



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

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : **Biologie Cellulaire**

Présentée par

Jacqueline ROUX

Soutenue publiquement le 16 décembre 2010

**REGENERATION ET REMODELAGE DE L'EPITHELIUM
BRONCHIQUE HUMAIN NORMAL ET MUCOVISCIDOSIQUE**

Directeur de thèse

Mlle le Docteur Christelle CORAUX

Devant le jury :

Mme	le Docteur Marina PRETOLANI (Paris)	Rapporteur
M.	le Docteur Marc CHANSON (Genève)	Rapporteur
M.	le Docteur Olivier TABARY (Paris)	Examineur
Mme	le Professeur Sophie GANGLOFF (Reims)	Examineur
M.	le Professeur Philippe BIREMBAUT (Reims)	Examineur
Mlle.	le Docteur Christelle CORAUX (Reims)	Directeur de thèse

*A mon Papa, qui nous a quitté si tôt,
J'espère que, de là haut, tu es fier de moi.*

*A ma Maman et mes frères Gérard, Jean-Marie et Joël,
Que je remercie infiniment pour leur soutien, leur confiance tout au long de ces années.
Toujours là en cas de besoin !!!!*

*A ma Belle Famille,
Que je remercie pour leur soutien, car malgré la distance vous êtes toujours présents à chaque instants,
Merci Gaëlle d'avoir partagé ces dernières semaines mouvementées !*

*A tous mes amis,
Qui m'ont aidé par leur présence ou leur pensée (Je ne vous cite pas mais vous savez que je pense à vous ;))*

*A Olivier,
Qui a décidé de quitter le Sud et de venir dans le « Grand Nord » partager ma vie et le quotidien d'une
thésarde...
Je devrais te décerner une médaille d'honneur pour ta patience et ta compréhension.*

Qu'elles trouvent dans cette thèse le témoignage de mon affection.

A vous tous, je dédie cette thèse.

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité UMRS INSERM 903 à Reims, dirigée par le Pr Philippe Birembaut. Je tiens à vous remercier sincèrement pour votre accueil au sein de votre laboratoire.

Je remercie le Dr. Christelle Coraux, pour m'avoir donné cette chance de réaliser ce travail, pour sa rigueur scientifique ainsi que sa disponibilité et son engagement dans cette thèse.

Je remercie le Dr. Marina Pretolani et le Dr Marc Chanson, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie le Professeur Sophie Gangloff et le Dr. Olivier Tabary pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie les Dr Myriam Polette, Dr Béatrice Nawroski-Rabi pour leur aide techniques et leurs conseils, le Dr Jean-Marie Zahm pour son aide précieuse et sa disponibilité de tout instant, le Dr Jean-Marie Tournier pour les discussions interminables et enrichissantes concernant la culture primaire ainsi que les Dr Stéphanie Caudroy et Jean-Marie Nou pour m'avoir fait découvrir les joies de l'enseignement en PCEM1 et 2.

Je remercie Lydie Morcrette et Hélène Moret de la plateforme PRBI, pour leur disponibilité et leur aide technique (il est loin le temps où vous m'initiez aux techniques de biologie moléculaire en maîtrise...).

Je remercie Henriette et Annie, pour leur gentillesse, leur sourire et leurs fous rires. Toujours présentes pour gérer les innombrables soucis administratifs ...et personnels... Merci !!!!!

Je remercie mes colocataires temporaires de bureau: Camille, pour toutes tes petites attentions, bonbons et chocolats !!! Julie, pour ta bonne humeur, tes délires et surtout de m'avoir fait découvrir « Just Dance » ;) !

Je tiens à remercier les amis, thésards ou non qui m'ont aidé au cours de cette thèse : Kahina pour sa bonne humeur, sa fraîcheur et les câlins dans les moments difficiles (je n'aurais qu'une seule phrase pour toi « allez l'OM !!! » même si je n'ai jamais rien compris au foot ; Audrey et Emilie pour votre gentillesse, vos soirées et surtout votre présence qui m'ont bien remonté le moral ; Simon, tu vas être définitivement le dernier à faire la fermeture de l'INSERM, merci pour tes conseils... Simon II, je n'ai pas eu le privilège de te connaître davantage tout comme Damien mais je pense que cela sera vite rattrapé dans les mois à venir... Alexandra, ton humour et ta gentillesse vont me manquer, merci pour les petits gâteaux que m'ont bien réconforté !... Les Dr Grégoire Lebras et Dr Kamel Maouche pour tous vos conseils techniques ; Claire, pour ta bonne humeur, ton humour et les manips de dernières minutes ; Arnaud, pour tes conseils, tes blagues et ton humour décalé !

Sarah, une page ne serait pas suffisante pour te dire ma reconnaissance pour tout ce que tu m'as apporté au fil de ces quatre années de travail, tu as été ma coach personnelle, tu m'as recadré dans les moments difficiles, j'avoue que parfois nous n'étions pas sur la même longueur d'onde mais c'est ce qui fait la richesse de notre relation comme je te l'ai si bien expliqué. Steven, tu n'es là que depuis deux ans mais j'ai l'impression de t'avoir toujours connu. Voisin de bureau, voisin d'appart, tu es l'une des meilleures choses qui me soit arrivée au cours de ma thèse, j'espère que tu trouveras ce que tu cherches... Tes imitations et tes musiques du matin vont me manquer... Dr Thomas Jolly, nous avons partagé quatre ans de travail, de succès et de revers de fortune, tu as été un binôme formidable, toujours là pour me remonter le moral, m'apporter tes conseils scientifiques et personnels. Vous avez été là tous les trois dans les meilleurs et les pires moments de ma vie et je vous remercie infiniment de votre soutien et votre amitié.

Je remercie vivement l'Association Vaincre la Mucoviscidose pour son soutien financier durant ces quatre années de thèse.

SOMMAIRE

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	1
ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	7
A. Liste des figures	7
B. Liste des tableaux.....	10
PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	11
A. Objectifs de l'étude	11
B. Description des différents chapitres du manuscrit.....	12
I. INTRODUCTION GENERALE.....	14
A. Les voies aériennes	14
1. Généralités	14
a) L'arbre respiratoire.....	14
b) L'épithélium respiratoire.....	15
(1) L'épithélium de surface bronchique.....	15
(a) Les cellules caliciformes	16
(b) Les cellules ciliées	17
(c) Les cellules basales	18
(d) Les cellules intermédiaires (ou parabasales).....	19
(2) L'épithélium glandulaire.....	20
(a) Les cellules glandulaires	21
(b) Les cellules myoépithéliales	22
(3) L'épithélium bronchiolaire	22
(a) Les cellules neuro-endocrines	23
(b) Les cellules de Clara.....	24

(1) L'épithélium alvéolaire	25
2. Fonctions de l'épithélium respiratoire	26
a) Intégrité de la barrière épithéliale	27
(1) Jonctions serrées	27
(2) Jonctions intermédiaires	28
(1) Desmosomes	29
(2) Jonctions communicantes	30
(3) Hémidesmosomes	31
b) Défense immunitaire de l'épithélium respiratoire.....	32
(1) Le lysozyme	32
(2) La lactoferrine.....	32
(3) Les défensines	33
(4) SLPI	33
(5) Cathélicidine LL-37	33
(6) Lactoperoxydase.....	34
c) Clairance mucociliaire	34
(1) Le liquide périciliaire	34
(2) Le mucus.....	35
(3) Les cils.....	36
(4) Le mécanisme de la clairance mucociliaire	37
d) Cellules immunitaires	37
3. Les transports ioniques	38
a) Le transport de chlore	38
(1) CFTR.....	38
(2) Le canal ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel)	39
(3) CaCC : Calcium activated chloride channel	39
b) Le transport de sodium	39
c) Le transport de potassium.....	40
d) Les autres transporteurs	41
(1) Pompe Na/K ATPase	41
(2) Co-transporteur Na-K-Cl.....	41
(3) L'échangeur Na/H.....	42
e) Modèle de transports transépithéliaux.....	43
B. La plasticité de l'épithélium bronchique.....	45
1. Le contexte de lésions	45
a) Lésions d'origine non pathologiques.....	45

(1) Particules issues de la pollution	45
(2) Les composants de la fumée de cigarette.....	46
(3) Stress mécanique	46
b) Lésions pathologiques.....	47
(1) Bactéries- Virus.....	47
(2) Inflammation	47
(3) Predisposition génétique.....	47
2. Les mécanismes de réparation / régénération	48
a) Mécanismes de régénération et de réparation épithéliale.....	49
(1) Les stades de réparation – régénération des épithélia	49
(2) La différenciation des cellules ciliées	49
b) Modèles de réparation / régénération in vivo	50
c) Modèles de réparation / régénération in vitro	51
3. Facteurs intervenant au cours de ces mécanismes de réparation/ régénération de l'épithélium bronchique	52
a) Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)	53
b) Les autres facteurs (cytokines, facteurs de croissance...)	54
4. Remodelage de l'épithélium respiratoire.....	56
a) Métaplasie de type squameux ou malpighien	56
(1) Définition, description, localisation normale	56
(2) Lésions à l'origine des remaniements épithéliaux squameux.....	56
(3) Mécanismes impliqués dans la différenciation squameuse.....	58
b) Hyperplasie sécrétoire.....	59
(1) Définition	59
(2) Hyperplasie des cellules sécrétoires dans les maladies chroniques respiratoires	60
(3) Molécules impliquées dans la formation de l'hyperplasie de cellules sécrétoires ...	61
C. La mucoviscidose	62
1. Un peu d'histoire	62
2. CFTR.....	63
a) Structure du gène et de la protéine CFTR	63
b) Fonctionnement du canal CFTR.....	64
c) Mutations de la protéine CFTR.....	65
3. Physiopathologie de la mucoviscidose	67
a) Modification de la clairance mucociliaire.....	68
(1) Modèle isotonique (low salt model)	69
(2) Modèle hypotonique (Hight salt model).....	69

b) Infection	70
c) Inflammation	74
4. Remodelage de l'épithélium respiratoire.....	75
II. MATERIELS.....	78
A. Tissus respiratoires humains CF et non-CF.....	78
B. Souche bactérienne de référence.....	78
III. METHODES	80
A. Culture cellulaire.....	80
1. Dissociation des polypes	80
2. Culture des cellules dissociées	80
a) Culture en condition liquide-liquide.....	80
b) Culture en interface air liquide (IAL) des cellules épithéliales respiratoires.....	81
(1) Modèle de régénération normale.....	81
(2) Remodelages de l'épithélium respiratoire humain.....	82
(a) Modèle de culture aboutissant à la formation d'une hyperplasie sécrétoire.....	82
(b) Modèle de culture aboutissant à la formation d'une métaplasie malpighienne..	82
B. Etude des sécrétions des cellules épithéliales respiratoires au cours de la régénération et du remodelage.....	83
1. Recueil des sécrétions apicales des cultures.....	83
2. Dosage de la concentration en protéines totales des sécrétions	83
C. Etude histologique	84
1. Coupe des blocs.....	84
2. Coloration histologique des cultures en IAL.....	84
a) Coloration à l'Hématoxyline de Harris	84
b) Coloration à l'hématoxyline / éosine	84
c) Coloration bleu Alcian / acide périodique Schiff.....	85
3. Immunohistochimie.....	85
a) Anticorps utilisés	85
b) Mode opératoire	86
c) Quantification cellulaire	87
D. Analyse des sécrétions protéiques	88
1. Analyse et dosage protéique par la technologie Luminex [®]	88
a) Principe du dosage par la technologie Luminex [®]	88

b) Mode opératoire	89
2. Dosage par la technique ELISA de la β -défensine, le SLPI et la LL37	90
E. Etude des propriétés fonctionnelles.....	91
1. Test de survie bactérienne au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire humain.....	91
2. Etude des propriétés électrophysiologiques dans les cultures normales ou remodelées de cellules épithéliales respiratoires CF ou non CF.....	92
a) Etude des propriétés bioélectriques par la méthode de la chambre de Ussing	92
(1) Principe de la technique de la Chambre de Ussing :	92
(2) Matériels utilisés	92
(3) Solutions utilisées lors des mesures.....	93
(4) Protocole	94
F. Analyses statistiques	94
IV. Régénération de l'épithélium bronchique CF dans un contexte exempt d'infection et d'inflammation exogène	95
A. Régénération de l'épithélium bronchique non CF en culture en IAL	95
B. Régénération de l'épithélium bronchique CF en culture en IAL	97
1. Régénération de l'épithélium bronchique CF.....	97
2. Analyse de la dynamique de régénération de l'épithélium bronchique CF en culture en IAL.	98
a) Etude du retard de différenciation.....	98
b) Mesure de la hauteur des épithélia régénérés	100
c) Quantification du nombre de cellules basales	101
d) Quantification du nombre de cellules caliciformes.....	102
e) Analyse de la prolifération cellulaire.....	102
f) Conclusion	104
C. DISCUSSION	105
V. Remodelage de l'épithélium CF/ non CF	110
A. Modèles de remodelage de l'épithélium CF / non CF	110
1. Modèle de remodelage aboutissant à une hyperplasie des cellules sécrétoires.....	110
2. Modèle de remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne.....	111
B. Propriétés électrophysiologiques des épithélia non CF et CF régénérés et remodelés	112
1. Propriétés bioélectriques des épithélia non CF.....	113
a) Mesure du courant de court-circuit	113

b) Mesure de la résistance transépithéliales.....	114
2. Propriété bioélectriques des épithélia CF	115
a) Mesure du courant de court circuit	115
b) Mesure de la résistance transépithéliales.....	116
3. Propriétés électrophysiologiques des épithélia non CF vs CF	117
C. Propriétés de défense antibactérienne des épithélia régénérés et remodelés non CF et CF...120	
1. Capacité de défense des épithélia non CF.....	120
a) Propriétés défensives des épithélia non CF non remodelés	120
b) Propriétés des épithélia non CF remodelés	122
2. Capacité de défense des épithélia CF.....	123
a) Propriétés défensives des épithélia CF non remodelés	123
b) Propriétés défensives des épithélia CF remodelés	124
3. Conclusions.....	125
D.Sécrétion de facteurs antibactériens au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF126	
1. Sécrétion de la cathélicidine LL-37	126
2. Sécrétion de la β -défensine.....	128
a) Sécrétion de la β -défensine au cours de la régénération non CF et CF	128
b) Sécrétion de la β -défensine au cours du remodelage non CF et CF.....	128
c) Sécrétion de la β -défensine dans les cultures CF et non CF.....	129
3. Sécrétion du SLPI	131
a) Sécrétion du SLPI au cours de la régénération non CF et CF.....	131
b) Sécrétion du SLPI au cours du remodelage non CF et CF.....	131
E. Bilan des résultats.....134	
VI. Etude du profil de sécrétion des cellules épithéliales au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire bronchique non CF et CF136	
A. Profil de sécrétion de l'interleukine 8137	
1. Sécrétion de l'interleukine 8 au cours de la régénération non CF et CF	137
2. Sécrétion de l'interleukine 8 au cours du remodelage non CF et CF	137
B. Profil de sécrétion de l'EGF.....139	
1. Sécrétion de l'EGF au cours de la régénération non CF et CF	139
2. Sécrétion d'EGF au cours du remodelage non CF et CF	139
C. Profil de sécrétion de MCP-1141	
1. Sécrétion de MCP-1 au cours de la régénération non CF et CF.....	141
2. Sécrétion de MCP-1 au cours du remodelage non CF et CF.....	141

D. Profil de sécrétion de l'IP-10	143
1. Sécrétion de l'IP-10 au cours de la régénération non CF et CF	143
2. Sécrétion de l'IP-10 au cours du remodelage non CF et CF	143
E. Profil de sécrétion du GM-CSF	145
1. Sécrétion du GMCSF au cours de la régénération non CF et CF.....	145
2. Sécrétion de GMCSF au cours du remodelage non CF et CF.....	145
F. Profil de sécrétion de la fractalkine	147
1. Sécrétion de la fractalkine au cours de la régénération non CF et CF	147
2. Sécrétion de la fractalkine au cours du remodelage non CF et CF.....	147
G. Bilan des résultats	149
H. Discussion	151
VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	163
BIBLIOGRAPHIE	166

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications originales dans des revues à comité de lecture

Coraux C, **Roux J**, Jolly T, Birembaut P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. Proc Am Thorac Soc. 2008, 5(6):689-694.

Publications effectuées dans le cadre de congrès nationaux et internationaux

Jolly T, Le Naour R, **Roux J**, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium ? Pediatric Pulmonology 2010, suppl. 33, 292

Jolly T, Le Naour R, **Roux J**, Collet S, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Rev Mal Respir, 2010, 27, 14.

Roux J, Jolly T., Collet S., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Régénération et remodelage de l'épithélium respiratoire humain mucoviscidique. Rev Mal Respir, 2010, 27, 55.

Roux J, Jolly T., Collet S., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Etude de la regeneration et du remodelage de l'épithélium bronchique humain normal et mucoviscidique. Rev Mal Respir, 2009, 26, 47.

Jolly T, Le Naour R, **Roux J**, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Rev Mal Respir, 2009, 26, 39.

Roux J, Jolly T., Collet S., Birembaut P., Coraux C. Epithelial factors produced during the remodelling of the human airway epithelium. J. Cystic Fibrosis, 2009, 8, suppl. 2, s91

Coraux C., Marcet B., **Roux J**, Jolly T., Barbry P., Birembaut P. Transcriptional profile of human airway cells during the epithelial regeneration. J. Cystic Fibrosis, 2008, 7, suppl. 2, s21.

Roux J, Jolly T., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Epithelial factors involved in the regeneration and remodelling of the human airway epithelium. Pediatric Pulmonology 2008, suppl. 31, 137.

Jolly T, **Roux J**, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Caractérisation des cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte. Rev Mal Respir, 2008, 25, 8.

Roux J, Jolly T, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Etude des facteurs épithéliaux intervenant dans la régénération et le remodelage de l'épithélium respiratoire humain. Rev Mal Respir, 2008, 25, 35.

Coraux C., Marcet B., **Roux J**, Jolly T., Barbry P., Birembaut P. Transcriptional profile of human airway cells during the epithelial regeneration. Pediatric Pulmonology 2007, suppl. 30, 122.

Coraux C, Jolly T, **Roux J**, Lingée S, Laplace V, Birembaut P. Modèle d'étude de la régénération de l'épithélium bronchiolaire humain. Rev Mal Respir, 2007, 24, 1196.

Communications orales dans le cadre de congrès

Roux J, Jolly T, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Régénération et remodelage de l'épithélium bronchique humain mucoviscidose. 11ème Colloque des Jeunes Chercheurs en Mucoviscidose, 2010, Paris, France

Roux J, Jolly T., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Régénération et remodelage de l'épithélium bronchique humain mucoviscidose. Forum des jeunes chercheurs de l'IFR53, 2010, Reims, France

Roux J, Jolly T, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Epithelial factors produced during the remodelling of the human airway epithelium. 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 2009, Brest, France

Roux J, Jolly T., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Epithelial factors involved in regeneration and remodelling of human airway epithelium. 2^{ème} Forum européen des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, 2008, Lille, France

Roux J, Jolly T., Lingée S., Birembaut P., Coraux C.. Etude des facteurs épithéliaux intervenant lors de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire humain. Forum des jeunes chercheurs de l'IFR53, 2008, Reims, France

Communications affichées dans le cadre de congrès

Roux J, Jolly T., Collet S., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Airway epithelial regeneration and remodelling in Cystic Fibrosis. International Symposium of the Federative Research Institute N°53, 2010, Reims, France.

Roux J, Jolly T., Collet S., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Régénération et remodelage de l'épithélium respiratoire humain mucoviscidose. Journées de Recherche Respiratoire, 2010 Nantes, France.

Roux J, Jolly T., Collet S., Lingée S., Birembaut P., Coraux C. Etude de la regeneration et du remodelage de l'épithélium bronchique humain normal et mucoviscidose. Journées de Recherche Respiratoire, 2009, Strasbourg, France.

Roux J, Jolly T, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Epithelial factors produced during the remodelling of the human airway epithelium. 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 2009, Brest, France

Roux J. Jolly T, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Etude des facteurs épithéliaux au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique humain. 10^{ème} Forum des jeunes chercheurs de la Mucoviscidose, 2009, Paris, France

Roux J. Jolly T, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Epithelial factors involved in regeneration and remodelling of human airway epithelium. 22nd North American Cystic Fibrosis Conference, 2008, Orlando, USA

Roux J. Jolly T, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Etude des facteurs épithéliaux intervenant lors de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire humain. 9^{ème} Forum des jeunes chercheurs de la Mucoviscidose, 2008, Paris, France

Roux J. Jolly T, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Epithelial factors involved in regeneration and remodelling of human airway epithelium. 2^{ème} Forum européen des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, 2008, Lille, France

Roux J. Jolly T, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Etude des facteurs épithéliaux intervenant lors de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire humain. Journées de Recherche Respiratoire, 2008, Grenoble, France

Roux J. Jolly T, Lingée S, Gaillard D, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Cellules souches embryonnaires humaines et épithélium respiratoire. 8^{ème} Forum des jeunes chercheurs de la Mucoviscidose, 2007, Paris, France

ABREVIATIONS

ΔI_{sc}	Variation des courants de court-circuit
5HT	5-hydroxytryptamine receptors
°C	degrés Celsius
μg	microgramme
μm	micromètre
μM	micromolaire ($\mu\text{mol/L}$)
μm	micromètre
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AP1	activator protein 1
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BEBM	Bronchial Epithelial cell Basal Medium
BPAG1	bullous pemphigoid antigen 1
BPCO	Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive
BSA	Bovine serum albumin
CaCC	Calcium activated chloride channel
CaCl_2	Chlorure de Calcium
CC10	Clara cell 10 kDa protein
CCD	charge coupled device
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CK	cytokératine
CO_2	dioxyde de carbone
Da	dalton
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
ddp	différence de potentiel transépithélial
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO	Densité Optique
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENaC	Epithelial Na^+ Channel
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
FOXJ1	Forkhead box protein J1
g	gramme
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRP	gastrin-releasing peptide
HAM F12	Ham's Nutrient Mixtures F12

ABREVIATIONS

H ₂	dihydrogène
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HNP	Human Neutrophil Peptides
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IAL	interface air liquide
Ig	Immunoglobuline
IL	interleukine
Isc	Courant de court-circuit
JAM	Junctional Adhesion Molecule
kb	kilo base
KCl	chlorure de potassium
kDa	kilodalton
KHPO ₄	mono de phosphate de potassium
lb	lame basale
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molaire
m ²	mètre carré
mA	milliampère
MAP-kinase	Mitogen-activated protein <i>kinase</i>
Mg	milligramme
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MgSO ₄	sulfate de magnésium
mL	millilitre
mM	milli molaire
mm ²	millimètre carré
MMP	Matrix metalloproteinases
MUC	Mucine
mV	millivolt
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor
NaCl	chlorure de sodium
NEBs	neuroepithelial body
NFκB	nuclear factor-kappa B
ng	nanogramme/millilitre
NHE	échangeur Na ⁺ /H ⁺
NKCC	Na-K-Cl cotransporter
nm	nanomètre
NO	Monoxyde d'azote
O ₃	ozone
OCT	Optimum Cutting Temperature compound
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channe
P2R	récepteur purinergique
PBS	Phosphate buffered saline

ABREVIATIONS

pg	picogramme
pH	potentiel Hydrogène
pHi	pH intracellulaire
PKC	Protein kinase C
PN	Pneumocytes
R	Résistance
RAR	Retinoic acid receptor
Ras	Raspberry
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNase	ribonucléases
rpm	rotation par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse Transcriptase -polymerase chain reaction
RXR	Retinoic X receptor
s	seconde
SCID	Severe combined immunodeficient
SLPI	Secretory Leukocyte Protein Inhibitor
SO ₂	Dioxyde de soufre
SVCs	Small colony variants
SVF	sérum de veau foetal
TFF	trefoil factor
TIMP-1	metallopeptidase inhibitor 1
TMD	Transmembrane Domain
TNF α	tumor necrosis factor α
TSA	Tryptocase Soja Agar
TSB	Trypticase Soja Bouillon
U	Unité
UTP	uridine triphosphate
vol/vol	volume/volume
WPI	Word Precision Instrument
ZO	Zonula Occludens

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

A. Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1: Représentation schématique des voies aériennes et des alvéoles humaines.

Figure 2 : Représentation schématique des épithélia de surface trachéo-bronchique et glandulaires.

Figure 3 : Morphologie des cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission.

Figure 4 : Morphologie des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire

Figure 5 : Mise en évidence des cellules basales au sein d'un épithélium bronchique humain.

