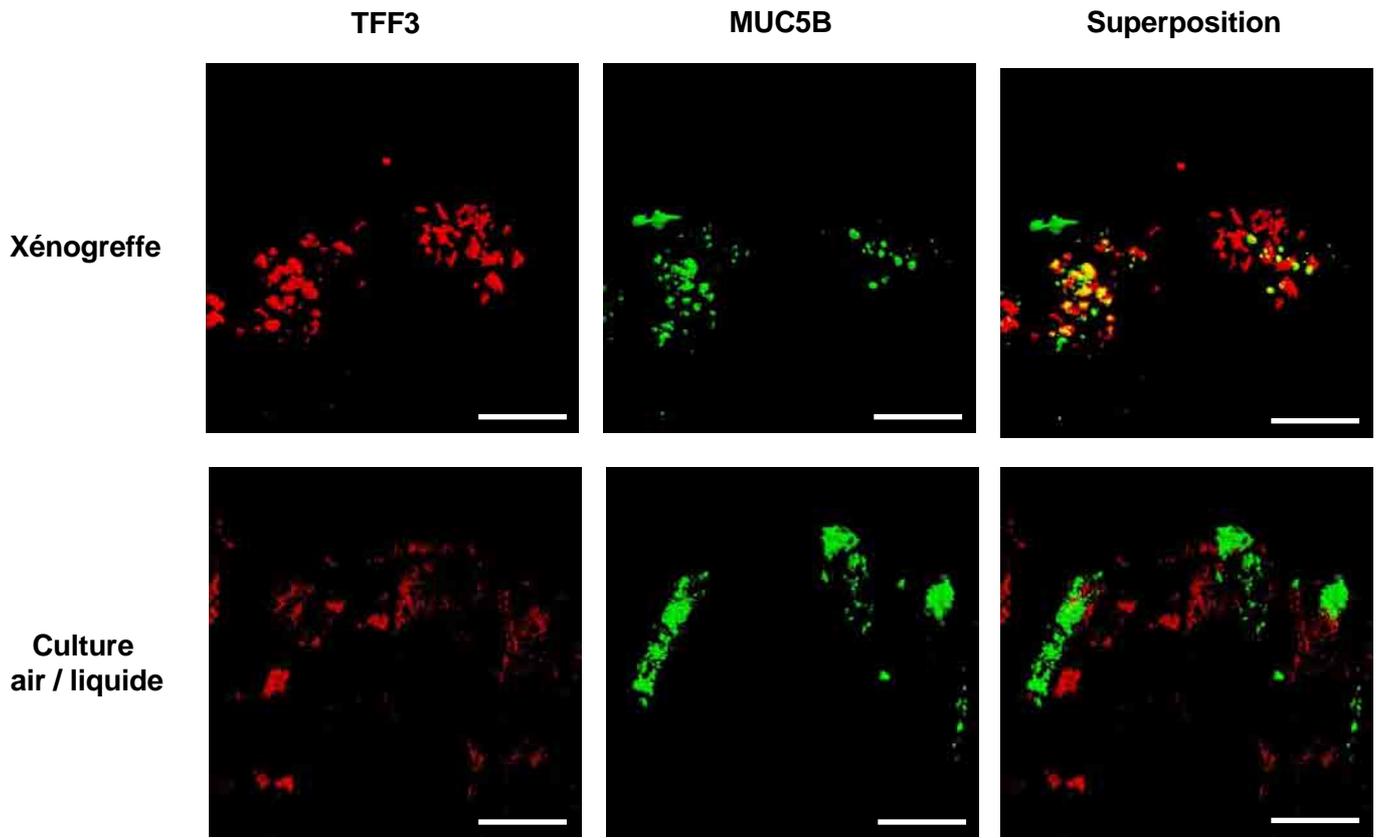


Figure 35: Co-localisation partielle de TFF3 et MUC5B

Dans les modèles de xénotgreffe et de culture à l'interface air / liquide, l'observation des marquages TFF3 et MUC5B au microscope confocal révèle qu'ils sont tous deux localisés dans les granules sécrétoires des cellules caliciformes.

La superposition des marquages obtenus dans le modèle de xénotgreffe montre que certains de ces granules ne contiennent que TFF3 (rouge), d'autres ne contiennent que MUC5B (vert) et certains contiennent à la fois TFF3 et MUC5B (jaune). Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, la co-localisation de TFF3 et MUC5B est encore moins importante.

Barres d'échelle: 15 µm.

E.V.5 MUC5B est partiellement co-localisée avec le peptide TFF3

Nous avons observé un marquage MUC5AC dans toutes les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire humain bien différencié dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide. Au contraire, les marquages TFF3 et MUC5B ne sont observées que dans des sous-catégories de cellules caliciformes, dans ces deux modèles. Ceci suggère l'existence de sous-classes de cellules caliciformes dans l'épithélium respiratoire humain, et indique que l'expression de MUC5AC d'une part, et de MUC5B et TFF3 d'autre part, est régulée différemment. Afin de mieux caractériser les sous-populations de cellules caliciformes identifiées par les marquages TFF3 et MUC5B, et notamment pour vérifier si TFF3 et MUC5B sont exprimés conjointement par les mêmes cellules, nous avons effectué des doubles immunomarquages TFF3/MUC5B au stade 3 (épithélium mature) dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide. Ces marquages ont été analysés en microscopie confocale (Figure 35).

Dans le modèle de xéno greffe bronchique humanisée, les marquages TFF3 (en rouge) et MUC5B (en vert) sont présents sous forme de granules, qui correspondent aux granules de sécrétion des cellules caliciformes. La superposition des deux marquages fait apparaître quelques points jaunes, correspondant à une superposition des marquages rouge et vert. Ces granules jaunes sont donc les granules sécrétoires dans lesquels TFF3 et MUC5B sont co-exprimés. On remarque aussi de nombreux granules rouges qui correspondent aux granules

contenant TFF3, mais pas MUC5B et des granules verts qui correspondent aux granules contenant MUC5B, mais pas TFF3.

Dans le modèles de culture à l'interface air / liquide, les marquages rouge (TFF3) et vert (MUC5B) sont également présents sous forme de granules dans les cellules caliciformes. La superposition des deux marquages fait apparaître de très rares points jaunes, correspondant aux granules contenant à la fois TFF3 et MUC5B. Dans leur majorité, les marquages TFF3 (rouge) et MUC5B (vert) sont bien distincts, et sont présents dans des cellules différentes.

Ces résultats indiquent que TFF3 et MUC5B ne sont pas strictement co-localisés dans les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire différencié régénéré dans les modèles de xénotransplantation et de culture à l'interface air / liquide. Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, certaines cellules caliciformes expriment uniquement TFF3 ou uniquement MUC5B. Dans les deux modèles, certaines cellules expriment conjointement TFF3 et MUC5B. Dans ces cellules, les granules de sécrétion peuvent contenir soit TFF3 seul, soit MUC5B seule, soit TFF3 et MUC5B. L'expression et la sécrétion de TFF3 et de MUC5B semblent donc être régulées de façon différente.

E.VI Effet du peptide TFF3 recombinant dans le modèle de culture à l'interface air / liquide

Nous avons vu que le peptide TFF3 ne semble pas avoir d'effets sur la croissance de *Staphylococcus aureus*. Il est capable d'induire une augmentation de la migration des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain, mais cet effet est très faible comparé à l'effet motogène de l'EGF. Afin de déterminer le rôle joué par le peptide TFF3 dans les voies aériennes humaines, nous avons étudié l'effet de l'addition du peptide TFF3 recombinant dans le modèle de culture à l'interface air / liquide. Pour cela, nous avons ajouté le peptide TFF3 au milieu basolatéral de nos cultures au moment du passage à l'interface air / liquide (jour 0), et nous l'y avons maintenu jusqu'à un stade de différenciation précoce (jour 15), intermédiaire entre le stade 2 et le stade 3.

Ce traitement a été appliqué en présence et en absence d'EGF, afin d'étudier les éventuelles interférences avec la voie de signalisation de l'EGF. Dans le même but, le traitement par le peptide TFF3 a également été réalisé en absence d'EGF, mais en présence de tyrphostine AG 1478, qui est un inhibiteur puissant et spécifique du récepteur HER1 (récepteur de l'EGF).

E.VI.1 Quantification des cellules ciliées, basales et sécrétoires.

Dans les différentes conditions testées, les cellules ciliées ont été identifiées par

immunomarquage de la tubuline β , puis quantifiées. Pour le comptage des cellules basales, le marquage de la cytokératine 13 a été utilisé, alors que les cellules caliciformes ont été identifiées par marquage de MUC5AC. Nous avons également utilisé le facteur de transcription FOXJ1 pour quantifier les noyaux des cellules en cours de ciliogenèse.

L'addition du peptide TFF3 recombinant (2 μ M) dans le milieu de différenciation n'induit pas de modification significative du nombre de cellules ciliées: dans les cultures ayant reçu TFF3. On compte, après 15 jours de culture, 26,4 (15,21; 29,42) cellules positives pour la tubuline β par millimètre d'épithélium contre 25,44 (14,81;31,11) cellules ciliées par millimètre dans les cultures témoin ($p=0,41$). L'expérience a été réalisée de façon indépendante sur trois cultures issues de polypes nasaux différents.

Le milieu de différenciation que nous utilisons est conçu pour optimiser la différenciation des cellules de l'épithélium respiratoire de surface humain. Il est donc compréhensible que l'addition d'un facteur supplémentaire n'a pas d'effet. Nous avons donc réitéré cette expérience en utilisant cette fois un milieu de différenciation dans lequel l'EGF n'a pas été ajouté. En dehors de cette omission volontaire, la composition de ce milieu est identique à celle du milieu de différenciation utilisé précédemment.

Dans ces conditions, l'ajout de TFF3 n'induit pas de modification significative du nombre de cellules positives pour la cytokératine 13 après 15 jours de culture à l'interface air / liquide: on dénombre 38,9 (31,6;50,7) cellules basales par millimètre d'épithélium dans les cultures témoins contre 52,4 (40,0;68,5) cellules basales par mm dans les cultures ayant reçu le peptide TFF3 ($p=0,28$). Le nombre de cellules caliciformes n'est pas non plus significativement modifié par ce traitement, puisqu'on compte 1,8 (1,4;2,9) cellules marquées pour MUC5AC par mm d'épithélium dans les cultures témoins contre 1,4 (0,6;2,0) cellules MUC5AC+ par mm dans les

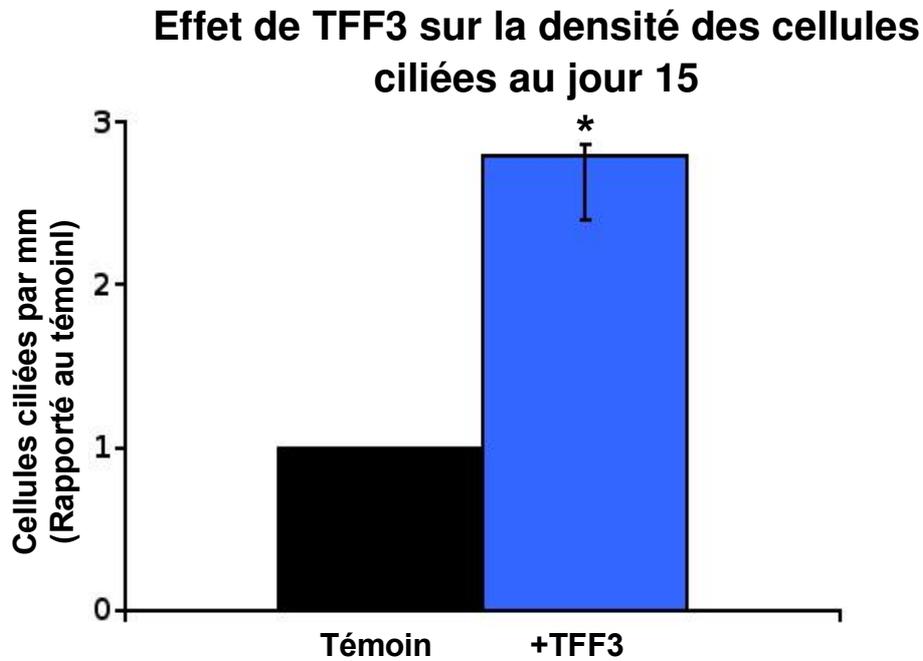
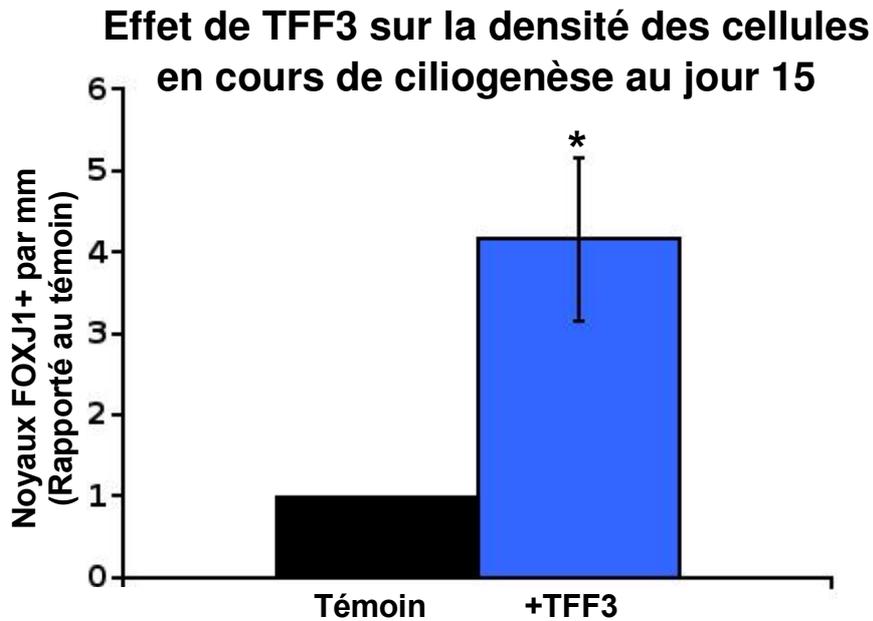
A**B**

Figure 36: Effet de TFF3 sur la différenciation des cellules ciliées au jour 15 en culture à l'interface air / liquide

A: Le peptide TFF3 recombinant ajouté aux cultures à l'interface air / liquide en absence d'EGF induit une augmentation significative du nombre de cellules ciliées (marquées par la tubuline β) par millimètre d'épithélium au quinzième jour de culture.

B: L'addition du peptide TFF3 recombinant dans le modèle de culture air / liquide sans EGF induit une augmentation significative de la densité de noyaux marqués par le facteur de transcription FOXJ1, indiquant une augmentation du nombre de cellules en cours de ciliogenèse.

Les colonnes représentent les médianes, et les barres d'erreur représentent les premier et troisième quartiles.

*: $p < 0,05$.

cultures traitées par le peptide TFF3 ($p=0,26$).

Par contre, nous avons constaté une augmentation significative du nombre de cellules ciliées après traitement continu par le peptide TFF3 recombinant pendant 15 jours: le nombre de cellules marquées par la tubuline β par mm d'épithélium est augmenté d'un facteur de 2,8 (2,4;2,9) dans les cultures traitées par rapport aux cultures témoin correspondantes ($p<0,05$) (Figure 36 A).

Ce résultat est confirmé par l'augmentation du nombre de cellules en cours de ciliogenèse, évalué à l'aide du marquage du facteur de transcription FOXJ1: le nombre de noyaux positifs pour ce marqueur par mm d'épithélium est multiplié par un facteur de 4,1 (2,9;5,0) dans les cultures ayant reçu le peptide TFF3 recombinant, par rapport aux cultures témoin correspondantes ($p<0,05$) (Figure 36 B).

Ces résultats indiquent que l'ajout de TFF3 recombinant dans le modèle de culture à l'interface air / liquide permet d'augmenter spécifiquement la différenciation des cellules ciliées en absence d'EGF. L'absence d'effet du peptide TFF3 en présence de l'EGF suggère que ces deux facteurs partagent des voies de signalisation communes.

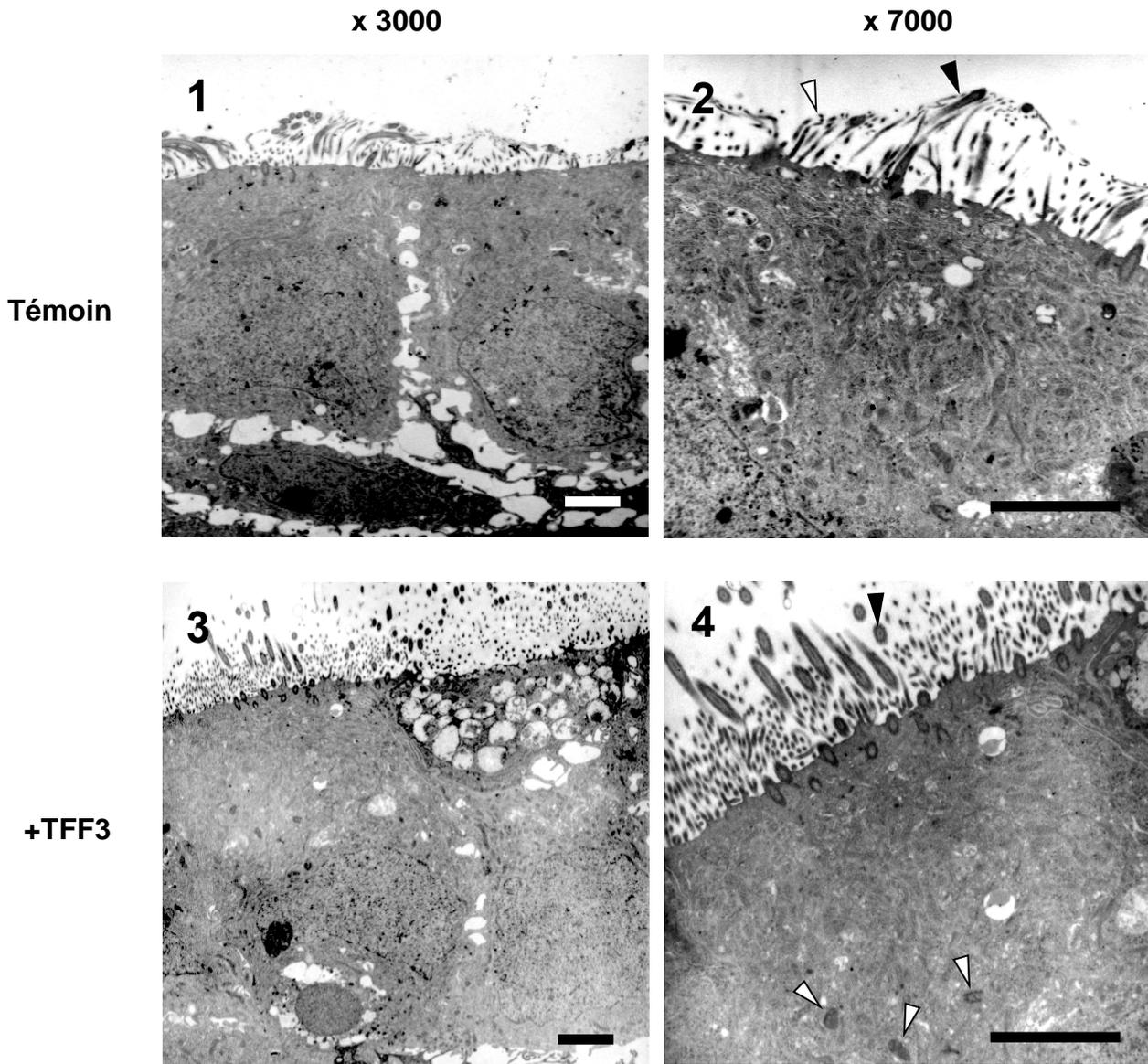


Figure 37: Effet de TFF3 sur la ciliogenèse au jour 15

1 et 2: Au jour 15 dans le modèle de culture à l'interface air /liquide en absence d'EGF, l'observation en microscopie électronique à transmission montre que la surface des cultures présente principalement de longues microvillosités (**2**, flèche blanche) et des cils immatures (**2**, flèche noire).

3 et 4: Les cultures réalisées en absence d'EGF, mais en présence du peptide TFF3 recombinant présentent des cils matures (**4**, flèche noire) et on peut observer des corps basaux en cours de migration vers la membrane apicale (**4**, flèche blanche).

1 et 3: grossissement initial x 3000

2 et 4: grossissement initial x 7000

Barres d'échelle: 3 μ m

E.VI.2 Observation des marqueurs ultrastructuraux de la ciliogenèse

La ciliogenèse est caractérisée au niveau sub-cellulaire par la migration vers la membrane apicale des structures à partir desquelles se développent les cils: les corps basaux. Nous avons donc examiné les cultures à l'interface air / liquide réalisées en absence d'EGF, avec ou sans addition du peptide TFF3, à la recherche de telles structures. L'observation a été réalisée au début de la différenciation, après 15 jours de culture (étape intermédiaire entre l'épithélium stratifié transitoire et l'épithélium pseudostratifié mature), comme décrit précédemment.

La surface des cultures réalisées en absence d'EGF et sans TFF3 présente majoritairement de longues microvillosités et des cils immatures caractérisés par l'absence de structure du type « 9+2 ». Dans ces cultures, nous n'avons pas observé de corps basaux en migration. A l'inverse, les cultures ayant reçu le peptide TFF3 recombinant en absence d'EGF portent de nombreux cils matures, et des corps basaux en formation et/ou en migration sont observables (Figure 37).