Figure 6 : Histologie de la muqueuse et de la sous-muqueuse trachéo-bronchique humaine, mise en évidence des glandes sous-muqueuses au niveau des voies aériennes cartilagineuses.

Figure 7 : Schéma d'une glande sous-muqueuse trachéo-bronchique humaine.

Figure 8 : Epithélium bronchiolaire en microscopie optique.

Figure 9 : Morphologie d'une cellule neuroendocrine en microscopie électronique à transmission.

Figure 10 : Cellule de Clara.

Figure 11 : Représentation schématique d'un épithélium alvéolaire.

Figure 12 : Représentation schématique des différents types de jonctions existant au niveau des cellules épithéliales respiratoires.

Figure 13 : Schéma d'une jonction serrée (tight junction).

Figure 14 : Représentation schématique des deux types de jonction d'ancrage.

Figure 15 : Représentation schématique des jonctions communicantes.

Figure 16 : Hémidosomes.

Figure 17 : Localisation du liquide périciliaire et du mucus

Figure 18 : Mouvement de battement ciliaire et interaction des cils avec le mucus

Figure 19 : Structure du canal ENac

Figure 20 : Transports ioniques de l'épithélium bronchique normal

Figure 21 : Régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes

Figure 22 : Métaplasie malpighienne observée dans les voies respiratoires

Figure 23 : Hyperplasie de cellules sécrétoires observée dans les voies respiratoires

Figure 24 : Topologie du canal CFTR

Figure 25 : Les différentes classes de mutations du gène CFTR

Figure 26 : Régulation du volume de la couche de liquide périciliaire par le transport actif d'ion

Figure 27 : Altération du mucus dans les voies respiratoires de patients normaux et mucoviscidosiques

Figure 28 : Remodelage de l'épithélium respiratoire mucoviscidosique

MATERIELS ET METHODES

Figure 1 : Principe de détection des protéines par la technologie Luminex®

Figure 2 : Protocole de dosage des protéines par la technologie Luminex®

Figure 3 : Schéma descriptif du montage de la chambre de Ussing

RESULTATS

Figure 1 : Dynamique de la régénération épithéliale bronchique non CF.

Figure 2 : Caractérisation de l'épithélium régénéré au stade J30.

Figure 3 : Dynamique de la régénération épithéliale bronchique CF.

Figure 4 : Expression de FOXJ1 par les épithélia non CF et CF aux stades J15 et J30.

Figure 5 : Quantification du nombre de cellules exprimant FOXJ1 au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 6 : Etude histologique des épithélia non CF et CF au stade J30 de culture en IAL.

Figure 7 : Mesure de la hauteur de l'épithélium non CF et CF au stade J30

Figure 8 : Expression de la CK13 dans les épithélia non CF et CF au stade J30 de culture en IAL.

Figure 9 : Quantification du nombre de cellules exprimant la CK13 dans l'épithélium bronchique non CF et CF au stade J30 de culture IAL.

Figure 10 : Quantification du nombre de cellules exprimant le Ki67 dans l'épithélium bronchique non CF et CF au stade J30 de culture IAL.

Figure 11: Caractérisation de l'hyperplasie sécrétoire non CF au stade J30

Figure 12 : Caractérisation de la métaplasie malpighienne non CF au stade J30

Figure 13 : Mesure du courant de court-circuit ΔI_{sc} au stade J30 des épithélia non CF non remodelés et remodelés à J30

Figure 14 : Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia bronchiques humains non remodelés et remodelés au stade J30.

Figure 15 : Mesure du courant de court-circuit ΔI_{sc} de l'épithélium bronchique humain non remodelé, ou présentant une hyperplasie sécrétoire ou une métaplasie malpighienne au stade J30.

Figure 16 : Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia bronchiques humains non remodelés et remodelés CF au stade J30.

Figure 17 : Courant de court circuit ΔI_{sc} , de l'épithélium bronchique humain CF / non CF non remodelé et présentant une hyperplasie sécrétoire non CF au stade J30

Figure 18 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non remodelées non CF au stade J0.

Figure 19 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non remodelées non CF au cours de la régénération

Figure 20 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non CF au cours du remodelage de l'épithélium bronchique.

Figure 21 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non remodelées CF au cours de la régénération normale.

Figure 22 : Survie de *S. aureus* au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF

Figure 23 : Sécrétion de la LL-37 au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 24 : Sécrétion de la LL-37 au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 25 : Sécrétion de la β -défensine au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 26 : Sécrétion de la β -défensine au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 27 : Sécrétion du SLPI au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 28 : Sécrétion du SLPI au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Figure 29 : Sécrétion d'IL-8 au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

Figure 30 : Sécrétion d'EGF au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

Figure 31 : Sécrétion de MCP-1 au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

Figure 32 : Sécrétion d'IP-10 au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

Figure 33 : Sécrétion du GM-CSF au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

Figure 34 : Sécrétion de la fractalkine au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

B. Liste des tableaux

Tableau 1 : Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia non CF et CF, non remodelés et remodelés au stade J30

Tableau 2 : Protocole de détection protéique par immunohistochimie

Tableau 3 : Bilan de l'étude de la régénération de l'épithélium bronchique CF comparé au non CF dans un contexte exempt de toute infection et d'inflammation.

Tableau 4 : Bilan de l'étude des fonctionnalités lors du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF comparé à la régénération normale non CF dans un contexte exempt de toute infection et d'inflammation.

Tableau 5 : Bilan de l'étude des profils de sécrétions lors du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF comparé à la régénération normale non CF dans un contexte exempt de toute infection et d'inflammation

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

A. *Objectifs de l'étude*

La mucoviscidose (CF) est une maladie génétique autosomale récessive due à une mutation du gène *cftr* codant pour le canal chlore CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). L'une des caractéristiques de cette pathologie est l'atteinte pulmonaire responsable de la morbidité du patient. La dégradation de la fonction respiratoire est liée à une infection chronique et une hyper-inflammation de la muqueuse respiratoire. L'épithélium bronchique, chez ces patients, présente de nombreuses lésions épithéliales et des zones fréquentes de remaniements épithéliaux.

Les travaux réalisés en 2007 dans notre laboratoire ont montré, dans un modèle de xénogreffe dans la souris nude, que la régénération de l'épithélium bronchique CF, dans un contexte exempt de toute infection bactérienne, est retardée, avec une phase de métaplasie malpighienne transitoire plus importante qu'au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non-CF. En outre, il a été montré que l'épithélium bronchique CF régénéré est remodelé, plus haut que l'épithélium non-CF, et présente une hyperplasie de cellules basales (Hajj *et al.*, 2007).

Le remodelage épithélial étant fortement observé chez les patients atteints de pathologies respiratoires inflammatoires chroniques telles que la CF ou la BPCO (Randell, 2006), nous avons étudié, au cours de ce travail de thèse, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus de régénération et de remodelage de l'épithélium bronchique humain non CF et CF, dans un contexte exempt, non seulement de facteurs infectieux, mais aussi de facteurs inflammatoires exogènes.

Afin de réaliser cette étude, nous avons mis en place des modèles *in vitro* de culture des cellules épithéliales bronchiques humaines non-CF et CF aboutissant à la régénération d'un épithélium mucociliaire différencié ou au remodelages épithéliaux de type hyperplasie des cellules sécrétoires ou métaplasie malpighienne. Utilisant ces trois de modèles de culture, nous avons:

1. Analysé la régénération de l'épithélium bronchique humain CF dans un contexte exempt d'infection et d'inflammation exogène

2. Analysé le remodelage épithélial non CF et CF, et en particulier les conséquences fonctionnelles de ce remodelage par :
 - L'étude des propriétés électrophysiologiques des épithélia
 - L'étude des propriétés de défense antibactérienne des épithélia

3. Analysé le profil de sécrétions de facteurs de croissance, chimiokines et cytokines au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF, afin de déterminer leur implication dans le remodelage épithélial

B. Description des différents chapitres du manuscrit

Le manuscrit sera divisé en cinq parties :

- **INTRODUCTION GENERALE :**

Dans cette première partie, nous décrivons l'histologie des épithélia de surface et glandulaire respiratoires. Puis, nous aborderons la description des différents mécanismes de défense de cet épithélium, en termes de barrière jonctionnelle, de mécanisme de clairance mucociliaire, de transports ioniques ou de production de peptides de défenses anti-microbiens associés au système de défense immunitaire.

Nous décrivons les mécanismes de réparation / régénération de l'épithélium bronchique suite à des lésions, en présentant les différents modèles *in vivo* et *in vitro* d'études établis dans la littérature. Nous aborderons également la notion de remodelage épithélial, en décrivant les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les propriétés de plasticité des cellules épithéliales bronchiques. Enfin, nous présenterons la mucoviscidose, sur le plan physiologique et pathologique.

- **MATERIELS ET METHODES**

Dans cette partie, nous décrivons les matériels et les méthodes utilisés dans notre étude.

- **MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA REGENERATION DE L'EPITHELIUM BRONCHIQUE CF :**

Dans cette partie, nous décrivons les résultats obtenus quant à la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la régénération de l'épithélium bronchique humain CF. Les résultats seront ensuite discutés.

- **MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LE REMODELAGE DE L'EPITHELIUM BRONCHIQUE NON CF ET CF**

Nous analyserons, dans cette partie du manuscrit, les résultats obtenus quant à la caractérisation du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF. Les résultats seront ensuite discutés.

- **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :**

Nous établirons l'implication du remodelage épithélial non-CF et CF dans l'altération des fonctions de l'épithélium bronchique, et présenterons quelques perspectives de nos travaux.

I. INTRODUCTION GENERALE

A. *Les voies aériennes*

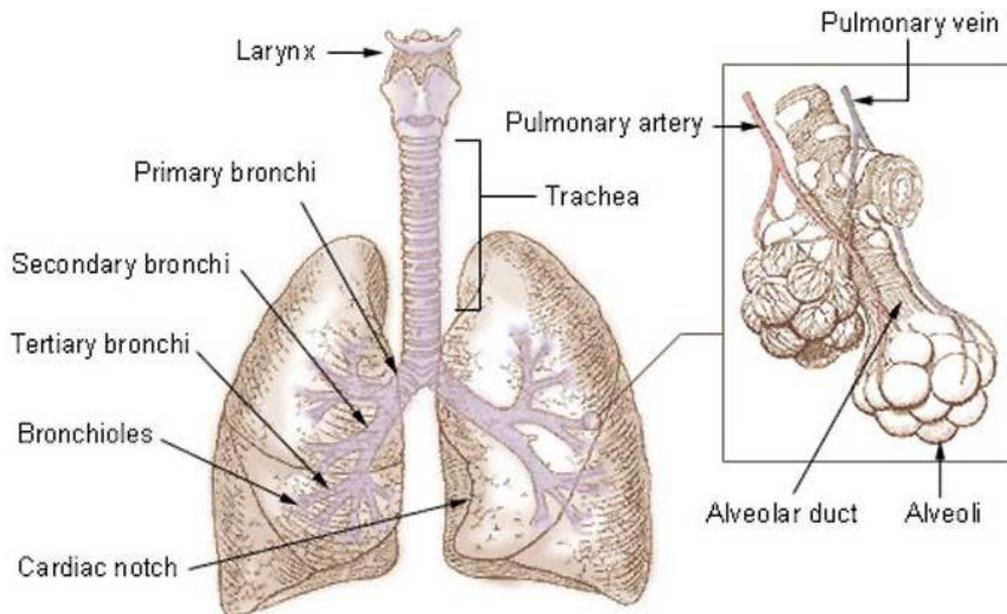
1. Généralités

a) *L'arbre respiratoire*

Les voies aériennes supérieures sont formées par les cavités nasales, les sinus, le pharynx et le larynx. La première partie, constituée de la cavité nasale, a pour fonction de réchauffer et d'humidifier l'air inspiré afin d'éviter le dessèchement des voies aériennes au cours de l'inspiration. Cette partie haute des voies aériennes assure également, par la présence d'une muqueuse, une première filtration de l'air inspiré grâce à la présence de nombreux cils qui filtrent la poussière contenue dans l'air.

La partie aérienne inférieure assure un rôle de conduction. Les étages inférieurs sont formés par l'arbre aérien, depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. La trachée se divise en bronches souches qui pénètrent dans les poumons. Elles se ramifient en bronches lobaires au niveau de chaque lobe pulmonaire. Ainsi, au fur et mesure de leur progression intra-pulmonaire, les bronches se ramifient de manière dichotomique en bronches segmentaires, puis en petites bronches, pour enfin aboutir aux bronchioles.

La fonction essentielle de cette partie inférieure de l'appareil respiratoire est le transport de l'air riche en oxygène jusqu'à la partie alvéolaire des poumons lors de l'inspiration et par la suite d'évacuer l'air riche en dioxyde de carbone par l'expiration. Les échanges gazeux ont lieu au niveau des sacs alvéolaires (Figure 1).



Conducting Pathway and Lung

Figure 1: Représentation schématique des voies aériennes et des alvéoles humaines.

(<http://corditecountryshownotes.wordpress.com/2009/11/23/lungs-smoking-and-cancer/>)

b) L'épithélium respiratoire

L'appareil respiratoire humain est tapissé d'un épithélium dont l'organisation morphologique diffère selon sa localisation dans les voies aériennes. La composition cellulaire change en fonction de sa position dans l'arbre respiratoire, où chacune aura des propriétés spécifiques. L'épithélium des voies aériennes inférieures est composé de trois types d'épithélium : l'épithélium bronchique, l'épithélium bronchiolaire et l'épithélium alvéolaire.

(1) L'épithélium de surface bronchique

Les voies aériennes bronchiques sont recouvertes d'une muqueuse respiratoire. Elle est constituée d'un épithélium de surface pseudostratifié reposant sur une lame basale et un chorion

sous-jacent. Il existe deux types d'épithélia : d'une part, un épithélium de revêtement localisé à la surface des voies respiratoires, en contact direct avec l'air inspiré et, d'autre part, un épithélium glandulaire situé dans la sous-muqueuse (Figure 2).

L'épithélium de revêtement (ou de surface) est constitué de quatre types cellulaires : les cellules caliciformes, les cellules ciliées, les cellules basales et les cellules intermédiaires.

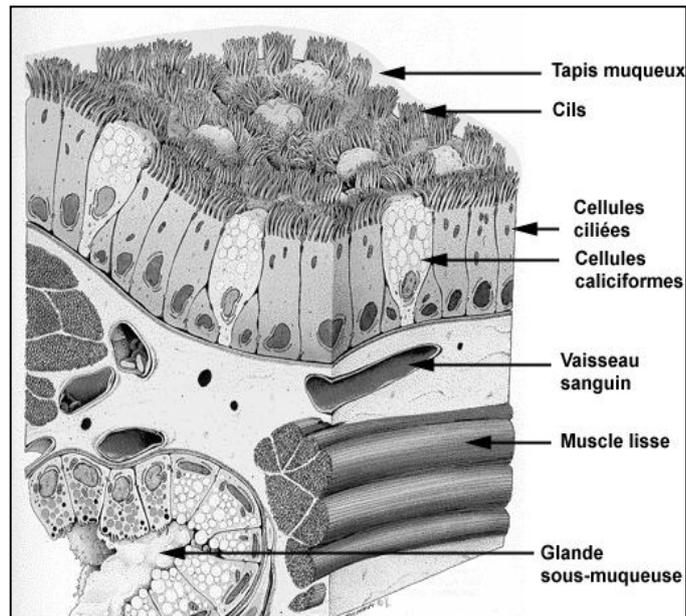


Figure 2 : Représentation schématique des épithélia de surface trachéo-bronchique et glandulaires. Chez l'Homme, l'épithélium trachéo-bronchique de surface est un épithélium pseudostratifié, composé de quatre types cellulaires principaux (cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires et basales). L'épithélium glandulaire est constitué de trois types cellulaires qui sont les cellules muqueuses, séreuses et myoépithéliales.

(a) Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes ou sécrétoires assurent une partie de la sécrétion du mucus. Elles représentent 6000 à 7000 cellules par mm^2 (Ellefsen et Tos, 1972). En microscopie électronique, ces cellules ont un noyau cellulaire en position basale, autour duquel s'amassent la plupart des organites qui vont être impliqués dans la synthèse des mucines. La partie apicale est caractérisée par la présence de nombreux granules sécrétoires peu denses aux électrons. Ces granules sont des grains de sécrétion volumineux de 800 nm de diamètre, occupant la majeure partie du cytoplasme (Jeffery

et Li, 1997). Ils contiennent un mélange de protéoglycanes neutres et acides de par la présence d'acide sialique et de groupements sulfates. Les cellules sécrétoires sont également impliquées dans la sécrétion des protéines à activité anti-bactérienne telles que les IgA sécrétoires (Goodman *et al.*, 1981), ainsi que la peroxydase (Christensen *et al.*, 1981; Christensen et Hayes, 1982). Le nombre de cellules caliciformes peut augmenter dans certains cas, notamment lorsque l'épithélium respiratoire est agressé par des particules xénobiotiques mais également dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques telles que la mucoviscidose ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Turner *et al.*, 2010) (Figure 3).

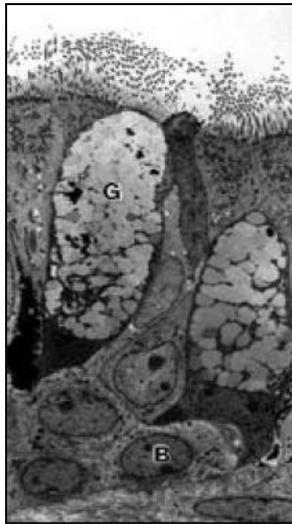


Figure 3 : Morphologie des cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission. G : cellule sécrétoire, B : cellule basale. (Jeffery et Li, 1997)

(b) Les cellules ciliées

Les cellules ciliées constituent plus de 56 % de la population cellulaire au sein de l'épithélium respiratoire bronchique et assurent une fonction essentielle dans la clairance mucociliaire par le battement coordonné des cils (voir chapitre. 1B.4). On trouvera un ratio de 5 cellules ciliées pour une cellule caliciforme (Wanner *et al.*, 1996). Ce sont des cellules de 20 μm de longueur, mesurant 7 μm de diamètre du côté apical et 2 μm à la base. L'étude de l'ultrastructure des cellules ciliées indique que chaque cil est ancré à la cellule par un corps basal d'où se prolongent les axonèmes formés de 9 doublets de microtubules à la périphérie du cil, présentant des bras externes et internes de dynéine

et deux microtubules centraux. L'interaction entre les microtubules et les bras de dynéine permettent le glissement des doublets de microtubules et d'enclencher le battement des cils (Wanner *et al.*, 1996) (Figure 4).

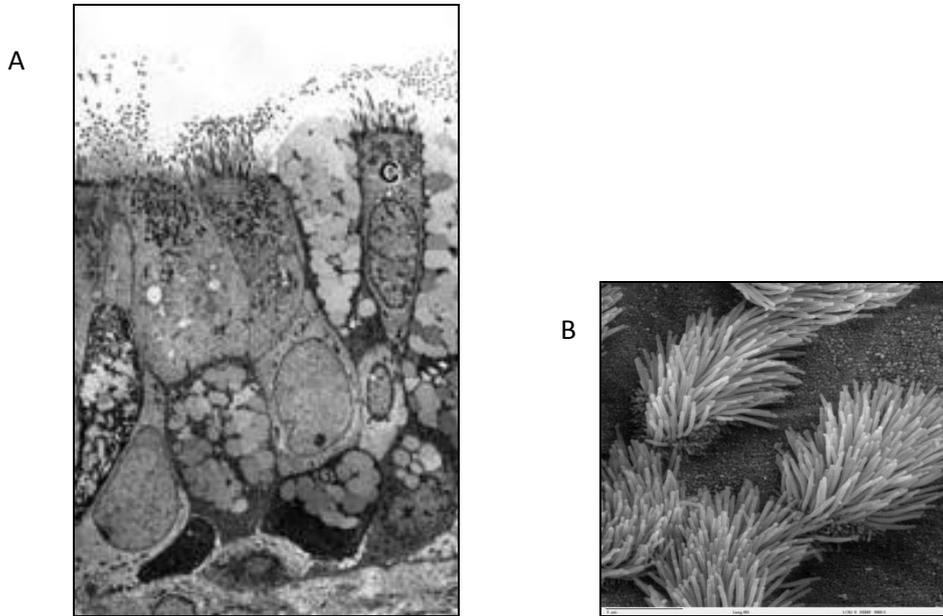


Figure 4 : Cellules ciliées de l'épithélium respiratoire

A) Morphologie des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire C : Cellules ciliées microscopie électronique à transmission (Jeffery et Li, 1997)

B) Cellules ciliées microscopie à balayage électronique de l'épithélium respiratoire. Grossissement x5000 (Credit: Dartmouth College)

(c) Les cellules basales

Les cellules basales représentent approximativement 30 % de la population cellulaire de l'épithélium respiratoire humain bronchique (Rock *et al.*, 2009). Elles sont localisées dans la partie basale de l'épithélium bronchique, en contact direct avec la lame basale, qu'elles recouvrent à 90 % (Mercer *et al.*, 1994). Ce sont de petites cellules arrondies ou pyramidales, avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Elles assurent la cohésion de l'épithélium respiratoire bronchique en se liant aux cellules cylindriques ciliées et caliciformes par des jonctions intercellulaires : les desmosomes. Elles sont elles-mêmes solidement ancrées à la lame basale par la présence d'hémidesmosomes assurant ainsi la stabilité de l'épithélium à la membrane basale (Shebani *et al.*,

2005). Les cellules basales sont caractérisées de manière spécifique par la présence de filaments intermédiaires du cytosquelette tels que les cytokératines 5 et 13 (Evans *et al.*, 2001) et la présence du marqueur p63 (Daniely *et al.*, 2004). Les cellules basales ont un rôle majeur dans la plasticité cellulaire en intervenant lors des processus de régénération et de réparation de l'épithélium respiratoire (Hajj *et al.*, 2007; Maouche *et al.*, 2009) (Figure 5).

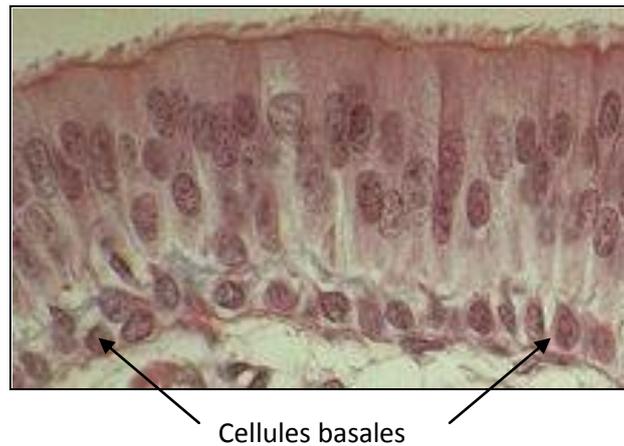


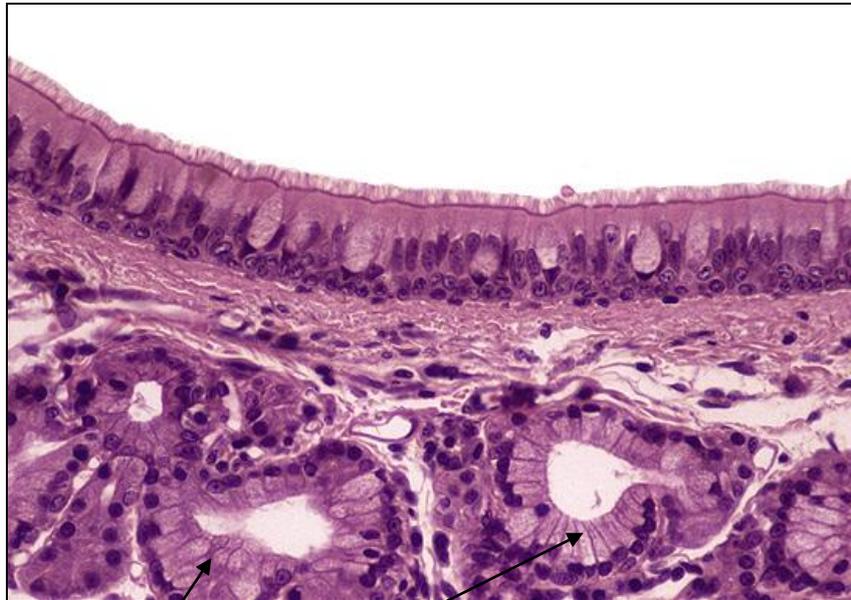
Figure 5 : Mise en évidence des cellules basales au sein d'un épithélium bronchique humain (flèches = cellules basales).