Ces résultats confirment au niveau sub-cellulaire l'augmentation de la différenciation des cellules ciliées induite par le peptide TFF3 après 15 jours de culture à l'interface air / liquide en absence d'EGF. La présence de nombreux cils matures indique une fonctionnalité accrue des cellules ciliées, alors que les corps basaux en migration révèle l'existence d'un processus de ciliogenèse actif dans les cultures ayant reçu le peptide TFF3. A l'inverse, les cellules n'ayant pas reçu ce peptide sont moins fonctionnelles (cils immatures et microvillosités) et ne montrent pas de signe de ciliogenèse active.

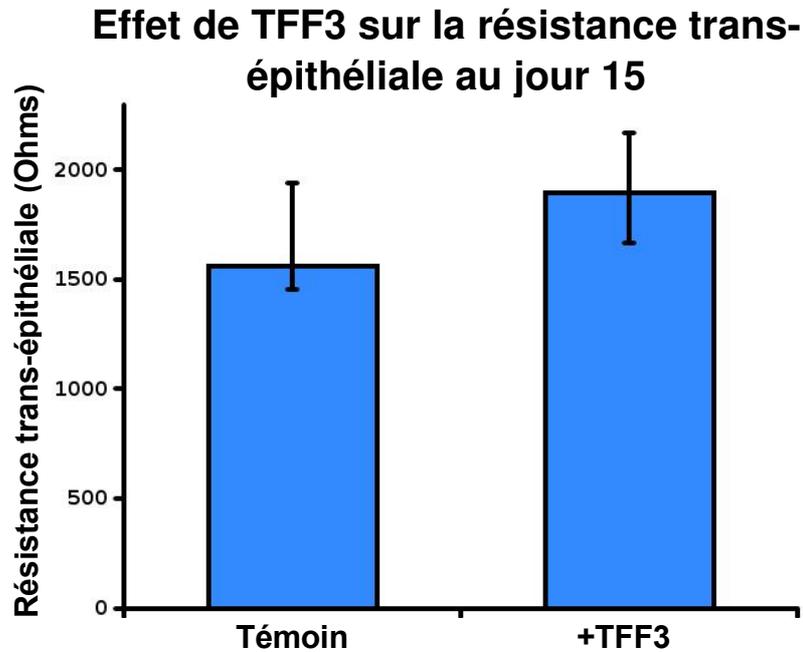
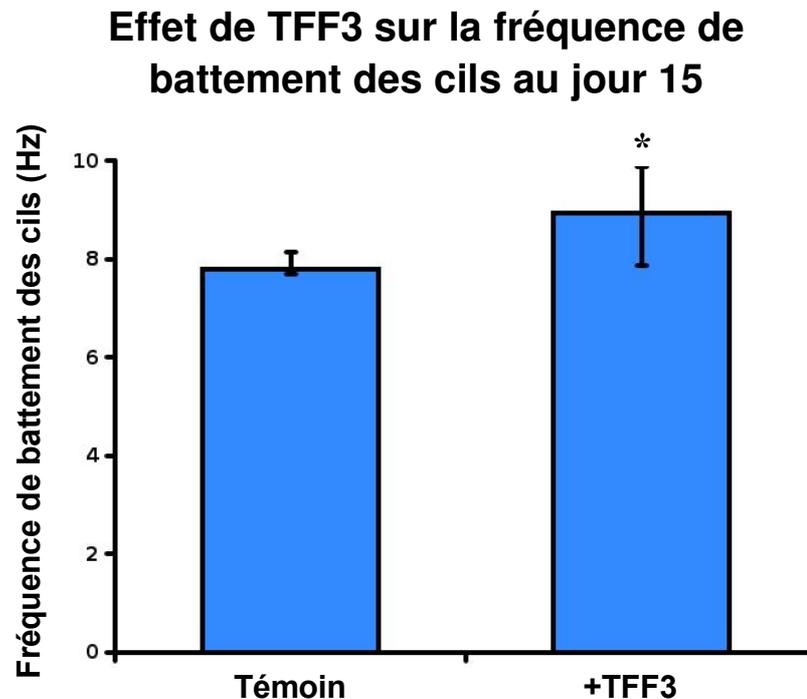
A**B**

Figure 38: Effets de TFF3 sur la fonctionnalité de l'épithélium au jour 15 en culture à l'interface air / liquide

A: Le peptide TFF3 recombinant ajouté aux cultures à l'interface air / liquide en absence d'EGF n'induit pas de variation significative de la résistance trans-épithéliale au jour 15.

B: L'addition du peptide TFF3 recombinant dans le modèle de culture air / liquide sans EGF induit une augmentation faible mais statistiquement significative de la fréquence de battement des cils.

Les colonnes représentent les médianes, et les barres d'erreur représentent les premier et troisième quartiles.

*: $p < 0,05$.

E.VI.3 Paramètres fonctionnels: battement ciliaire, perméabilité

Nous avons vu que l'addition du peptide TFF3 recombinant en absence d'EGF est capable d'augmenter le nombre de cellules ciliées et de cellules en cours de ciliogenèse, et favorise l'apparition des marqueurs ultrastructuraux des cellules ciliées fonctionnelles. Nous nous sommes donc ensuite naturellement penchés sur les effets de TFF3 sur la fonctionnalité de l'épithélium. Nous avons choisi d'étudier la résistance trans-épithéliale, reflet de la jonctionnalité de l'épithélium et donc de sa fonction de barrière, et la fréquence de battement des cils, qui reflète la fonction de clairance mucociliaire (Figure 38).

La résistance trans-épithéliale, mesurée sur les cultures issues de 8 polypes différents, est de 1560 (1475,5;1942,5) Ω dans les cultures réalisées en absence d'EGF, sans addition de TFF3, contre 1895 (1667,5;1940) Ω dans les cultures sans EGF mais traitées par le peptide TFF3 recombinant. Cette très légère augmentation n'est pas statistiquement significative ($p=0,26$).

A l'inverse, La fréquence de battement des cils est de 8,9 (7,9;9,9) Hz dans les cultures ayant reçu le peptide TFF3, ce qui constitue une augmentation significative ($p<0,05$) par rapport à la fréquence observée dans les cultures témoins, qui n'est que de 7,8 (7,4;8,6) Hz.

Ces données démontrent que l'addition du peptide TFF3 dans les cultures à l'interface air / liquide réalisées en absence d'EGF induit une augmentation spécifique de la fonction défensive de clairance mucociliaire, par l'intermédiaire d'une augmentation de la fréquence de battement des cils. La perméabilité de l'épithélium aux ions, par contre, n'est pas significativement altérée.

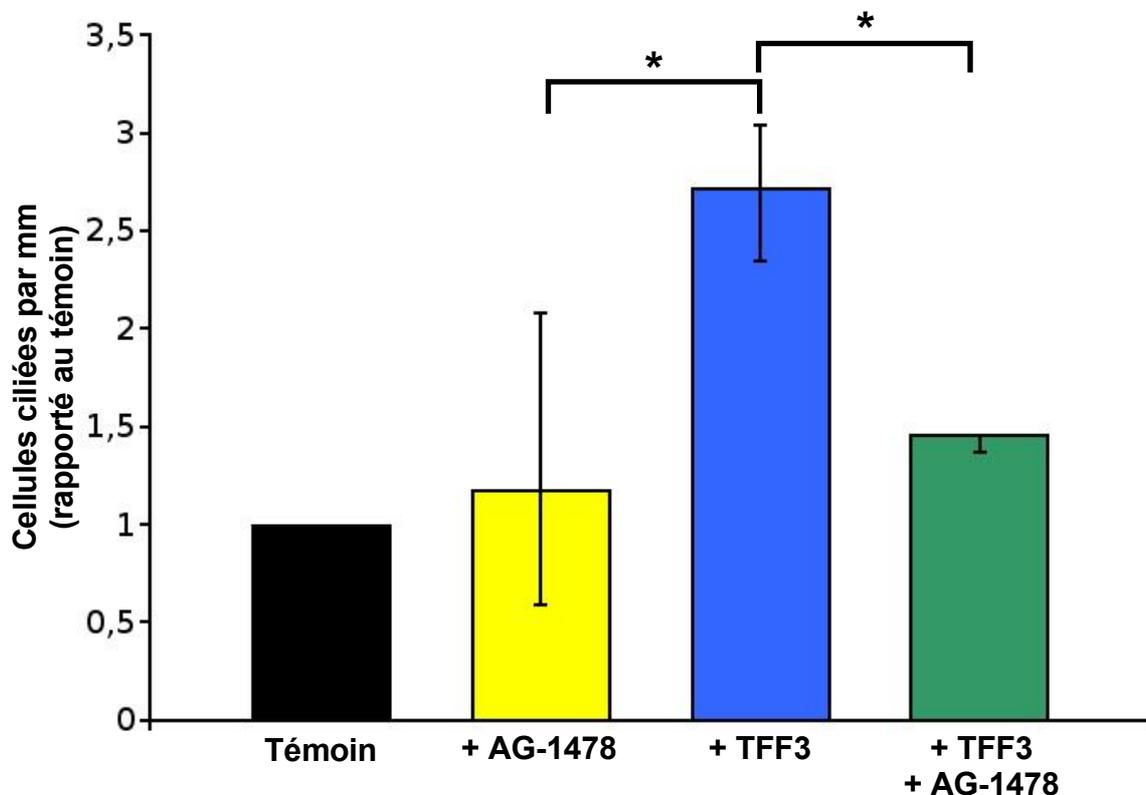


Figure 39: Effet de l'inhibition de l'EGF-R sur l'action du peptide TFF3

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, l'ajout de l'inhibiteur de l'EGF-R AG-1478 (**+AG-1478**) n'induit pas de variation de la densité de cellules ciliées (marquées par la tubuline β) au jour 15. L'ajout du peptide trifolié TFF3 recombinant (**+ TFF3**) induit une augmentation significative du nombre de cellules ciliées par millimètre d'épithélium. Cette augmentation est totalement inhibée par l'ajout de l'inhibiteur AG-1478 conjointement au peptide TFF3 (**+TFF3, +AG-1478**).

Les colonnes représentent les médianes, et les barres d'erreur représentent les premier et troisième quartiles.

*: $p < 0,05$

E.VI.4 Effet de l'inhibition du récepteur de l'EGF

Le peptide TFF3 recombinant n'augmente pas le nombre de cellules ciliées lorsqu'il est ajouté aux cultures à l'interface air / liquide réalisées en présence d'EGF. Ceci suggère que le peptide TFF3 pourrait partager des voies de signalisation communes avec l'EGF. Pour éclaircir la nature de ces interactions, nous avons employé un inhibiteur puissant et spécifique du récepteur de l'EGF HER1 (EGF-R), la tyrphostine AG-1478, dans des cultures à l'interface air / liquide réalisées en l'absence d'EGF, avec ou sans addition de TFF3. Dans ces différentes conditions, nous avons quantifié les cellules ciliées grâce à l'immunomarquage de la tubuline β (Figure 39).

Le traitement des cultures cellulaires réalisées sans EGF par l'inhibiteur de HER1 n'induit pas de changement significatif dans le nombre de cellules ciliées par mm d'épithélium après 15 jours de culture à l'interface air / liquide (8,1 (4,0; 15,2) cellules ciliées par mm dans les cultures traitées, contre 7,4 (7,2;13,9) cellules ciliées par mm dans les contrôles).

L'addition du peptide TFF3 recombinant dans les mêmes conditions induit une augmentation d'un facteur 2,7 (2,3;3,0) du nombre de cellules positive pour la tubuline β par mm d'épithélium ($p < 0,05$).

Lorsque l'on ajoute en même temps le peptide TFF3 et l'inhibiteur de l'EGF-R, le nombre de cellules ciliées observées par millimètre de lame basale est similaire à celui observable dans les cultures témoins, et significativement plus faible que dans les cultures ayant reçu le peptide TFF3 seul (10,1 (9,8;18,4) cellules ciliées par millimètre dans les cultures ayant reçu TFF3 et l'inhibiteur AG 1478 contre 18,6 (16,7;40,2) cellules ciliées par mm dans les cultures ayant reçu le peptide TFF3 seul).

Ces résultats confirment l'augmentation du nombre de cellules ciliées induite par l'ajout du peptide TFF3 recombinant.

L'inhibiteur AG 1478 seul n'a pas d'effet sur le nombre de cellules ciliées lorsqu'il est ajouté dans les cultures à l'interface air / liquide réalisées en absence d'EGF. Par contre, lorsqu'il est ajouté dans les cultures réalisées sans EGF mais avec le peptide TFF3 recombinant, il inhibe l'augmentation du nombre de cellules ciliées, annulant complètement l'effet du peptide TFF3. Ceci suggère que l'augmentation du nombre de cellules ciliées induite par le peptide TFF3 recombinant requiert l'activation du récepteur à l'EGF.

Discussion

F Discussion: implications des mucines et des TFF dans la physiologie et les pathologies de l'épithélium respiratoire

Nous montrons que les modèles de xéno greffe bronchique humanisée et de culture à l'interface air / liquide permettent de reproduire toutes les étapes de la régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain, jusqu'à la différenciation complète d'un épithélium pseudostratifié mucociliaire fonctionnel. Les étapes de la régénération de l'épithélium respiratoire humain dans le modèle de xéno greffe bronchique humanisée ont été décrites précédemment (**Dupuit et al., 2000**). Nous avons ici démontré que la régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide suivait les mêmes étapes que la régénération de l'épithélium respiratoire humain *in vivo*. Dans ce modèle, les cellules caliciformes sont plus rares que dans le modèle de xéno greffe, et leur taille est réduite. Ceci peut s'expliquer par l'absence, dans le modèle *in vitro* de culture à l'interface air / liquide, des facteurs sécrétés par la sous-muqueuse et les cellules immunitaires, notamment les facteurs pro-inflammatoires dont l'importance dans la différenciation des cellules sécrétoires de l'épithélium respiratoire est bien établie (**Ahlstedt et Enander, 1987; Evans et al., 2004**).

Nous avons également démontré que les mucines dites membranaires MUC1 et MUC4 sont exprimées dès les premières étapes de la régénération dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, leur transcription augmente graduellement au cours de la différenciation. MUC1 est toujours et exclusivement présente au niveau des membranes cellulaires exposées vers la

lumière des voies respiratoires, quel que soit le stade considéré. Ses propriétés anti-adhésives pourraient lui permettre de jouer un rôle dans la mise en place de l'épithélium stratifié transitoire (stade 2). Elle pourrait aussi jouer un rôle dans la défense de l'épithélium, en diminuant l'adhérence des contaminants inhalés (bactéries ou particules). Ce rôle pourrait être particulièrement important durant les premières étapes de la régénération (stade 1 et stade 2), car le mécanisme d'élimination des contaminants par clairance mucociliaire n'est alors pas encore en place.

Nous avons détecté MUC4 dans le cytoplasme de toutes les cellules au stade 1, dans le cytoplasme des cellules malpighiennes de surface au stade 2, et dans toutes les cellules de l'épithélium pseudostratifié différencié. Aucune localisation membranaire de cette mucine n'a pu être mise en évidence. A notre connaissance, aucune preuve d'une localisation de MUC4 à la membrane plasmique des cellules de l'épithélium respiratoire n'a été publiée. Une localisation cytoplasmique de cette mucine dans l'appareil respiratoire est notamment décrite par (**Lopez-Ferrer et al., 2001**) et par (**Llinares et al., 2004**). Il est possible que MUC4 soit présente dans la membrane d'organites cytoplasmiques spécifiques, mais le rôle de cette mucine dans la physiopathologie de l'épithélium respiratoire reste mal connu.

Les mucines MUC1 et MUC4 gardent la même localisation à toutes les étapes de la régénération et de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain dans les modèles de xénotransgreffe et de culture à l'interface air / liquide, ce qui suggère qu'elles ne jouent pas de rôle spécifique dans une étape particulière.

Nous nous sommes donc plus particulièrement orientés vers l'étude des mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B. Nous avons démontré que les ARN messagers de ces deux mucines sont

exprimés à un faible niveau dans l'épithélium stratifié transitoire (stade 2), alors même que les protéines correspondantes ne sont pas détectables par marquage immunologique. Ces ARN sont transcrits plus tardivement, dans l'épithélium pseudostratifié bien différencié (stade 3). En cas de différenciation sécrétoire importante, comme dans le modèle de xéno greffe, la transcription de MUC5AC et MUC5B augmente encore dans l'épithélium bien différencié (stade 3). Par contre, lorsque les conditions environnementales n'induisent pas de différenciation mucosécrétoire importante, comme dans le modèle de culture à l'interface air-liquide, la transcription des mucines sécrétoires reste stable, et MUC5AC et MUC5B sont produites à partir du stock d'ARN messagers existant. Dans tous les cas, la transcription de MUC5AC reste faible, au point que les ARN messagers sont indétectables dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, malgré une production et une sécrétion active de la protéine correspondante. Ceci suggère une forte régulation post-transcriptionnelle positive de l'expression de cette mucine.

Les différences dans les profils d'expression de MUC5AC et de MUC5B entre le modèle de xéno greffe et les cultures à l'interface air / liquide peuvent s'expliquer par l'absence, dans ce dernier modèle, de facteurs inflammatoires produits par la sous-muqueuse ou les cellules immunitaires, dont l'importance pour la production des mucines sécrétoires est démontrée (**Elsheikh et Mahfouz, 2006; Fischer et Voynow, 2002; Jonckheere *et al.*, 2004; Smirnova *et al.*, 2000; Smirnova *et al.*, 2001; Smirnova *et al.*, 2002**).

Nous démontrons également que les peptides trifoliés TFF1 et TFF2 ne sont détectables à aucun stade de la régénération ou de la différenciation dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide. Ils ne jouent donc probablement pas un rôle majeur dans la régénération normale de l'épithélium respiratoire. L'expression de TFF1 décrite dans les tissus respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, de bronchite ou de carcinome bronchique (**dos Santos**

Silva et al., 2000) pourrait donc correspondre à des situations pathologiques particulières.

Le peptide TFF3, par contre, est fortement exprimé par l'épithélium pleinement régénéré et différencié dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide. Cette situation est similaire à ce que l'on peut observer au niveau de l'intestin, organe dans lequel TFF3 joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité mucoale.

Tous ces résultats concordent avec la localisation des TFF et des mucines que nous avons observé dans l'épithélium respiratoire humain *in vivo*, confirmant la validité des modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide pour évaluer le rôle des peptides trifoliés au cours de la régénération de l'épithélium humain.

Les profils de transcription de TFF3 dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide diffèrent moins que ce que nous avons observé pour les mucines. Ceci suggère que l'expression du peptide TFF3 n'est pas principalement contrôlée par l'inflammation, soutenant l'hypothèse d'un rôle important de ce peptide dans la physiologie de l'épithélium respiratoire humain, indépendamment des influences exogènes.

TFF1 et TFF3 sont capables de se lier à *Staphylococcus aureus*, et il a été suggéré qu'ils pourraient jouer un rôle antibactérien (**dos Santos Silva et al., 2000**). TFF3 étant exprimé et sécrété par les cellules de l'épithélium respiratoire humain *in vivo* et dans nos deux modèles de régénération, son rôle pourrait être la lutte contre les bactéries pathogènes inhalées.

Nous avons testé cette hypothèse en utilisant la souche de référence de *Staphylococcus aureus*

8325-4. Le peptide TFF3 recombinant n'a aucun effet sur la croissance de cette souche bactérienne. Il est cependant possible que ce peptide trifolié joue un rôle dans la lutte contre les contaminants bactériens dans l'appareil respiratoire *in vivo*, grâce à une association avec un ou plusieurs autres facteurs. Il est aussi possible que TFF3 ait une activité antibactérienne dirigée contre d'autres souches ou d'autres espèces microbiennes.

Pour pouvoir écarter l'hypothèse d'un peptide recombinant inactif, nous avons testé l'activité biologique du peptide TFF3 recombinant que nous avons utilisé. A ce jour, les seuls tests existants pour tester l'activité biologique du peptide TFF3 sur des cellules de l'épithélium respiratoire sont des test de migration réalisés sur des lignées cellulaires (**Chwieralski et al., 2004; Oertel et al., 2001**).

Nous avons ici démontré que le peptide TFF3 humain recombinant est également capable d'induire la migration des cellules fraîchement dissociées de l'épithélium respiratoire humain, confirmant l'activité biologique du peptide que nous avons employé. *In vivo*, le peptide TFF3 pourrait donc favoriser la migration des cellules de la bordure vers le centre d'un lésion, participant ainsi à la régénération de l'épithélium respiratoire.

Cependant, nous avons aussi montré que l'effet motogène de TFF3 est très faible comparé à celui de l'EGF. Cet effet motogène n'est donc probablement pas le rôle principal de ce peptide dans l'épithélium respiratoire *in vivo*.

Dans les modèles de xéno greffe bronchique humanisée et de culture à l'interface air / liquide, le peptide trifolié TFF3 est produit par les cellules caliciformes de l'épithélium pseudostratifié bien différencié. Il a été démontré que l'expression de ce peptide augmente en bordure des lésions

dans l'appareil digestif (**Taupin et al., 2001**), suggérant un rôle paracrine dans la régénération de la lésion adjacente. Nous avons mimé la production de TFF3 par les cellules bordant la lésion en ajoutant le peptide TFF3 recombinant dans le modèle de culture à l'interface air / liquide dès la première étape de la régénération (stade 1, jour 0).

Dans le milieu de différenciation complet et optimal, l'addition du peptide TFF3 recombinant n'a pas d'effet détectable. Lorsque nous avons réitéré cette expérience en utilisant un milieu de différenciation sans EGF, nous avons observé que le peptide TFF3 recombinant induit une augmentation du nombre de cellules ciliées (tubuline β) et du nombre de cellules en cours de ciliogenèse (FOXJ1). Cette augmentation de la différenciation des cellules ciliées est observée également au niveau sub-cellulaire par l'apparition précoce de marqueurs ultrastructuraux de la ciliogenèse (corps basaux en migration).