(d) Les cellules intermédiaires (ou parabasales)

Les cellules intermédiaires ou parabasales constituent 7 % de la population totale des cellules de l'épithélium bronchique. Elles sont localisées entre les cellules basales et cylindriques (Boers *et al.*, 1998). L'étude en microscopie électronique à transmission indique des similitudes morphologiques avec les cellules basales mais leur noyau se situe en position suprabasale. En microscopie optique, ces cellules ne présentent aucune caractéristique de cellules ciliées ni de cellules caliciformes (Mercer *et al.*, 1994; Breeze et Wheeldon, 1977). La fonctionnalité de ces cellules n'est pas encore bien définie. Cependant d'après les travaux de Donnelly, elles contribueraient au renouvellement des cellules cylindriques dans la mesure où ce seraient des cellules basales en cours de différenciation (Donnelly *et al.*, 1982).

(2) L'épithélium glandulaire

De nombreuses glandes sécrétrices sont localisées entre l'épithélium respiratoire bronchique et la sous-muqueuse. Elles sont tapissées d'un épithélium fortement impliqué dans la sécrétion de facteurs antibactériens, de mucus et de fluide dans la lumière épithéliale (Jeffery, 1983 ; Basbaum *et al.*, 1990 ; Bals *et al.*, 1998). Ces glandes sont formées d'un canal bordé de cils en continuité avec l'épithélium de surface, d'un grand canal collecteur et d'acini muqueux, séreux ou séro-muqueux (Meyrick *et al.*, 1969). Différents types cellulaires y sont observables, notamment des cellules séreuses, des cellules à mucus et des cellules myoépithéliales (Figure 6).



Glandes sous muqueuses

Figure 6 : Histologie de la muqueuse et de la sous-muqueuse trachéo-bronchique humaine, mise en évidence des glandes sous-muqueuses au niveau des voies aériennes cartilagineuses (flèches). Les cellules séreuses et muqueuses sont les deux types cellulaires prédominants de l'épithélium glandulaire, qui compte également des cellules myoépithéliales.

(a) Les cellules glandulaires

L'épithélium glandulaire est caractérisé par la présence d'une majorité de cellules sécrétrices, d'une part les cellules à mucus, et d'autre part les cellules séreuses, constituant respectivement 40 % et de 60 % de la population totale.

Les cellules à mucus contiennent tout comme les cellules sécrétrices de l'épithélium de surface, de larges granules de sécrétion apparaissant clairs aux électrons en microscopie électronique à transmission. Ces vésicules, d'un diamètre variant de 300 à 1800 nm, sont remplies de mucines. Ces cellules, responsables de la sécrétion du mucus, sont localisées dans la partie proximale de la glande (Figure 7).

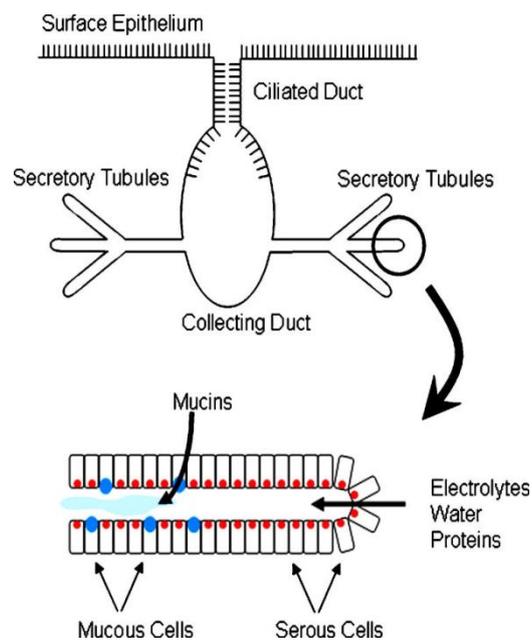


Figure 7 : Schéma d'une glande sous-muqueuse trachéo-bronchique humaine.

Structures sécrétrices majeures, les glandes sous-muqueuses sont composées de tubules et acini séreux, muqueux ou séro-muqueux, de tubules interconnectés et de canaux collecteurs. Les produits de sécrétion (mucus) s'accumulent au sein des canaux collecteurs, vont être sécrétés au niveau de la lumière des voies aériennes en passant par des canaux ciliaires bordés d'un épithélium cylindrique cilié.

Les cellules séreuses sont les cellules les plus distales de la glande. Elles présentent au pôle apical de nombreux granules denses aux électrons. Elles sont responsables de la sécrétion d'eau et d'électrolytes mais les vésicules sécrétrices, de 300 à 1000 nm de diamètre, contiennent également

de nombreuses macromolécules telles que le lysozyme, la lactoferrine, les IgA sécrétoires, la peroxydase et ainsi que de l'albumine (Meyrick et Reid, 1970; Basbaum *et al.*, 1990). Suite à la stimulation par différents sécrétagogues glandulaires, les cellules séreuses changent de morphologie et augmentent leur sécrétion (Quinton, 1981).

(b) Les cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales sont des cellules allongées en contact direct avec les cellules glandulaires et localisées au niveau de la lame basale. Leur cytoplasme est compartimenté en deux parties : un compartiment riche en filaments et un compartiment composé du noyau autour duquel s'accumulent de nombreux organites (Shimura *et al.*, 1986). Ces cellules possèdent des propriétés contractiles permettant d'exercer une pression sur les cellules glandulaires et ainsi, faciliter la libération des granules sécrétoires dans la lumière (Ballard et Inglis, 2004).

(3) L'épithélium bronchiolaire

L'épithélium bronchiolaire est un épithélium plus ou moins pseudostratifié ne présentant qu'une à deux couches de cellules. Différents types de cellules existent au niveau des bronchioles : tout comme les précédents épithélia décrits, de nombreuses cellules ciliées y sont présentes ainsi que des cellules basales. L'épithélium bronchiolaire est caractérisé par la présence de deux autres types cellulaires : les cellules neuro-endocrines et les cellules de Clara (Figure 8).



Figure 8 : Epithélium bronchiolaire en microscopie optique.
(Crédit : Université catholique de Louvain <http://www.isto.ucl.ac.be/>)

(a) Les cellules neuro-endocrines

Les cellules neuro-endocrines forment une sous-population de cellules épithéliales respiratoires (Warburton *et al.*, 1998). Elles peuvent être retrouvées isolées au niveau de l'arbre trachéobronchique. Cependant, au niveau bronchiolaire, elles sont retrouvées en amas, formant ainsi des corps neuro-épithéliaux (NEBs) (Linnoila, 2006). En contact avec la lame basale, elles présentent au sein de leur cytoplasme des granules denses aux électrons contenant des amines bioactives et des neuropeptides (Kummer *et al.*, 2008).

Les cellules neuroendocrines jouent un rôle important durant la morphogénèse des poumons. En effet elles possèdent la capacité de sécréter différentes molécules bioactives, telles que la CGRP (calcitonin gene-related peptide) ou encore la GRP (gastrin-releasing peptide) qui agissent sur la croissance et la différenciation pulmonaire (Sunday *et al.*, 1990; Pan *et al.*, 2006). Ces cellules expriment à leur surface un complexe moléculaire sensible à l'oxygène activé par la détection des neuropeptides et de la 5HT médiateurs de l'hypoxie (Youngson *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 2002). Enfin, les NEBs jouent un rôle dans la régénération de l'épithélium bronchiolaire puisqu'il est suggéré que les NEBs représentent des réservoirs de cellules progénitrices résistant aux polluants, activables suite à

une déplétion importante des cellules progénitrices bronchiolaires, les cellules de Clara (Reynolds *et al.*, 2000) (Figure 9).

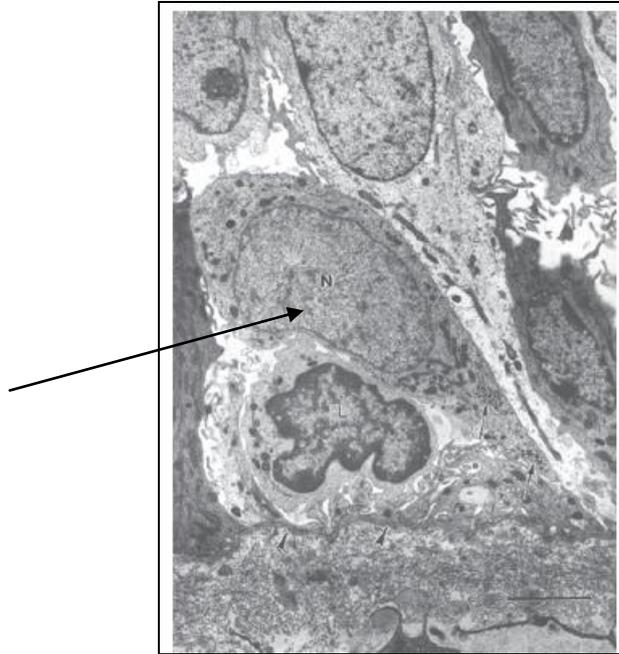


Figure 9 : Morphologie d'une cellule neuroendocrine en microscopie électronique à transmission (flèche).

(b) Les cellules de Clara

Ce sont des cellules cuboïdales appelées également cellules bronchiolaires non ciliées. Le nombre de cellules de Clara augmente au fur et à mesure des segmentations des voies aériennes bronchiolaires. Elles possèdent un noyau en position basale, des granules cytoplasmiques et présentent un dôme apical qui fait saillie dans la lumière bronchiolaire. Les cellules de Clara sont impliquées dans trois fonctions physiologiques majeures. Elles sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion du CC10 (Clara Cell protein) qui est une protéine de 10 kDa ainsi que de l'apoprotéine du surfactant (Singh *et al.*, 1988). Elles participent à la protection des voies respiratoires via le mécanisme de clairance mucociliaire et par leur capacité de détoxification des substances xénobiotiques et des gaz irritants inhalés (Stripp et Reynolds, 2008). Enfin, les cellules de Clara participent au renouvellement épithélial en agissant comme cellule progénitrice de l'épithélium bronchiolaire (Figure 10)

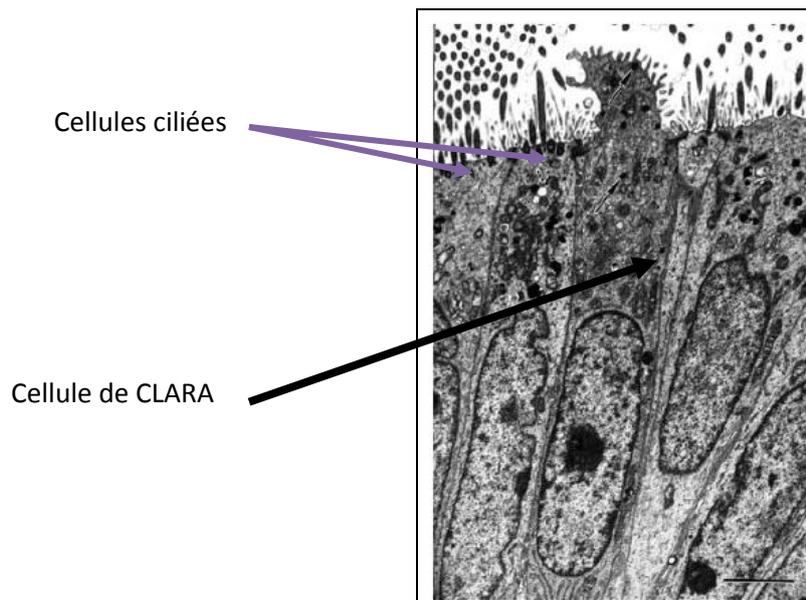


Figure 10 : Cellule de Clara. Morphologie d'une cellule de Clara entourée de cellules ciliées, en microscopie électronique en transmission (flèche noire), présentant un dôme apical bombant dans la lumière

(1) L'épithélium alvéolaire

La fonction principale de l'épithélium alvéolaire est d'assurer les échanges gazeux entre l'air et le sang. Cette surface d'échange, de l'ordre de 80 m², est constituée de deux types de cellules: les pneumocytes de type I (PNI) et les pneumocytes de type II (PNII) (Figure 11).

Les PNI recouvrent 95 % de la paroi alvéolaire. De forme squameuse, ils sont aplatis et très minces avec une épaisseur de 0.2 à 0.5 µm. Leur rôle principal est d'être imperméable aux liquides mais perméable aux gaz. Ils sont étroitement accolés à l'endothélium des capillaires dont ils ne sont séparés que par leur membrane basale (Matthay *et al.*, 2005).

Les PNII ont une morphologie plus cuboïdale. Ils sécrètent le surfactant pulmonaire (Clements, 1997). Cette grande activité de sécrétion est caractérisée au niveau cellulaire par la présence de nombreux organites et notamment de corps lamellaires, organes de stockage du surfactant (Castranova *et al.*, 1988). Ce surfactant facilite les échanges gazeux. Possédant des propriétés tensio-actives, il fluidifie le mucus et réduit la tension de surface du mucus pulmonaire dans les alvéoles. Les PNII ont également un rôle de cellules souches pouvant générer des PNI incapables de se diviser.

Les PNI et les PNII possèdent, tout comme les cellules des épithélia bronchiques, des canaux ioniques leur permettant de réguler le transport liquidien à travers l'épithélium alvéolaire (Matthay *et al.*, 1996; Matthay *et al.*, 2005).

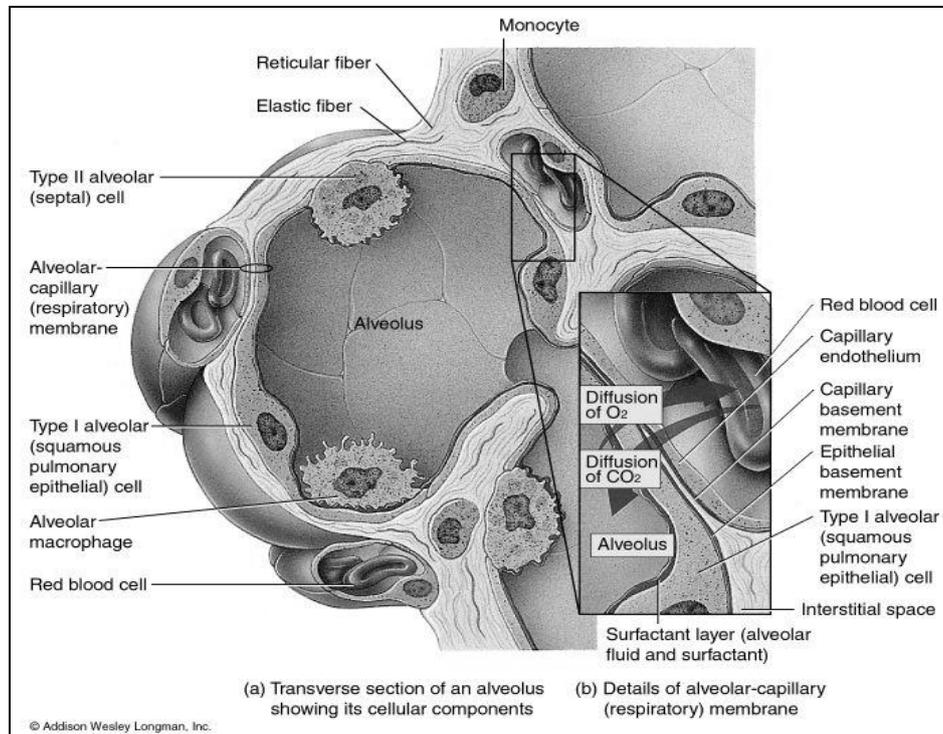


Figure 11 : Représentation schématique d'un épithélium alvéolaire. L'épithélium bordant les alvéoles est monostratifié, constitué de deux types cellulaires principaux: les Pneumocytes de type I (PN I) et de type II (PN II). Quelques éléments cellulaires, notamment les macrophages, sont retrouvés dans la lumière alvéolaire, en se déplaçant sur la paroi alvéolaire, immergés dans le surfactant.

2. Fonctions de l'épithélium respiratoire

En contact permanent avec l'environnement extérieur et continuellement exposé aux agents pathogènes, l'épithélium respiratoire protège notre organisme en constituant une véritable barrière de défense. Cette propriété essentielle est assurée par plusieurs moyens de défense, d'une part par la propriété même d'un épithélium qui est défini comme un ensemble cellulaire très cohésif qui va donc constituer une barrière physique et, d'autre part, de par sa capacité à éliminer les particules

inhalées par la clairance mucociliaire. Enfin, l'épithélium respiratoire est capable de sécréter des molécules antibactériennes.

a) Intégrité de la barrière épithéliale

L'épithélium respiratoire est un ensemble cellulaire très cohésif qui forme une barrière physique intègre entre l'environnement extérieur et l'organisme. Cette intégrité rend l'organisme imperméable aux aéro-contaminants et autres agents pathogènes. La cohésion est assurée par plusieurs types de complexes jonctionnels qui vont également déterminer la polarité des cellules épithéliales avec un compartiment apical et un compartiment basolatéral (Figure 12).

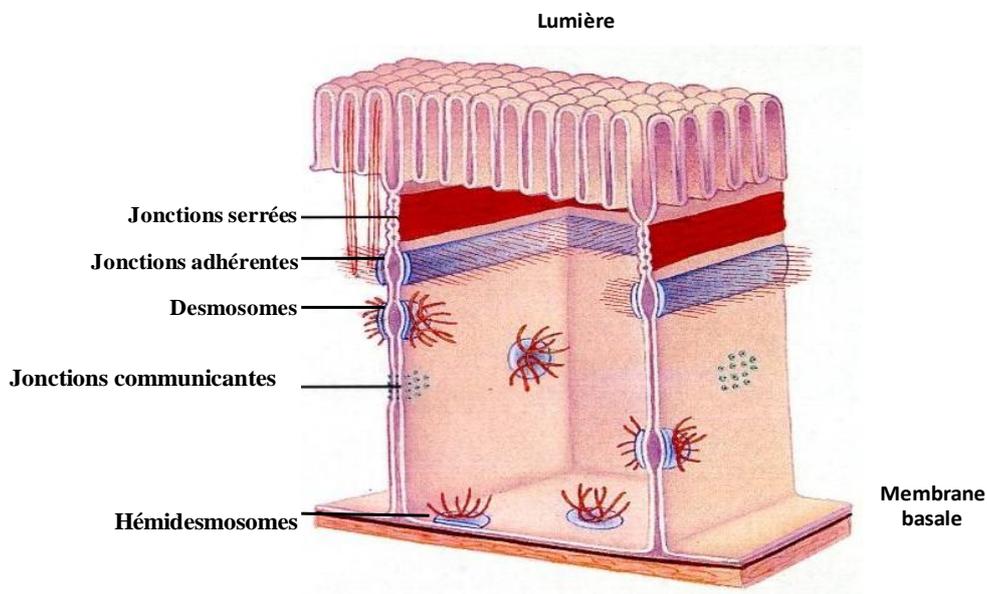


Figure 12 : Les différents types de jonctions existant au niveau des cellules épithéliales respiratoires.

(1) Jonctions serrées

Les jonctions serrées (*zonula occludens* ou encore tight junction) sont localisées au niveau apical de la membrane basolatérale des cellules épithéliales cylindriques où elles déterminent une barrière physiologique entre les compartiments extérieur et intérieur de l'organisme en limitant le

INTRODUCTION

passage de molécules dans l'espace paracellulaire (Gumbiner, 1993). Elles établissent également la polarité de la cellule en déterminant les domaines basolatéral et apical de la membrane cellulaire.

Les jonctions serrées sont des complexes multiprotéiques formés par la *zonula occludens 1* (ZO-1) qui est une protéine de 225 kDa et qui fut la première protéine découverte associée aux tight junctions (Stevenson *et al.*, 1986). ZO-2 et ZO-3 ont été co-localisées avec ZO-1 plus tardivement (Gumbiner *et al.*, 1991 ; Haskins *et al.*, 1998 ; Jesaitis et Goodenough, 1994).

L'association des molécules cytoplasmiques ZO-1, ZO-2 et ZO-3 aux protéines membranaires d'occludines, de claudines et de JAM (Junctional Adhesion Molecule) constitue une jonction serrée qui va se disposer telle une ceinture tout autour de l'apex de la cellule épithéliale. Si la jonction serrée constitue une barrière, elle permet cependant le passage sélectif de certaines petites molécules par transport paracellulaire et transcellulaire (Powell, 1981) (Figure 13).

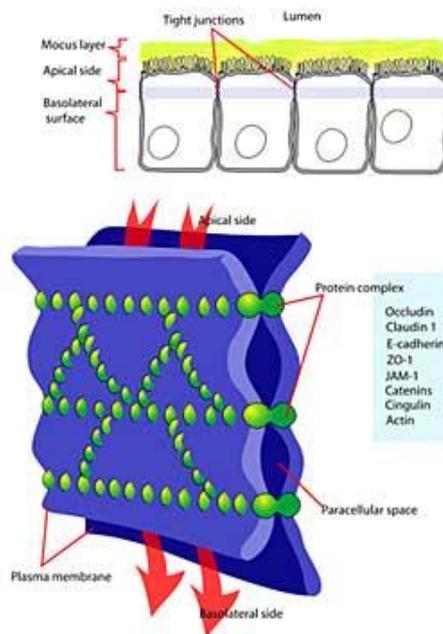


Figure 13 : Schéma d'une jonction serrée (tight junction). Les jonctions serrées séparent le pôle apical du pôle basolatéral, en assurant l'étanchéité de l'épithélium. (Crédit: <http://www.statemaster.com/encyclopedia/>)

(2) Jonctions intermédiaires

Les jonctions intermédiaires (ou *zonula adherens*) sont situées en dessous des jonctions serrées. Elles forment une ceinture et sont impliquées dans l'adhérence intercellulaire. Elles sont

INTRODUCTION

composées de plaques intracellulaires et de protéines transmembranaires (Farquhar et Palade, 1963). Les protéines centrales de ce type de jonction sont les cadhérines-E. Ce sont des protéines transmembranaires localisées au niveau de la membrane basolatérale de chacune des cellules adjacentes qui vont créer des interactions homotypiques dépendantes du calcium. Des filaments d'actine vont venir s'associer à cette structure par un complexe protéique composé de différentes protéines de caténines (la α -caténine, la β -caténine et la p120-caténine), de vinculine et de α -actinine.

Le rôle essentiel de cette ceinture est de renforcer l'intégrité de l'épithélium lors des modifications de formes générées par les changements conformationnels des filaments d'actine (Perez-Moreno *et al.*, 2003) (Figure 14).

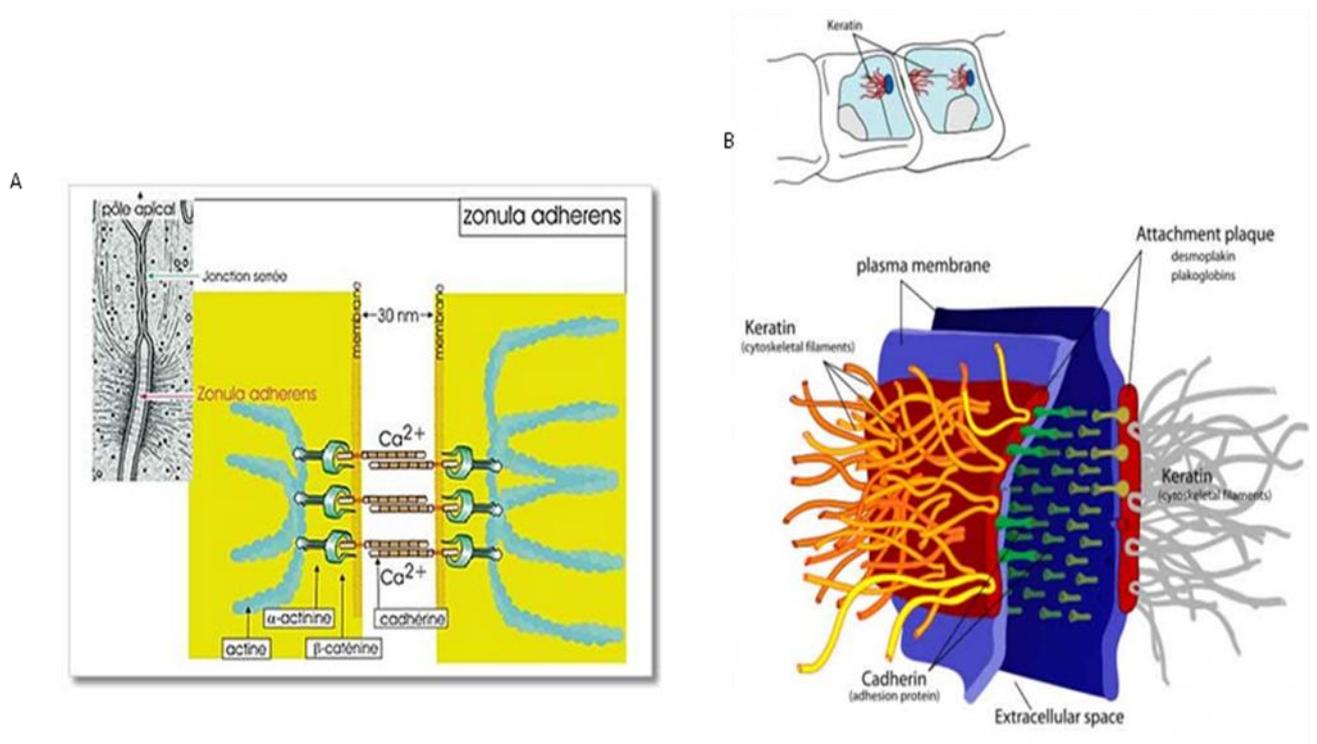


Figure 14 : Représentation schématique des deux types de jonction d'ancrage.