Ces résultats indiquent que le peptide TFF3 recombinant favorise la différenciation des cellules ciliées en agissant en amont de la migration des corps basaux et de leur ancrage à la membrane apicale.

L'effet du peptide TFF3 recombinant semble spécifique de la différenciation ciliée, comme le montre la quantification des cellules basales et caliciformes. Il est cependant possible que l'absence d'effets sur la différenciation sécrétoire soit due à l'absence dans ce modèle de facteurs normalement présents *in vivo* dans le mésenchyme, qui pourraient être nécessaires à cette différenciation.

Nous avons aussi montré que l'augmentation de la différenciation des cellules ciliées induite par l'ajout de TFF3 exogène se traduit au plan fonctionnel par une augmentation de la fréquence des battements ciliaires.

Le peptide TFF3 recombinant n'induit pas de modification significative de la perméabilité de l'épithélium aux ions. A ce stade (jour 15), l'épithélium est déjà bien jonctionnel et assure une bonne protection physique, comme le montre la résistance trans-épithéliale élevée. De plus, les transports ioniques à travers l'épithélium sont étroitement régulés, et toute modification pourrait conduire à un déséquilibre altérant potentiellement l'hydratation de la surface de l'épithélium, et donc la clairance mucociliaire *in vivo*.

L'ensemble de ces résultats suggère que le peptide TFF3, par l'intermédiaire de l'augmentation du nombre de cellules ciliées et de la fréquence de battement des cils sans altération de l'hydratation du mucus, pourrait *in vivo* conduire à une amélioration importante de la fonction de clairance mucociliaire dans l'épithélium respiratoire incomplètement régénéré.

Nous avons observé que le peptide TFF3 est très résistant à la dégradation par les protéases des polynucléaires neutrophiles. Cette caractéristique pourrait lui permettre de jouer son rôle efficacement même en cas de forte réponse immunitaire, fréquemment rencontrée *in vivo* en cas de lésion de l'épithélium respiratoire.

L'épithélium respiratoire est très fréquemment agressé, et une meilleure défense mucociliaire précoce au cours de sa régénération pourrait éviter l'apparition de nouvelles lésions, conduisant à une amélioration globale de la fonction respiratoire.

Ces propriétés du peptide trifolié TFF3 pourraient être particulièrement importantes dans les pathologies de l'épithélium respiratoire comme la mucoviscidose, la bronchite chronique et l'asthme, dans lesquels une grande proportion de l'épithélium respiratoire est incomplètement

différencié de façon chronique et qui présentent une réponse immunitaire très forte.

Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation impliquées dans l'effet du peptide TFF3 sur la différenciation des cellules ciliées. De nombreux liens ont été établis entre les voies de signalisation empruntées par les TFF et le récepteur de l'EGF (EGF-R, ou HER1) (**Chwieralski et al., 2004; FitzGerald et al., 2004; Oertel et al., 2001; Rodrigues et al., 2003**). Nous avons donc utilisé un inhibiteur spécifique de ce récepteur, la tyrphostine AG 1478, dans le modèle de culture à l'interface air / liquide sans EGF, avec ou sans addition de TFF3 exogène.

Nous avons démontré que l'ajout de la tyrphostine AG 1478 seule, en absence d'EGF et de TFF3, n'induit pas de variation de la densité des cellules ciliées au jour 15 dans le modèle de culture à l'interface air / liquide.

L'ajout de TFF3 seul induit une augmentation significative du nombre de cellules ciliées par millimètre d'épithélium, comparable à ce que nous avons observé précédemment.

L'ajout de la tyrphostine AG 1478 conjointement au peptide TFF3 recombinant inhibe complètement l'effet de ce dernier.

L'effet de la tyrphostine AG 1478 correspond bien à une inhibition spécifique de l'action du peptide TFF3, comme le montre l'absence d'effet de l'inhibiteur lorsqu'il est ajouté seul.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la densité de cellules ciliées provoquée par le peptide TFF3 nécessite l'activation du récepteur HER1.

Le peptide TFF3 est incapable de se lier directement au récepteur HER1 (**Otto et Thim, 2005**). Son action pourrait donc impliquer la production d'un ligand endogène de ce récepteur par les cellules épithéliales. Il est également envisageable que l'activation de l'EGF-R par le peptide

TFF3 nécessite un co-récepteur. TFF3 est capable de se lier aux mucines; ces dernières pourraient donc jouer ce rôle de co-récepteurs *in vivo*.

*Conclusions générales
et perspectives*

G Conclusions générales et perspectives

Nous avons démontré que le peptide trifolié TFF3 et les mucines sécrétoires MUC5AC et MUC5B sont exprimés et sécrétés par l'épithélium respiratoire de surface humain bien différencié dans deux modèles de régénération, *ex vivo* (xénogreffe bronchique humanisée) et *in vitro* (culture à l'interface air / liquide). Leur expression au cours de la différenciation de l'épithélium est régulée différemment, indiquant des rôles distincts pour chacun de ces trois facteurs: MUC5AC et MUC5B, dont la transcription est fortement dépendante de l'environnement, joueraient plutôt un rôle de protection, alors que TFF3 pourrait avoir un rôle plus actif dans la régénération et la différenciation de l'épithélium respiratoire.

La mucine MUC1 est exprimée dès le premier stade de la régénération dans le modèle de xénogreffe, et est présente exclusivement dans les membranes cellulaires exposées vers la lumière de la trachée. Elle pourrait jouer un rôle dans la mise en place de l'épithélium transitoire et dans la protection précoce contre les contaminants inhalés, grâce à ses propriétés anti-adhésives.

Le peptide TFF3 recombinant intervient dans la mise en place précoce du mécanisme de clairance mucociliaire, en favorisant la différenciation rapide des cellules ciliées par une voie dépendant de l'activation du récepteur de l'EGF. Nous proposons que le peptide trifoliés TFF3, sécrété par l'épithélium différencié en bordure des zones lésées, pourrait participer au rétablissement rapide d'un épithélium fonctionnel après une lésion (Figure 40).

En ajoutant le peptide trifolié TFF3 recombinant de façon exogène, nous avons mimé la sécrétion du peptide TFF3 par l'épithélium différencié situé autour d'une lésion. La participation des cellules différenciées bordant une lésion pourrait être évaluée de façon plus précise en

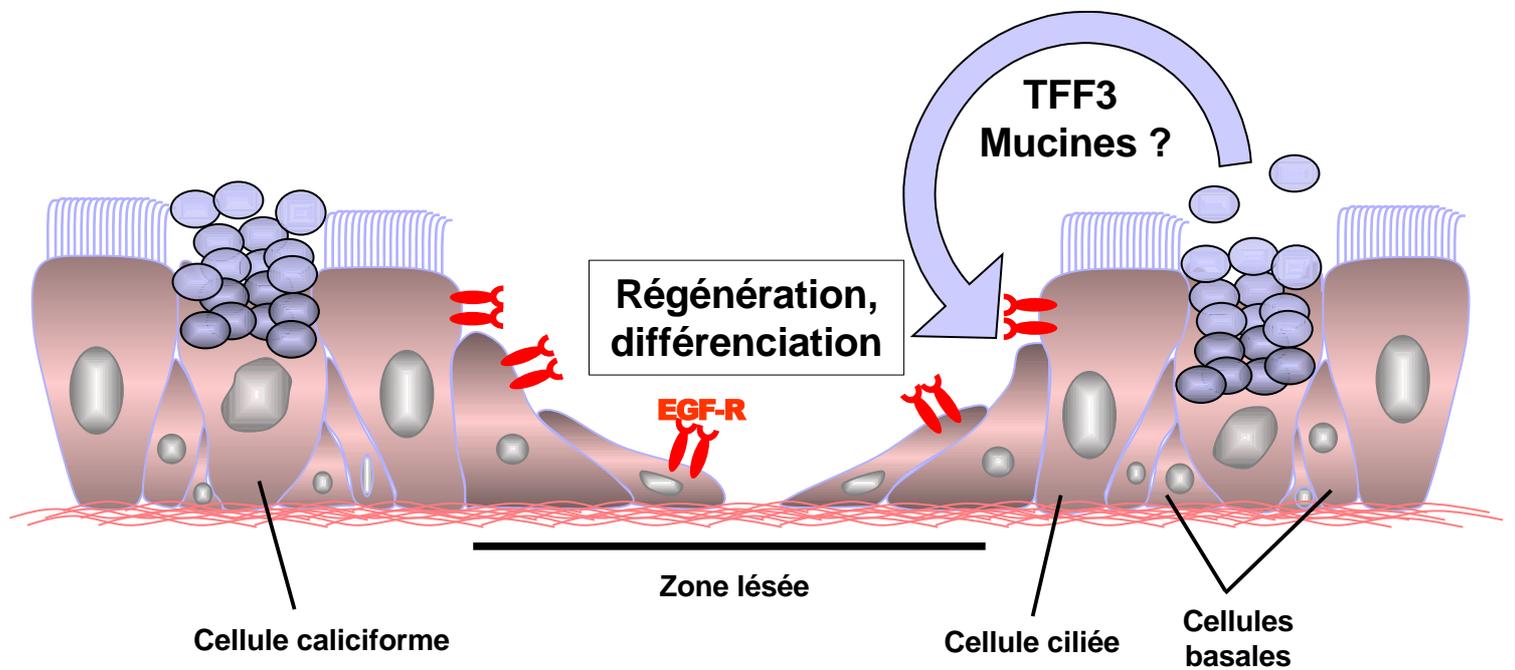


Figure 40: Rôle de TFF3 et des mucines sécrétées dans la régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain

Nous proposons que le peptide TFF3 sécrété par les cellules caliciformes intactes bordant une lésion de l'épithélium respiratoire de surface pourrait activer les récepteurs à l'EGF exposés par les cellules de la zone lésée. Le peptide TFF3 accélérerait ainsi le rétablissement de l'épithélium différencié grâce à ses effets sur la migration et la différenciation cellulaires. Les mucines pourraient jouer le rôle de co-récepteurs, permettant l'activation de l'EGF-R par le peptide TFF3.

étudiant la régénération de lésions expérimentales de l'épithélium différencié (stade 3) dans le modèle de culture à l'interface air / liquide et dans le modèle de xéno greffe bronchique humanisée.

Afin de mieux comprendre les effets de TFF3 dans les processus de régénération et de différenciation de l'épithélium respiratoire, il est maintenant essentiel d'étudier plus précisément les voies de signalisation impliquées dans l'action du peptide TFF3. Ceci pourrait être réalisé dans le modèle de régénération de l'épithélium respiratoire humain à l'interface air / liquide, en utilisant des inhibiteurs spécifiques des différents intermédiaires de signalisation, comme les MAP kinases ou akt, ou en étudiant l'activation de ces intermédiaire après ajout de TFF3.

Pour étudier la participation de la sécrétion endogène du peptide TFF3 dans les modèles de xéno greffe bronchique humanisée et de culture à l'interface air / liquide, nous avons obtenu, en collaboration avec l'équipe du Dr Podolsky et le Génethon (Evry, France), un vecteur lentiviral permettant l'expression du peptide TFF3. Ce vecteur sera utilisé pour transfecter les cellules fraîchement dissociées de l'épithélium respiratoire humain, qui seront ensuiteensemencées dans les modèles de régénération, permettant d'évaluer les effets d'une expression endogène précoce du peptide trifolié TFF3.

L'inhibition de la production endogène de ce peptide pourrait également permettre de mieux comprendre son implication dans les mécanismes de régénération et de différenciation. Cette étude pourrait être effectuée en utilisant dans les modèles de xéno greffe et de culture à l'interface air / liquide des cellules de l'épithélium respiratoire humain transfectées par un vecteur permettant la synthèse d'ARN interférents inhibant spécifiquement la production de TFF3.

Dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, les cellules caliciformes sont peu nombreuses et de petite taille. Ceci correspond probablement à la morphologie d'un épithélium respiratoire de surface établi en absence d'infection et de facteurs inflammatoires. L'ajout des médiateurs de l'inflammation dans ce modèle pourrait donc être utilisé afin d'évaluer précisément les effets de ces facteurs sur la régénération de l'épithélium respiratoire humain. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que l'interleukine 1 β est capable d'induire une sécrétion très importante de mucus dans ce modèle, suggérant une augmentation de la production de mucines et de TFF3, qui pourrait favoriser *in vivo* la régénération rapide de l'épithélium. Le peptide TFF3 pourrait également favoriser la différenciation ciliée de l'épithélium et ainsi contrebalancer l'hyperplasie sécrétoire généralement observée en cas d'inflammation, permettant le rétablissement rapide de la fonction de clairance mucociliaire. Il a été démontré que l'interleukine 13 favorise la différenciation sécrétoire au détriment de la différenciation ciliée, ce qui pourrait participer à l'accumulation de mucus dans des pathologies respiratoires comme l'asthme ou les bronchopneumopathies chroniques obstructives (**Laoukili et al, 2001**). Dans de telles pathologies, l'apport exogène du peptide TFF3 pourrait permettre de rétablir l'équilibre entre différenciation ciliée et différenciation sécrétoire, améliorant la fonction de clairance mucociliaire

L'étude de l'expression du peptide TFF3 dans les pathologies chroniques de l'épithélium respiratoire pourrait également permettre de mettre en évidence des anomalies dans la production de ce peptide, notamment en cas de différenciation incomplète prolongée de l'épithélium respiratoire (métaplasie malpighienne), ouvrant la voie à des thérapies régénératives basées sur l'administration de peptide TFF3 exogène. Dans la mucoviscidose, en particulier, de nombreux remaniements ont été décrits à un stade avancé de la maladie, se traduisant par une hyperprolifération cellulaire et surtout par une métaplasie malpighienne de

l'épithélium respiratoire de surface, qui pourraient correspondre à une régénération incomplète de l'épithélium lésé par les agressions bactériennes, très fréquentes dans cette pathologie. Nous avons de plus démontré, dans un modèle de régénération en xéno greffe bronchique, que les cellules de l'épithélium mucoviscidose présentent un retard de régénération par rapport aux cellules de l'épithélium respiratoire normal (**Hajj et al., 2006b**) Il serait donc très intéressant d'évaluer le bénéfice de l'apport de TFF3 exogène dans la régénération et la différenciation de l'épithélium respiratoire mucoviscidose.

Dans une telle perspective, il est crucial de connaître les interactions entre les effets de TFF3 et les facteurs apportés par la sous-muqueuse, le système immunitaire et la circulation sanguine. Les effets du peptide trifolié TFF3 devront donc être étudiés dans des modèles permettant de rendre compte de l'influence de ces facteurs, soit individuellement en réalisant des co-cultures des cellules épithéliales de surface avec des fibroblastes ou des cellules immunitaires dans le compartiment basal dans le modèle de culture de cellules épithéliales de surface à l'interface air / liquide, soit dans le modèle de xéno greffe bronchique humanisée qui mime les interactions entre tous ces facteurs. Enfin, des études sur l'effet de l'ajout de TFF3 exogène pourront être menées dans des modèles *in vivo* de lésion de l'épithélium respiratoire chez l'animal.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de TFF3, et dans la perspective de l'utilisation de TFF3 dans des thérapies régénératives, il sera nécessaire de déterminer les paramètres optimaux d'action de ce peptide. La concentration de TFF3 optimale pourra être évaluée dans un premier temps par étude de courbes de réponse dans le modèle de culture à l'interface air / liquide et de xéno greffe bronchique humanisée. Une telle étude est actuellement en cours dans le modèle de régénération à l'interface air / liquide.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ADALIS D, GARDNER DE & MILLER FJ.

Cytotoxic Effects Of Nickel On Ciliated Epithelium.
Am Rev Respir Dis (1978) 118: pp. 347-354.

ADRIAENSEN D, SCHEUERMANN DW, TIMMERMANS JP & DE GROODT-LASSEEL MH.

Calcitonin Gene-Related Peptide, Enkephalin And Serotonin Coexist In Neuroepithelial Bodies Of The Respiratory Tract Of The Red-Eared Turtle, *Pseudemys Scripta Elegans*. An Immunocytochemical Study. Histochemistry (1991) 95: p. pp. 567-572.

AHLSTEDT S & ENANDER I.

Immune Regulation Of Goblet Cell Development.
Int Arch Allergy Appl Immunol (1987) 82: pp. 357-360.

ALLEN-GIPSON DS, ROMBERGER DJ, FORGET MA, MAY KL, SISSON JH & WYATT TA.

IL-8 Inhibits Isoproterenol-Stimulated Ciliary Beat Frequency In Bovine Bronchial Epithelial Cells.
J Aerosol Med (2004) 17: pp. 107-115.

ALOS L, LUJAN B, CASTILLO M, NADAL A, CARRERAS M, CABALLERO M *ET AL.*

Expression Of Membrane-Bound Mucins (MUC1 And MUC4) And Secreted Mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 And MUC7) In Mucoepidermoid Carcinomas Of Salivary Glands.
Am J Surg Pathol (2005) 29: pp. 806-813.

ANDERSON RG & BRENNER RM.

The Formation Of Basal Bodies (Centrioles) In The Rhesus Monkey Oviduct.
J Cell Biol (1971) 50: pp. 10-34.

ANDRIANIFAHANANA M, MONIAUX N, SCHMIED BM, RINGEL J, FRIESS H, HOLLINGSWORTH MA *ET AL.*

Mucin (Muc) Gene Expression In Human Pancreatic Adenocarcinoma And Chronic Pancreatitis: A Potential Role Of MUC4 As A Tumor Marker Of Diagnostic Significance.
Clin Cancer Res (2001) 7: pp. 4033-4040.

ARAI T, FUJITA K, FUJIME M & IRIMURA T.

Expression Of Sialylated MUC1 In Prostate Cancer: Relationship To Clinical Stage And Prognosis.

Int J Urol (2005) 12: pp. 654-661.

ASKER N, AXELSSON MA, OLOFSSON SO & HANSSON GC.

Human MUC5AC Mucin Dimerizes In The Rough Endoplasmic Reticulum, Similarly To The MUC2 Mucin.

Biochem J (1998) 335 (Pt 2): pp. 381-387.

AVADHANULA V, RODRIGUEZ CA, ULETT GC, BAKALETZ LO & ADDERSON EE.

Nontypeable Haemophilus Influenzae Adheres To Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) On Respiratory Epithelial Cells And Upregulates ICAM-1 Expression.

Infect Immun (2006) 74: pp. 830-838.

AVRIL-DELPLANQUE A, CASAL I, CASTILLON N, HINNRASKY J, PUCHELLE E & PEULT B.

Aquaporin-3 Expression In Human Fetal Airway Epithelial Progenitor Cells.

Stem Cells (2005) 23: pp. 992-1001.

AZZADIN A, KASACKA I, SAWICKI B, MALLA H, DADAN J & BUCZKO W.

Preliminary Evaluation Of Neuroendocrine Cells In The Respiratory Tract In Rats With Experimental Uremia.

Folia Histochem Cytobiol (2001) 39: p. pp. 205-206.

BACONNAIS S, TIROUVANZIAM R, ZAHM JM, DE BENTZMANN S, PEULT 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: pp. 605-611.

BALDUS SE, MONIG SP, HUXEL S, LANDSBERG S, HANISCH F, ENGELMANN K ET AL.

MUC1 And Nuclear Beta-Catenin Are Coexpressed At The Invasion Front Of Colorectal Carcinomas And Are Both Correlated With Tumor Prognosis.

Clin Cancer Res (2004) 10: pp. 2790-2796.

BAGINSKI TK, DABBAGH K, SATJAWATCHARAPHONG C & SWINNEY DC.

Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli.

Am J Respir Cell Mol Biol (2006) 35: pp. 165-174.

BEORLEGUI C SP&MA.

An Immunocytochemical Study Of The Respiratory System Of *Podarcis hispanica* (Reptilia).

Gen Comp Endocrinol (1994) 96: p. pp. 327-338.

BERR SS, ROCHE JK, EL-RIFAI W, SMITH MFJ & POWELL SM.

Magnetic Resonance Imaging Of Gastric Cancer In TFF1 Knock-Out Mice.
Magn Reson Med (2003) 49: pp. 1033-1036.

BESNARD V, WERT SE, KAESTNER KH & WHITSETT JA.

Stage-specific regulation of respiratory epithelial cell differentiation by Foxa1.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005) 289: p. L750-9.

BODEM CR, LAMPTON LM, MILLER DP, TARKA EF & EVERETT ED.

Endobronchial Ph. Relevance Of Aminoglycoside Activity In Gram-Negative Bacillary Pneumonia.
Am Rev Respir Dis (1983) 127: pp. 39-41.

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: pp. 1585-1591.

BOOTZ F & REUTER G.

Regeneration Of Respiratory Epithelia In The Rat After Free Grafting.
Eur Arch Otorhinolaryngol (1992) 249: pp. 359-363.

BORCHERS MT, CARTY MP & LEIKAUF GD.

Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators.
Am J Physiol (1999) 276: p. L549-55.

BORGERDING M & KLUS H.

Analysis Of Complex Mixtures--Cigarette Smoke.
Exp Toxicol Pathol (2005) 57 Suppl 1: pp. 43-73.

**BOSENMEYER-POURIE C, KANNAN R, RIBIERAS S, WENDLING C, STOLL I, THIM L
*ET AL.***

The Trefoil Factor 1 Participates In Gastrointestinal Cell Differentiation By Delaying G1-S Phase
Transition And Reducing Apoptosis.
J Cell Biol (2002) 157: pp. 761-770.

BOUCHER RC.