Les jonctions adhérentes (zonula adherens, A) ainsi que les desmosomes (B) garantissent la cohésion de l'épithélium respiratoire

(Crédit : http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion).

(1) Desmosomes

Les desmosomes (ou *macula adherens*) sont localisés en dessous des zonula adherens. Contrairement aux *zonula adherens* qui forment une structure en ceinture, celles-ci sont

punctiformes et présentes au niveau de toutes les cellules épithéliales, assurant ainsi la cohésion intercellulaire. Ce sont des jonctions d'ancrage caractérisées par la présence de plaques denses de protéines dans lesquelles s'insèrent les filaments intermédiaires de deux cellules adjacentes. Ces macula adherens sont formées de protéines appelées desmoplakines de type 1, 2, 3 et 4 (Brézillon *et al.*, 1997; Green et Gaudry, 2000).

(2) Jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (ou gap junction) sont constituées par l'association de connexons de deux cellules adjacentes, formant ainsi un pore constitué principalement d'hexamères de molécules de connexines (Figure 15). Ces protéines transmembranaires permettent l'échange de très petites molécules hydrosolubles inférieures à 1 kDa telles que le cAMP, le Ca⁺ ou l'inositol 1,4,5-tris-phosphate, entre deux cellules adjacentes (Saez *et al.*, 1986; Kumar et Gilula, 1996). Cette communication moléculaire se fait par diffusion passive.

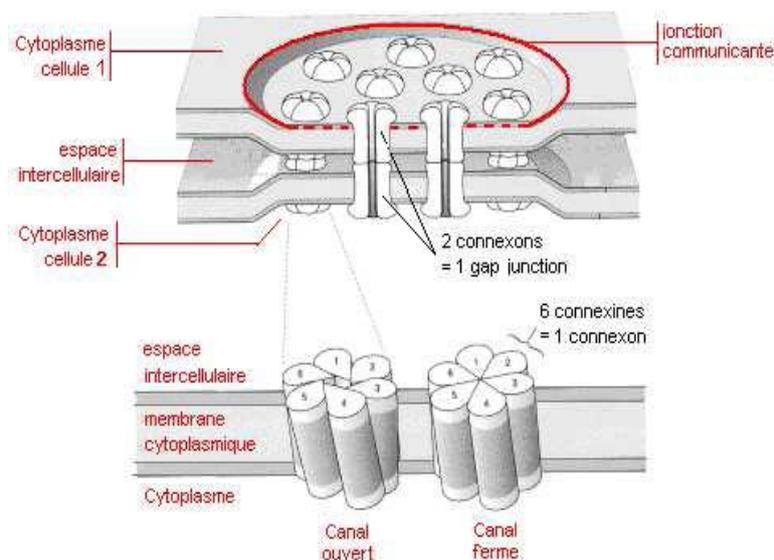


Figure 15 : Représentation schématique des jonctions communicantes. Celles-ci permettent une communication directe entre des cytoplasmes de cellules adjacentes, en assurant leurs couplages physiologiques (Grazul-Bilska *et al.*, 1997).

(3) Hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont des petits complexes multiprotéiques de 0,1 à 0,5 μm de diamètre localisés au pôle basal des cellules basales (Schwarz *et al.*, 1990). Elles sont formées de plaques intracellulaires qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique. Elles sont situées contre la lame basale sous-jacente où elles assurent une fonction de stabilité cellulaire en ancrant les cellules via des hétérodimères d'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Ces jonctions agissent comme un transducteur de signal (Borradori et Sonnenberg, 1996 ; Jones *et al.*, 1998 ; Staehelin, 1974). Elles sont liées à la plectine et l'antigène 1 de la pemphigoïde bulleuse (BPAG1 de 230 kDa) et aux filaments de cytokératine permettant d'établir une connexion entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire en particulier le collagène de type VII et la laminine 5 (Garrod, 1993 ; Green et Jones, 1996). Ce sont des structures dynamiques qui interviennent au cours des processus de remodelage tissulaire par un assemblage et désassemblage de l'édifice moléculaire permettant ainsi de maintenir l'intégrité du tissu épithélial (Tsuruta *et al.*, 2003) (Figure 16).

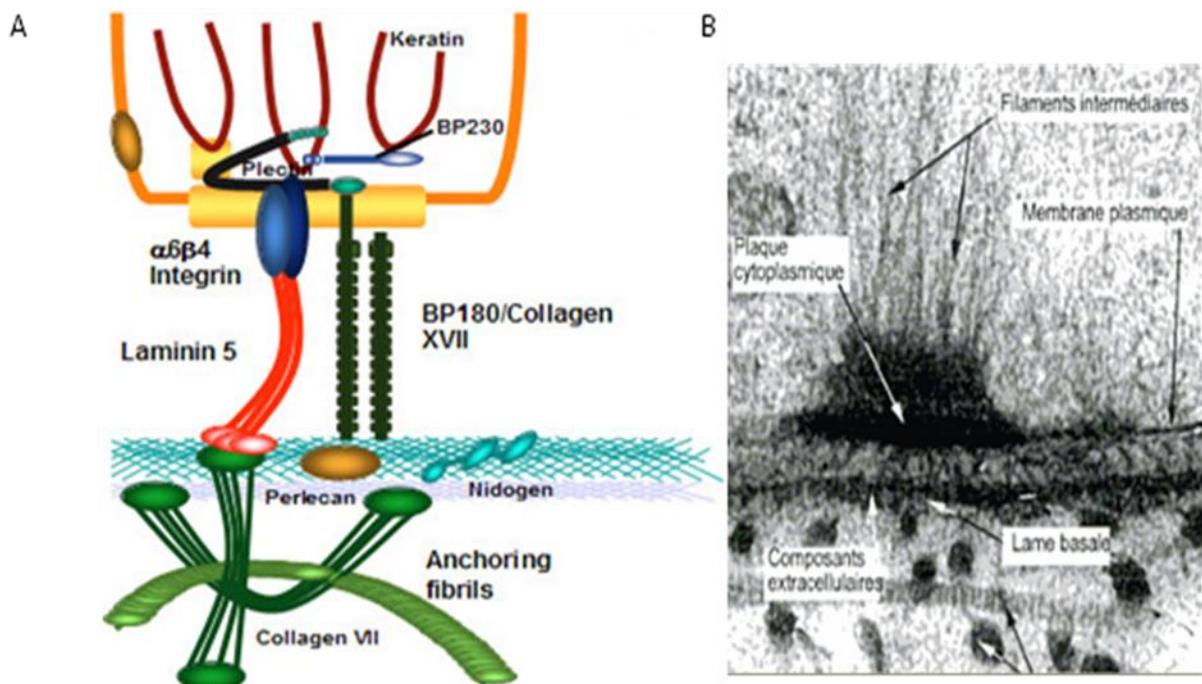


Figure 16 : Hémidesmosomes. Représentation schématique (A) et en microscopie électronique en transmission (B) de ces complexes multiprotéiques assurant l'ancrage des cellules épithéliales à la membrane basale sous-jacente (Crédit : <http://prepgmedicos.redstetho.com/>).

b) Défense immunitaire de l'épithélium respiratoire

L'air inspiré contient une multitude d'agents pathogènes, d'aéro-contaminants et d'autres particules issues de la pollution. Face aux pathogènes, l'épithélium respiratoire est capable de se défendre via la production de protéines et de peptides sécrétés dans le mucus. Ces molécules possèdent des capacités antibactériennes, antivirales mais aussi antifongiques pour certaines.

(1) Le lysozyme

Le lysozyme est une protéine basique enzymatique de 14k Da. Elle agit directement sur la paroi bactérienne en détruisant la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ glycosidique entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuraminique situé au sein des peptidoglycanes. Sécrétée en très grande quantité, elle est présente à une concentration de 0,1 à 1 mg/mL dans les sécrétions respiratoires. Elle est en grande partie produite par les cellules glandulaires et les cellules caliciformes de l'épithélium de surface ainsi que par les macrophages alvéolaires, et elle est retrouvée stockée en grande quantité dans les granules sécrétoires des neutrophiles (Konstan *et al.*, 1982). Elle est capable, de lyser aussi bien les parois des bactéries GRAM positives que les parois des bactéries GRAM négatives.

(2) La lactoferrine

La lactoferrine (ou transferrine) est une glycoprotéine enzymatique de 80 kDa contenant des ions ferriques (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Elle est retrouvée dans plusieurs types de sécrétions telles que les larmes, la salive et autres sécrétions de muqueuse (Lønnerdal et Lyer, 1995; Levay et Viljoen, 1995). Elle est présente dans les vésicules de sécrétions secondaires des neutrophiles et dans les granules de sécrétion des cellules glandulaires séreuses (Finkbeiner *et al.*, 2010). Elle a une activité bactériostatique et bactéricide mais elle possède également des propriétés anti-inflammatoires.

(3) Les défensines

Ce sont de petits peptides cationiques de 3 à 5 kDa. Les défensines sont des molécules antimicrobiennes à large spectre, cytotoxiques envers les bactéries, les parasites, les moisissures et les virus (Martin *et al.*, 1995). Au niveau des voies respiratoires, les défensines sont principalement synthétisées et excrétées par les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires. Il existe 2 types de défensines : les α -défensines et les β -défensines. Les α -défensines, également appelées HNP (Human Neutrophil Peptides) sont retrouvées dans les grains azurophiles des neutrophiles (Harwig *et al.*, 1994). Elles sont impliquées dans les phénomènes mitogéniques et chimiotactiques (Chertov *et al.*, 1996; C J Murphy *et al.*, 1993). Elles contribuent à la réparation de l'épithélium respiratoire en activant la prolifération cellulaire (Aarbiou *et al.*, 2002). Les β -défensines, ou HBD (Human Beta Defensin), sont sécrétées par les cellules de l'épithélium des deux et des glandes des voies aériennes (Singh *et al.*, 1998) en réponse à une stimulation par le LPS et les cytokines telles que le TNF- α et l'interleukine-1 β et elles sont actives contre les bactéries GRAM positives et négatives (Oppenheim *et al.*, 2003 ; Ganz 2003).

(4) SLPI

Le SLPI (ou Secretory Leukocyte Protein Inhibitor) est une protéine de 11.7 kDa exprimée par les macrophages, les neutrophiles et les cellules séreuses de l'épithélium respiratoire (Melrose *et al.*, 1992). SLPI est la 3^{ème} protéine la plus abondante après le lysozyme et la lactoferrine au niveau pulmonaire. Le domaine C terminal possède une activité inhibitrice de la neutrophile élastase ainsi que de la cathepsine G (Gauthier *et al.*, 1982). Il possède une activité antibactérienne et antivirale (P S Hiemstra *et al.*, 2004).

(5) Cathélicidine LL-37

LL-37 est une protéine antimicrobienne appartenant à la famille des cathélicidines. Elle est retrouvée dans les granules spécifiques des neutrophiles, les lymphocytes et les cellules épithéliales respiratoires (Agerberth *et al.*, 2000). Elle est présente sous une forme inactive et le précurseur (hCAP-18) a besoin d'être clivé par la protéinase 3. Elle a une action chemoattractante vis-à-vis des

cellules immunitaires au foyer d'inflammation ou d'infection. Cependant, la LL-37 a une activité réduite dans le cas de la mucoviscidose où son action bactéricide est inhibée (Cf. paragraphe inflammation chapitre IC).

(6) Lactoperoxydase

Les cellules épithéliales des voies respiratoires peuvent sécréter la peroxydase intervenant lors des infections des voies aériennes (Christensen *et al.*, 1981). L'inhibition de la lactoperoxydase entraîne une diminution de la clairance bactérienne dans les voies respiratoires (C Gerson *et al.*, 2000). La lactoperoxydase a une fonction antivirale (Pourtois *et al.*, 1990; Tenovuo, *et al.*, 1995), antifongique (Lenander-Lumikari, 1992; Popper et Knorr, 1997) et possède une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Haemophilus influenzae* (Wijkstrom-Frei *et al.*, 2003).

c) *Clairance mucociliaire*

Avec une surface totale d'échange d'environ 100 à 130 m², l'épithélium respiratoire est fortement exposé aux agressions extérieures par l'inhalation des pathogènes et autres aéro-contaminants. La clairance mucociliaire est un des systèmes de défense innée les plus importants de l'appareil respiratoire. Cette défense mécanique est formée de trois composantes essentielles à son fonctionnement : le liquide de surface formé d'une phase sol appelée liquide périciliaire, d'une phase gel composée par le mucus, et le battement ciliaire des cellules ciliées (Davis et Lazarowski, 2008).

(1) Le liquide périciliaire

Le liquide périciliaire est une solution aqueuse de faible viscosité avec une épaisseur physiologique de 7 µm. L'origine de cette phase liquide serait la résultante des transports ioniques transépithéliaux de sodium et de chlore entraînant des mouvements d'eau (Sleigh, 1989). Cette phase sol joue un rôle de lubrifiant en facilitant le mouvement du mucus le long des voies

respiratoires (Zahm *et al.*, 1989). La régulation de sa faible viscosité ainsi que de son épaisseur est primordiale pour obtenir une clairance mucociliaire efficace (Figure 17).

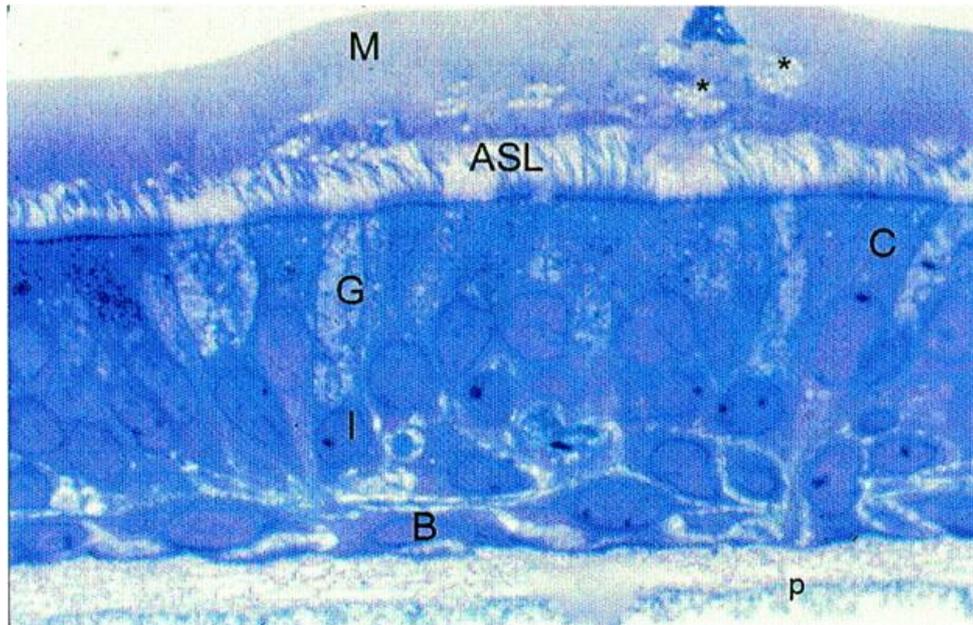


Figure 17 : Localisation du liquide périciliaire et du mucus

Culture primaire d'un epithelium bronchique. Représentation d'une section de culture en interface air-liquide avec la présence de mucus (M), du liquide de surface (ASL), de cellules sécrétoires (G), de cellules ciliées (C), de cellules basales (B), de cellules intermédiaires (I) et la membrane du support de culture (p). Photomicrograph provided by Scott H. Randell. **Guggino W B , Guggino S E PNAS 2000;97:9827-9829**

(2) Le mucus

Le mucus est produit par les cellules caliciformes et les cellules sécrétoires glandulaires. Composé à 95 % d'eau et 5 % d'ions et de protéines glycosylées, il forme un film tapissant l'épithélium respiratoire où il maintient son hydratation. Les protéines retrouvées majoritairement au sein du mucus sont les mucines.

Les mucines sont des protéines filamenteuses de très hauts poids moléculaire fortement glycosylées par de nombreuses chaînes O-glycanniques représentant 50 à 80 % de la masse de la

mucine. Elles sont sécrétées par les cellules caliciformes ainsi que par les cellules à mucus glandulaires.

Il existe deux classes de mucines : les mucines sécrétées et les mucines membranaires. Elles possèdent toute une structure similaire. Les mucines majoritaires sécrétées au niveau des voies aériennes, sont les MUC2, 5AC, 5B. Elles sont riches en domaine-cystéine leur permettant de former des oligomères et de polymériser. Cette structure multimérique est très importante dans la mesure où elle procure la configuration tridimensionnelle d'un gel (Van Klinken *et al.*, 2000; van Klinken *et al.*, 1998). Les mucines, MUC5AC et MUC5B, sont les molécules prédominantes dans la formation du gel de mucus (Hovenberg *et al.*, 1996; Sheehan *et al.*, 1999). La mucine MUC5AC est produite par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface bronchique tandis que MUC5B est sécrétée majoritairement par les glandes de la sous-muqueuse (Hovenberg *et al.*, 1996; Wickström *et al.*, 1998).

Les mucines membranaires, MUC1, 3, 4 et 13, possèdent un domaine glycoprotéique transmembranaire (Rose *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001; Moniaux *et al.*, 1999). Elles sont retrouvées également dans le mucus mais elles ne participent pas à la formation du réseau tridimensionnelle.

Les mucines confèrent au mucus des propriétés rhéologiques bien précises afin de lui établir une efficacité optimale d'épuration des particules pathogènes. Le mucus possède des propriétés de viscoélasticité et de filance, capacité à former des fils, régulant le transport mucociliaire (Puchelle *et al.*, 1983).

(3) Les cils

Enfin, les cils constituent le facteur clé de l'ensemble du système de clairance mucociliaire. Ils entrent en contact avec le mucus sur une profondeur de 0.5 μm à une vitesse de 800 $\mu\text{m/s}$, paramètre idéal pour une clairance efficace. Le mouvement ciliaire est caractérisé par des battements coordonnés avec un mouvement métachronal à une fréquence de 12 à 15 Hz (Chilvers et O'Callaghan, 2000). Le mouvement d'un cil est réalisé de manière asymétrique dans le temps : une phase de battement de propulsion de courte durée suivie d'une phase de retour à l'état initial plus longue (Sanderson et Sleight, 1981) (Figure 18).

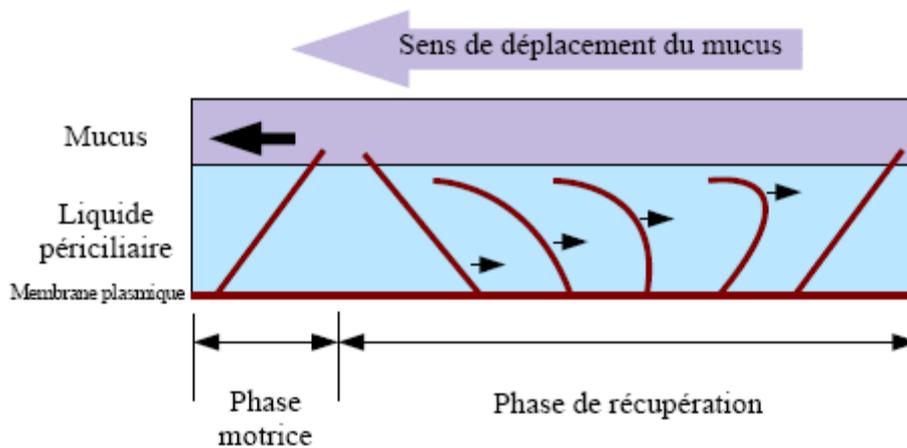


Figure 18 : Mouvement de battement ciliaire et interaction des cils avec le mucus

(4) Le mécanisme de la clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire agit comme un vaste tapis roulant. Les particules xénobiotiques et autres pathogènes sont piégés et englobés dans le mucus (Rose, 1992). Les battements ciliaires coordonnés poussent le mucus et les agents étrangers piégés vers le carrefour aéro-pharyngé où ils sont déglutis. La régulation de chacun des composants du mécanisme de la clairance est primordiale. Une faible épaisseur du liquide périciliaire empêcherait une interaction efficace cils-mucus tandis qu'une épaisseur plus importante ne permettrait pas un couplage cil-mucus. De même, une mauvaise régulation des flux ioniques transépithéliaux nuirait à la composition et à la viscosité du liquide périciliaire et du mucus, menant ainsi à une inefficacité de la clairance mucociliaire (Cf. paragraphe inflammation chapitre IC)

d) Cellules immunitaires

L'inhalation d'agents pathogènes active les cellules immunitaires présentes au sein de la muqueuse respiratoire. Plusieurs types de cellules immunitaires sont impliqués dans cette immunité dite acquise. Les cellules dendritiques activées par la présence de pathogènes se différencient en cellules présentatrices d'antigènes. Elles ont la capacité de présenter les antigènes étrangers aux lymphocytes T qui vont alors proliférer. Bien que la plupart de ces lymphocytes T meurent par

apoptose, quelques cellules subsistent et deviennent des cellules mémoires formant ainsi la mémoire immunologique assurant une protection immune durable.

Les polynucléaires neutrophiles, bien qu'étant en quantité réduite dans les voies respiratoires d'individus sains, peuvent affluer rapidement et massivement suite à une lésion en réponse à la production de facteurs chimioattractants dont le principal est l'interleukine-8 (IL-8).

3. Les transports ioniques

Les échanges ioniques, au niveau des cellules épithéliales respiratoires, ont un rôle prépondérant dans la mesure où ils permettent de réguler le volume et la composition du liquide de surface des voies aériennes en générant un gradient osmotique intervenant dans le mouvement transépithélial des fluides. Ces échanges sont réalisés par l'intermédiaire de canaux ioniques constitués de protéines transmembranaires perméables à un ou plusieurs ions.

Les transports ioniques à travers les canaux peuvent se faire de manière active ou passive. Les transports à travers les canaux sont dits « passifs » s'ils ne consomment pas d'énergie mais suivent le gradient électrochimique de l'ion d'intérêt, c'est-à-dire les concentrations ioniques de l'ion considéré de part et d'autre de la membrane. Cependant, il existe aussi des transports « actifs » initiés par des pompes et consommant de l'énergie (ATP). Ces transports créent des gradients électrochimiques de part et d'autre de la membrane. Ces transports d'ions sont responsables de l'existence d'un potentiel membranaire et sont impliqués dans les phénomènes de sécrétion ou d'absorption d'eau et d'ions à travers la membrane épithéliale. Différents types de canaux existent en fonction des ions transportés.

a) Le transport de chlore

(1) CFTR

La majorité du transport de chlore est réalisée par le canal CFTR dont la structure et la fonction ainsi que les implications dans la pathologie de la mucoviscidose seront développées dans le chapitre III.

(2) Le canal ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel)

Le canal ORCC est régulé par la protéine CFTR par un mécanisme autocrine/paracrine impliquant le transport d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP se lie aux récepteurs purinergiques P2R pour stimuler le canal ORCC (Schwiebert *et al.*, 1995). Il permet la sécrétion de chlore AMPc dépendante.

(3) CaCC : Calcium activated chloride channel

Le canal CaCC est activé par le calcium. Il existe trois isoformes protéiques CaCC 1 à 3. Le canal CaCC 1 est retrouvé en grande quantité à la membrane des cellules à mucus. Cette expression est corrélée à la quantité de mucus produite. Il constituerait une alternative au canal CFTR dans le cas de la mucoviscidose pour la sécrétion de chlore AMPc dépendante.

b) Le transport de sodium

Les canaux de transport sodique sont exprimés au côté apical de la membrane plasmique des cellules épithéliales et permettent l'entrée du Na⁺ selon un gradient électrochimique. La majorité des transports d'ions Na⁺ est réalisée par le canal ENac (Epithelial Na⁺ Channel) selon un gradient électrochimique. Ce canal fonctionne en coordination avec la pompe Na⁺/K⁺-ATPase, située du côté basolatéral de la cellule qui permet la sortie du sodium tout en créant une force électrogénique assurant la polarisation cellulaire.