Chemical Modulation Of Airway Epithelial Permeability.
Environ Health Perspect (1980) 35: pp. 3-12.

BOUCHER RC.

An Overview Of The Pathogenesis Of Cystic Fibrosis Lung Disease.
Adv Drug Deliv Rev (2002) 54: pp. 1359-1371.

BRAGONZI A & CONESE M.

Non-Viral Approach Toward Gene Therapy Of Cystic Fibrosis Lung Disease.
Curr Gene Ther (2002) 2: pp. 295-305.

BREEZE RG & WHEELDON EB.

The Cells Of The Pulmonary Airways.
Am Rev Respir Dis (1977) 116: p. pp. 705-777.

BREMBECK FH, ROSARIO M & BIRCHMEIER W.

Balancing Cell Adhesion And Wnt Signaling, The Key Role Of Beta-Catenin.
Curr Opin Genet Dev (2006) 16: pp. 51-59.

BRETSCHER A.

Regulation Of Cortical Structure By The Ezrin-Radixin-Moesin Protein Family.
Curr Opin Cell Biol (1999) 11: pp. 109-116.

BRODY SL, YAN XH, WUERFFEL MK, SONG SK & SHAPIRO SD.

Ciliogenesis And Left-Right Axis Defects In Forkhead Factor HFH-4-Null Mice.
Am J Respir Cell Mol Biol (2000) 23: pp. 45-51.

BROMBERG LE & BARR DP.

Self-Association Of Mucin.
Biomacromolecules (2000) 1: pp. 325-334.

BRUNEKREEF B & HOLGATE ST.

Air Pollution And Health.
Lancet (2002) 360: pp. 1233-1242.

BURGEL PR, ESCUDIER E, COSTE A, DAO-PICK T, UEKI IF, TAKEYAMA K *ET AL.*

Relation of epidermal growth factor receptor expression to goblet cell hyperplasia in nasal polyps.
J Allergy Clin Immunol (2000) 106: pp. 705-712.

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 (1996) 74: pp. 658-669.

BYRD JC & BRESALIER RS.

Mucins And Mucin Binding Proteins In Colorectal Cancer.
Cancer Metastasis Rev (2004) 23: pp. 77-99.

**CADIEUX A, SPRINGALL DR, MULDERY PK, RODRIGO J, GHATEI MA, TERENGI G
ET AL.**

Occurrence, Distribution And Ontogeny Of Cgrp Immunoreactivity In The Rat Lower Respiratory Tract:
Effect Of Capsaicin Treatment And Surgical Denervations.
Neuroscience (1986) 19: pp. 605-627.

CARRASCO R, PERA M, MAY FEB, WESTLEY BR, MARTINEZ A & MORALES L.

Trefoil Factor Family Peptide 3 Prevents The Development And Promotes Healing Of Ischemia-
Reperfusion Injury In Weanling Rats.
J Pediatr Surg (2004) 39: pp. 1693-1700.

CARTER JD, GHIO AJ, SAMET JM & DEVLIN RB.

Cytokine Production By Human Airway Epithelial Cells After Exposure To An Air Pollution Particle Is
Metal-Dependent.
Toxicol Appl Pharmacol (1997) 146: pp. 180-188.

CARVALHO F, SERUCA R, DAVID L, AMORIM A, SEIXAS M, BENNETT E ET AL.

MUC1 Gene Polymorphism And Gastric Cancer--An Epidemiological Study.
Glycoconj J (1997) 14: pp. 107-111.

CASTILLON N, HINNERSKY J, ZAHM J, 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: pp. 989-998.

**CASTILLON N, AVRIL-DELPLANQUE A, CORAUX C, DELENDA C, PEULT 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: pp. 846-856.

CHAN AK, LOCKHART DC, VON BERNSTORFF W, SPANJAARD RA, JOO HG, EBERLEIN

TJ ET AL.

Soluble MUC1 Secreted By Human Epithelial Cancer Cells Mediates Immune Suppression By Blocking T-Cell Activation.

Int J Cancer (1999) 82: pp. 721-726.

CHANG JF, ZHAO HL, PHILLIPS J & GREENBURG G.

The Epithelial Mucin, MUC1, Is Expressed On Resting T Lymphocytes And Can Function As A Negative Regulator Of T Cell Activation.

Cell Immunol (2000) 201: pp. 83-88.

CHEN JH, TAKENO S, OSADA R, UEDA T & YAJIN K.

Modulation Of Ciliary Activity By Tumor Necrosis Factor-Alpha In Cultured Sinus Epithelial Cells. Possible Roles Of Nitric Oxide.

Hiroshima J Med Sci (2000) 49: pp. 49-55.

CHEVILLARD M, HINNRASKY J, PIERROT D, ZAHM JM, KLOSSEK JM & PUCHELLE E.

Differentiation Of Human Surface Upper Airway Epithelial Cells In Primary Culture On A Floating Collagen Gel.

Epithelial Cell Biol (1993) 2: pp. 17-25.

CHINERY R & COX HM.

Modulation Of Epidermal Growth Factor Effects On Epithelial Ion Transport By Intestinal Trefoil Factor.

Br J Pharmacol (1995) 115: pp. 77-80.

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: pp. 528-537.

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: pp. 160-169.

CORTE M, TAMARGO F, ALVAREZ A, RODRA GJ, VA ZJ, SA NR ET AL.

Cytosolic Levels Of TFF1/pS2 In Breast Cancer: Their Relationship With Clinical-Pathological Parameters And Their Prognostic Significance.

Breast Cancer Res Treat (2005) : pp. 1-10.

CROSIER M, SCOTT D, WILSON RG, GRIFFITHS CD, MAY FE & WESTLEY BR.

High Expression Of The Trefoil Protein TFF1 In Interval Breast Cancers.

Am J Pathol (2001) 159: pp. 215-221.

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: pp. 321-330.

DAVIES JR, HERRMANN A, RUSSELL W, SVITACHEVA N, WICKSTROM C & CARLSTEDT I.

Respiratory Tract Mucins: Structure And Expression Patterns.

Novartis Found Symp (2002) 248: p. 76-88; discussion 88-93, 277-82.

DE BENTZMANN S, ROGER P & PUCHELLE E.

Pseudomonas Aeruginosa Adherence To Remodelling Respiratory Epithelium.

Eur Respir J (1996a) 9: pp. 2145-2150.

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 (1996b) 154: p. S155-62.

DE A, BROWN DG, GORMAN MA, CARR M, SANDERSON MR & FREEMONT PS.

Crystal Structure Of A Disulfide-Linked "Trefoil" Motif Found In A Large Family Of Putative Growth Factors.

Proc Natl Acad Sci U S A (1994) 91: pp. 1084-1088.

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: pp. 251-259.

DONALDSON SH, BENNETT WD, ZEMAN KL, KNOWLES MR, TARRAN R & BOUCHER RC.

Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline.

N Engl J Med (2006) 354: pp. 241-250.

DOS SANTOS SILVA E, ULRICH M, DORING G, BOTZENHART K & GOTT P.

Trefoil Factor Family Domain Peptides In The Human Respiratory Tract.
J Pathol (2000) 190: pp. 133-142.

**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: p. L165-76.

DUTCHER SK.

Purification Of Basal Bodies And Basal Body Complexes From *Chlamydomonas reinhardtii*.
Methods Cell Biol (1995) 47: pp. 323-334.

ELSHEIKH MN & MAHFOUZ ME.

Up-Regulation Of MUC5AC And MUC5B Mucin Genes In Nasopharyngeal Respiratory Mucosa And
Selective Up-Regulation Of MUC5B In Middle Ear In Pediatric Otitis Media With Effusion.
Laryngoscope (2006) 116: pp. 365-369.

ELY EW, SEEDS MC, CHILTON FH & BASS DA.

Neutrophil Release Of Arachidonic Acid, Oxidants, And Proteinases: Causally Related Or Independent.
Biochim Biophys Acta (1995) 1258: pp. 135-144.

EMAMI S, RODRIGUES S, RODRIGUE CM, LE FLOCH N, RIVAT C, ATTOUB S ET AL.

Trefoil Factor Family (TFF) Peptides And Cancer Progression.
Peptides (2004) 25: pp. 885-898.

**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: pp. 382-394.

FELDMAN GJ, MULLIN JM & RYAN MP.

Occludin: Structure, Function And Regulation.
Adv Drug Deliv Rev (2005) 57: pp. 883-917.

FINKBEINER WE.

Physiology And Pathology Of Tracheobronchial Glands.
Respir Physiol (1999) 118: pp. 77-83.

FISCHER BM & VOYNOW JA.

Neutrophil Elastase Induces MUC5AC Gene Expression In Airway Epithelium Via A Pathway Involving Reactive Oxygen Species.

Am J Respir Cell Mol Biol (2002) 26: pp. 447-452.

FISCHER BM, CUELLAR JG, DIEHL ML, DEFREYAS AM, ZHANG J, CARRAWAY KL *ET AL.*

Neutrophil elastase increases MUC4 expression in normal human bronchial epithelial cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2003) 284: p. L671-9.

FITCH PM, ROGHANIAN A, HOWIE SEM & SALLENAVE J.

Human Neutrophil Elastase Inhibitors In Innate And Adaptive Immunity.

Biochem Soc Trans (2006) 34: pp. 279-282.

FITZGERALD AJ, PU M, MARCHBANK T, WESTLEY BR, MAY FEB, BOYLE J *ET AL.*

Synergistic Effects Of Systemic Trefoil Factor Family 1 (TFF1) Peptide And Epidermal Growth Factor In A Rat Model Of Colitis.

Peptides (2004) 25: pp. 793-801.

FLAK TA & GOLDMAN WE.

Autotoxicity Of Nitric Oxide In Airway Disease.

Am J Respir Crit Care Med (1996) 154: p. S202-6.

FOWLER J, VINALL L & SWALLOW D.

Polymorphism Of The Human Muc Genes.

Front Biosci (2001) 6: p. D1207-15.

FOWLER JC, TEIXEIRA AS, VINALL LE & SWALLOW DM.

Hypervariability Of The Membrane-Associated Mucin And Cancer Marker MUC1.

Hum Genet (2003) 113: pp. 473-479.

GAILLARD DA, LALLEMENT AV, PETIT AF & PUCHELLE ES.

In Vivo Ciliogenesis In Human Fetal Tracheal Epithelium.

Am J Anat (1989) 185: pp. 415-428.

GAILLARD D, JOUET JB, EGRETEAU L, PLOTKOWSKI L, ZAHM JM, BENALI R *ET AL.*

Airway Epithelial Damage And Inflammation In Children With Recurrent Bronchitis.

Am J Respir Crit Care Med (1994) 150: pp. 810-817.

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: pp. 139-149.

GAMARRA F, BERGNER A, STAUSS E, STOCKER I, GRUNDLER S & HUBER R.

Rotation Frequency Of Human Bronchial And Nasal Epithelial Spheroids As An Indicator Of Mucociliary Function.

Respiration (2006)

GARAT C, KHERADMAND F, ALBERTINE KH, FOLKESSON HG & MATTHAY MA.

Soluble And Insoluble Fibronectin Increases Alveolar Epithelial Wound Healing In Vitro.

Am J Physiol (1996) 271: p. L844-53.

GEREMEK M & WITT M.

Primary Ciliary Dyskinesia: Genes, Candidate Genes And Chromosomal Regions.

J Appl Genet (2004) 45: pp. 347-361.

GILLAN JE PK&CE.

Association Of Changes In Bombesin Immunoreactive Neuroendocrine Cells In Lungs Of Newborn Infants With Persistent Fetal Circulation And Brainstem Damage Due To Birth Asphyxia.

Pediatr Res (1986) 20: p. pp. 828-833.

GOMPERTS BN, GONG-COOPER X & HACKETT BP.

FOXJ1 Regulates Basal Body Anchoring To The Cytoskeleton Of Ciliated Pulmonary Epithelial Cells.

J Cell Sci (2004) 117: pp. 1329-1337.

GORDON RE.

Orthogonal Arrays In Normal And Injured Respiratory Airway Epithelium.

J Cell Biol (1985) 100: pp. 648-651.

GOTT P, BECK S, MACHADO JC, CARNEIRO F, SCHMITT H & BLIN N.

Human Trefoil Peptides: Genomic Structure In 21Q22.3 And Coordinated Expression.

Eur J Hum Genet (1996) 4: pp. 308-315.

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: pp. 104-112.

GREENSTONE M, RUTMAN A, DEWAR A, MACKAY I & COLE PJ.

Primary ciliary dyskinesia: cytological and clinical features.
Q J Med (1988) 67: pp. 405-423.

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: pp. 81-86.

GRUBB BR, CHADBURN JL & BOUCHER RC.
In Vivo Microdialysis For Determination Of Nasal Liquid Ion Composition.
Am J Physiol Cell Physiol (2002) 282: p. C1423-31.

HAGIWARA H, OHWADA N & TAKATA K.
Cell Biology Of Normal And Abnormal Ciliogenesis In The Ciliated Epithelium.
Int Rev Cytol (2004) 234: pp. 101-141.

HAJJ R, BARANEK T, LE NAOUR R, LESIMPLE P, PUCHELLE E & CORAUX C.
Basal Cells Of The Human Adult Airway Surface Epithelium Retain Transit-Amplifying Cell Properties.
Stem Cells (2006a), sous presse

HAJJ R, LESIMPLE P, NAWROCKI-RABY B, BIREMBAUT P, PUCHELLE E ET AL.
Human Airway Surface Epithelial Regeneration Is Delayed and Abnormal in Cystic Fibrosis
J. Pathol.(2006b), accepted with minor revisions

HANAMURE Y, DEGUCHI K & OHYAMA M.
Ciliogenesis And Mucus Synthesis In Cultured Human Respiratory Epithelial Cells.
Ann Otol Rhinol Laryngol (1994) 103: pp. 889-895.

HANBY AM, MCKEE P, JEFFERY M, GRAYSON W, DUBLIN E, POULSOM R ET AL.
Primary Mucinous Carcinomas Of The Skin Express TFF1, TFF3, Estrogen Receptor, And Progesterone
Receptors.
Am J Surg Pathol (1998) 22: pp. 1125-1131.

**HARMS HK, MATOUK E, TOURNIER G, VON DER HARDT H, WELLER PH, ROMANO L
ET AL.**
Multicenter, Open-Label Study Of Recombinant Human Dnase In Cystic Fibrosis Patients With
Moderate Lung Disease. Dnase International Study Group.
Pediatr Pulmonol (1998) 26: pp. 155-161.

HATTRUP CL, FERNANDEZ-RODRIGUEZ J, SCHROEDER JA, HANSSON GC &

GENDLER SJ.

MUC1 Can Interact With Adenomatous Polyposis Coli In Breast Cancer.
Biochem Biophys Res Commun (2004) 316: pp. 364-369.

HAUSER-KRONBERGER C, HACKER GW, FRANZ P, ALBEGGER K & DIETZE O.

CGRP And Substance P In Intraepithelial Neuronal Structures Of The Human Upper Respiratory System.
Regul Pept (1997) 72: p. pp. 79-85.

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: pp. 86-91.

HILKENS J, LIGTENBERG MJ, VOS HL & LITVINOV SV.

Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property.
Trends Biochem Sci (1992) 17: pp. 359-363.

HOLLINGSWORTH MA & SWANSON BJ.

Mucins In Cancer: Protection And Control Of The Cell Surface.
Nat Rev Cancer (2004) 4: pp. 45-60.

HOLMA B & HEGG PO.

pH- And Protein-Dependent Buffer Capacity And Viscosity Of Respiratory Mucus. Their Interrelationships And Influence On Health.
Sci Total Environ (1989) 84: pp. 71-82.

HOVENBERG HW, DAVIES JR, HERRMANN A, LINDEN CJ & CARLSTEDT I.

MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions.
Glycoconj J (1996) 13: pp. 839-847.

HYDE SC, GILL DR, HIGGINS CF, TREZISE AE, MACVINISH LJ, CUTHBERT AW *ET AL.*

Correction Of The Ion Transport Defect In Cystic Fibrosis Transgenic Mice By Gene Therapy.
Nature (1993) 362: pp. 250-255.

JACKSON AD.

Airway goblet-cell mucus secretion.
Trends Pharmacol Sci (2001) 22: pp. 39-45.

JAGLA W, WIEDE A, DIETZMANN K, RUTKOWSKI K & HOFFMANN W.

Co-Localization Of TFF3 Peptide And Oxytocin In The Human Hypothalamus.
FASEB J (2000) 14: pp. 1126-1131.

JARAMILLO MA GJ&ML.

Pulmonary Gastrin-Releasing Peptide Expression In Anencephaly.
Pediatr Pathol Lab Med (1995) 15: p. pp. 377-387.

JAYARAMAN S, SONG Y & VERKMAN AS.

Airway Surface Liquid Ph In Well-Differentiated Airway Epithelial Cell Cultures And Mouse Trachea.
Am J Physiol Cell Physiol (2001) 281: p. C1504-11.

JEANNON JP, STAFFORD FW, SOAMES JV & WILSON JA.

Altered MUC1 and MUC2 glycoprotein expression in laryngeal cancer.
Otolaryngol Head Neck Surg (2001) 124: pp. 199-202.

JEFFERY PK, GAILLARD D & MORET S.

Human Airway Secretory Cells During Development And In Mature Airway Epithelium.
Eur Respir J (1992) 5: pp. 93-104.

JEFFERY PK & LI D.

Airway Mucosa: Secretory Cells, Mucus And Mucin Genes.
Eur Respir J (1997) 10: pp. 1655-1662.

**JONCKHEERE N, VAN DER SLUIS M, VELGHE A, BUISINE M, SUTMULLER M,
DUCOUROUBLE M *ET AL.***

Transcriptional Activation Of The Murine MUC5AC Mucin Gene In Epithelial Cancer Cells By TGF-Beta/SMAD4 Signalling Pathway Is Potentiated By SP1.
Biochem J (2004) 377: pp. 797-808.

JONO H, SHUTO T, XU H, KAI H, LIM DJ, GUM JRJ *ET AL.*

Transforming growth factor-beta -Smad signaling pathway cooperates with NF-kappa B to mediate nontypeable Haemophilus influenzae-induced MUC2 mucin transcription.
J Biol Chem (2002) 277: pp. 45547-45557.

JORGENSEN KH, THIM L & JACOBSEN HE.

Pancreatic Spasmolytic Polypeptide (PSP): I. Preparation And Initial Chemical Characterization Of A New Polypeptide From Porcine Pancreas.
Regul Pept (1982) 3: pp. 207-219.

KARAM SM, TOMASETTO C & RIO M.

Trefoil Factor 1 Is Required For The Commitment Programme Of Mouse Oxyntic Epithelial Progenitors.
Gut (2004) 53: pp. 1408-1415.

KAWAKUBO M, ITO Y, OKIMURA Y, KOBAYASHI M, SAKURA K, KASAMA S ET AL.

Natural Antibiotic Function Of A Human Gastric Mucin Against Helicobacter Pylori Infection.
Science (2004) 305: pp. 1003-1006.

KENNEDY MP & OSTROWSKI L.

Primary Ciliary Dyskinesia and Upper Airway Diseases.
Curr Allergy Asthma Rep (2006) 6: pp. 513-517.

KIM Y, KWON E, PARK D, SONG S, YOON S & BAEK S.

Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells.
Mol Pharmacol (2002) 62: pp. 1112-1118.

KIM J, JUNG K, HAN J, SHIM J, IN K, KANG K ET AL.

Relation of epidermal growth factor receptor expression to mucus hypersecretion in diffuse panbronchiolitis.
Chest (2004) 126: pp. 888-895.

KIM S & NADEL JA.

Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy.
Treat Respir Med (2004) 3: pp. 147-159.

KINOSHITA K, TAUPIN DR, ITOH H & PODOLSKY DK.

Distinct Pathways Of Cell Migration And Antiapoptotic Response To Epithelial Injury: Structure-Function Analysis Of Human Intestinal Trefoil Factor.
Mol Cell Biol (2000) 20: pp. 4680-4690.

KIRIKOSHI H & KATOH M.

Expression Of TFF1, TFF2 And TFF3 In Gastric Cancer.
Int J Oncol (2002) 21: pp. 655-659.

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: pp. 537-546.

KNOWLES MR, CARSON JL, COLLIER AM, GATZY JT & BOUCHER RC.

Measurements Of Nasal Transepithelial Electric Potential Differences In Normal Human Subjects In Vivo.

Am Rev Respir Dis (1981) 124: pp. 484-490.

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: pp. 2588-2595.

KOHLGRAF KG, GAWRON AJ, HIGASHI M, MEZA JL, BURDICK MD *ET AL.*

Contribution Of The MUC1 Tandem Repeat And Cytoplasmic Tail To Invasive And Metastatic Properties Of A Pancreatic Cancer Cell Line.

Cancer Res (2003) 63: pp. 5011-5020.

KOHRI K, UEKI IF, SHIM JJ, BURGEL PR, OH YM, TAM DC *ET AL.*

Pseudomonas aeruginosa induces MUC5AC production via epidermal growth factor receptor.

Eur Respir J (2002a) 20: pp. 1263-1270.

KOHRI K, UEKI IF & NADEL JA.

Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2002b) 283: p. L531-40.

KOMATSU M, JEPSON S, ARANGO ME, CAROTHERS CARRAWAY CA & CARRAWAY KL.

MUC4/Sialomucin Complex, An Intramembrane Modulator Of ErbB2/HER2/Neu, Potentiates Primary Tumor Growth And Suppresses Apoptosis In A Xenotransplanted Tumor.

Oncogene (2001) 20: pp. 461-470.

KOO JS, YOON JH, GRAY T, NORFORD D, JETTEN AM & NETTESHEIM P.

Restoration of the mucous phenotype by retinoic acid in retinoid-deficient human bronchial cell cultures: changes in mucin gene expression.

Am J Respir Cell Mol Biol (1999) 20: pp. 43-52.

KOO JS, KIM Y, JETTEN AM, BELLONI P & NETTESHEIM P.

Overexpression of mucin genes induced by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and neutrophil elastase is inhibited by a retinoic acid receptor alpha antagonist.

Exp Lung Res (2002) 28: pp. 315-332.

KOTTKE MD, DELVA E & KOWALCZYK AP.

The Desmosome: Cell Science Lessons From Human Diseases.
J Cell Sci (2006) 119: pp. 797-806.

KOVAL M.

Sharing Signals: Connecting Lung Epithelial Cells With Gap Junction Channels.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2002) 283: p. L875-93.

LABAT C, BARA J, GASCARD JP, SOSSE-ALAOUI H, THOMAS DE MONTPREVILLE V ET AL.

M1/MUC5AC mucin released by human airways in vitro.
Eur Respir J (1999) 14: pp. 390-395.

LALANI EN, WILLIAMS R, JAYARAM Y, GILBERT C, CHAUDHARY KS, SIU LS ET AL.

Trefoil Factor-2, Human Spasmolytic Polypeptide, Promotes Branching Morphogenesis In MCF-7 Cells.
Lab Invest (1999) 79: pp. 537-546.

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: pp. 1817-1824.

LAPPALAINEN U, WHITSETT JA, WERT SE, TICHELAAR JW & BRY K.

Interleukin-1Beta Causes Pulmonary Inflammation, Emphysema, And Airway Remodeling In The Adult Murine Lung.
Am J Respir Cell Mol Biol (2005) 32: pp. 311-318.

LEE SH, LEE SH, OH BH, LEE HM, CHOI JO & JUNG KY.

Expression Of mRNA Of Trefoil Factor Peptides In Human Nasal Mucosa.
Acta Otolaryngol (2001) 121: pp. 849-853.

LEMJABBAR H & BASBAUM C.

Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to Staphylococcus aureus in epithelial cells.
Nat Med (2002) 8: pp. 41-46.

LEMERCINIER X, MUSKETT FW, CHEESEMAN B, MCINTOSH PB, THIM L & CARR MD.

High-Resolution Solution Structure Of Human Intestinal Trefoil Factor And Functional Insights From Detailed Structural Comparisons With The Other Members Of The Trefoil Family Of Mammalian Cell Motility Factors.

Biochemistry (2001) 40: pp. 9552-9559.

LEROY X, ZERIMECH F, ZINI L, COPIN M, BUISINE M, GOSSELIN B ET AL.

MUC1 Expression Is Correlated With Nuclear Grade And Tumor Progression In PT1 Renal Clear Cell Carcinoma.

Am J Clin Pathol (2002) 118: pp. 47-51.

LETHEM MI, JAMES SL & MARRIOTT C.

The role of mucous glycoproteins in the rheologic properties of cystic fibrosis sputum.

Am Rev Respir Dis (1990) 142: pp. 1053-1058.

LETHEM MI, DOWELL ML, VAN SCOTT M, YANKASKAS JR, EGAN T, BOUCHER RC ET AL.

Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis.

Am J Respir Cell Mol Biol (1993) 9: pp. 315-322.

LEVIN M, SULLIVAN S, NIELSON D, YANG B, FINKBEINER W & VERKMAN A.

Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: evidence against the proposed mechanism involving aquaporins.

J Biol Chem (2006) sous presse.

LEVRIER J, MOLON-NOBLOT S, DUVAL D & LLOYD KG.

A New Ex Vivo Method For The Study Of Nasal Drops On Ciliary Function.

Fundam Clin Pharmacol (1989) 3: pp. 471-482.

LI JD, FENG W, GALLUP M, KIM JH, GUM J, KIM Y ET AL.

Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for Pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells.

Proc Natl Acad Sci U S A (1998) 95: pp. 5718-5723.

LIU D, EL-HARIRY I, KARAYIANNAKIS AJ, WILDING J, CHINERY R, KMIOT W ET AL.

Phosphorylation Of Beta-Catenin And Epidermal Growth Factor Receptor By Intestinal Trefoil Factor.

Lab Invest (1997) 77: pp. 557-563.

LLINARES K, ESCANDE F, AUBERT S, BUISINE M, DE BOLOS C, BATRA SK ET AL.

Diagnostic Value Of MUC4 Immunostaining In Distinguishing Epithelial Mesothelioma And Lung Adenocarcinoma.

Mod Pathol (2004) 17: pp. 150-157.

LONGPHRE M, LI D, LI J, MATOVINOVIC E, GALLUP M, SAMET JM ET AL.

Lung mucin production is stimulated by the air pollutant residual oil fly ash.
Toxicol Appl Pharmacol (2000) 162: pp. 86-92.

LOPEZ-FERRER A, CURULL V, BARRANCO C, GARRIDO M, LLORETA J & REAL FX.

Mucins As Differentiation Markers In Bronchial Epithelium. Squamous Cell Carcinoma And Adenocarcinoma Display Similar Expression Patterns.
Am J Respir Cell Mol Biol (2001) 24: pp. 22-29.

LUK CK & DULFANO MJ.

Effect Of pH, Viscosity And Ionic-Strength Changes On Ciliary Beating Frequency Of Human Bronchial Explants.
Clin Sci (Lond) (1983) 64: pp. 449-451.

MANSON AL, TREZISE AE, MACVINISH LJ, KASSCHAU KD, BIRCHALL N, EPISKOPOU V ET AL.

Complementation Of Null CF Mice With A Human CFTR YAC Transgene.
EMBO J (1997) 16: pp. 4238-4249.

MARCHBANK T, WESTLEY BR, MAY FE, CALNAN DP & PLAYFORD RJ.

Dimerization Of Human pS2 (TFF1) Plays A Key Role In Its Protective/Healing Effects.
J Pathol (1998) 185: pp. 153-158.

MARTIN WR, BROWN C, ZHANG YJ & WU R.

Growth and differentiation of primary tracheal epithelial cells in culture: regulation by extracellular calcium.
J Cell Physiol (1991) 147: pp. 138-148.

MASHIMO H, WU DC, PODOLSKY DK & FISHMAN MC.

Impaired Defense Of Intestinal Mucosa In Mice Lacking Intestinal Trefoil Factor.
Science (1996) 274: pp. 262-265.

MAY FEB, SEMPLE JI, PREST SJ & WESTLEY BR.

Expression And Motogenic Activity Of TFF2 In Human Breast Cancer Cells.
Peptides (2004) 25: pp. 865-872.

MCILHINNEY RA, PATEL S & GORE ME.

Monoclonal antibodies recognizing epitopes carried on both glycolipids and glycoproteins of the human

milk fat globule membrane.

Biochem J (1985) 227: pp. 155-162.

MCNAMARA N, GALLUP M, KHONG A, SUCHER A, MALTSEVA I, FAHY J *ET AL.*

Adenosine up-regulation of the mucin gene, MUC2, in asthma.

FASEB J (2004) 18: pp. 1770-1772.

MESEGUER M, PELLICER A & SIMON C.

MUC1 And Endometrial Receptivity.

Mol Hum Reprod (1998) 4: pp. 1089-1098.

MIDDLETON AM, CHADWICK MV, NICHOLSON AG, WILSON R, THORNTON DJ, KIRKHAM S *ET AL.*

Interaction Between Mycobacteria And Mucus On A Human Respiratory Tissue Organ Culture Model With An Air Interface.

Exp Lung Res (2004) 30: pp. 17-29.

MILLION K, TOURNIER F, HOUCINE O, ANCIAN P, REICHERT U & MARANO F.

Effects Of Retinoic Acid Receptor-Selective Agonists On Human Nasal Epithelial Cell Differentiation.

Am J Respir Cell Mol Biol (2001) 25: pp. 744-750.

MONTUENGA LM, GUEMBE L, BURRELL MA, BODEGAS ME, CALVO A, SOLA JJ *ET AL.*

The Diffuse Endocrine System: From Embryogenesis To Carcinogenesis.

Prog Histochem Cytochem (2003) 38: pp. 155-272.

MORCILLO EJ & CORTIJO J.

Mucus and MUC in asthma.

Curr Opin Pulm Med (2006) 12: pp. 1-6.

MOSCOSO GJ, DRIVER M, CODD J & WHIMSTER WF.

The Morphology Of Ciliogenesis In The Developing Fetal Human Respiratory Epithelium.

Pathol Res Pract (1988) 183: pp. 403-411.

MUCENSKI ML, NATION JM, THITOFF AR, BESNARD V, XU Y, WERT SE *ET AL.*

Beta-Catenin Regulates Differentiation Of Respiratory Epithelial Cells In Vivo.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005) 289: p. L971-9.

MUSKETT FW, MAY FEB, WESTLEY BR & FEENEY J.

Solution Structure Of The Disulfide-Linked Dimer Of Human Intestinal Trefoil Factor (TFF3): The

Intermolecular Orientation And Interactions Are Markedly Different From Those Of Other Dimeric Trefoil Proteins.

Biochemistry (2003) 42: pp. 15139-15147.

NADEL JA.

Role Of Epidermal Growth Factor Receptor Activation In Regulating Mucin Synthesis.

Respir Res (2001) 2: pp. 85-89.

NAGAFUCHI A.

Molecular Architecture Of Adherens Junctions.

Curr Opin Cell Biol (2001) 13: pp. 600-603.

NAKAMURA H, YOSHIMURA K, MCELVANEY NG & CRYSTAL RG.

Neutrophil Elastase In Respiratory Epithelial Lining Fluid Of Individuals With Cystic Fibrosis Induces Interleukin-8 Gene Expression In A Human Bronchial Epithelial Cell Line.

J Clin Invest (1992) 89: pp. 1478-1484.

NEUGEBAUER P, ENDEPOLS H, MICKENHAGEN A & WALGER M.

Ciliogenesis In Submersion And Suspension Cultures Of Human Nasal Epithelial Cells.

Eur Arch Otorhinolaryngol (2003) 260: pp. 325-330.

NG AW, BIDANI A & HEMING TA.

Innate Host Defense Of The Lung: Effects Of Lung-Lining Fluid pH.

Lung (2004) 182: pp. 297-317.

NIEVERS MG, SCHAAPVELD RQ & SONNENBERG A.

Biology And Function Of Hemidesmosomes.

Matrix Biol (1999) 18: pp. 5-17.

**NIKOLAIDIS NM, ZIMMERMANN N, KING NE, MISHRA A, POPE SM, FINKELMAN FD
*ET AL.***

Trefoil Factor-2 Is An Allergen-Induced Gene Regulated By Th2 Cytokines And STAT6 In The Lung.

Am J Respir Cell Mol Biol (2003) 29: pp. 458-464.

OBERDORSTER G.

Pulmonary Effects Of Inhaled Ultrafine Particles.

Int Arch Occup Environ Health (2001) 74: pp. 1-8.

OERTEL M, GRANESS A, THIM L, BUHLING F, KALBACHER H & HOFFMANN W.

Trefoil Factor Family-Peptides Promote Migration Of Human Bronchial Epithelial Cells: Synergistic Effect With Epidermal Growth Factor.

Am J Respir Cell Mol Biol (2001) 25: pp. 418-424.

OTTO WR & THIM L.

Trefoil Factor Family-Interacting Proteins.

Cell Mol Life Sci (2005) 62: pp. 2939-2946.

PEREZ-VILAR J & BOUCHER RC.

Reevaluating Gel-Forming Mucins' Roles In Cystic Fibrosis Lung Disease.

Free Radic Biol Med (2004) 37: pp. 1564-1577.

PERRAIS M, PIGNY P, BUISINE MP, PORCHET N, AUBERT JP & VAN SEUNINGEN-LEMPIRE I.

Aberrant Expression Of Human Mucin Gene MUC5B In Gastric Carcinoma And Cancer Cells.

Identification And Regulation Of A Distal Promoter.

J Biol Chem (2001) 276: pp. 15386-15396.

PERRAIS M, PIGNY P, COPIN M, AUBERT J & VAN SEUNINGEN I.

Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1.

J Biol Chem (2002) 277: pp. 32258-32267.

PIGNY P, GUYONNET-DUPERAT V, HILL AS, PRATT WS, GALIEGUE-ZOUITINA S, D'HOOGHE MC *ET AL.*

Human Mucin Genes Assigned To 11P15.5: Identification And Organization Of A Cluster Of Genes.

Genomics (1996) 38: pp. 340-352.

PONSARD C, SKOWRON-ZWARG M, SELTZER V, PERRET E, GALLINGER J, FISH C *ET AL.*

Identification Of ICIS-1, A New Protein Involved In Cilia Stability.

Frontiers in Bioscience (sous presse)

POOL-ZOBEL BL, SCHMEZER P, ZELLER WJ & KLEIN RG.

In Vitro And Ex Vivo Effects Of The Air Pollutants SO₂ And NO_X On Benzo(A)Pyrene Activating Enzymes Of The Rat Liver.

Exp Pathol (1990) 39: pp. 207-212.

PORCHET N & AUBERT J.

Les gènes MUC: Mucin Or Not Mucin? That Is The Question.
Med Sci (Paris) (2004) 20: pp. 569-574.

POSCHET J, PERKETT E & DERETIC V.

Hyperacidification In Cystic Fibrosis: Links With Lung Disease And New Prospects For Treatment.
Trends Mol Med (2002) 8: pp. 512-519.

PREST SJ, MAY FEB & WESTLEY BR.

The Estrogen-Regulated Protein, TFF1, Stimulates Migration Of Human Breast Cancer Cells.
FASEB J (2002) 16: pp. 592-594.

PROBST JC, ZETZSCHE T, WEBER M, THEILEMANN P, SKUTELLA T, LANDGRAF R *ET AL.*

Human Intestinal Trefoil Factor Is Expressed In Human Hypothalamus And Pituitary: Evidence For A Novel Neuropeptide.
ASEB J (1996) 10: pp. 1518-1523.

PUCHELLE E, ZAHM JM & QUEMADA D.

Rheological Properties Controlling Mucociliary Frequency And Respiratory Mucus Transport.
Biorheology (1987) 24: pp. 557-563.

PUCHELLE E, BEORCHIA A, MENAGER M, ZAHM JM & PLOTON D.

Three-Dimensional Imaging Of The Mucus Secretory Process In The Cryofixed Frog Respiratory Epithelium.
Biol Cell (1991) 72: pp. 159-166.

PUCHELLE E, BAJOLET O & ABELY M.

Airway Mucus In Cystic Fibrosis.
Paediatr Respir Rev (2002) 3: pp. 115-119.

PUCHELLE E, LE SIMPLE P, HAJJ R & CORAUX C.

Régénération De L'Épithélium Respiratoire Lésé.
Ann Pharm Fr (2006) 64: pp. 107-113.

RAHN JJ, SHEN Q, MAH BK & HUGH JC.

MUC1 Initiates A Calcium Signal After Ligation By Intercellular Adhesion Molecule-1.
J Biol Chem (2004) 279: pp. 29386-29390.

RAYNAL BDE, HARDINGHAM TE, THORNTON DJ & SHEEHAN JK.

Concentrated Solutions Of Salivary MUC5B Mucin Do Not Replicate The Gel-Forming Properties Of Saliva.

Biochem J (2002) 362: pp. 289-296.

RHEE CS, MIN YG, LEE CH, KWON TY, LEE CH, YI WJ *ET AL.*

Ciliary Beat Frequency In Cultured Human Nasal Epithelial Cells.

Ann Otol Rhinol Laryngol (2001) 110: pp. 1011-1016.

RODRIGUES S, VAN AKEN E, VAN BOCXLAER S, ATTOUB S, NGUYEN Q, BRUYNEEL E *ET AL.*

Trefoil Peptides As Proangiogenic Factors In Vivo And In Vitro: Implication Of Cyclooxygenase-2 And EGF Receptor Signaling.

FASEB J (2003) 17: pp. 7-16.

ROGERS DF.

Airway Goblet Cells: Responsive And Adaptable Front-Line Defenders.

Eur Respir J (1994) 7: pp. 1690-1706.

ROSE MC & VOYNOW JA.

Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease.

Physiol Rev (2006) 86: pp. 245-278.

ROWE RK, BRODY SL & PEKOSZ A.

Differentiated Cultures Of Primary Hamster Tracheal Airway Epithelial Cells.

In Vitro Cell Dev Biol Anim (2004) 40: pp. 303-311.

SANCHEZ SALMON A, ARGIBAY S, ARIAS JI & RUIBAL A.

pS2 citosólica y proliferación celular en carcinomas ductales infiltrantes de mama hormonodependientes.

Rev Esp Med Nucl (2005) 24: pp. 185-190.

SANDERSON MJ

Mechanisms Controlling Airway Ciliary Activity.

In:

Airway Mucus: Basic Mechanisms And Clinical Perspectives.

ed: Rogers D & Lethem MI.

Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser; 1997. pp. 91-116.

SAUKKONEN K, TOMASETTO C, NARKO K, RIO M & RISTIMAKI A.

Cyclooxygenase-2 Expression And Effect Of Celecoxib In Gastric Adenomas Of Trefoil Factor 1-Deficient Mice.

Cancer Res (2003) 63: pp. 3032-3036.

SAUTY A, DZIEJMAN M, TAHA RA, IAROSI AS, NEOTE K, GARCIA-ZEPEDA EA ET AL.

The T Cell-Specific CXC Chemokines IP-10, MIG, And I-TAC Are Expressed By Activated Human Bronchial Epithelial Cells.

J Immunol (1999) 162: pp. 3549-3558.

SCHROEDER JA, MASRI AA, ADRIANCE MC, TESSIER JC, KOTLARCZYK KL, THOMPSON MC ET AL.

MUC1 Overexpression Results In Mammary Gland Tumorigenesis And Prolonged Alveolar Differentiation.

Oncogene (2004) 23: pp. 5739-5747.

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: pp. 911-919.

SCHWARZBERG H, KALBACHER H & HOFFMANN W.

Differential Behavioral Effects Of TFF Peptides: Injections Of Synthetic TFF3 Into The Rat Amygdala.

Pharmacol Biochem Behav (1999) 62: pp. 173-178.

SEIB T, BLIN N, HILGERT K, SEIFERT M, THEISINGER B, ENGEL M ET AL.

The Three Human Trefoil Genes TFF1, TFF2, And TFF3 Are Located Within A Region Of 55 Kb On Chromosome 21Q22.3.

Genomics (1997) 40: pp. 200-202.

SHEEHAN JK, KIRKHAM S, HOWARD M, WOODMAN P, KUTAY S, BRAZEAU C ET AL.

Identification Of Molecular Intermediates In The Assembly Pathway Of The MUC5AC Mucin.

J Biol Chem (2004) 279: pp. 15698-15705.

SMIRNOVA MG, BIRCHALL JP & PEARSON JP.

TNF-Alpha In The Regulation Of MUC5AC Secretion: Some Aspects Of Cytokine-Induced Mucin Hypersecretion On The In Vitro Model.

Cytokine (2000) 12: pp. 1732-1736.

SMIRNOVA MG, KISELEV SL, BIRCHALL JP & PEARSON JP.

Up-Regulation Of Mucin Secretion In HT29-Mtx Cells By The Pro-Inflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor-Alpha And Interleukin-6.
Eur Cytokine Netw (2001) 12: pp. 119-125.

SMIRNOVA MG, BIRCHALL JP & PEARSON JP.

In Vitro Study Of IL-8 And Goblet Cells: Possible Role Of IL-8 In The Aetiology Of Otitis Media With Effusion.
Acta Otolaryngol (2002) 122: pp. 146-152.

SONG Y, JAYARAMAN S, YANG B, MATTHAY MA & VERKMAN AS.

Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration.
J Gen Physiol (2001) 117: pp. 573-582.

SONG KS, SEONG J, CHUNG KC, LEE W, KIM C, CHO KN *ET AL.*

Induction of MUC8 gene expression by interleukin-1 beta is mediated by a sequential ERK MAPK/RSK1/CREB cascade pathway in human airway epithelial cells.
J Biol Chem (2003a) 278: pp. 34890-34896.

SONG KS, LEE W, CHUNG KC, KOO JS, YANG EJ, CHOI JY *ET AL.*

Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells.
J Biol Chem (2003b) 278: pp. 23243-23250.

STANNARD W, RUTMAN A, WALLIS C & O'CALLAGHAN C.

Central microtubular agenesis causing primary ciliary dyskinesia.
Am J Respir Crit Care Med (2004) 169: pp. 634-637.

STREITZ JMJ & SHAPSHAY SM.

Airway Injury After Tracheotomy And Endotracheal Intubation.
Surg Clin North Am (1991) 71: pp. 1211-1230.

SWARTZ MJ, BATRA SK, VARSHNEY GC, HOLLINGSWORTH MA, YEO CJ, CAMERON JL *ET AL.*

MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia.
Am J Clin Pathol (2002) 117: pp. 791-796.

TAKEYAMA K, JUNG B, SHIM JJ, BURGEL PR, DAO-PICK T, UEKI IF *ET AL.*

Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2001) 280: p. L165-72.

TARRAN R, TROUT L, DONALDSON SH & BOUCHER RC.

Soluble mediators, not cilia, determine airway surface liquid volume in normal and cystic fibrosis superficial airway epithelia.

J Gen Physiol (2006) 127: pp. 591-604.

TAUPIN D, PEDERSEN J, FAMILARI M, COOK G, YEOMANS N & GIRAUD AS.

Augmented Intestinal Trefoil Factor (TFF3) And Loss Of pS2 (TFF1) Expression Precedes Metaplastic Differentiation Of Gastric Epithelium.