Le canal ENac est formé de trois sous-unités, α -, β - et γ -ENac de 85 à 95 kDa et est, hautement sélectif pour le Na⁺ (Canessa *et al.*, 1994). La sous-unité α transporte les ions sodium et les sous-unités β et γ bien que, ne transportant pas le Na⁺, augmentent néanmoins son transport. Ce canal ENac est inhibé par le diurétique amiloride capable de se lier à la sous-unité α (Figure 19).

Le transport des ions sodium dans la cellule et à travers celle-ci joue un rôle physiologique primordial. Il est impliqué dans l'homéostasie du Na⁺ dans le milieu extracellulaire en le réabsorbant et représente un canal important dans la régulation de l'hydratation du liquide de surface en laissant entrer le sodium dans la cellule épithéliale.

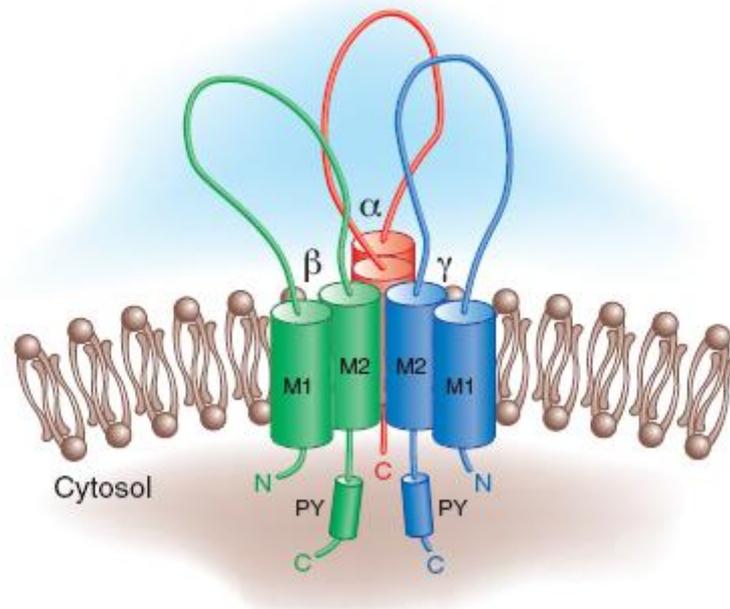


Figure 19 : Structure du canal ENaC

c) Le transport de potassium

Il existe une trentaine de canaux potassiques au sein des voies respiratoires. Ils sont situés du côté apical mais également du côté basolatéral. Il y a 3 classes de canaux K⁺, différenciées par le nombre de domaines transmembranaires (TMB). Parmi les canaux possédant 6 domaines TMB, il existe 2 sous classes de canaux, les canaux voltage dépendant du K⁺ et ceux dépendant du Ca⁺. Puis

on trouve les canaux formés de 4 TMB et de deux pores (K2P), et enfin les canaux, présentant 2 domaines TMD (ou Kir) (Bardou *et al.*, 2009).

Ces canaux sont impliqués dans diverses fonctions physiologiques de l'épithélium respiratoire. Ils jouent un rôle dans le maintien du gradient électrochimique pour le transport des ions et des fluides et de ce fait, permettent l'équilibre entre les ions Na⁺ et Cl⁻ permettant ainsi de contrôler le volume du liquide de surface ainsi que sa composition. Ces canaux ont également une importance dans l'adaptation cellulaire aux différents niveaux d'oxygène. Mais les canaux

potassiques auraient aussi une forte implication dans la réparation des lésions de l'épithélium respiratoire. En effet, il a été montré que l'activité des canaux K^+ module la prolifération et la migration de différents types cellulaires (Trinh *et al.*, 2007a).

d) Les autres transporteurs

(1) Pompe Na/K ATPase

La pompe Na^+/K^+ ATPase assure le transport actif des ions sodium et potassium. Elle permet d'expulser du côté basolatéral trois ions sodium et de réabsorber deux ions potassium. Elle est essentielle au fonctionnement de toutes les cellules. Son rôle principal est de maintenir l'homéostasie sodique et potassique intracellulaire. Elle est nécessaire à l'absorption transépithéliale de sodium (Jorgensen *et al.*, 2003).

La pompe est un complexe protéique appartenant à la famille ATPase de type P constitué d'un hétérodimère de sous unités α et β ainsi que d'une protéine régulatrice de transport ionique appartenant à la famille FXYD (P L Jorgensen *et al.*, 1998; Kuster *et al.*, 2000; Sweadner *et al.*, 2000). L'activité de la pompe est inhibée par des glycosides cardiotoniques comme l'ouabaïne ou la digitaline.

C'est une pompe électrogène qui, en maintenant une faible concentration de sodium intracellulaire et une forte concentration de potassium, permet de créer une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique. Ce passage des ions Na^+ et K^+ produit une énergie potentielle directement liée au gradient ionique qui va être utilisée pour les transports actifs secondaires couplés essentiellement au sodium.

(2) Co-transporteur Na-K-Cl

Le co-transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$ est localisé au niveau de la membrane basolatérale. Il permet de faire entrer des ions chlorures contre le gradient électrochimique, ions qui sont ensuite excrétés au pôle apical. Ce cotransport est électroneutre avec une stœchiométrie de $1Na : 1K : 2Cl$ (Haas et Forbush, 1998).

Ce cotransporteur peut être inhibé par la classe des diurétiques tels que le furosemide, le bumétanide et le benzmetanide. Il existe deux isoformes du cotransporteur Na-K-Cl : NKCC1 et NKCC2 (Ecelbarger *et al.*, 2001). Cependant, seul NKCC1 est présent au niveau des cellules épithéliales respiratoires, NKCC2 étant présent uniquement au niveau rénal. NKCC1 est étroitement lié avec les canaux chlores afin de réguler le volume cellulaire au cours de la sécrétion des fluides et des ions (Haas et Forbush, 2000).

L'activation de ce cotransporteur au niveau des cellules épithéliales est réalisée de manière indirecte suite à une stimulation par l'UTP apical ou par l'isoprotérénol (Haas et Forbush 2000 ; Haas *et al.*, 1993). La concentration de chlore intracellulaire est également fortement impliquée dans son activation. En effet, les variations de concentrations, suite aux différentes stimulations par l'AMPc, l'UTP ou encore l'isoprotérénol, permettent l'activation de NKCC1 par la phosphorylation via une protéine kinase (Haas et Forbush, 2000).

(3) L'échangeur Na/H

L'échangeur Na/H (ou NHE) assure un échange électroneutre par l'intermédiaire de l'entrée d'un ion Na⁺ extracellulaire et la sortie d'un proton intracellulaire, activé par la production de protons cellulaires (Harvey et Ehrenfeld, 1988). L'échangeur sodium/proton est impliqué dans le flux ionique mais également dans la régulation du pH intracellulaire (pHi) ainsi que du volume cellulaire (Orlowski et Grinstein, 1997).

Les NHE sont une superfamille de 9 isoformes (Orlowski et Grinstein, 2004). L'isoforme NHE1 est ubiquitaire et est localisée au pôle basolatéral de la cellule épithéliale (Paradiso, 1992). Les isoformes NH2 et NH3 ont été mises en évidence dans les cellules épithéliales nasales humaines (Shin *et al.*, 2005), quant aux autres isoformes, ils sont spécifiques d'autres tissus.

Les NHE sont associés à de nombreuses fonctions physiologiques. Ils protègent la cellule contre l'acidification intracellulaire. Les NHE sont activés par la diminution du pHi. D'autre part, les NHE peuvent modifier le pHi afin de stimuler la croissance et l'état de la cellule. En effet, NHE1 est fortement impliqué dans la croissance cellulaire et la prolifération (Putney et Barber, 2003 ; Wang *et al.*, 1997). Enfin, l'activité de NHE1 participe à la différenciation cellulaire (Rao *et al.*, 1992).

INTRODUCTION

combinaison formée par le canal ENaC et la pompe Na⁺/K⁺ ATPase permet de créer un flux net d'ions sodiques du compartiment muqueux vers le compartiment séreux.

Le gradient ionique ainsi généré par la pompe Na⁺/K⁺ ATPase au pôle basolatéral permet l'accumulation des ions potassiques au niveau cytosolique et ainsi de former un gradient électrochimique favorable au transport de K⁺ vers l'extérieur de la cellule. Différents canaux potassiques (dépendants du voltage et/ou du calcium) permettent de maintenir la concentration de K⁺ et le potentiel de membrane.

Parallèlement au passage des ions Na⁺, les ions chlorure Cl⁻ traversent également de manière passive la barrière épithéliale essentiellement par des voies de type paracellulaire. Ce passage permet de préserver l'électroneutralité et l'absorption d'eau.

Cependant, la sécrétion de chlore Cl⁻ peut également s'effectuer selon un gradient électrochimique maintenu par le co-transporteur Na⁺/K⁺/Cl⁻ mais aussi par les canaux Cl⁻ de la membrane apicale comme CFTR et les CaCC.

L'équilibre existant entre l'absorption de sodium et la sécrétion de chlore est très important dans la régulation des mouvements d'eau à travers l'épithélium. Il permet de contribuer à l'hydratation optimale des voies aériennes et permet d'assurer une clairance mucociliaire efficace (Boucher, 1994; Widdicombe *et al.*, 1997 ; Tarran *et al.*, 2001 ; Boucher, 2003 ; Chambers *et al.*, 2007).

B. La plasticité de l'épithélium bronchique

L'épithélium respiratoire constitue, après l'épiderme, la deuxième plus grande surface tissulaire au contact de l'environnement extérieur. Dans les cas non pathologiques, cette exposition permanente, via l'inspiration, l'expose à différents facteurs plus ou moins néfastes pouvant entraîner des lésions dénudant partiellement ou totalement la lame basale. Face à ces lésions, l'épithélium respiratoire est capable de restaurer son intégrité par des mécanismes de réparation et de régénération.

L'épithélium respiratoire est une structure dynamique possédant, comme décrit dans la partie I, différents types cellulaires participant à son architecture. Ces cellules basales, ciliées ou encore caliciformes coexistent dans une certaine proportion au sein de l'épithélium. L'homéostasie cellulaire maintient la composition cellulaire de l'épithélium. De plus, en cas de lésion, les cellules épithéliales ont des propriétés de plasticité leur permettant de migrer et de se redifférencier pour régénérer l'épithélium. Ces mécanismes sont régis rigoureusement et leurs déséquilibres dans certains cas pathologiques, tels que les maladies respiratoires chroniques inflammatoires comme la BPCO, l'asthme ou la mucoviscidose, entraînent la formation de zones de remaniements épithéliaux avec la présence de métaplasies malpighiennes et/ou d'hyperplasies de cellules basales ou sécrétoires (Basbaum et Jany, 1990).

1. Le contexte de lésions

a) Lésions d'origine non pathologiques

(1) Particules issues de la pollution

La pollution atmosphérique représente une source majeure de particules pouvant léser la muqueuse respiratoire. Les principales molécules pouvant nuire à l'épithélium sont l'ozone (O₃), les oxydes nitriques (NO) et les particules dérivées du diesel. Les études menées par Devalia et ses collaborateurs ont montré, dans un modèle de culture *in vitro*, que l'exposition des cellules épithéliales respiratoires à ces particules diminuait l'activité des battements ciliaires ainsi

qu'entraînait une augmentation des lésions membranaires et de la perméabilité cellulaire. D'autre part, cette exposition aux molécules, issues de la pollution, induit la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, le GM-CSF, le TNF- α et le leucotriène C4 (Devalia *et al.*, 1993).

(2) Les composants de la fumée de cigarette

La fumée de cigarette est formée d'un ensemble de plus de 6000 molécules chimiques parmi lesquelles peuvent être retrouvés des radicaux libres et d'autres agents oxydants tels que l'acétaldéhyde et l'acroléine (MacNee, 2000). Wang et collaborateurs ont montré, dans un modèle de culture *in vitro*, que certains extraits de la fumée de cigarette diminuaient les capacités de migration et de prolifération des cellules épithéliales bronchiques humaines. D'autre part, la fumée de cigarette détruit les jonctions cellulaires et provoque la perte de l'intégrité de l'épithélium respiratoire (Peteccchia *et al.*, 2009; Dye et Adler, 1994). Enfin, la fumée de cigarette induit des altérations histologiques de l'épithélium respiratoire au niveau de voies aériennes supérieures et inférieures entraînant la formation de métaplasies et d'hyperplasies de cellules sécrétoires (Dye et Adler, 1994 ; Haswell *et al.*, 2010). La présence de ces composés oxydatifs interfère avec les mécanismes de réparation épithéliale aggravant les lésions de l'épithélium respiratoire (H Wang *et al.*, 2001).

(3) Stress mécanique

Les interventions médicales peuvent être une source de lésion de l'épithélium respiratoire (Dohar et Stool, 1995). La ventilation par assistance médicale, l'intubation par insertion d'une sonde endotrachéale tout comme l'utilisation de la trachéotomie entraînent la desquamation plus ou moins totale de la lame basale (Mammel et Boros, 1987). L'utilisation de la ventilation mécanique pulmonaire impose des tensions qui distendent les tissus respiratoires. L'imposition cyclique de cette tension altère le processus de réparation de l'épithélium respiratoire en influant sur les mécanismes de migration cellulaire (Savla et Waters, 1998).

b) Lésions pathologiques

(1) Bactéries- Virus

Certains pathogènes sont capables d'altérer l'intégrité de la barrière épithéliale. Cette altération peut intervenir via une desquamation cellulaire ou par une détérioration des jonctions cellule-cellule ou cellule-matrice. Certains pathogènes viraux (rhinovirus) ou bactériens (*Bulkoderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*) dégradent les jonctions serrées (Sajjan *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2005; Coraux *et al.*, 2004) perméabilisant l'épithélium respiratoire et facilitant ainsi leur invasion tissulaire.

Les bactéries sont capables de produire des exotoxines pouvant inhiber les fonctions ciliées et léser l'épithélium (R Wilson, D Roberts, et P Cole 1985) ; (R Wilson et P J Cole 1988). Ces toxines altèrent le transport mucociliaire (Munro *et al.*, 1989) ainsi que les transports ioniques (Stutts *et al.*, 1986) et stimulent la sécrétion de mucus (Li *et al.*, 1997). Enfin, la présence de pathogènes bactériens induit la sécrétion de médiateurs inflammatoires responsables lors de la dégradation cellulaire (Cf. paragraphe inflammation chapitre IC).

(2) Inflammation

Dans le cas des pathologies respiratoires chroniques inflammatoires telles que la BPCO, la mucoviscidose ou l'asthme, l'inflammation devient un facteur délétère de l'épithélium des voies aériennes. Les nombreuses réactions inflammatoires impliquant l'afflux massif de cellules immunitaires, notamment de neutrophiles et d'éosinophiles, entraînent la libération de nombreuses protéases et cytokines (Cf. paragraphe inflammation chapitre IC).

(3) Prédisposition génétique

Certaines anomalies génétiques sont impliquées dans la formation des lésions de l'épithélium respiratoire. La mucoviscidose (chapitre développé dans la partie IC) se traduit par une altération de la clairance mucociliaire associée à une infection et une inflammation chroniques entraînant, à long terme, une détérioration progressive de l'épithélium respiratoire. La dyskinésie ciliaire primaire,

autre atteinte génétique empêchant la mobilité des cils, présente les mêmes complications (Chhin *et al.*, 2009).

2. Les mécanismes de réparation / régénération

Face à ces diverses lésions qui vont entraîner une desquamation partielle pouvant aller jusqu'à une dénudation totale de la membrane basale, des mécanismes de réparation / régénération se mettent en place afin de restaurer la barrière épithéliale. De nombreux modèles expérimentaux de lésion / réparation *in vivo* et *in vitro* ont été mis au point afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Ainsi, il a été montré, suite aux lésions, une succession d'événements cellulaires tels que l'étalement et la migration des cellules restées attachées à la lame basale ou bordant la zone lésée, suivis de leur prolifération et enfin de leur différenciation pour restaurer un épithélium pseudostratifié mucociliaire parfaitement fonctionnel (Figure 21).

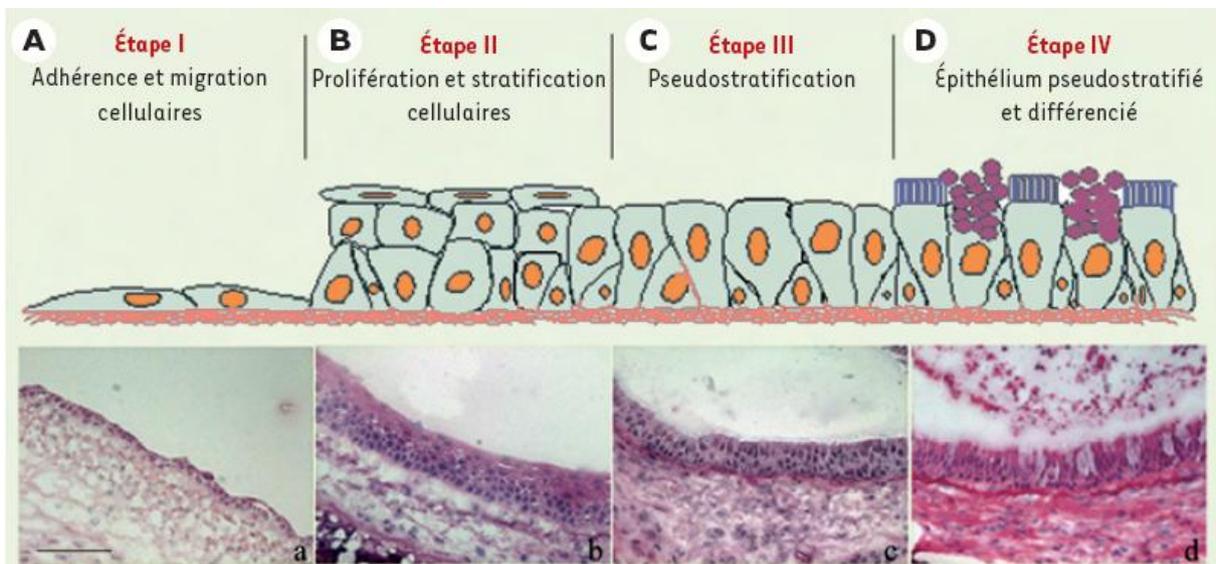


Figure 21 : Régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes dans le modèle de xénogreffe humanisée dans la souris nude.

(Coraux *et al.*, 2005. *J Pathol*; 206 : 160-9)

a) Mécanismes de régénération et de réparation épithéliale

(1) Les stades de réparation – régénération des épithélia

Face aux différents types d'agressions, l'épithélium respiratoire peut subir une desquamation plus ou moins importante. La reconstitution de l'architecture de l'épithélium respiratoire a pu être étudiée à l'aide de différents modèles de lésion / réparation *in vivo* et *in vitro*. Elle nécessite, dans un premier temps, l'étalement et la migration des cellules bordant la zone de lésion. Cette étape est suivie de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales aboutissant à un épithélium mucociliaire fonctionnel (Dupuit *et al.*, 2000; Coraux *et al.*, 2005).

Le premier stade du processus de réparation nécessite une dédifférenciation, suivi de l'étalement et la migration des cellules épithéliales bordant la zone de lésion (Erjefält *et al.*, 1995). Elle est réalisée par les cellules basales mais aussi par les cellules progénitrices. Les cellules migrent, recouvrant ainsi la membrane basale dénudée, et instaurent une protection (Erjefält *et al.*, 1997).

Lorsque la zone lésée est réépithélialisée, la majorité des cellules sont entrées en phase de prolifération et expriment les cytokératine 13, 14 et 18 (Dupuit *et al.*, 2000). Les cellules présentes forment, de manière transitoire, une structure épithéliale stratifiée composée de plusieurs couches de cellules cuboïdales couvertes d'une couche de cellules étalées morphologiquement squameuses.

La phase proliférative cellulaire diminue et les cellules épithéliales entrent dans une phase de différenciation provoquant le remaniement de la structure épithéliale squameuse. Deux grands mécanismes sont alors mis en jeu, d'une part une différenciation sécrétoire et d'autre part l'activation de la ciliogénèse. Les premières cellules ciliées apparaissent, l'épithélium n'est plus stratifié mais adopte un aspect architectural pseudostratifié avec des cellules ayant une morphologie cylindrique.

(2) La différenciation des cellules ciliées

La ciliogénèse est un processus de différenciation terminale de l'épithélium respiratoire nécessaire à l'acquisition de ses propriétés de défense par le transport mucociliaire. Ce mécanisme

permet de développer les structures centriolaires à l'origine de l'architecture des cils présents à la surface des cellules ciliées. Il a été montré que le facteur de transcription FOXJ1 est exprimé et est nécessaire dans le processus de différenciation des cellules ciliées. Son expression précède l'apparition des cils (Blatt *et al.*, 1999).

L'établissement de la polarité des cellules épithéliales est essentiel pour la ciliogénèse. Les corps basaux ciliaires migrent vers la surface de la cellule à l'aide du cytosquelette d'actine (Boisvieux-Ulrich *et al.*, 1990). Ce mécanisme implique l'ezrine et RhoA qui sont régulées par le facteur de transcription FOXJ1 (Huang *et al.*, 2003 ; Gomperts *et al.*, 2004). La formation des cils est dépendante des corps basaux dont l'origine proviendrait de la transformation des centrioles, un processus qui reste encore à expliquer (Hoyer-Fender, 2010).

De récentes études montrent la présence de cils primaires dans les cultures de cellules respiratoires murines et humaines. L'étude de l'évolution temporelle de ces cils indique que les cellules possédant ce facteur ont la capacité d'acquérir des cils motiles, ce qui suggère que le cil primaire serait à l'origine des cils mobiles présents dans la différenciation terminale des cellules ciliées. Leur absence dans l'épithélium respiratoire mature ainsi que leur apparition lors de lésions semblent les impliquer dans les processus de réparation et de différenciation épithéliale (Jain *et al.*, 2010).

b) Modèles de réparation / régénération in vivo

Plusieurs modèles d'étude *in vivo*, comprenant des modèles chez le lapin, le cochon d'Inde, le rat et la souris, ont été développés afin de reproduire les conditions de lésions pathologiques ou non, observables chez l'homme, et ainsi de comprendre les mécanismes impliqués dans la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire. L'apport d'un environnement dit *in vivo* permet d'étudier la régénération dans les conditions physiologiques et d'appréhender l'apport de l'inflammation et l'implication d'autres facteurs dans le processus de réparation épithéliale.

D'autre part, des modèles de xéno greffe de cellules respiratoires ont permis d'obtenir la régénération de l'épithélium dans les conditions physiologiques (Dupuit *et al.*, 2000). Le modèle expérimental le plus utilisé implique l'implantation sous-cutanée chez la souris d'une trachée de rat exempt de son épithélium, dans lequel sontensemencées les cellules épithéliales humaines issues de polypes nasaux ou de bronches humaines. Ce modèle expérimental dit « ouvert » permet d'analyser d'une part, les étapes successives de la régénération, et d'autre part, d'analyser les sécrétions

épithéliales et d'étudier la modulation de l'expression des molécules matricielles, des facteurs de croissance et des cytokines au cours de la régénération épithéliale (Zhang *et al.*, 1996). Il a pu être observé que les cellules épithéliales respiratoires, ensemencées dans ce modèle de xénogreffe, possèdent la capacité d'adhérer à la lame basale, de s'étaler et de migrer afin de recoloniser la matrice hôte, puis de proliférer et de se redifférencier pour former un épithélium de surface pseudostratifié mature (Escotte *et al.*, 2004).

L'expérimentation dans les souris SCID présente l'avantage de n'avoir aucune influence de l'inflammation et une tolérance des cellules humaines. Ce modèle a permis de montrer que des cellules indifférenciées de trachée fœtale humaine avaient la capacité de reformer un épithélium respiratoire mucociliaire mature et bien différencié (Delplanque *et al.*, 2000).

La xénogreffe bronchique dans la souris nude ne présentant pas de thymus et par conséquent ne possédant pas de lymphocytes T, permet d'analyser la régénération au cours du temps sans l'influence de ces cellules. Le développement de l'utilisation des souris nude a permis d'obtenir un épithélium respiratoire humain pseudostratifié mucociliaire et de suivre les différentes étapes de la régénération épithéliale dans les conditions proches de celles observées *in vivo* chez l'homme (Dupuit *et al.*, 2000).

c) Modèles de réparation / régénération in vitro

L'accessibilité cellulaire et l'observation des différents événements de la réparation épithéliale étant limitées dans les modèles d'étude *in vivo*, des modèles de lésions *in vitro* ont été mis au point. Les lésions chimiques ou mécaniques permettent de mimer la desquamation de l'épithélium bronchique puis, les étapes successives de la réparation sont analysées. Ces modèles permettent l'accès aux sécrétions des facteurs épithéliaux impliqués dans la régénération de l'épithélium respiratoire, mais permettent également de moduler l'environnement dans lequel se déroule ce processus.

Les modèles de lésions mécaniques (Zahm *et al.*, 1991) ou chimiques (Zahm *et al.*, 1997) ont permis d'observer les phénomènes impliqués lors de l'étalement et la migration des cellules après desquamation d'une partie de la couche monocellulaire de culture de cellules épithéliales bronchiques à confluence.

La mise au point du modèle de culture en interface air-liquide a permis d'obtenir la régénération d'un épithélium mucociliaire parfaitement différencié. Ce modèle de différenciation en deux dimensions consiste en une chambre bicompartimentale formée par un filtre poreux sur lequel sont ensemencées des cellules issues de la dissociation enzymatique de bronche ou de polypes nasaux. Les cellules sont cultivées initialement en condition liquide-liquide jusqu'à l'obtention de la confluence de la couche cellulaire. Les cellules sont alors mises en culture en condition air-liquide par suppression du milieu du compartiment apical. Cette condition air-liquide est primordiale pour la différenciation des cellules épithéliales respiratoires ainsi que l'obtention d'un épithélium mucociliaire fonctionnel (de Jong *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1996).

L'avantage de ce modèle de régénération réside dans la capacité de modulation de l'environnement de différenciation des cellules épithéliales respiratoires afin d'étudier l'effet de différents facteurs exogènes dans les mécanismes de la régénération.

Enfin, il existe également un modèle de différenciation des cellules épithéliales respiratoires en trois dimensions sous forme de sphéroïdes. Ce sont des structures sphériques épithéliales parfaitement différenciées et fonctionnelles obtenues à l'aide des cellules respiratoires dissociées. Ces sphéroïdes ont la capacité de maintenir leur différenciation à long terme (Castillon *et al.*, 2002).

3. Facteurs intervenant au cours de ces mécanismes de réparation/ régénération de l'épithélium bronchique

Quelle que soit la nature de la lésion, le processus de réparation est initié le plus rapidement possible. Ce mécanisme de régénération fait intervenir une réponse cellulaire, comme décrit dans le paragraphe précédent, mais également une réponse inflammatoire impliquant la sécrétion de cytokines, de protéases et le recrutement de cellules immunitaires. Suite à la formation de la lésion et de l'environnement inflammatoire qui en résulte, les cellules endothéliales, les macrophages, les fibroblastes ainsi que les cellules épithéliales lésées sécrètent des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, ainsi que de nombreuses enzymes impliquées dans le processus de régénération/ réparation épithéliale.

a) Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Ce sont des protéases à cystéines sécrétées par plusieurs types de cellules. Plus d'une vingtaine de MMPs sont connues, classées en trois catégories majeures : les collagénases, les gélatinases et les stromélysines. Ces protéases sont capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire. Elles sont fortement exprimées pendant les processus de réparation épithéliale et interviennent à différents niveaux.

Les cellules en cours de migration acquièrent des propriétés de cellules mésenchymateuses. Elles expriment les MMP-3 et 11 (Buisson *et al.*, 1996) ainsi que la vimentine, marqueur des cellules en transition épithélio-mésenchymateuse. Ce changement phénotypique cellulaire est caractérisé par une perte des jonctions serrées, une augmentation de l'expression des MMPs et des composants de la matrice extracellulaire (Davies, 2009). Les MMPs sont impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire favorisant le phénomène migratoire.

Les métalloprotéinases ne sont pas ou peu exprimées dans les tissus sains excepté la matrilysine (MMP-7) (Dunsmore *et al.*, 1998). Produite de manière constitutive, la MMP-7 n'a pas seulement une action sur la matrice extracellulaire mais également dans la défense de l'épithélium respiratoire en activant par clivage certains peptides de l'immunité telle que les défensines (Ganz 1999 ; Parks *et al.*, 2001). Il a pu être démontré que la MMP-7 augmentait la migration des cellules respiratoires (Parks *et al.*, 2001). Elle permet le clivage de l'ectodomaine de la cadhérine E impliqué dans la réparation des lésions épithéliales (McGuire *et al.*, 2003).

La gélatinase B (MMP-9) stimule également la migration cellulaire impliquée dans la réparation des lésions épithéliales respiratoires. Cependant, il a été démontré que les lésions provoquées par l'arsenic stimulent fortement la sécrétion de la MMP-9 et empêchent la réparation épithéliale (Olsen *et al.*, 2008), montrant qu'une fine régulation de cette enzyme est nécessaire dans les processus de réparation. Différents travaux réalisés chez les souris déficientes en MMP-9 ont montré que cette métalloprotéinase est impliquée dans les processus d'inflammation et dans le remodelage de l'épithélium des voies respiratoires. Elle est exprimée faiblement dans les tissus sains, mais est fortement stimulée par les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et régule la

migration des cellules épithéliales (C Legrand *et al.*, 1999) ainsi que la réparation de l'épithélium (Mohan *et al.*, 2002).

De récentes études ont montré que les MMP-7 et -9 ont une influence directe dans la différenciation des cellules épithéliales respiratoires. En effet, l'étude de leur expression dans le modèle de xénotransgreffe bronchique humanisée dans la souris nude a montré qu'elles étaient modulées au cours de la régénération de l'épithélium bronchique (Hajj *et al.*, 2007). La synthèse et la sécrétion de ces MMPs augmentent au cours des différentes étapes aboutissant à la régénération épithéliale. D'autre part, l'inhibition des MMP-7 et -9 entraîne le remodelage de l'épithélium, menant à un défaut de différenciation mucociliaire aboutissant à la génération de métaplasie malpighienne avec la présence de zones d'hyperplasie de cellules basales (Coraux *et al.*, 2005).

b) Les autres facteurs (cytokines, facteurs de croissance...)

Différents facteurs ont été décrits, modulant la migration et la prolifération cellulaire dans les mécanismes de réparation et de régénération épithéliale. Secrétés par les cellules du mésenchyme et les cellules affluant au niveau de la lésion, ils sont également produits par les cellules épithéliales.

L'EGF (Epidermal Growth Factor), via le récepteur EGFR, stimule et accélère la réparation épithéliale (Puddicombe *et al.*, 2000 ; Zahm *et al.*, 1993). En effet, l'EGF accélère la réparation des lésions épithéliales en modulant la migration cellulaire, un inhibiteur de la voie EGFR tyrosine kinase entraînant un blocage de la réépithélialisation (White *et al.*, 1999 ; Puddicombe *et al.*, 2000). De plus, Barrow *et al.*, ont suggéré que l'EGF et le PDGF (*platelet-derived growth factor*) favorisent la régénération de l'épithélium respiratoire, en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales respiratoires (Barrow *et al.*, 1993). L'HGF (*hepatocyte growth factor*), le KGF (*keratinocyte growth factor*) et les IL-1 α et β régulent la migration cellulaire, mais peuvent également avoir une action mitogénique (Zahm *et al.*, 2000 ; Waters et Savla, 1999 ; Hicks *et al.*, 2003).

Il a été montré que l'EGF avait la capacité de stimuler certains canaux potassiques, leur action combinée potentialisant la migration et la prolifération des cellules épithéliales respiratoires (Trinh *et al.*, 2008 ; Trinh *et al.*, 2007b). La famille des peptides de l'EGF et EGFR augmente en réponse aux lésions de l'épithélium respiratoire.

Des peptides trifoliés (TFF), en particulier TFF2 et TFF3, peuvent également, *via* la voie d'activation de la protéine kinase C et de ERK (*extracellular signal-related protein kinase*) 1/2, agir en synergie avec l'EGF dans la réparation de l'épithélium respiratoire et la différenciation des cellules ciliées (LeSimple *et al.*, 2007; Chwieralski *et al.*, 2004). Enfin, l'héréguline- α , en raison de sa liaison avec les récepteurs erbB2-4, favorise la réépithélialisation de lésion de l'épithélium respiratoire (Vermeer *et al.*, 2003).

Les facteurs de croissance comme l'insuline ou l'HGF interviennent en activant la synthèse de la matrice extracellulaire, comme l'IL-8 en stimulant l'expression des MMPs ou comme l'IL-13 en favorisant la sécrétion d'autres facteurs de croissance motogènes et mitogènes. L'augmentation de l'expression de ces facteurs de croissance par les cellules épithéliales respiratoires lésées faciliterait la réépithélialisation par un mécanisme de réparation autocrine. Les travaux de Shen *et al.*, suggèrent que l'HGF pourrait non seulement moduler la migration et la prolifération des cellules épithéliales respiratoires, mais également favoriser la différenciation ciliée probablement *via* une activation de son récepteur c-met (Shen *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'EGF, la toxine cholérique et l'IL-13 seraient des inhibiteurs de la différenciation ciliée tandis que l'EGF, comme l'IL-4, l'IL-9, l'IL-13 et l'élastase du neutrophile seraient de puissants inducteurs de la différenciation des cellules muco-sécrétrices (Clark *et al.*, 1995 ; Burgel et Nadel, 2004; Laoukili *et al.*, 2001). On sait également que les défensines du neutrophile, comme l'HNP1-3, peuvent moduler la régénération de l'épithélium respiratoire lésé, non seulement en modulant la migration et la prolifération cellulaire par la voie d'activation MAP-kinase/ERK1/2, mais également en induisant la différenciation des cellules à mucus (Aarbiou *et al.*, 2004).

Une récente étude montre que le TNF α et l'IL-1 β augmentent la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF- β 1 et dérèglent la réparation des lésions de l'épithélium respiratoire (Borthwick *et al.*, 2010). Enfin, il semblerait d'après Lazard *et al.*, que le TGF- β , par sa capacité à limiter la différenciation des cellules sécrétrices et ciliées, contribue au remodelage de l'épithélium respiratoire (Lazard *et al.*, 2009).

4. Remodelage de l'épithélium respiratoire

a) *Métaplasie de type squameux ou malpighien*

(1) Définition, description, localisation normale

L'épithélium malpighien ou de type squameux est un épithélium pavimenteux stratifié formé d'une assise de cellules basales en contact avec la lame basale. Les cellules se divisent et forment des couches de cellules polyédriques. La couche cellulaire superficielle présente des cellules plus aplaties. Les épithélia malpighiens ou squameux sont localisés au niveau de l'épiderme de la peau, du revêtement de la cavité buccale, de l'œsophage et du vagin. Dans les conditions physiologiques, l'épithélium malpighien est inexistant dans l'appareil respiratoire.

Les cellules engagées dans la voie de différenciation squameuse présentent des changements morphologiques avec une diminution du rapport nucléo-cytoplasmique dû à une augmentation de la taille cellulaire (Watt et H Green 1981). D'autre part, le nombre de jonctions de type desmosome augmente (Brezillon *et al.*, 1995). Les cellules squameuses expriment la transglutaminase I (Jetten et Shirley, 1986), l'involucrine (Tian *et al.*, 2006) et la p63 (Murata *et al.*, 2007). Le facteur $\Delta Np63$, exprimé dans les carcinomes, joue un rôle important dans le développement d'un phénotype épithélial de type squameux (Hibi *et al.*, 2000; Chilosi *et al.*, 2002). La régulation des filaments intermédiaires de cytokératine est complexe, les cytokératines 4, 13, 14 et 16 étant retrouvées dans les cellules squameuses respiratoires (Boisvieux-Ulrich *et al.*, 2000) (figure 22).

(2) Lésions à l'origine des remaniements épithéliaux squameux

Dans certaines conditions, l'épithélium de surface respiratoire est engagé dans une voie de différenciation squameuse. La métaplasie malpighienne peut être induite suite à une lésion et serait alors une réponse adaptative. Elle peut être également observée dans les cas de lésions précancéreuses des carcinomes épidermoïdes. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces métaplasies ne sont pas encore clairement connus.

Une lésion chimique ou mécanique, va induire au cours de la régénération, la formation de zones de métaplasies squameuses. Ce type de remaniement épithélial, retrouvé dans l'appareil respiratoire, semble faire partie des mécanismes de réparation rapide afin de restaurer l'étanchéité

de la barrière épithéliale (Jetten, 1991). Dans ce cas, la métaplasie squameuse est une structure transitoire et réversible qui, dans les conditions normales de réparation tissulaire évolue pour reconstituer un épithélium mucociliaire bien différencié (Puchelle *et al.*, 2006).

Ces remaniements squameux peuvent être aussi observés dans le cas d'une carence en acide rétinoïque. En effet, l'absence de vitamine A chez la souris entraîne une hyperplasie cellulaire suivie de la formation d'une métaplasie malpighienne de l'épithélium bronchique (Kaartinen *et al.*, 1993). Un traitement par la vitamine A permet de reverser ce processus (Jetten *et al.*, 1990). Les dérivés de la vitamine A sont fortement impliqués dans la maintenance du phénotype mucociliaire de l'épithélium respiratoire (Jetten, 1991), en agissant via les récepteurs nucléaires RAR (Retinoic acid receptor) et les RXR (Retinoic X receptor) (Chambon, 1996).

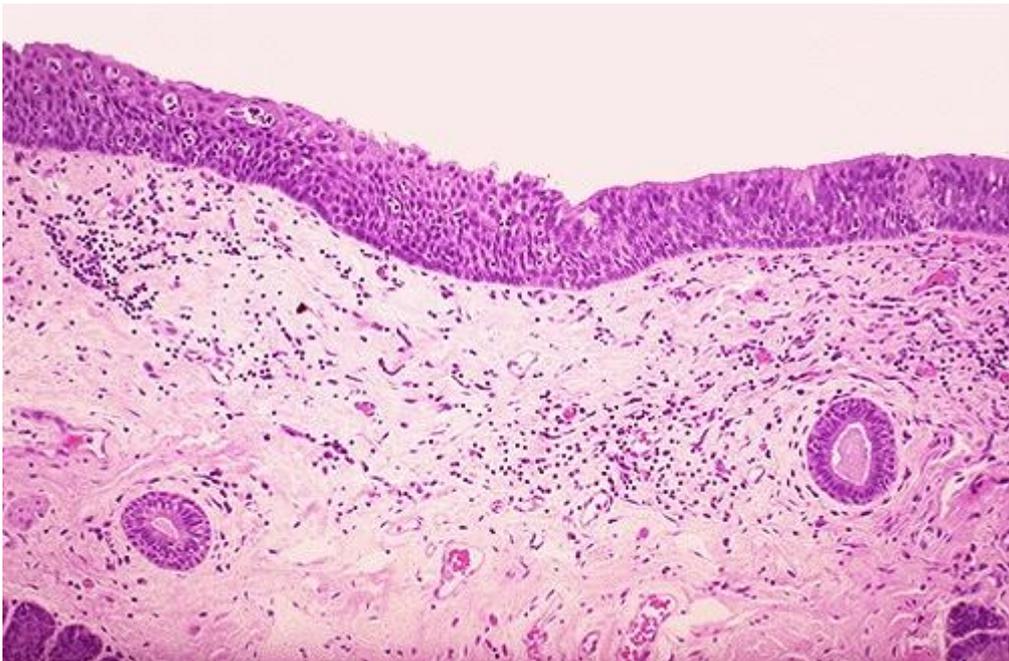


Figure 22 : Métaplasie malpighienne observée dans les voies respiratoires

(credit : www.sciencesway.com)

Le changement de la composition cellulaire et de l'organisation architecturale de l'épithélium respiratoire a été observé dans de nombreuses pathologies respiratoires chroniques inflammatoires telles que la BPCO (Randell, 2006) ou la mucoviscidose. L'installation de la chronicité de la maladie,

ainsi que le développement et la persistance de l'inflammation semblent être des facteurs déterminant dans la formation des métaplasies squameuses.

L'exposition de la muqueuse respiratoire à la fumée de cigarette est impliquée dans la formation des métaplasies squameuses. En effet, différentes études ont démontré qu'en présence des composants de la fumée de cigarette, un profond remaniement histologique intervient au sein de l'épithélium respiratoire. L'analyse de ces changements, réalisée chez le rat, indique la présence de nombreuses zones de métaplasies squameuses (von Meyerinck *et al.*, 1989). La formation de métaplasies squameuses entraîne un dysfonctionnement de la clairance mucociliaire et contribue, dans le cas de la BPCO, à l'augmentation du risque de développement de cancers épidermoïdes (Papi *et al.*, 2004).

Cependant en cas de lésions chroniques, comme cela a été étudié chez le chien par l'utilisation d'une sonde d'intubation trachéale pendant 14 jours, il a été montré l'induction d'une différenciation épithéliale squameuse (Severson *et al.*, 1982). Ainsi, les lésions répétées telles que l'exposition de la muqueuse respiratoire à la fumée de cigarette, un état inflammatoire persistant ou encore le retard de différenciation et de maturation de l'épithélium respiratoire entraineraient la formation de métaplasies squameuses irréversibles (Bolton *et al.*, 2009).

(3) Mécanismes impliqués dans la différenciation squameuse

La métaplasie squameuse est liée à par une hyperprolifération cellulaire (Lee *et al.*, 2001) suivie d'une différenciation permettant d'acquérir le phénotype squameux caractérisé par une stratification de couches cellulaires. Ce processus est un des premiers mécanismes de réparation intervenant suite à une lésion de l'épithélium respiratoire.

Ce mécanisme est associé à un état inflammatoire induisant la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance. Par exemple, il a été montré que les cellules squameuses expriment l'IL1- β activant le TGF- β qui amplifierait l'interaction épithélio-mésenchymateuse pathologique dans la BPCO (Macnee, 2007), et jouerait un rôle clé dans la différenciation squameuse.

Récemment, certains auteurs semblent établir un lien entre la prolifération cellulaire, la formation d'hyperplasie de cellules basales et le développement de métaplasies malpighiennes respiratoires. Rock *et al.*, dans leur revue de 2010, suggèrent un lien entre la prolifération des cellules basales et la différenciation squameuse (Rock *et al.*, 2010). D'autre part, une étude récente

de notre laboratoire a montré que le récepteur nicotinique $\alpha 7$ à l'acétylcholine ($\alpha 7$ nAChR) jouait un rôle majeur dans la prolifération des cellules basales ainsi que dans la différenciation épithéliale et serait impliqué dans le remodelage de l'épithélium respiratoire dans la BPCO (Maouche *et al.*, 2009). Une analyse de ces données par Roman et Koval suggère même que l'activité du récepteur $\alpha 7$ nAChR serait un facteur limitant la prolifération des cellules basales (Roman et Koval, 2009).

b) Hyperplasie sécrétoire

Les zones de métaplasies squameuses sont souvent localisées à proximité de zones d'hyperplasies de cellules caliciformes avec la présence d'une couche basale continue de cellules exprimant la p63 (Randell, 2006).

(1) Définition

Dénotées hyperplasie de cellules sécrétoires (Aikawa *et al.*, 1992), ces zones épithéliales remaniées sont caractérisées par une augmentation du ratio cellules sécrétoires par rapport aux cellules ciliées. Elles sont le siège d'une synthèse et d'une sécrétion accrues de mucus entraînant un défaut de la clairance mucociliaire (Rose, 2001) (Figure 23).

Le phénotype muco-sécrétant de l'épithélium respiratoire est sous la dépendance de l'environnement des voies aériennes. En effet, les cellules épithéliales augmentent la production de mucus ainsi que d'autres molécules en réponse aux agressions externes d'agents infectieux, de particules ou de polluants et d'allergènes, menant ainsi à l'altération des fonctions de l'épithélium mucociliaire.

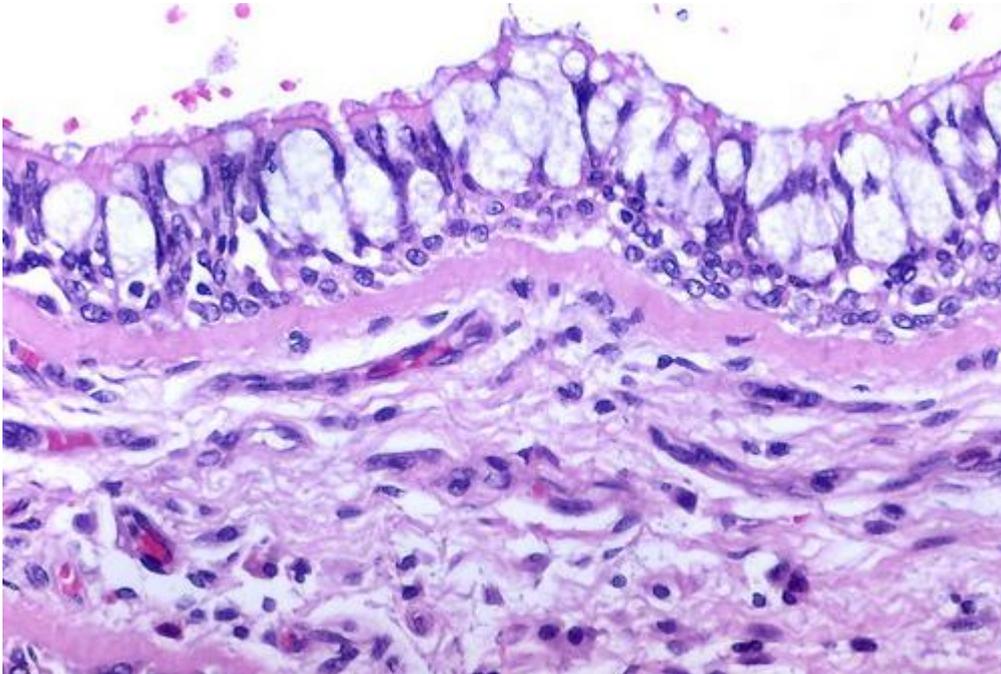


Figure 23 : Hyperplasie de cellules sécrétoires observée dans les voies respiratoires

(Credit : [Pulmonary Pathology Yale Rosen FLickr](#))

(2) Hyperplasie des cellules sécrétoires dans les maladies chroniques respiratoires

Dans les maladies respiratoires chroniques inflammatoires, une forte augmentation du nombre de cellules sécrétoires est observable. Des modèles *in vivo* ont été mis au point afin d'étudier l'influence de différents paramètres observés dans ces pathologies. Ainsi, l'hypersecretion de mucus a pu être reproduite chez le rat par exposition à l'ozone. Afin d'étudier le développement de l'asthme sévère, des modèles murins ont été mis au point en exposant les animaux de manière chronique à des antigènes. L'hyperplasie de cellules sécrétoires est une des caractéristiques des patients qui meurent suite à une exacerbation aiguë dans le cadre d'un asthme sévère (Aikawa *et al.*, 1992). Enfin, l'exposition de rats aux gaz SO₂ et à la fumée de cigarette reproduit les effets observés chez l'Homme (Lamb et Reid, 1969 ; Lamb et Reid, 1968).

Les gènes MUC sont stimulés dans le cas d'une inflammation ou par la présence de pathogènes infectieux (Rose et Voynow, 2006). L'environnement inflammatoire formé par les cytokines et les lipides pathogènes des bactéries Gram négatifs et positifs induit l'activation de la voie MAPK via la protéine Ras et les facteurs de transcription NFκB, AP1 ou SP1 régulant les gènes MUC2 et MUC5AC des voies respiratoires.

(3) Molécules impliquées dans la formation de l'hyperplasie de cellules sécrétoires

L'EGF est impliqué dans la production de mucus et dans les hyperplasies sécrétoires. La formation des hyperplasies sécrétoires chez les patients atteints de BPCO, implique la dérégulation de l'EGFR par la présence d'oxydants, provenant de la fumée de cigarette, et par la sécrétion de nombreuses cytokines comme le TNF-α, le CXCL8/IL-8 et l'IL-13 (Takeyama *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 2001).