Lab Invest (2001) 81: pp. 397-408.

TAUPIN D & PODOLSKY DK.

Trefoil Factors: Initiators Of Mucosal Healing.

Nat Rev Mol Cell Biol (2003) 4: pp. 721-732.

THIM L, MADSEN F & POULSEN SS.

Effect Of Trefoil Factors On The Viscoelastic Properties Of Mucus Gels.

Eur J Clin Invest (2002) 32: pp. 519-527.

TOMASETTO C & RIO M.

Pleiotropic Effects Of Trefoil Factor 1 Deficiency.

Cell Mol Life Sci (2005) 62: pp. 2916-2920.

TRUMP BF, MCDOWELL EM, GLAVIN F, BARRETT LA, BECCI PJ, SCHURCH W *ET AL.*

The Respiratory Epithelium. III. Histogenesis Of Epidermoid Metaplasia And Carcinoma In Situ In The Human.

J Natl Cancer Inst (1978) 61: pp. 563-575.

VAN DER SLUIS M, DE KONING BAE, DE BRUIJN ACJM, VELCICH A, MELJERINK JPP, VAN GOUDOEVER JB *ET AL.*

MUC2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical For Colonic Protection.

Gastroenterology (2006) 131: pp. 117-129.

VAN KLINKEN BJ, EINERHAND AW, BULLER HA & DEKKER J.

The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins.

Glycobiology (1998) 8: pp. 67-75.

VAN SEUNINGEN I, PIGNY P, PERRAIS M, PORCHET N & AUBERT JP.

Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer?.

Front Biosci (2001) 6: p. D1216-34.

VEALE D, RODGERS AD, GRIFFITHS CJ, ASHCROFT T & GIBSON GJ.

Variability In Ciliary Beat Frequency In Normal Subjects And In Patients With Bronchiectasis.

Thorax (1993) 48: pp. 1018-1020.

VERMEER PD, PANKO L, KARP P, LEE JH & ZABNER J.

Differentiation Of Human Airway Epithelia Is Dependent On ErbB2.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2006) 291: p. L175-80.

VINALL LE, FOWLER JC, JONES AL, KIRKBRIDE HJ, DE BOLOS C, LAINE A *ET AL.*

Polymorphism Of Human Mucin Genes In Chest Disease: Possible Significance Of MUC2.

Am J Respir Cell Mol Biol (2000) 23: pp. 678-686.

WAN H, KAESTNER KH, ANG S, IKEGAMI M, FINKELMAN FD, STAHLMAN MT *ET AL.*

FoxA2 Regulates Alveolarization And Goblet Cell Hyperplasia.

Development (2004) 131: pp. 953-964.

WANG B, LIM DJ, HAN J, KIM YS, BASBAUM CB & LI J.

Novel cytoplasmic proteins of nontypeable Haemophilus influenzae up-regulate human MUC5AC mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway.

J Biol Chem (2002) 277: pp. 949-957.

WANG DG, LIU WH, LUNDY FT, POGUE KM, CUNNINGHAM RT, JOHNSTON CF *ET AL.*

TFF1 Gene Expression In Human Medullary Thyroid Carcinoma.

J Pathol (1998) 184: pp. 408-413.

WATERS CM, SPORN PHS, LIU M & FREDBERG JJ.

Cellular Biomechanics In The Lung.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2002) 283: p. L503-9.

WEN Y, CAFFREY TC, WHEELOCK MJ, JOHNSON KR & HOLLINGSWORTH MA.

Nuclear Association Of The Cytoplasmic Tail Of MUC1 And Beta-Catenin.

J Biol Chem (2003) 278: pp. 38029-38039.

WHITEMAN SC, BIANCO A, KNIGHT RA & SPITERI MA.

Human Rhinovirus Selectively Modulates Membranous And Soluble Forms Of Its Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Receptor To Promote Epithelial Cell Infectivity.
J Biol Chem (2003) 278: pp. 11954-11961.

WIDDICOMBE JG.

Role Of Lipids In Airway Function.
Eur J Respir Dis Suppl (1987) 153: pp. 197-204.

WIEDE A, JAGLA W, WELTE T, KOHNLEIN T, BUSK H & HOFFMANN W.

Localization Of TFF3, A New Mucus-Associated Peptide Of The Human Respiratory Tract.
Am J Respir Crit Care Med (1999) 159: pp. 1330-1335.

WILLIAMS MA, WESTLEY BR, MAY FE & FEENEY J.

The Solution Structure Of The Disulphide-Linked Homodimer Of The Human Trefoil Protein TFF1.
FEBS Lett (2001) 493: pp. 70-74.

WILSON DW, PLOPPER CG & DUNGWORTH DL.

The Response Of The Macaque Tracheobronchial Epithelium To Acute Ozone Injury. A Quantitative Ultrastructural And Autoradiographic Study.
Am J Pathol (1984) 116: pp. 193-206.

WRIGHT NA.

Interaction Of Trefoil Family Factors With Mucins: Clues To Their Mechanism Of Action?.
Gut (2001) 48: pp. 293-294.

WU R, MARTIN WR, ROBINSON CB, ST GEORGE JA, PLOPPER CG, KURLAND G *ET AL.*

Expression of mucin synthesis and secretion in human tracheobronchial epithelial cells grown in culture.
Am J Respir Cell Mol Biol (1990) 3: pp. 467-478.

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: pp. 747-775.

YOU Y, HUANG T, RICHER EJ, SCHMIDT JH, ZABNER J, BOROK Z *ET AL.*

Role Of F-Box Factor FOXJ1 In Differentiation Of Ciliated Airway Epithelial Cells.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2004) 286: p. L650-7.

ZAHM JM, CHEVILLARD M & PUCHELLE E.

Wound Repair Of Human Surface Respiratory Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol (1991) 5: pp. 242-248.

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 (1997) 37: pp. 33-43.

ZHANG P, SUMMER WR, BAGBY GJ & NELSON S.

Innate Immunity And Pulmonary Host Defense.

Immunol Rev (2000) 173: pp. 39-51.

Article:

Pierre Lesimple, Isabelle van Seuning, Marie-Pierre Buisine, Marie-christine Copin, Margitta Hinz, Werner Hoffmann, Rodolphe Hajj, Steven L. Brody, Christelle Coraux et Edith Puchelle

Trefoil Factor Family 3 peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation

(American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology 2006, sous presse)

Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation

Pierre LeSimple^{1,3}, Isabelle van Seuning², Marie-Pierre Buisine², Marie-Christine Copin², Margitta Hinz⁵, Werner Hoffmann⁵, Rodolphe Hajj^{1,3}, Steven L. Brody⁶, Christelle Coraux^{1,4} and Edith Puchelle^{1,4}.

¹ INSERM, U514, Reims, F-51092, France; ² INSERM, U560, Lille, F-59045, France; ³ Université Reims Champagne Ardenne, IFR53, Reims, F-51095, France; ⁴ CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Reims, F-51092, France; ⁵ Otto-von-Guericke-Universität, Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Magdeburg, Germany; ⁶ Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA.

Corresponding author: Edith Puchelle

Phone: 33 326 78 77 70; fax: 33 326 06 58 61;

e-mail: edith.puchelle@univ-reims.fr

Running title: TFF3 promotes airway ciliated cell differentiation

This work was supported by a PhD grant from INSERM/Région Champagne-Ardenne, by Adult Stem Cell Concerted Action (ATC) INSERM/Ministry of Research, by the French association Vaincre la Mucoviscidose and by Cancéropôle Grand Est.

Abstract

Human airway surface epithelium is frequently damaged by inhaled factors (viruses, bacteria, xenobiotic substances) as well as by inflammatory mediators that contribute to the shedding of surface epithelial cells. To regain its protective function, the epithelium must rapidly repair and redifferentiate. The Trefoil Factor Family (TFF) peptides are secretory products of many mucous cells. TFF3, the major TFF in the airways, is able to enhance airway epithelial cell migration, but the role of this protein in differentiation has not been defined. To identify the specific role of TFF3 in the differentiation of the human airway surface epithelium, we analyzed the temporal expression pattern of TFF3, MUC5AC and MUC5B mucins (goblet cells) and ciliated cell markers β -tubulin (cilia) and FOXJ1 (ciliogenesis) during human airway epithelial regeneration using *in vivo* humanized xenograft and *in vitro* air-liquid interface (ALI) culture models. We observed that TFF3, MUC5AC, MUC5B and ciliated cell markers were expressed in well-differentiated airway epithelium. The addition of exogenous recombinant human TFF3 to epithelial cell cultures prior to the initiation of differentiation resulted in no change in MUC5AC or cytokeratin 13 (CK13, basal cell marker) -positive cells, but induced an increase in the number of FOXJ1 positive cells and in the number of β -tubulin-positive ciliated cells ($p < 0.05$). Furthermore, this effect on ciliated cell differentiation could be reversed by specific epidermal growth factor (EGF) receptor (EGF-R) inhibition. These results indicate that TFF3 is able to induce ciliogenesis and to promote airway epithelial ciliated cell differentiation, in part through an EGF-R dependent pathway.

Keywords

Human airway xenograft, airway air-liquid interface culture, airway epithelium, ciliated cell differentiation, TFF3, mucins, FOXJ1.

Introduction

Surface airway epithelium is repeatedly damaged by inhaled noxious agents, such as viruses, bacteria or xenobiotic substances, as well as by the associated inflammatory response. This results in epithelial remodeling and desquamation leading to denuding of the basal lamina and loss of the epithelial barrier function, which has to be restored rapidly.

In mammals, the Trefoil Factor Family (TFF) consists of three low molecular weight peptides (TFF1: ~6.6 kDa; TFF2: ~11.6 kDa; TFF3: ~6.5 kDa) that share a TFF domain composed of three intramolecular disulfide bridges. TFFs have been identified in various mucous epithelia and have been attributed different functions in regeneration and tumorigenesis (review in [1]). The protective role of TFF3 in the digestive apparatus has been clearly established [2-4]. Under physiological conditions, TFF3 is the major TFF in the respiratory tract, being expressed by glandular and surface mucous cells [5; 6]. TFFs are also able to bind to mucins, and can modulate mucus rheology [7].

Although a role for mucins [8] or EGF-R [9; 10] have been proposed in TFF signal transduction, there are no molecular data published that unambiguously describe TFF receptors. Mucins (MUCs) are very high molecular weight glycoproteins that can be classified in two main categories: membrane-bound mucins (mainly MUC1 and MUC4) and secreted, mucus-forming mucins (mainly MUC2, MUC5AC and MUC5B in the respiratory tract) (review in [11]). Secretory MUCs are responsible for the mucus rheological properties that facilitate the elimination of pathogens through mucociliary clearance[12] but they may also act as reservoir or as co-receptors as their heavy glycosylation, von Willebrandt-type domains and receptor-like domains provide docking sites for lectins [13] or growth factors [14; 15]. The aim of this study was to analyze the temporal expression and secretion patterns of TFF3 relative to MUC5AC and MUC5B during airway epithelial regeneration and to determine the specific role of TFF3 in epithelial differentiation.

To reproduce human airway epithelial regeneration and differentiation, we used two different

models: an *in vivo* open humanized tracheal xenograft model and an *in vitro* air-liquid interface (ALI) primary human epithelial cell culture model, both mimicking the *in vivo* dynamics of epithelial regeneration and allowing complete epithelial differentiation. In these models, as previously demonstrated in animal models *in vivo* [16], epithelial cells migrate to cover the whole area, then they proliferate and form a pluristratified (multi-layered undifferentiated) epithelium, and finally re-differentiate into a columnar, pseudostratified mucociliary epithelium. We show in the present study that, in these models, TFF3 and secretory MUCs are increasingly expressed and secreted by airway surface epithelial mucous cells, in which they are partially co-localized. We also report that the addition of recombinant human TFF3 in the basal culture medium promotes ciliated cell differentiation and ciliogenesis in the ALI cultures, as assessed by the appearance of ultrastructural markers of ciliogenesis associated to an increase in the number of cells expressing the ciliogenesis-related transcription factor FOXJ1 [17] in their nuclei. Furthermore, we demonstrate that the specific EGF-R inhibitor 4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (tyrphostin AG-1478) could reverse TFF3-dependent induction of ciliated cell differentiation. Taken together, these observations support the hypothesis that TFF3 is capable of promoting ciliated cell differentiation in human airway epithelial cells through EGF-R and FOXJ1 signaling pathways.

Material and Methods

Human surface airway epithelial cell isolation

Human surface airway epithelial cells were dissociated from bronchi or nasal polyps as previously described [18]. Briefly, surgical pieces (obtained according to the L1245-2 article of Bioethical Law 94-654, new Public Health Code) were carefully rinsed with HEPES-buffered Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 culture medium (Gibco BRL, Paisley, UK) supplemented with penicillin (200 UI/mL) and streptomycin (200 µg/mL). Airway tissues were incubated with 0.1%

type XIV collagenase (Pronase E, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in RPMI 1640-HEPES overnight at 4°C. Epithelial cells were dissociated by agitation, numbered and either used in the *in vitro* ALI culture model or amplified on plastic culture dishes in proliferation medium consisting of DMEM/Ham F-12, 3/1 (Gibco BRL) supplemented with 0.87 µM bovine insulin, 65 nM human transferrin, 1.6 nM rhEGF, 1.38 µM hydrocortisone, 30 nM retinyl acetate, 9.7 µM 3,3',5-triiodo-L-thyronine, 2.7 µM epinephrine, 35 µg/mL bovine pituitary extract (BPE), 5 µM ethanolamine, 5 µM O-phosphorylethanolamine, 30 nM sodium selenite, 1 nM manganese chloride tetrahydrate, 5 nM ammonium vanadate, 1 nM nickel sulfate hexahydrate, 0.5 nM stannous chloride dihydrate (Sigma Aldrich) then seeded in the *in vivo* xenograft model described below.

Humanized bronchial xenografts

The use of animals was authorized by the French Veterinary Services (N° A 51-454-5). Open tracheal xenografts were performed as previously described [18]. Briefly, tracheae of adult Wistar rats (weighing 220-250g) (Charles River France, Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France) were frozen at -80°C, thawed and flushed with DMEM/Ham F12 medium to remove the rat surface epithelium. Each end of the rat tracheae was then tied aseptically to sterile polyethylene tubing. Human airway epithelial cells (1.10^6 cells/80µl in proliferation medium supplemented with 10% fetal calf serum, or culture medium alone (control tracheae), were inoculated in epithelium-denuded rat tracheae that were grafted subcutaneously (2 per mouse) into the flanks of 7 week-old female nude mice (Charles River France) anaesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (40mg/Kg) (Centravet, Gondreville, France). Nude mice were housed under pathogen-free conditions. The lumen of tracheal xenografts were flushed twice a week with serum-free DMEM/Ham F-12 medium (Gibco BRL) supplemented with 200 U/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamicin, 2.5 µg/ml amphotericin, 420 U/ml colimycin to remove cell debris from the lumen. Nude mice were euthanized by injection of a lethal dose of pentobarbital sodium after 4, 15 and 35 days of engraftment and xenografts were removed. A portion of each xenograft was used for

histological and immunohistochemical analyzes and remaining portion was processed for RNA extraction.

Air-liquid interface (ALI) culture

Dissociated human airway epithelial cells were seeded on porous polyester membranes (3.10^4 cells per membrane), in cell culture inserts (Transwell-clear, diameter 12 mm, 0.4 μm pores; Corning, Acton, MA, USA) coated with human placenta collagen (Sigma-Aldrich) (0.2 mg/mL for 2 hrs at room temperature (RT)). Cells were cultured in liquid-liquid conditions in the proliferation medium until confluent (~1 week). Then the culture medium was removed from the upper compartment and the epithelium was allowed to differentiate by using the differentiation medium consisting of 1:1 DMEM (GIBCO) and bronchial epithelial basal medium (BEBM) (Clonetics, Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) with the Clonetics complements for hEGF (0.5 ng/mL), epinephrine (5 $\mu\text{g/mL}$), BPE (0.13 mg/mL), hydrocortisone (0.5 $\mu\text{g/mL}$), insulin (5 $\mu\text{g/mL}$), triiodothyronine (6.5 $\mu\text{g/mL}$) and transferrin (0.5 $\mu\text{g/mL}$), supplemented with 200 UI/mL penicillin, 200 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, 0.1 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich) and 1.5 $\mu\text{g/mL}$ bovine serum albumine (BSA) (Sigma-Aldrich) in the basal compartment. At ALI day 0 (step 1), day 10 (step 2) and day 30 (step 3), the cultures were collected: 100 μL DMEM/BEBM were added on the epithelial surface in the upper chamber, collected after 14 hours, centrifuged for 5 seconds at 10,000 rpm and stored at -20°C until used for western blotting analysis. A portion of each membrane was used for histological and immunohistochemical analyzes and another portion was processed for RNA extraction.

To investigate the effects of exogenous TFF3 addition in the ALI culture model, recombinant TFF3 (2 μM) (kindly provided by D.K. Podolsky, Massachusetts General Hospital, Boston, USA) was added to the medium of ALI cultures from 3 different patients and to EGF-free medium of ALI cultures from 4 different patients, at ALI day 0. Membranes were processed for either immunohistological analysis and RNA extraction or for transmission electron microscopy (TEM) examination.

To study the role of EGF-R in the induction of ciliated cell differentiation by TFF3, we used a specific EGF-R inhibitor, 4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (tyrphostin AG1478, Calbiochem) (100 nM): in ALI cultures from 3 different patients, cells were cultured in EGF-free medium alone (control), in EGF-free medium with AG1478, in EGF-free medium with TFF3 (2 μ M) or in EGF-free medium with both TFF3 and AG1478.

Epithelial differentiation was evaluated at days 12 and 15, corresponding to intermediate steps of differentiation between step 2 (day 10, undifferentiated pluristratified epithelium) and step 3 (day 30, mature pseudostratified differentiated epithelium).

RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from xenografts or ALI cultures using the *High Pure RNA Isolation kit* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), following the manufacturer's instructions. RT-PCR amplification of TFF3 was performed with 10 ng RNA using the *RTth DNA Polymerase* kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

The following TFF3 primers were used: forward: 5'-GCTGCTGCTTTGACTCCAGGAT-3'; reverse: 5'-CGTTAAGACATCAGGCTCCAGAT-3' (expected amplicon size: 230 bp). RT was performed at 70°C (15 min.), followed by cDNA denaturation for 2 min at 95°C and amplified by 35 PCR cycles using the protocol as follows: 90°C, 20 s; 65 °C, 30 s; 72°C, 30 s. A final elongation step (72°C, 2 min) was performed before PAGE analysis. Resulting bands were quantified by fluorescence scanning (LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) and normalized to GAPDH (forward and reverse primers: 5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTA-3' and 5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGAT-3') for xenografts and 28S RNA (forward and reverse primers: 5'-GTTACCCACTAATAGGGAACGTGA-3' and 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3') for ALI cultures.

For MUCs transcription analysis in the ALI culture model, 0.5 μ g of total RNA was used to prepare cDNA using oligod(T) (1 μ L) and recombinant reverse transcriptase M-MLV (1 μ L) from Promega

(Charbonnières, France). PCR was performed using Taq Polymerase (Roche) on 5 μ L of cDNA using specific pairs of primers for MUC5AC and MUC5B genes (described in [19]). PCR reactions were carried out in 50 μ L final solutions as previously described [20]. The ribosomal RNA 28S subunit was used as the internal control. PCR products (10 μ L) were separated on a 1.5 % agarose gel containing ethidium bromide run in 1X Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid buffer. The mucin gene/28S ratio was calculated after scanning DNA bands with GelAnalyst-GelSmart software (ClaraVision, Orsay, France). Stomach mRNA was used as a positive control.

For MUCs transcription analysis in the xenograft model, the same protocol was used except that the RT was performed using the Clontech advantage RT-for-PCR kit with 50 ng of total RNA and oligod(T). The following program was used: 94°C 4 min then 35 cycles (MUC5B) or 40 cycles (MUC5AC) : 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1 min, followed by a final elongation step (72°C 7 min), and the results were normalized to GAPDH.

Western Blotting analysis

Secretions from ALI cultures were analyzed for TFF3 and MUC secretion; for MUC detection, 30 μ L of culture secretion products in Laemmli buffer containing 20 % β -mercaptoethanol were heat denatured (95 °C, 5 min) and allowed to migrate for 7 hrs (100 V) in a 2 % agarose gel. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane by passive, capillary transfer overnight. After non-specific sites were blocked (1 hour at room temperature in PBS containing 5 % non-fat milk) membranes were blotted with anti-MUC5B monoclonal antibody (mAb), 1/500 [21] or anti-MUC5AC mAb, 1/500 (HGM, Novocastra), then rinsed three times in PBS containing 0.5 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) and revealed using ECL+ Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions and observed by chemiluminescence scanning (LAS-1000, Fujifilm).

Methods used for TFF3 western blot analysis under reducing conditions were essentially as described previously [22]. In brief, centrifuged culture supernatants were analyzed on 15% SDS-

polyacrylamide gels (45 μ L supernatant per lane). After electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes and fixation with 0.2 % glutaraldehyde, the membrane was treated with the affinity-purified polyclonal rabbit antiserum (anti-hTFF3-2) directed against the peptide FKPLQEAECTF representing the C-terminus of human TFF3 [6] or with the monoclonal antiserum anti-TFF315C6 raised against the N-terminus of mature human TFF3 (nanoTools Antikörpertechnik, Teningen, Germany). As secondary antibody a peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:2000 dilution; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) or a peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Vector Laboratories Inc.) were used, respectively. Detection was with the help of the enhanced chemiluminescence (ECL) system and Kodak BioMax Light Film (Kodak Industrie, Chalon-sur-Saône, France).

For all western blotting analyses BEBM/DMEM medium alone and nasal polyp protein extracts were used as negative and positive controls, respectively.

Immunohistochemistry

Xenografts and ALI cultures were either embedded in optimum cutting temperature (O.C.T.) compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, The Netherlands), frozen in liquid nitrogen and conserved at -80 °C, or fixed in Lillie (5% formaldehyde in water, pH 7) and paraffin embedded. 5 μ m thick sections were performed and collected on gelatin-coated microscopy slides (cryosections) or SuperFrost Plus (O. Kindler GmbH, Germany) slides (paraffin sections). Frozen sections were cold methanol permeabilized (-20°C, 10 min) whereas deparaffinization in graded ethanol concentrations and microwave oven antigen retrieval (350 W, 4x5min in pH 6.6 citrate buffer) were performed on paraffin-embedded sections.

Immunohistology for TFF3, MUC5AC and MUC5B was performed as follows: paraffin-embedded and frozen sections were incubated with 3% BSA in phosphate buffered saline 0.1 M pH 7.2 (PBS) (Sigma-Aldrich) to prevent unspecific binding, then primary antibody was added for 1 hour at RT, slides were rinsed twice in PBS and once in PBS + 1% BSA, and detection was performed using

ALEXA-conjugated secondary antibodies (Interchim, Eugene, USA). Slides were counter-stained using Harris hematoxylin and coverslip mounted using Biomedica GEL/MOUNT medium (Biomedica, Foster City, CA, USA). MUC/TFF co-immunostaining was performed by adding both primary antibodies (mouse and rabbit antibodies) then both secondary antibodies (ALEXA 488-conjugated anti-mouse and ALEXA 594-conjugated anti-rabbit antibodies), and were then analyzed by confocal microscopy.

FOXJ1/ β -tubulin coimmunostaining was performed on paraffin-embedded sections by using the protocol described above successively with β -tubulin antibody and ALEXA 488-conjugated anti-mouse antibody then FOXJ1 and ALEXA 594-conjugated anti-mouse antibody. Slides were counterstained using 4', 6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes, 300 nM, 10 min. at RT) instead of hematoxylin.

β -tubulin, MUC5AC and CK 13 immunostaining for ciliated, mucous and basal cell numeration, as well as KI-67 immunostaining were performed using Envision+ Dual link peroxydase/AEC system (DAKO-Cytomation) according to the manufacturer's instructions. At least two distant full width sections from each membrane (12 mm) were analyzed by counting the number of stained cells per mm of membrane. For the numeration, pictures of the stained sections were taken, so that the successive pictures covered the whole section, without overlaps. The pictures were analysed under blind conditions, then the results were gathered and submitted to statistical analysis. The number of positive cells in each TFF3-treated, AG1478-treated or TFF3+AG1478-treated culture was normalized to the corresponding number of positive cells observed in the same, non-treated culture. The following antibodies (at the indicated dilution) were used: anti- β -tubulin mouse monoclonal antibody (mAb), 1/5000 (KMX-1, Chemicon); anti-MUC5B mAb, 1/200 (EU-MUC5Bb, European consortium, BMH4-CT98-3222) [21]; anti-MUC5AC mAb, 1/100 (CLH2, Novocastra); anti-TFF3 rabbit polyclonal antiserum, 1/200 (kindly provided by Dr Giraud, Melbourne, Australia); anti-FOXJ1 mAb, 1/200 (clones 1A4 and 2A5); anti-KI-67 mAb, 1/50 (DAKO-Cytomation). Adult

respiratory tissues (bronchial resections and nasal polyps) were used as controls.

Transmission electron microscopy

Ciliogenesis was assessed in TFF3 treated and non-treated cultures using transmission electron microscopy. At day 15, ALI cultures were fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS (Sigma-Aldrich) for 60 min at 4°C, postfixed in 1% osmium tetroxide-H₂O (Merck) for 120 min at 4°C, dehydrated through graded ethanol concentrations at RT and embedded in agar resin 100 (Agar Scientific, Stansted, UK). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed using a Hitachi 300 transmission electron microscope (Elexience, Verrières-le-buisson, France), operating at 75 kV. Active ciliogenesis was assessed by basal body migration identification on TEM micrographs.

Ciliary beat frequency

Video-recordings of PBS washed cell cultures were performed in a culture chamber at 37°C with 5 % CO₂, with a x40 phase contrast lens by using a CCD camera (JAI PULNIX TM-760, San Jose, CA, USA) and a DVD recorder (RDR-HX900, Sony). The recorded images were then displayed on a video monitor where ciliated cells were selected for ciliary beat analysis. The variations in light intensity induced by the ciliary beat were detected by a photodetector placed on the screen of the monitor. The signal was then digitized by a computer and the resulting data converted by a Fast Fourier Transform method into a frequency spectrum from which a mean ciliary beat frequency was calculated [23]. Measurements were performed on at least 5 different ciliated cells per culture, and 10 cultures from 2 different patients were measured for each condition.

Statistical analysis

All results were expressed as median value and quartiles (median (Q1;Q3)). Statistical significance was evaluated using a non-parametric Mann-Whitney test. A p value < 0.05 was considered to be significant.

Results

TFF3 and MUCs localization during regeneration

Regeneration of a functional, fully differentiated human airway epithelium in the xenograft model has already been described [18]. A similar regeneration profile was observed in the ALI culture model. At step 1, the cells flattened and migrated to cover the whole denuded rat trachea or microporous membrane in xenograft or ALI culture, respectively (*figures 1A and 1G*), at step 2 the cells proliferated, as identified by nuclear KI-67 positive immunostaining (data not shown), and formed a pluristratified epithelium (*figures 1B and 1H*), and finally at step 3 they differentiated into a normal pseudostratified epithelium characterized by basal, ciliated and goblet cells (*figures 1C and 1I*). MUC and TFF3 expression was characterized at these three regeneration steps using immunohistochemistry. At steps 1 and 2, no TFF3, MUC5AC or MUC5B staining was observed (data not shown). At step 3, all goblet cells (as identified by alcian blue-periodic acid-Schiff staining, not shown) expressed MUC5AC antibody in both models (*figures 1D and 1J*). MUC5B was detectable in a subset of goblet cells (*figures 1E and 1K*). TFF3 expression was identified in a subset of goblet cells (*figures 1F and 1L*).

MUCs and TFF3 are partially co-localized

To define the cell types that expressed TFF3, we examined ALI cultures and xenografts for TFF3 and MUCs, and we colocalized MUC5AC/TFF3 and MUC5B/TFF3 by immunostaining analyzed using confocal microscopy. MUC5AC expression was present in all observed secretory granules of all goblet cells, whereas TFF3 antibody stained a subcategory of MUC5AC-positive cells (data not shown). There was partial overlap between cells that expressed TFF3 and MUC5B, suggesting that some cells expressed both markers, whereas some other expressed only one. Moreover, in cells expressing both markers, some granules expressed only a single marker whereas some others expressed both TFF3 and MUC5B (*figure 2*).

MUCs and TFF3 expression and secretion increase with differentiation

Secretory MUCs and TFF3 gene expression during regeneration was assessed by RT-PCR analysis. In the xenograft model, TFF3 expression was low at steps 1 and 2, and a significant ($p < 0.005$) increase was observed at step 3 (67.9 (45.0;92.7)) as compared to step 1 (0.5 (0.1;1.8)) (*figure 3A*). Similarly, MUC5AC and MUC5B expression significantly increased at the differentiated step (step 3, as compared to step 1: 40.7 (38.1;45.9) vs 4.9 (3.8;12.4), $p < 0.05$ and 91.0 (89.9;95.5) vs 13.6 (13.1;21.4), $p < 0.005$ respectively) (*figure 3B*). In the ALI culture model, TFF3 expression was low at step 1 and markedly increased by step 3. This increase was statistically significant at step 3 as compared to step 1 (42.1 (16.7;56.9) vs 6.1 (4.8;16.7), $p < 0.05$) (*figure 3C*). MUC5B transcription followed the same profile as TFF3, whereas the MUC5AC mRNAs were barely detectable at steps 1 and 2 (*figure 3D*).

At the final step 3 of differentiation, epithelia synthesized MUCs and TFF3, as shown in *figure 1*. Western blot analysis of the ALI culture supernatants allowed us to investigate products that were secreted in the upper compartment. The undifferentiated epithelium (step 1) did not secrete TFF3, MUC5AC or MUC5B. In contrast, these proteins could be detected in the secretions obtained from well-differentiated epithelia (step 3) (*figure 4*) although in several samples of apical ALI surface liquid the secretion was very low or even absent.

TFF3 promotes ciliated cell differentiation in ALI cultures

We next sought to determine if TFF3 might have a role in the differentiation of airway epithelial cells. In ALI cultures, ciliated cell differentiation (FOXJ1 and apical β -tubulin expression) was detectable as soon as day 12, and nuclear FOXJ1 was detectable in some cells devoid of apical β -tubulin staining (data not shown). However, the number of ciliated cells was relatively low at day 12, precluding quantification. Accordingly, ALI day 15, a time at which ciliogenesis was initiated, but not complete, was selected to analyze TFF3 effects on human airway epithelial differentiation.

When the cells were cultured in the fully-complemented medium, the addition of TFF3 peptide did not significantly modify the number of ciliated cells (+TFF3: 26.4 (15.21;29.42) vs control: 25.44

(14.81;31.11) ciliated cells/mm, $p=0,41$). We therefore removed the EGF from the medium to avoid interferences.

The addition of TFF3 to EGF-deprived ALI cultures at ALI day 0 did not change the number of goblet cells or basal cells at day 15 (1.4 (0.6;2) vs. 1.8 (1.4;2.9) goblet cells/mm, $p=0.26$ and 52.4 (40.0;68.5) vs. 38.9 (31.6;50.7) basal cells/mm, $p=0.28$, respectively). However, the continuous addition of TFF3 resulted in a significant increase (2.8 (2.4;2,9) fold, $p < 0.05$) in the number of β -tubulin-positive ciliated cells at day 15 of ALI culture (*figure 5A*). Compared to control media-treated cells, the number of cells expressing transcription factor FOXJ1 increased by 4.1 (2.9;5.0) fold ($p < 0.05$) (*figure 5B*). TEM observation obtained at ALI day 15 in TFF3-treated cultures showed initiation of ciliogenesis demonstrated by basal body migration in addition to mature cilia (*figures 5C and 5D*), whereas the non-treated cell cultures exhibited mainly long microvilli and immature megacilia and a relative lack of ultrastructural changes of ciliogenesis (*figures 5E and 5F*).

Light microscopy observation before culture fixation showed that the cilia were functional, moreover the ciliary beating frequency has been used as an index of ciliated cell maturation in culture models. In this regard, the ciliary beating frequency was significantly higher in TFF3-treated than in control cultures (8.9 (7.9;9.9) Hz vs 7.8 (7.4;8.6) Hz in control, $p < 0.05$).

TFF3 signal transduction requires EGF-R activation

A role for EGF-R [9; 10] has been proposed in TFF signal transduction. To assess a role for EGF-R in TFF3 promotion of ciliated cell differentiation, we used the specific EGF-R inhibitor AG1478 in combination with TFF3 treatment, in EGF-free ALI cultures. AG1478 addition did not show any significant effect (8.1 (4.0;15.2) vs control: 7.4 (7.2;13.9) ciliated cells per mm) in the absence of TFF3. In contrast, TFF3 treatment significantly increased the number of ciliated cells (2.7 (2.3;3.0) fold; $p<0.05$). When TFF3 and AG1478 were added together, the number of ciliated cells was similar to that observed in control cultures but was significantly lower than in TFF3-treated cultures

(10.11 (9.8;18.4) vs 18.8 (16.7;40.2) ciliated cells per mm, $p < 0.05$) (figure 6).

Discussion

Several studies have reported that TFF peptides are upregulated at the sites of mucosal injury and participate in mucosal repair in the gastrointestinal tract, mainly related to an increased migration of cells at the wounding edge [2-4]. We demonstrate herein, for the first time, that apart from its motogenic activity, TFF3 plays a major role in human airway epithelial regeneration by promoting ciliated cell differentiation. We analyze the temporal expression pattern of secretory mucins MUC5AC and MUC5B and of TFF3, which are secreted in the apical airway liquid collected from the ALI cultures after complete epithelial differentiation. At this step, the epithelium is a pseudostratified mucociliary epithelium similar to that observed in well-polarized human airway surface epithelial tissues. This result is consistent with a previous study showing that MUC transcription was activated concomitantly to mucous cell differentiation in an airway epithelial cell ALI culture model [24]. MUCs and TFF3 localization in mucous cells is in agreement with the results previously reported by Groneberg *et al.* [25], Wiede *et al.* [5] and dos Santos Silva *et al.* [6]. Nevertheless, though mucins and TFF3 may co-localize inside the secretory granules, their association is not an exclusive feature.-In ALI culture, MUC5AC transcripts were barely detectable in the first two steps of the regenerative process whereas the corresponding protein was expressed and secreted at a later stage (step 3). Moreover, in the xenograft model, mucin mRNAs were detectable at a low level at step 2, but the corresponding proteins were not detectable. This suggests that mucins, in particular MUC5AC, are transcribed early during the regeneration process, allowing a pool of mRNA to be present in the cell and translated at a later stage of mucous differentiation. The fact that MUC5AC mRNA was hardly detectable in the ALI culture model, though MUC5AC protein was expressed and secreted, suggests a very strong positive post-transcriptional regulation. This is supported by the fact that we had to apply 40 PCR cycles to detect this mRNA in the

xenograft model, to be compared to the strong MUC5B signal obtained at 35 PCR cycles. Although MUCs and TFF3 co-localized in secretory granules, the pattern of MUC expression was distinct from TFF3, suggesting that these factors were independently regulated.

In this ALI model, devoid of inflammatory factors, mucous cells are small and sparse. This may explain the weak MUC5AC expression in ALI cultures as compared to the high MUC5AC mRNA level and the numerous goblet cells in the xenograft model, which could be specifically induced by immune cells [26] or other signals absent in the ALI culture model. MUC5B gene was more highly transcribed but the corresponding protein was present in fewer cells. This is consistent with differential regulations of MUCs and TFF3 expression, suggesting that these molecules could play important and independent roles in the physiology of human airway surface epithelium.

We also demonstrate here that addition of exogenous TFF3 to ALI cultures at a very early step, when ciliated cells are not present, can favor ciliated cell differentiation, as shown by the increase in the number of β -tubulin positive cells. Chwieralski *et al.* have shown that TFF3 has pro-migratory effects on the respiratory cell line BEAS-2B [27]. An increased migration of epithelial cells cannot alone be responsible for the effect of TFF3 on epithelial regeneration. Indeed, TFF3 promoted ciliogenesis when added at the post-confluency step (step 1), a point at which cell migration is of secondary importance and cell proliferation and differentiation dominated. This suggests that TFF3 does not only act as a pro-migratory factor, but may also specifically enhance ciliated cell differentiation. Moreover, migrating basal bodies could be observed in TFF3 treated cultures at day 15 but never in control cultures, and FOXJ1 (HFH4)-positive cell number significantly increased as well. The fact that FOXJ1 was detectable in some cells with no apical β -tubulin staining in the early steps of ciliated cell differentiation (day 12) is in agreement with studies showing that this Forkhead-box factor is necessary to airway ciliated cell differentiation in mice [28] by allowing basal body docking to the apical membrane [17; 29]. These findings suggest that TFF3 may function upstream of FOXJ1 to activate ciliogenesis.

Interestingly, TFF3 also increased ciliary beating frequency at ALI day 15. It is difficult to directly link dynamic functional parameters, such as ciliary beating frequency, with histological or cytological observations. However, it has been reported that ciliary beating frequency (CBF) increases with differentiation in the ALI culture model [30]. The CBF increase that we observed can be interpreted as the marker of a higher differentiation stage in the TFF3 treated cultures, further supporting the role of TFF3 peptide in airway epithelial ciliated cell differentiation.

Taken together, these results suggest that TFF3 signaling plays an early role in the ciliogenesis process, upstream to axoneme assembly. TFF3 appears to specifically enhance ciliated cell differentiation, as the number of goblet or basal cells did not significantly change. Nevertheless, we observed a tendency towards a higher number of goblet cells. The lack of statistical significance may be explained by the overall low number of goblet cells in the ALI culture model. This model system is devoid of immune cells, normally present in the mesenchyme and may therefore lack additional signals necessary for mucous differentiation of the airway surface epithelium. This view is supported by the higher number of goblet cells observed in the xenograft model as well as by reports showing that inflammatory factors such as chemokines and cytokines are responsible for mucous metaplasia (review in [8]).

TFF3 peptide did not increase the number of ciliated cells when added in the fully-complemented ALI medium. This suggests that TFF3 and EGF may share common signalling pathways, as TFF3 effects are dependent on EGF-R activation.

Indeed, we also demonstrated that TFF3 effects could be reversed by tyrophostin AG1478 addition. This molecule is a potent HER1 inhibitor (IC₅₀= 3 nM) but does not affect other receptors at low concentration (PDGF-R and HER2 IC₅₀ > 100 μM). At the concentration used (100 nM), the addition of the EGF-R inhibitor did not induce any change in EGF-free culture differentiation. Liu *et al.* demonstrated that rat TFF3 can enhance EGF-R phosphorylation in the colonic cell line HT29 [9]; Rivat *et al.* showed that STAT3 activation is necessary to TFF3 pro-invasive effect on colonic

cells, but the upstream pathway was not elucidated [31]. Our results strongly suggest that TFF3 signal transduction and pro-differentiation effect in ALI-cultured primary airway epithelial cells require EGF-R (HER1) activation. This is also supported by the fact that we had to remove EGF from the medium in order to unravel the effects of TFF3 addition. Furthermore, a recent case report from Vermeer *et al.* [32] showed that EGF-R family receptor ErbB2 blockade could impair airway epithelial differentiation, further emphasizing the importance of this family in the differentiation of the respiratory epithelium.

It is not clear yet whether TFF3 can bind to EGF-R. TFF3 effects could depend on endogenous synthesis of an EGF-R ligand, or a co-receptor may be needed. As TFF3 is present in a wide variety of tissues, specific co-receptors could modulate its activity and allow tissue-specific effects. TFFs can bind to MUCs [33], with which they are specifically co-expressed in various organs (review in [34]), thus mucins could play this regulatory role. Modulation of TFF signals by specific association with mucins would allow a fine-tuned regulation of local cell signaling by allowing local variations in TFFs/MUCs association, and thus local variations in signal transduction.

We show here that TFF3 is not endogenously produced by undifferentiated regenerating cells, but is secreted by well-differentiated mucous cells. Thus, by adding TFF3 at the beginning of the regeneration, we presumably mimic the role of the secretory cells surrounding a lesion *in vivo*. We propose that, in addition to its role in mucus rheology, it could act both as a lesion sensor and a regeneration enhancer. When the airway epithelium is damaged, TFF3 present in the mucus layer could conceivably bind to EGF-R present at the membrane of injured cells and promote cell migration, as well as differentiation, leading to the faster restoration of a fully functional airway epithelium. TFF3 would thus be a key peptide in the *in vivo* airway epithelial regeneration.

A role for TFF3 as a differentiation factor would be in line with a previous report on the altered differentiation of gastric cells in TFF1-deficient mice [35]. Cross-talk with the ciliogenesis

signaling pathway is likely to occur early, at or before the axoneme assembly step.

Elucidating the mechanisms involved in TFF3 expression may provide insights into the epithelial diseases related to abnormal repair and regeneration after injury. Whether defects in TFF3 expression and release at the airway epithelial level could lead to impaired restoration of functional epithelium and may occur in chronic airway diseases is unknown, but the frequent extensive remodeling observed in pathologies such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis, is likely to impair TFF3 secretion, and this mechanism could participate in the pathological process. Pro-regenerative molecules such as TFF3 may represent novel therapeutic approaches in chronic and acute airway diseases involving epithelial injury and repair.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr C. Martinella-Catusse (INSERM UMRS 514, Reims, France) who started this project during her post-doctoral stage , Dr J.-M. Zahm (INSERM UMRS 514, Reims, France) for CBF measurements and assistance with statistical analysis, Dr H. Kaplan (IFR 53, Reims, France) for the confocal microscopy analysis, Pr P. Birembaut (INSERM UMRS 514/Laboratoire Pol Bouin, Department of Histology and Cytology, Maison Blanche Hospital, Reims) for his support to the histological techniques and M.-P. Ducourouble (INSERM U 560, Lille, France) for her excellent technical help.

Bibliography

- [1] Hoffmann, W. Trefoil factor family (TFF) peptides: regulators of mucosal regeneration and repair, and more. *Peptides* (2004) **25**: 727-30.
- [2] Carrasco, R; Pera, M; May, F E B; Westley, B R; Martinez, A; Morales, L. Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. *J Pediatr Surg* (2004) **39**: 1693-700.
- [3] Beck, P L; Wong, J F; Li, Y; Swaminathan, S; Xavier, R J; Devaney, K L; Podolsky, D K. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* (2004) **126**: 796-808.
- [4] Poulsen, S S; Kissow, H; Hare, K; Hartmann, B; Thim, L. Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul Pept* (2005) **126**: 163-71.
- [5] Wiede, A; Jagla, W; Welte, T; Kohnlein, T; Busk, H; Hoffmann, W. Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* (1999) **159**: 1330-5.
- [6] dos Santos Silva, E; Ulrich, M; Doring, G; Botzenhart, K; Gott, P. Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J Pathol* (2000) **190**: 133-42.
- [7] Thim, L; Madsen, F; Poulsen, S S. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* (2002) **32**: 519-27.
- [8] Longman, R J; Douthwaite, J; Sylvester, P A; Poulson, R; Corfield, A P; Thomas, M G; Wright, N A. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* (2000) **47**: 792-800.
- [9] Liu, D; el-Hariry, I; Karayiannakis, A J; Wilding, J; Chinery, R; Kmiot, W; McCrea, P D; Gullick, W J; Pignatelli, M. Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab Invest* (1997) **77**: 557-63.