L'interleukine 13, une cytokine induite par les lymphocytes T Helper 2, augmente le nombre de cellules caliciformes. Ce phénomène a été, d'une part montré dans un modèle murin modélisant l'asthme d'origine allergique (Grünig *et al.*, 1998) et d'autre part, dans un modèle *in vitro* de reconstitution de l'épithélium respiratoire humain (Atherton *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que l'IL-13 induisait l'augmentation de l'expression de la mucine MUC5AC (Wills-Karp *et al.*, 1998 ; Atherton *et al.*, 2003). En outre, l'IL-13 inhibe la différenciation des cellules ciliées, et elle altère la morphologie des cellules en créant des espaces intercellulaires larges et des interdigitations membranaires. Cette cytokine diminue la fréquence des battements ciliaires, ce qui permet de corréler les observations réalisées *in vivo* entre la présence d'hyperplasie sécrétoire et les obstructions bronchiques (Laoukili *et al.*, 2001). Cette action est également observable pour l'IL-4, cytokine qui possède le même récepteur que l'IL-13.

C. La mucoviscidose

1. Un peu d'histoire

La mucoviscidose (ou Cystic Fibrosis ou CF) est la plus fréquente des maladies génétiques, transmise selon le mode autosomal récessif dans les populations européennes et nord-américaines d'origine caucasienne. Cette maladie touche en France environ 1 enfant sur 2500 à la naissance.

C'est en 1938 que la mucoviscidose fut reconnue comme pathologie à part entière par le Dr Andersen, d'après les observations et les descriptions anatomo-pathologiques faites au cours des autopsies de jeunes enfants. Cette maladie, nommée alors « fibrose kystique du pancréas », a été caractérisée par une mauvaise réabsorption des graisses et des protéines, avec de nombreuses stéatorrhées, un retard de croissance et des infections pulmonaires, corrélés avec un défaut de sécrétion en enzyme pancréatique. Une relation entre les stéatorrhées, la fibrose kystique du pancréas et les infections pulmonaires fut établie (Andersen, 1938).

Sous le terme « *mucoviscidosis* » donné en 1944 par le Dr Farber, la maladie fut caractérisée par la présence d'un mucus abondant et anormalement épais au sein des canaux glandulaires (Farber *et al.*, 1943). En 1946, Andersen et Hodges analysèrent le cas de 103 enfants atteints de la mucoviscidose et en conclurent que cette pathologie avait une incidence génétique et se transmettait de manière autosomale récessive (Andersen et Hodges, 1946).

En 1953, Di Sant'Agnese montra que chez les patients CF pouvait être détecté dans la sueur excrétée un taux de chlorure de sodium (NaCl) cinq fois plus important que chez les sujets sains, observation qui plus tard donnera un outil diagnostique important de la mucoviscidose par le test de la sueur (Di Sant'Agnese *et al.*, 1953). En 1983, Quinton *et al.*, utilisèrent des modèles de canaux glandulaires et mirent en évidence un défaut du transport de chlore (Quinton et Bijman, 1983). Parallèlement, Knowles en 1983 et Boucher en 1986 démontrèrent une forte absorption de sodium comme étant caractéristique des voies aériennes des patients atteints de la mucoviscidose (Knowles *et al.*, 1983; Boucher *et al.*, 1986). Enfin, en 1989, l'équipe de Riordan, Kerem et Rommens a montré qu'un seul gène serait impliqué dans la pathologie CF, le gène CFTR pour *Cystic Fibrosis Transmembrane Channel*, codant pour un canal chlore et présent dans tous les organes pourvus d'un épithélium sécrétoire (Kerem *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989). L'atteinte pulmonaire liée

à la mutation de CFTR est responsable à plus de 90 % de la mortalité et la morbidité de cette maladie.

2. CFTR

a) *Structure du gène et de la protéine CFTR*

Caractérisé grâce au système de clonage positionnel de Tsui et Collins, le gène *cftr* a été localisé sur le bras long du chromosome 7, en position 7q31. C'est un gène de 250 kilobases (kb) comprenant 27 exons (Rommens *et al.*, 1989). Il est transcrit en ARNm de 6.5 kb codant pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés, avec un poids moléculaire de 180 kDa. L'analyse de la séquence en acides aminés a permis d'apparenter CFTR à la famille des ABC transporteurs (ATP-Binding Cassette) (Higgins, 1992). Le canal CFTR est le seul transporteur ABC sélectif pour les ions Cl⁻ et dont l'activité est régulée par l'AMPc.

Ce canal est formé de deux motifs asymétriques MSD 1 et MSD 2 (Membrane Spanning Domain), composés chacun de six domaines transmembranaires TM 1 à TM 6 et un domaine de liaison à l'ATP (Nucleotide Binding Fold ou NBF). Ces deux structures sont liées entre elles par un domaine cytoplasmique régulateur appelé R, riche en sites de phosphorylation pour les protéines kinase PKA et PKC ATP dépendante (Hanrahan et Wioland, 2004). Le domaine R correspond aux résidus 590 à 831 codés par l'exon 13. Il est très spécifique du canal CFTR puisqu'il n'est pas retrouvé dans la structure des autres protéines de la famille ABC. La phosphorylation du domaine R par les protéines kinases est nécessaire à l'ouverture du canal par le MgATP (Berger et Welsh, 1991). En effet, l'état non phosphorylé du domaine R permet de maintenir le canal fermé (Riordan *et al.*, 1989 ; Cotten et Welsh, 1997) (Figure 24).

Le canal CFTR a une perméabilité plus importante aux anions qu'aux cations, avec une sélectivité préférentielle aux ions chlorures qu'aux ions iodures et fluorures ce qui distingue CFTR des autres canaux chlorures plus perméables aux ions Cl⁻ chlorures (ex : canal *ORCC*) (Anderson *et al.*, 1991).

L'activation du canal CFTR nécessite la phosphorylation par les PKA et PKC des résidus sérine situés dans le domaine R. Lorsque la protéine est phosphorylée, l'ouverture du canal est sous la dépendance de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP cytosolique et de magnésium, étape limitant l'ouverture et la fermeture du canal. Ainsi, la molécule d'ATP vient se fixer au site 1 formé par les motifs LSGGQ de NBD 2 et les motifs Walker 1 et 2 de NBD 1 puis l'hydrolyse a lieu dans le site 2 formé des motifs Walker 1 et 2 de NBD 2 et du motif LSGGQ de NBD 1. L'interaction au site 1 permet d'activer le canal et l'hydrolyse au site 2 enclenche la dimérisation des deux domaines NBD et le changement conformationnel des domaines MSD 1 et 2 entraînant le flux d'ions Cl⁻ (Vergani *et al.*, 2005).

c) Mutations de la protéine CFTR

Plus de 1700 mutations du gène *cftr* ont été décrites et répertoriées à ce jour (1798 le 05/09/2010 <http://www.genet.sickkids.on.ca/ctue/cftr/StatisticsPage.html>). Les mutations peuvent être réparties en 6 classes selon les prédictions des mécanismes moléculaires et des conséquences fonctionnelles sur la protéine CFTR (Figure 25).

La classe I affecte la synthèse de la protéine CFTR aboutissant à l'absence totale ou partielle du canal chlore au pôle apical des cellules épithéliales. Dans le premier cas, l'ARNm produit est instable par mutation au niveau d'un site d'épissage ou encore par des mutations non sens, par un décalage du cadre de lecture ou par mutation faux sens. Dans le deuxième cas, la protéine produite est tronquée, instable et rapidement dégradée.

La classe II correspond à un défaut de maturation cellulaire de la protéine. Cette anomalie dans la biosynthèse du canal CFTR altère le processus de glycosylation nécessaire à l'adressage de la protéine à la membrane plasmique apicale. La protéine s'accumule au sein du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi où elle est progressivement dégradée.

Le type de mutation de classe II est la plus fréquente. La mutation $\Delta F508$ est retrouvée à plus de 70 % chez les patients atteints de la mucoviscidose. Elle intervient dans l'exon 10 du gène *cftr*, dans le domaine NDB 1 où une délétion de trois bases entraîne la perte d'un résidu phénylalanine en position 508 indispensable au repliement correct de la protéine (Qu *et al.*, 1997).

La mutation de classe III altère la régulation de la protéine CFTR. Le canal CFTR est régulé par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation, permettant l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'ouverture et au passage d'ions chlorure. Dans le cas d'une mutation de classe III, la protéine est correctement synthétisée et parfaitement localisée au pôle apical de la cellule épithéliale. Cependant elle est résistante à la phosphorylation ou à la fixation de l'ATP ce qui empêche toute ouverture et passage de chlore. C'est le cas, par exemple de la mutation G551D, troisième cas de mutation la plus répandue dans le monde (Kerem, 2006). La mutation est localisée au niveau de NBD 1 et interfère avec l'hydrolyse de l'ATP.

Les mutations des classes I, II et III sont à l'origine des atteintes délétères les plus sévères car elles aboutissent toutes les trois à une absence d'activité de canal chlore de CFTR à la membrane plasmique.

La mutation de classe IV affecte la conductance et les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR. Elle n'altère pas la phosphorylation ni la fixation de l'ATP (Sheppard *et al.*, 1993).

La mutation de classe V affecte la stabilité de l'ARNm. Cette classe inclut des mutations dans le promoteur et des mutations qui modifient l'épissage alternatif ou provoquent une synthèse inefficace de la protéine. La réduction de la biosynthèse peut être due à un défaut d'épissage (ex : 3849 + 10 kb C → T (Highsmith *et al.*, 1994), par mutation du promoteur ou par un trafic défectueux (A455E) (De Braekeleer *et al.*, 1997). Elle mène à la diminution de l'expression de la protéine CFTR fonctionnelle à la membrane apicale.

Les mutations de classe IV et V ont un effet modéré sur la physiologie du patient CF.

La classe VI altère la stabilité de la protéine. La partie tronquée du côté C-terminal de CFTR altère la stabilité du canal chlore et entraîne rapidement sa dégradation (Haardt *et al.*, 1999).

courtesy of Dr. Rick Hallick

Molecular consequences of CFTR mutations

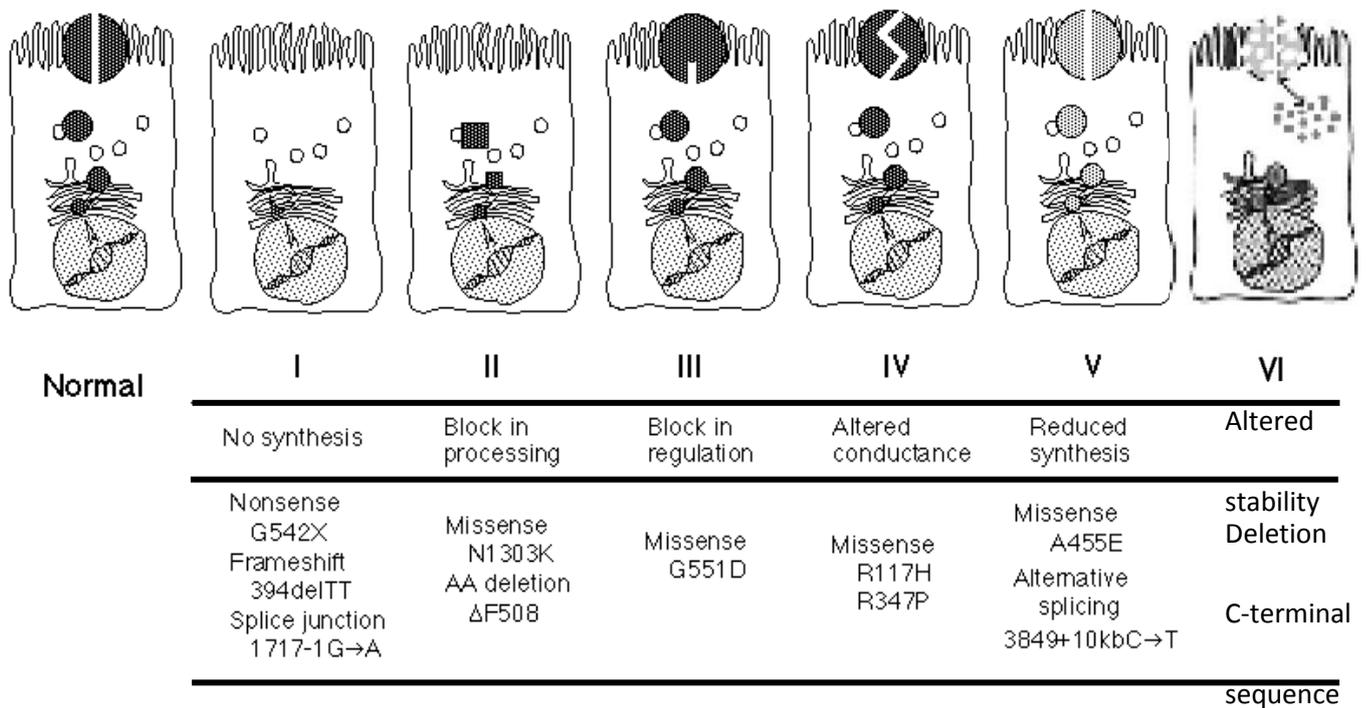


Figure 25 : Les différentes classes de mutations du gène CFTR (adapté de Wilschanski et al., *Gut* 2007;56:1153-1163)

3. Physiopathologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose conduit à un changement pathologique de l'ensemble des organes exprimant la protéine CFTR, ce qui inclut non seulement les voies respiratoires, mais également tous les organes possédant un épithélium exprimant la protéine CFTR tels que l'intestin, le pancréas, le foie et les conduits de l'appareil reproducteur.

Les modifications les plus radicales sont retrouvées au niveau pulmonaire, dans lequel le défaut de sécrétion de chlore, conséquence de la mutation du gène *cftr*, entraîne des modifications des échanges ioniques affectant la viscosité du mucus ainsi que la clairance mucociliaire. La résultante de cette affection consiste en des infections pulmonaires chroniques et en un « état d'inflammation auto-entretenu ».

a) *Modification de la clairance mucociliaire*

Les anomalies du liquide de surface bronchique représentent la cause majeure de l'atteinte pulmonaire des patients atteints de la mucoviscidose. L'absence d'un canal CFTR fonctionnel, au niveau apical des cellules épithéliales, entraîne des altérations de la composition ionique du liquide de surface. La conséquence directe est la modification des propriétés physiologiques de la clairance mucociliaire. Deux théories existent, expliquant la modification de la clairance mucociliaire, proposant ainsi deux modèles de transports transépithéliaux : le modèle hypotonique et le modèle isotonique (Figure 26).

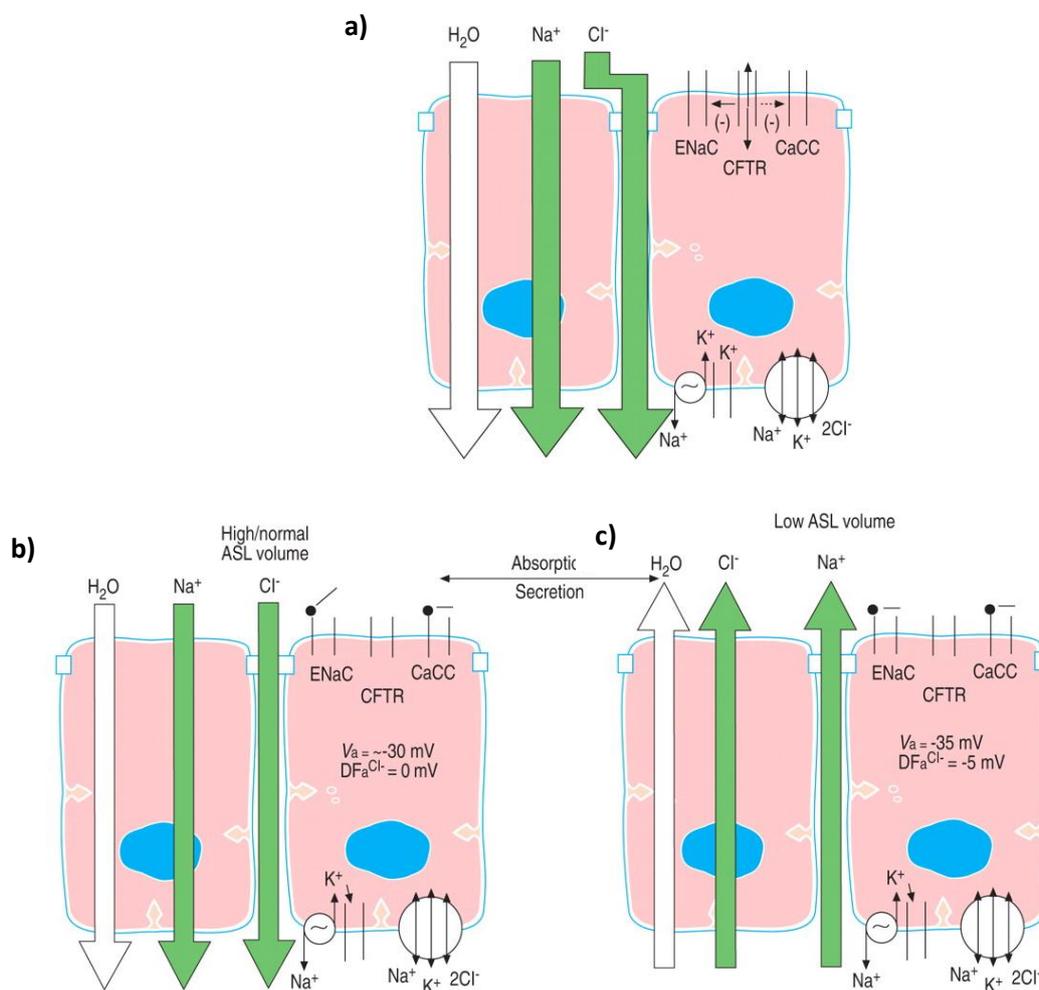


Figure 26 : Régulation du volume de la couche de liquide péri-ciliaire par le transport d'ions

a) Modèle de transports ioniques et d'eau de l'épithélium respiratoire normal

b) Modèle hypotonique : lorsque le liquide de surface respiratoire est présent en grande quantité, l'absorption de Na⁺ via ENaC domine. Le Cl⁻ est alors absorbé passivement via la voie paracellulaire

c) Modèle isotonique : le volume du liquide de surface respiratoire est faible et possède un taux de sels équivalent à celui du plasma, ENaC est inhibé par CFTR.

(Boucher *et al.*, Eur Respir J. 2004)

(1) Modèle isotonique (low salt model)

Ce modèle de transport considère que l'épithélium des voies respiratoires est perméable à l'eau. Dans le cas physiologique, l'épithélium de surface est de type absorbant favorisant une entrée de sodium et sa sortie par la pompe Na/K basolatérale. Ce passage d'ions sodiques entraîne l'absorption passive d'ions chlore par la voie paracellulaire sous l'effet de la différence de potentiel transépithélial générée par l'absorption active de sodium. Il y a donc une absorption nette de sels et d'eau.

Cependant, dans certains cas et notamment lorsqu'il y a une stimulation par la forskoline, l'isoprotérénol, l'ATP, ou encore des dérivés de l'acide arachidonique, il y a une forte augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPC, de calcium ou encore une activation de la PKC. Cette stimulation entraîne une sécrétion active de chlore qui s'oppose à l'absorption de sels et d'eau et tend à leur sécrétion. Le chlore entre dans la cellule par le côté basolatéral via la pompe Na/K/Cl et ressort par le côté apical à l'aide de différents canaux chlore.

Dans le cas des patients atteints de la mucoviscidose, l'absence de la protéine CFTR entraîne une hyper-absorption de sodium et un défaut de sécrétion de chlore se traduisant par une forte absorption de sels et donc d'eau.

L'absence du canal CFTR lève le contrôle négatif qu'exerce ce dernier sur les canaux sodiques et augmente l'activité des canaux Na⁺ sensibles à l'amiloride. Cette absorption massive de Na⁺ et donc de molécules d'eau mène à la déshydratation du mucus, et a pour conséquence une altération de ses propriétés rhéologiques et finalement une altération du mécanisme de la clairance mucociliaire (Zahm *et al.*, 1997).

(2) Modèle hypotonique (High salt model)

Contrairement au modèle isotonique, dans le modèle hypotonique, l'épithélium de surface bronchique est considéré comme imperméable à l'eau. Le transport de sodium est similaire au modèle précédent. À l'inverse, les ions Cl⁻ ne sont plus transportés par la voie paracellulaire mais *via* des canaux chlores (CFTR) et autres canaux sous sa régulation). De ce fait, il y a une absorption de chlorure de sodium non accompagné d'une entrée d'eau, ce qui rend le liquide de surface hypotonique.

Dans le cas de la mucoviscidose, il n'y a plus d'entrée d'ions Cl⁻. L'absorption de sels est inhibée car le sodium ne peut plus entrer, n'étant pas accompagné d'un anion lors de son mouvement transépithélial. Les concentrations de sodium et de chlore augmentent dans le liquide de surface bronchique. Ce nouvel environnement ionique est défavorable à l'activité de nombreuses molécules impliquées dans la défense innée des cellules épithéliales respiratoires et notamment des défensines, qui agissent de manière synergique avec d'autres protéines antimicrobiennes telles que le lysozyme ou la transferrine. Une inhibition de l'activité antimicrobienne des défensines par de fortes concentrations salines est vraisemblablement impliquée dans la survenue des surinfections bactériennes observées chez ces patients. En effet, les défensines sont chargées positivement, elles sont sensibles à la concentration de NaCl. La concentration élevée de NaCl dans les voies aériennes inhibe l'activité antibactérienne des défensines.

Modèle isotonique ou hypotonique ? La théorie défendue actuellement est surtout le modèle de transport isotonique qui semble l'hypothèse la plus probable (Boucher, 2004).

b) Infection

Le défaut de mécanisme d'épuration mucociliaire, associé à une inefficacité du système immunitaire inné, et une production continue de mucus par les glandes et les cellules sécrétoires mènent à une accumulation de plaques de mucus au niveau de la lumière des voies respiratoires, formant ainsi de véritables niches infectieuses.

La mucoviscidose est caractérisée par une colonisation par différents types de bactéries qui apparaissent selon une cinétique bien définie marquant les étapes décisives de la maladie. Les premières infections bactériennes surviennent, dans la majorité des cas, dès les premières années de vie et évoluent progressivement vers une infection chronique symptomatique (Pin *et al.*, 2001). Bien que de nombreuses souches bactériennes soient présentes, les principales infections bactériennes retrouvées chez les patients CF sont causées par *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*.

Les premières infections sont dues à *Haemophilus influenzae* puis *Staphylococcus aureus*. *H. influenzae* est retrouvé de manière précoce 20 % des enfants de moins de 1 an sont infectés avec un

pic de prévalence entre 2 et 5 ans, puis une diminution est observée de l'ordre de 10 % chez les patients adultes touchés.

S. aureus est une bactérie communément retrouvée dans les voies respiratoires supérieures. La présence de *S. aureus* dans les voies aériennes inférieures est représentative de la mucoviscidose mais pas du degré d'évolution de la maladie. *S. aureus* est reconnu comme responsable d'infections broncho-pulmonaires chez les patients les plus jeunes (Döring, 1997) et représentait avant l'avènement de l'ère de l'antibiothérapie, la première cause de mortalité. Sa colonisation débute par les voies aériennes supérieures puis la bactérie pénètre dans le tractus bronchique. L'anomalie et la diminution du mécanisme de la clairance mucociliaire favorise sa stagnation entraînant son adhésion, facilitée par les composants de sa paroi, tels que l'acide téichoïque et le slime, à la fibronectine des cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire. Ce processus d'adhésion est également renforcé par la présence de récepteurs bactériens comme l'asialoganglioside-1 dont la quantité est fortement augmentée chez les patients CF. Parallèlement, la survenue d'infection virale dénude les membranes basales et facilite l'infection par *S. aureus* (Armstrong *et al.*, 1997; Hiatt *et al.*, 1999). *S. aureus* sécrète des facteurs de virulence et notamment la hyaluronidase et l' α -hémolysine qui participent à la dégradation des tissus et favorisent l'implantation de *Pseudomonas aeruginosa* (Stutman *et al.*, 2002; Govan et Nelson, 1992). Malgré les antibiothérapies, l'infection à *S. aureus* persiste et elle devient chronique par la présence de colonies « naines » (ou Small colony variants = SVCs) (Kahl *et al.*, 2003) et par le développement des bactéries nosocomiales résistantes à la méthicilline, un antibiotique de la classe des β -lactamine généralement efficace contre *S. aureus*.

P. aeruginosa est un bacille pyocyanique hydrophile ubiquitaire principalement d'origine aérienne, provenant de l'environnement domestique humide. Il n'est jamais retrouvé à l'état commensal dans les voies respiratoires. Sa colonisation marque un tournant péjoratif dans l'évolution de la maladie.

L'infection à *P. aeruginosa* survient généralement vers l'âge de dix ans mais dans certains cas de manière plus précoce. En effet, la primo-infection intervient en moyenne entre 8 et 10 ans, même si parfois *P. aeruginosa* peut être retrouvé dès les premiers mois de vie. L'origine de la contamination est mal connue (Saiman et Siegel, 2004).