- [10] Rodrigues, S; Van Aken, E; Van Bocxlaer, S; Attoub, S; Nguyen, Q; Bruyneel, E; Westley, B R; May, F E B; Thim, L; Mareel, M; Gespach, C; Emami, S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* (2003) **17**: 7-16.
- [11] Rose, M C; Voynow, J A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* (2006) **86**: 245-78.
- [12] Thornton, D J; Sheehan, J K. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc* (2004) **1**: 54-61.
- [13] Byrd, J C; Bresalier, R S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2004) **23**: 77-99.
- [14] Nunes, D P; Keates, A C; Afdhal, N H; Offner, G D. Bovine gall-bladder mucin contains two distinct tandem repeating sequences: evidence for scavenger receptor cysteine-rich repeats. *Biochem J* (1995) **310** (Pt 1): 41-8.
- [15] Offner, G D; Nunes, D P; Keates, A C; Afdhal, N H; Troxler, R F. The amino-terminal sequence of MUC5B contains conserved multifunctional D domains: implications for tissue-specific mucin functions. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) **251**: 350-5.
- [16] McDowell, E M; Becci, P J; Schurch, W; Trump, B F. The respiratory epithelium. VII. Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury. *J Natl Cancer Inst* (1979) **62**: 995-1008.
- [17] You, Y; Huang, T; Richer, E J; Schmidt, J H; Zabner, J; Borok, Z; Brody, S L. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2004) **286**: L650-7.
- [18] Dupuit, F; Gaillard, D; Hinnrasky, J; Mongodin, E; de Bentzmann, S; Copreni, E; Puchelle, E. Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2000) **278**: L165-76.

- [19] Perrais, M; Pigny, P; Copin, M; Aubert, J; Van Seuningen, I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem* (2002) **277**: 32258-67.
- [20] Van Seuningen, I; Perrais, M; Pigny, P; Porchet, N; Aubert, J P. Sequence of the 5'-flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC5B in different phenotypes of colon cancer cells. *Biochem J* (2000) **348 Pt 3**: 675-86.
- [21] Rousseau, K; Wickstrom, C; Whitehouse, D B; Carlstedt, I; Swallow, D M. New monoclonal antibodies to non-glycosylated domains of the secreted mucins MUC5B and MUC7. *Hybrid Hybridomics* (2003) **22**: 293-9.
- [22] Jagla, W; Wiede, A; Kolle, S; Hoffmann, W. Differential expression of the TFF-peptides xP1 and xP4 in the gastrointestinal tract of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* (1998) **291**: 13-8.
- [23] Zahm, J M; Pierrot, D; Hinnrasky, J; Fuchey, C; Chevillard, M; Gaillard, D; Puchelle, E. Functional activity of ciliated outgrowths from cultured human nasal and tracheal epithelia. *Biorheology* (1990) **27**: 559-65.
- [24] Bernacki, S H; Nelson, A L; Abdullah, L; Sheehan, J K; Harris, A; Davis, C W; Randell, S H. 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**: 595-604.
- [25] Groneberg, DA; Eynott, PR; Oates, T; Lim, S; Wu, R; Carlstedt, I; Nicholson, AG; Chung, KF. Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med* (2002) **96(2)**: 81-6.
- [26] Park, JA; He, F; Martin LD; Li, Y; Chorley, BN; Adler, KB. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C $\{\delta\}$ -mediated mechanism. *Am J Pathol* (2005) **167(3)**: 651-61.
- [27] Chwieralski, C E; 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**: 528-37.
- [28] Brody, S L; Yan, X H; Wuerffel, M K; Song, S K; Shapiro, S D. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2000) **23**: 45-51.
- [29] Gomperts, B N; Gong-Cooper, X; Hackett, B P. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* (2004) **117**: 1329-37.
- [30] Rhee, C S; Min, Y G; Lee, C H; Kwon, T Y; Lee, C H; Yi, W J; Park, K S. Ciliary beat frequency in cultured human nasal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2001) **110**: 1011-6.
- [31] Rivat, C; Rodrigues, S; Bruyneel, E; Pietu, G; Robert, A; Redeuilh, G; Bracke, M; Gespach, C; Attoub, S. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) -- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* (2005) **65**: 195-202.
- [32] Vermeer, P D; Panko, L; Karp, P; Lee, J H; Zabner, J. Differentiation of human airway epithelia is dependent on erbB2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006) **291**: L175-80.
- [33] Tomasetto, C; Masson, R; Linares, J L; Wendling, C; Lefebvre, O; Chenard, M P; Rio, M C. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* (2000) **118**: 70-80.
- [34] Hoffmann, W; Jagla, W. Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol* (2002) **213**: 147-81.
- [35] Karam, S M; Tomasetto, C; Rio, M. Trefoil factor 1 is required for the commitment program of mouse oxyntic epithelial progenitors. *Gut* (2004) **53**: 1408-15.

Figure legends

Figure 1

TFF3 and secretory mucins localization during airway epithelial regeneration in the xenograft and ALI culture models.

TFF3, MUC5AC and MUC5B immunostainings. A-F: xenograft model. G-L: ALI culture model. A, B, C, G, H, I: regeneration steps: migration (step 1, A, G); proliferation (step 2, B, H); final differentiation (step 3, C, I). D, J: MUC5AC immunostaining in well-differentiated epithelia (step 3). E, K: MUC5B immunostaining in well-differentiated epithelia (step 3). Arrows and arrow heads show MUC5B-positive and -negative mucous cells, respectively. F, L: TFF3 immunostaining in well-differentiated epithelia. Arrows and arrow heads show TFF3-positive and -negative mucous cells, respectively.

Scale bars: 20 μm

Figure 2

TFF3 and MUC5B co-localization

TFF3 and MUC5B co-immunostaining in the xenograft or ALI culture models at regeneration step 3. A, B, C: xenograft model. D, E, F: ALI culture model. A, D: MUC5B immunostaining observed using a confocal microscope. B, E: TFF3 immunostaining observed using a confocal microscope. B, E: merge. In the xenograft model, some secretory granules contain both TFF3 and MUC5B (yellow) while some contain only TFF3 (green) or MUC5B (red) staining. In the ALI culture, very few co-localization of MUC5B and TFF3 is observed even though some cells exhibit both stainings.

Xeno: xenograft model. **ALI**: ALI culture model. Scale bars: 15 μm

Figure 3

Transcription of TFF3 and secretory mucins during airway epithelial regeneration.

A, C: TFF3 transcription along the regeneration in the xenograft model (A) and in the ALI culture model (C). B, D: MUC5AC and MUC5B transcription along regeneration in the xenograft model (B) and in the ALI culture model (D). Column height represents the median of 3 to 8 independent experiments. Error bars represent the first and third quartiles.

*: $p < 0,05$ as compared to step 1. **: $p < 0,005$ as compared to step 1.

Figure 4

Secretion of TFF3 and secretory mucins during airway epithelial regeneration.

Western blot analysis of ALI culture apical secretions at regeneration steps 1 and 3. TFF3, MUC5AC and MUC5B are secreted by well-differentiated epithelia (step 3). **Control**: negative control (cell culture medium). **Step 1** and **Step 3**: apical secretions from ALI cultures at regeneration step 1 and step 3, respectively.

Figure 5

Effect of TFF3 on ciliated cell differentiation.

Ciliated cell differentiation analyzed at day 15 in EGF-deprived, TFF3-treated ALI cultures. A, B: β -tubulin and FOXJ1 positive cells quantified after immunostaining. Results are expressed as positive cell number per mm, and each value normalized to the corresponding control. A: β -tubulin positive cell number at day 15 with (TFF3) or without (control) TFF3 treatment. B: FOXJ1 positive cell number at day 15 with or without TFF3 treatment. Column height represents the median of 4 independent experiments. Error bars represent the first and third quartiles. *: $p < 0.05$. C, D, E, F: Transmission electron microscopy observation of EGF-deprived ALI cultures at day 15, without or with TFF3 treatment. C, D: In EGF-deprived ALI culture without TFF3 treatment, the cells exhibit microvilli (**mv**) and megacilia (**Mc**) but very few cilia and no migrating basal bodies. E, F: EGF-

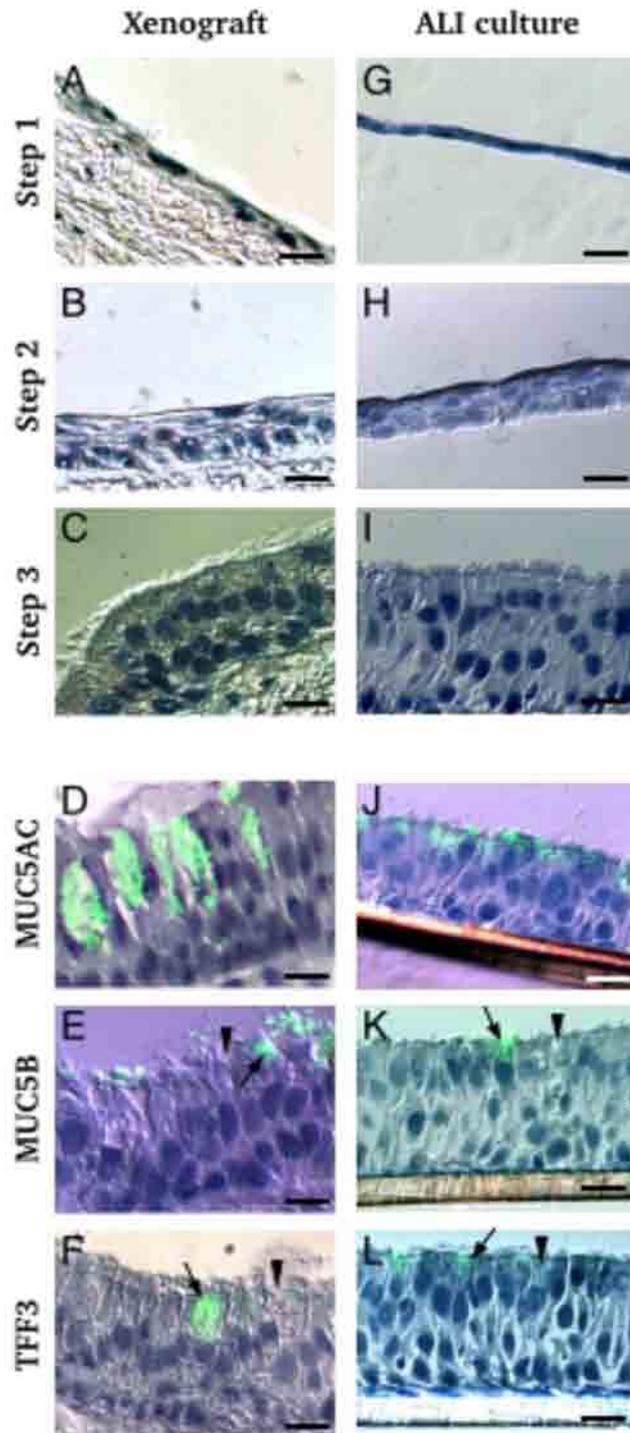
deprived ALI culture treated with TFF3. Cilia are observed (c), as well as migrating basal bodies (arrowheads), indicating active ciliogenesis. A mucous cell is also visible (E, white arrowhead). Scale bars 3 μ m

Figure 6

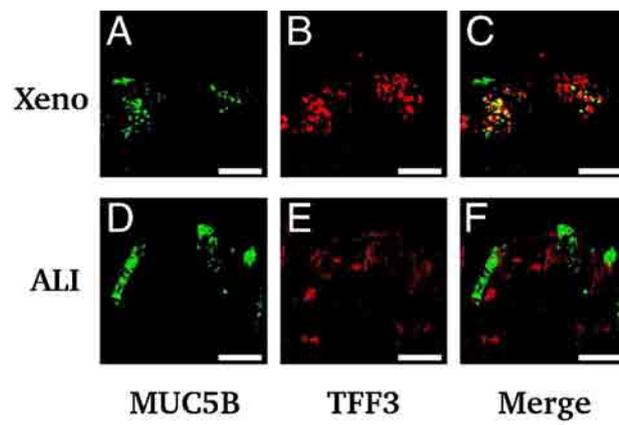
Reversal of TFF3 effect on ciliated cell differentiation by EGF-R inhibition.

Ciliated cell differentiation analyzed by β -tubulin-positive cell numeration at day 15 in EGF-deprived cultures with either TFF3 or TFF3 and tyrphostin AG1478 addition.

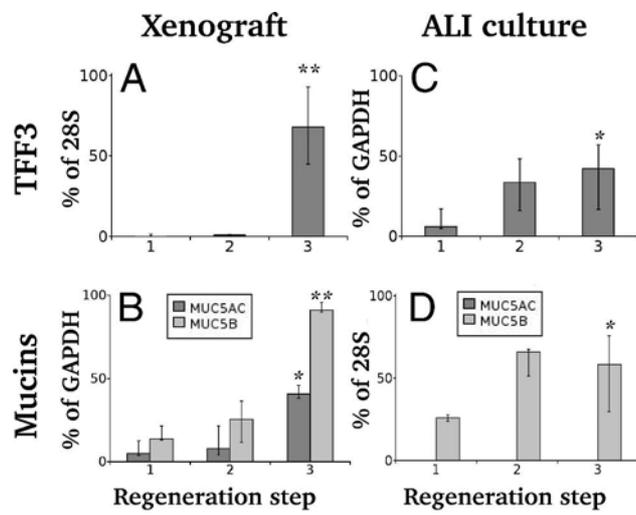
Control: EGF-free medium; **+AG1478:** EGF-free medium plus 4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (tyrphostin AG1478); **+TFF3:** EGF-free medium plus TFF3; **+TFF3 +AG1478:** EGF-free medium plus TFF3 and tyrphostin AG1478. Column height represents the median of 3 independent experiments. Error bars represent the first and third quartiles. *: $p < 0.05$ as compared to control; §: $p < 0.05$ as compared to TFF3 treatment.



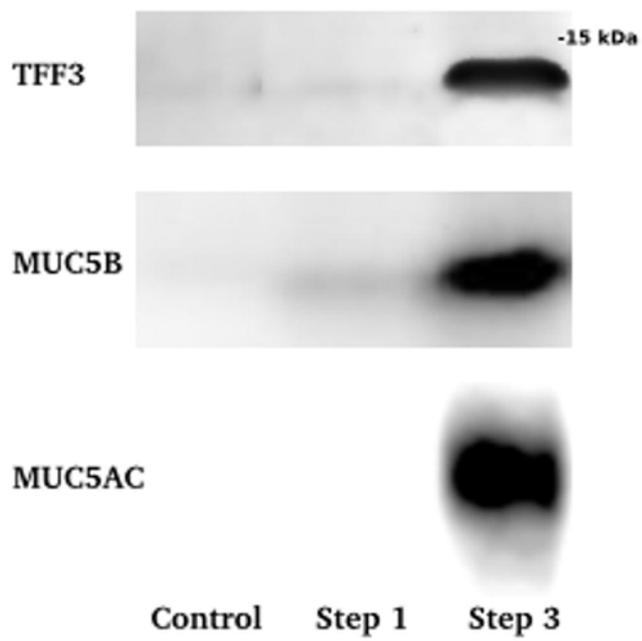
LeSimple *et al.*, Figure 1



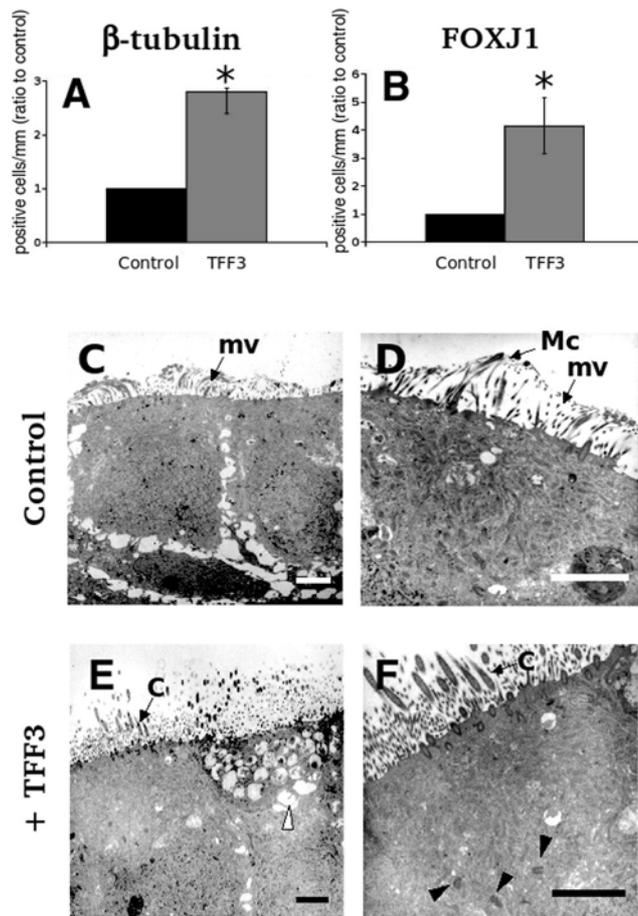
LeSimple *et al.*, Figure 2



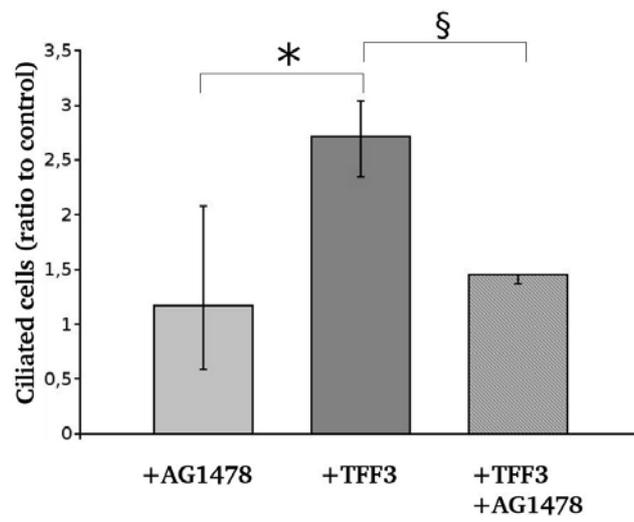
LeSimple *et al.*, Figure 3



LeSimple *et al.*, Figure 4



LeSimple *et al.*, Figure 5



LeSimple *et al.*, Figure 6

L'épithélium respiratoire de surface est fréquemment lésé et doit rapidement régénérer pour maintenir ses fonctions de barrière et de défense. L'identification de molécules capables de promouvoir la différenciation de l'épithélium respiratoire est donc d'un intérêt thérapeutique majeur. Les peptides trifoliés et les mucines, exprimés notamment par les épithéliums muqueux, ont des rôles importants dans de nombreux processus biologiques, mais leur rôle dans la régénération de l'épithélium respiratoire humain n'est pas connu.

Dans cette étude, nous décrivons l'expression des mucines MUC1, MUC4, MUC5AC et MUC5B, et des peptides trifoliés, au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire de surface humain dans un modèle *ex vivo* de xéno greffe bronchique humanisée et dans un modèle *in vitro* de culture à l'interface air / liquide. Nous montrons que le peptide trifolié TFF3 est capable de favoriser la migration des cellules épithéliales *in vitro* et la différenciation des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire humain dans le modèle de culture à l'interface air / liquide, de façon dépendante de l'activation du récepteur à l'EGF.

Nous proposons un modèle selon lequel le peptide TFF3, sécrété par les cellules intactes en bordure de lésion, favoriserait la régénération et la différenciation de l'épithélium respiratoire fonctionnel *in vivo*. Cet effet pourrait nécessiter une association avec les mucines.

Ce travail permet de mieux comprendre le rôle du peptide TFF3 dans la régénération de l'épithélium respiratoire humain, et ouvre des perspectives de thérapies régénératives applicables aux pathologies lésionnelles de l'épithélium respiratoire.

Mots-clés: Régénération, Différenciation, Ciliogenèse, Epithélium respiratoire, Xéno greffe bronchique, Mucines, TFF3, Culture à l'interface air / liquide.

Following injury, the surface airway epithelium has to rapidly repair and redifferentiate to recover its barrier and protective functions. Mucins and trefoil factors are expressed by mucous epithelia and have been shown to play important roles in various biological processes. However, their role in human airway epithelial regeneration and differentiation is not known.

We analyzed the spatio-temporal expression of trefoil factors and mucins MUC1, MUC4, MUC5AC and MUC5B during airway epithelial differentiation and regeneration using an *in vivo* open tracheal xenograft model and an *in vitro* air-liquid interface cell culture model.

We show that trefoil factor TFF3 is able to enhance human airway epithelial cell migration *in vitro* and human airway epithelium differentiation in the air / liquid interface culture model. This last effect was dependent on EGF receptor activation.

We propose that the trefoil factor family peptide TFF3 secreted by goblet cells surrounding a lesion could enhance *in vivo* the regeneration and differentiation of a mature and functional airway surface epithelium, possibly in association with mucins.

This study provides an insight on the role played by trefoil factor TFF3 in the human airway epithelium regeneration and differentiation processes, and suggests that it could be applied as regenerative therapy in chronic airway diseases with epithelial injury.

Keywords: Regeneration, Differentiation, Ciliogenesis, Respiratory epithelium, Bronchial xenograft, Mucins, TFF3, Air / liquid interface culture.