Le défaut de clairance mucociliaire entraînant la formation d'un mucus épais, *P. aeruginosa* pénètre dans ce mucus (Lamblin *et al.*, 2000). L'environnement visqueux et hypoxique entraîne un

INTRODUCTION

ralentissement de la croissance de *P. aeruginosa*. Face à ce changement environnemental entraînant un stress nutritionnel et hypoxique, seules les bactéries résistantes à ces conditions sont sélectionnées. Grâce au *quorum-sensing* (comportement de population) (Pesci et Iglewski, 1997), *P. aeruginosa* s'organise en structure complexe permettant son évolution d'une simple micro-colonie à des macro-colonies, dans un environnement protecteur formé d'un biofilm parfaitement structuré. En effet, *P. aeruginosa* sécrète un exopolysaccharide, l'alginate qui va former un biofilm donnant ainsi l'aspect caractéristique de la colonisation de *P. aeruginosa*. Ce changement phénotypique de la souche de *P. aeruginosa*, devenue de type mucoïde, va entretenir le foyer infectieux. Les bactéries sont ainsi protégées de la clairance mucociliaire mais également de toute réponse immunitaire et de tout traitement par antibiothérapie. D'autre part, ces structures mucoïdes sont hautement pro-inflammatoires (Figure 27).

La formation du biofilm dépend du mécanisme de *quorum sensing*. *P. aeruginosa* produit diverses molécules telles que la lactone acyl homo sérine. Ces molécules peuvent diffuser à travers la membrane bactérienne permettant la communication inter-bactérienne. Lorsque les bactéries atteignent une masse critique, les molécules du *quorum sensing* induisent des gènes impliqués dans la production du biofilm. Ce phénomène d'englobement permet d'installer une infection chronique, puisque les bactéries sont dorénavant protégées par cette matrice d'alginate de toute phagocytose et autre influence d'antibiotiques (Davies et Bilton, 2009).

L'infection par *P. aeruginosa* reste une étape inéluctable dans l'évolution de la maladie. En effet, plus de 95 % des patients atteints de mucoviscidose à un stade avancé présentent une contamination par *P. aeruginosa*.

Burkholderia cepacia, nommé initialement *Pseudomonas cepacia*, a été à l'origine de sévères infections durant les années 80 avec une morbidité et une mortalité conséquentes. Il présente une multirésistance aux antibiotiques et aux cellules phagocytaires. Cette bactérie est capable d'infecter les cellules épithéliales respiratoires et les cellules immunitaires (Sajjan *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 1999; Lamothe *et al.*, 2007). Il sécrète des protéases et possède des lipopolysaccharides hautement inflammatoires (McClean et Callaghan, 2009), provoquant des réponses immunitaires exagérées et une résistance aux antibiotiques, en particulier aux aminoglycosides et aux polymyxines (Moore et Hancock, 1986). Une des caractéristiques de *B. cepacia* est sa capacité à produire un biofilm, tout comme *P. aeruginosa* lui permettant de s'affranchir du système immunitaire (Conway *et al.*, 2002). Cette résistance peut également s'expliquer par son génome caractérisé par sa complexité et sa variabilité (Lessie *et al.*, 1996). L'infection à *B. cepacia* indique un pronostic négatif dans la

INTRODUCTION

mucoviscidose. Elle entraîne, dans la plupart des cas, un déclin de la fonction respiratoire et, dans une minorité des cas, le «syndrome cepacia» avec une atteinte infectieuse systémique menant à un choc endotoxique causant très souvent le décès du malade (Tablan *et al.*, 1987).

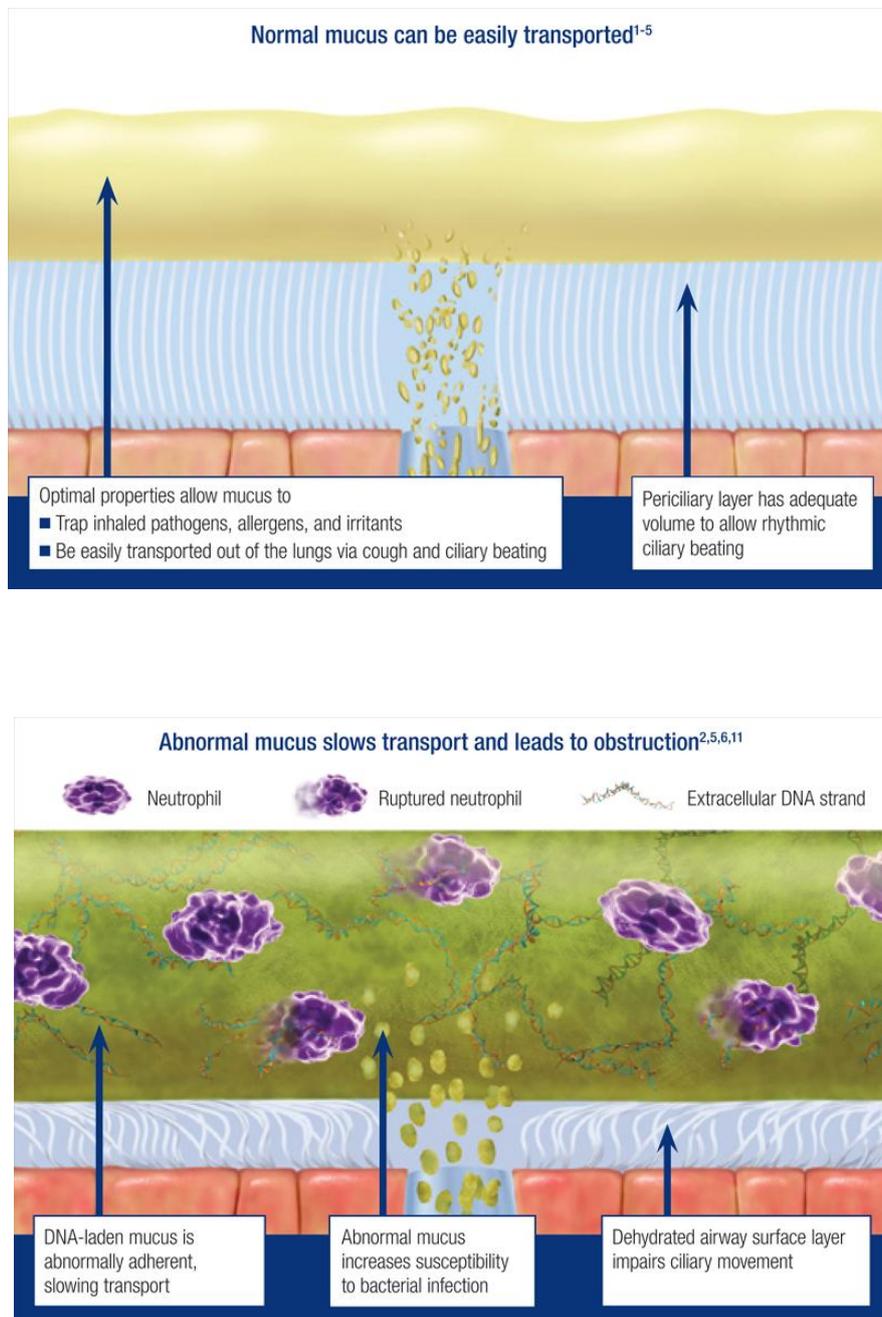


Figure 27 : Altération du mucus dans les voies respiratoires de patients normaux et mucoviscidosiques (Crédit : <http://www.pulmozyme.com>)

c) Inflammation

L'inflammation bronchique est une étape précoce, prolongée et sévère du développement de la mucoviscidose. Elle est caractérisée par l'afflux massif de polynucléaires neutrophiles. En effet, de nombreuses molécules chimio-attractantes pour les neutrophiles comme l'IL-8 sont retrouvées à de fortes concentrations dans les sécrétions bronchiques des patients CF.

Les neutrophiles ont un effet délétère et contribuent aux lésions des voies aériennes. Ils affluent en grand nombre au site inflammatoire, attirés par le taux important d'IL-8 sécrétée par les cellules épithéliales (Nakamura *et al.*, 1992). Ils sont capables de produire de nombreuses protéases, notamment des métalloprotéinases et sérine-protéinases, menant à la dégradation des molécules de la matrice extracellulaire. L'élastase produite par les neutrophiles dégrade différentes protéines dont l'élastine, ce qui mène à long terme à la bronchiectasie. L'étude de Konstan et Berger montre que cette enzyme est capable de cliver les opsonines et les récepteurs nécessaires à la phagocytose des pathogènes aggravant l'infection existante (Konstan et Berger, 1997). De plus, l'élastase stimule la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, qui sont retrouvées à de fortes concentrations chez les patients CF (Balfour-Lynn *et al.*, 1996; Bonfield *et al.*, 1999).

Les neutrophiles dégradés relarguent également de l'ADN augmentant ainsi la viscosité du mucus et la quantité d'oxydases (Henke et Ratjen, 2007). Les voies respiratoires de patients CF sont exposées aux radicaux oxygénés générés par la réponse immunitaire « exagérée ». Le stress oxydatif augmente la détérioration/dégradation pulmonaire menant à la bronchiectasie.

Enfin, l'activation de NFκB dépend de CFTR. Dans le cas de la mucoviscidose, l'accumulation de la protéine CFTR dans le cytoplasme crée un état de stress activant NFκB et par conséquent entraîne une synthèse accrue de l'IL-8. Il existe un déséquilibre entre les molécules pro et anti-inflammatoires (Bonfield *et al.*, 1995). La présence d'IL-10, normalement produite de manière constitutive par les cellules bronchiques chez les patients non CF, est déficiente chez les patients CF (Bonfield *et al.*, 1995).

Deux hypothèses existent concernant l'origine de l'inflammation. En effet, la question concernant la chronologie de l'apparition de l'inflammation reste posée : l'inflammation précède-t-elle l'infection ou est-elle secondaire à l'infection des voies aériennes ?

L'état inflammatoire existe chez les patients ne présentant pas d'infection respiratoire (Armstrong *et al.*, 1997; Muhlebach *et al.*, 1999; Tirouvanziam *et al.*, 2000). La notion d'inflammation primitive a été décrite par l'équipe de Khan. L'étude du lavage broncho-alvéolaire, réalisé chez des enfants CF âgés de 6 mois, a montré une forte concentration de polynucléaires neutrophiles ainsi qu'un taux élevé d'IL-8. D'autre part, la présence d'élastase α -1-antiprotéase chez les enfants âgés de 1 à 12 mois, avant même la présence d'infection, indique la présence d'une inflammation primitive initiée par des mécanismes non infectieux (Khan *et al.*, 1995; Balough *et al.*, 1995). Cependant, ces études doivent être prises avec précaution dans la mesure où divers facteurs peuvent entraîner des résultats faux négatifs pour les infections. En effet, la détection de pathogènes, dans les lavages broncho-alvéolaires obtenus par instillation de solution saline, peut s'avérer du fait d'une dilution de la concentration bactérienne. Il est toutefois convenu qu'en absence de toute infection, la réponse inflammatoire reste limitée (Armstrong *et al.*, 1997)

Les infections bactériennes précoces entraînent une réponse inflammatoire intense par rapport à des sujets non CF présentant le même type d'infection (Khan *et al.*, 1995). Cette réactivité inflammatoire exagérée est un aspect caractéristique de la pathologie. Les cellules épithéliales réagissent par une synthèse accrue de cytokines telles que l'IL-6 et IL-8, le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) mais également de mucines et du récepteur ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1). Le passage transendothélial, l'affluence accrue de neutrophiles et de macrophages provoquent à l'encontre des bactéries présentes, la synthèse de cytokines, de TNF- α et d'IL-1 β qui induisent la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules épithéliales, empruntant une voie d'activation autre que celle initiée par les bactéries.

4. Remodelage de l'épithélium respiratoire

Des similitudes importantes existent entre la mucoviscidose et des pathologies bronchiques inflammatoires chroniques, telles que la BPCO. Ces pathologies sont en effet caractérisées par des lésions épithéliales secondaires à un processus inflammatoire chronique (Regamey *et al.*, 2010). Chez les patients CF, il est souvent décrit la présence d'un épithélium respiratoire présentant par de nombreuses lésions (Chmiel et Davis, 2003) dont l'origine n'est pas clairement imputable à l'infection et/ou l'inflammation, même si ces dernières ont un rôle indéniable dans la destruction de la barrière épithéliale. A un stade avancé de la maladie, des études rapportent un développement important de

zones épithéliales remodelées, souvent corrélées à l'inflammation/infection persistante dans les voies aériennes (Regamey *et al.*, 2010). L'épithélium respiratoire, présente alors de nombreuses zones de métaplasie malpighienne (Piorunek *et al.*, 2008; Konrádová *et al.*, 1982; Mithal et Emery, 1976), d'hyperplasie sécrétoire (Hubeau *et al.*, 2001) ainsi qu'une perte des cellules ciliées et des jonctions serrées (Godfrey *et al.*, 1993). En outre, il a été mise en évidence la présence d'hyperplasie de cellules basales (Leigh *et al.*, 1995; Voynow *et al.*, 2005) suggérant une dérégulation de la différenciation cellulaire et une hyperprolifération des cellules épithéliales (Piorunek *et al.*, 2008)(Figure 28).

Mais ces remodelages épithéliaux sont également présents chez les jeunes patients CF: de nombreuses analyses histologiques ont démontré la présence de zones de métaplasie malpighienne et d'atrophie des glandes sous muqueuses (Bedrossian *et al.*, 2001; Sobonya *et al.*, 1986). Le développement de ces remodelages épithéliaux peut être la conséquence des nombreux cycles successifs de lésions et de réparations (Regamey *et al.*, 2010). Cependant, de récentes études suggèrent que non seulement les phases répétées de lésions/réparations suite à l'infection et l'inflammation tissulaires, pourraient être incriminées dans le remodelage épithéliale mais que d'autres facteurs pourraient jouer un rôle prépondérant, notamment le « type mucoviscidose » dû à l'absence d'un canal CFTR fonctionnel, ces remodelage étaient retrouvés au niveau de l'épithélium bronchique de fœtus mucoviscidosiques ne présentant ni infection (Regamey *et al.*, 2010), ni inflammation (Hubeau *et al.*, 2001). L'atrophie glandulaires et les métaplasies épithéliales de l'épithélium trachéal, ainsi que la présence d'appareil de Golgi et de mitochondries anormaux suggèrent fortement que les lésions formées dans ce contexte hors infection seraient liées au défaut fonctionnel du canal CFTR (Oppenheimer, 1981, Gosden et Gosden, 1984).

D'autre part, l'étude de la régénération CF dans le modèle de xénogreffe dans la souris nude, réalisée au laboratoire à partir de cellules épithéliales bronchiques CF dépourvues d'infection, a montré que le processus de régénération épithéliale aboutissait à la reconstitution d'un épithélium remodelé plus haut qu'un épithélium non CF avec développement d'une hyperplasie de cellules basales (Hajj *et al.*, 2007). De plus dans ce contexte non infectieux, la régénération est anormale et présente un retard de différenciation cellulaire lié à une phase de prolifération cellulaire plus importante et une étape de métaplasie squameuse transitoire plus longue que celle observée dans le modèle non CF (Hajj *et al.*, 2007). Ces anomalies de régénération ne sont donc pas imputables à un phénomène infectieux et restent à expliquer.

Les relations entre les mécanismes cellulaires menant à ces remodelages épithéliaux et l'infection/inflammation de l'arbre respiratoire ne sont donc pas clairement définies, tout comme l'implication de CFTR dans le remaniement épithélial.

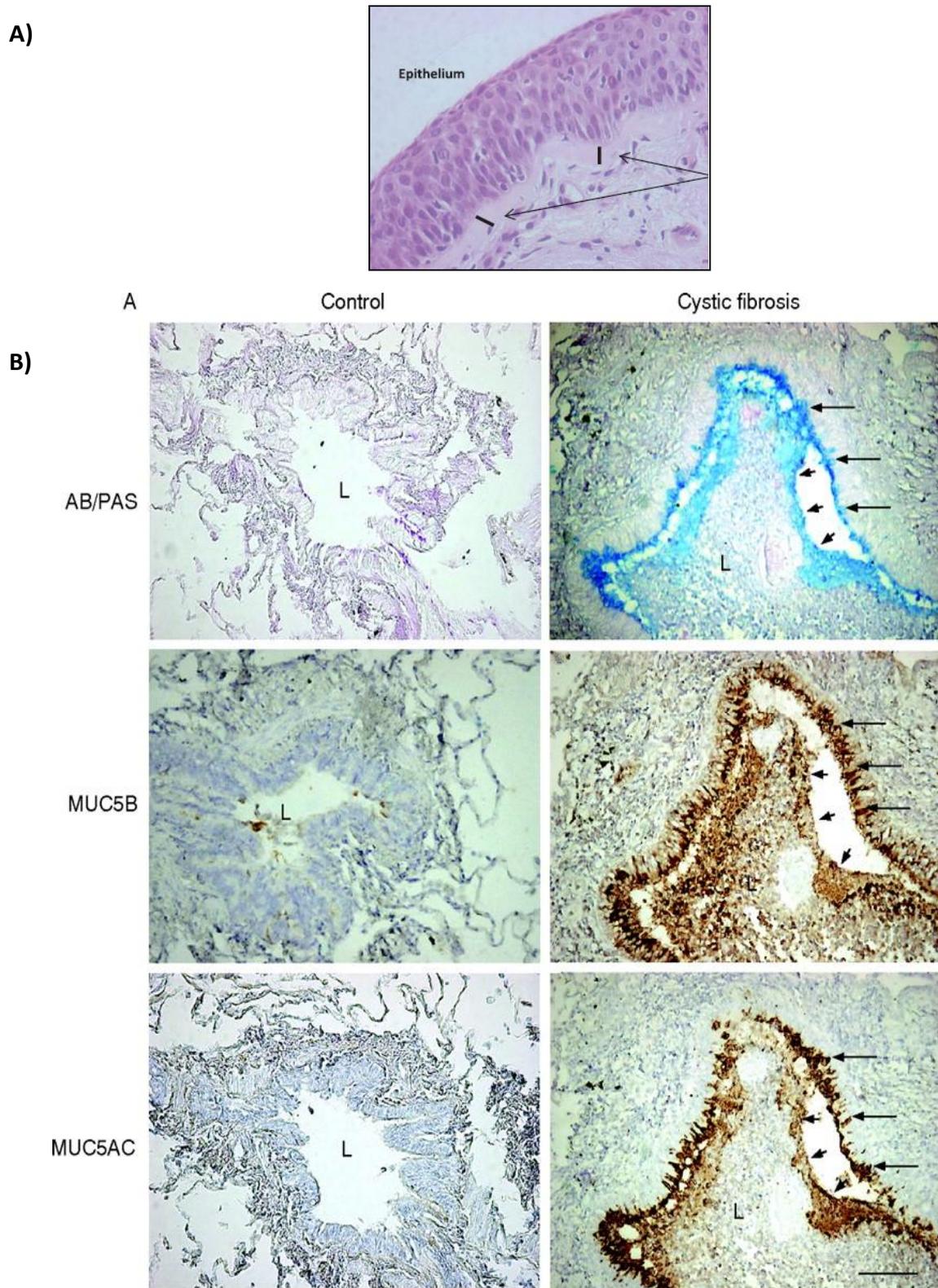


Figure 28 : Remodelage de l'épithélium respiratoire CF avec la présence de métaplasie malpighienne (Regamey *et al.*, 2010) (A) ainsi que de zones d'hyperplasies sécrétoires identifiées par une coloration AB/PAS et les marquage immunohistochimiques des mucines MUC5B et MUC5AC (Burgel *et al.*, 2007) (B)

II. MATERIELS

A. *Tissus respiratoires humains CF et non-CF*

Les pièces chirurgicales sont obtenues auprès d'otorhinolaryngologiste et de chirurgiens selon les dispositions prévues par l'article 12452 du Code de la Santé Publique modifié par la loi Bioéthique 94654.

Les tissus respiratoires (polypes nasaux) ont été obtenus par polypectomie nasale de 5 patients CF, de génotypes $\Delta F508/\Delta F508$ (n=2), $\Delta F508/\Delta I507$ (n=1), A1555G (n=1), $\Delta F508/G85E$ (n=1) et 5 patients non-CF. Les prélèvements ont été transférés au laboratoire dans du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) contenant de l'HEPES à 25 mM (Gibco BRL, Paisley, Royaume Uni) et supplémenté en antibiotiques (pénicilline 200 U/mL et streptomycine 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gibco BRL), puis lavés sous agitation dans du RPMI-Hepes à 4 °C.

Des tests bactériologiques ont été réalisés sur les milieux de transports des prélèvements. Vingt microlitres de la solution ont été prélevés puis déposés sur une gélose TSA (Tryptocase Soja Agar) (BIOMERIEUX, Marcy l'Etoile, France). Après 24h d'incubation à 37 °C, si des colonies bactériennes se développent, un protocole de décontamination anti-bactérien est mise en place.

Les prélèvements CF sont lavés et incubés à 4°C dans le RPMI 1640-Hepes 25 mM supplémenté en pénicilline (400 U/mL), streptomycine (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ceftazidime (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma Aldrich), tobramycine (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma Aldrich), amphotéricine B (Sigma Aldrich). Les prélèvements sont traités de 48 à 72 heures.

B. *Souche bactérienne de référence*

La souche bactérienne GRAM positive de *Staphylococcus aureus* (souche 8325-4) a été utilisée au cours de cette étude.

MATERIELS

Les souches bactériennes ont été conservées à -20°C dans le milieu nutritif TSB (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) contenant 20 % (vol/vol) de glycérol. Avant chaque manipulation, les souches bactériennes ont été décongelées puis les solutions bactériennes ont été étalées sur une gélose Tryptocase Soja Agar (TSA BIOMERIEUX, Marcy l'Etoile, France) afin de vérifier leur pureté.

III. METHODES

A. *Culture cellulaire*

1. **Dissociation des polypes**

Les cellules épithéliales respiratoires des polypes CF et non-CF ont été dissociées après une incubation, pendant une nuit à 4°C, dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 0,1 % de collagénase de type XIV de *Streptomyces griseus* (ou Pronase E) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Les cellules épithéliales ont été récupérées après agitation des morceaux de tissus dans du milieu RPMI, puis elles ont été centrifugées à 200 g pendant 5 minutes à température ambiante, et lavées deux fois dans du milieu RPMI. Après centrifugation, les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules ont été ensuite cultivées dans le modèle de culture en interface air-liquide (IAL).

2. **Culture des cellules dissociées**

a) *Culture en condition liquide-liquide*

Les cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF ont étéensemencées sur des membranes de polyester d'une porosité de 0,4 µm, préalablement recouvertes pendant 2 heures de collagène IV à 16 µg/cm² (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Cette membrane permet de séparer un compartiment apical et un compartiment basal (Transwell clear Costar). Les cellules ont étéensemencées à la densité de 4.2 x 10⁴ cellules/cm² dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (GIBCO) pendant 24 heures.

Les cellules ont ensuite été cultivées, en condition liquide-liquide, jusqu'à l'obtention d'un état de confluence dans un milieu de prolifération constitué de DMEM / Ham F-12 (Gibco BRL) (3/1; vol/vol) supplémenté avec 0,87 µM d'insuline bovine, 65 nM de transferrine humaine, 1,6 nM d'EGF recombinant humain, 1,38 µM d'hydrocortisone, 30 nM d'acétate de rétinyl, 9,7 µM de 3,3',5-

triiodo-L-thyronine, 2,7 μM d'épinéphrine, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extrait pituitaire bovin, 5 μM d'éthanolamine, 5 μM d'O-phosphoryléthanolamine, 30 nM de sélénite de sodium, 1 nM de chlorure de manganèse tétrahydraté, 0,5 μM de métasilicate de sodium déshydraté, 1 nM de molybdate d'ammonium tétrahydraté, 5 nM de vanadate d'ammonium, 1 nM de sulfate de nickel hexahydraté, 0,5 nM de chlorure d'étain dihydraté (Sigma Aldrich), 100 U/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine.

Les cellules ont été cultivées à 37 °C en atmosphère humide en présence de 5 % de CO_2 .

b) Culture en interface air liquide (IAL) des cellules épithéliales respiratoires

La régénération et le remodelage de l'épithélium respiratoire ont été étudiés dans le modèle *in vitro* de culture en IAL.

(1) Modèle de régénération normale

Lorsque les cellules étaient à plus de 80 % de confluence, elles ont été rincées au PBS stérile (Gibco BRL). Le milieu de prolifération a alors été éliminé du compartiment apical, et remplacé dans le compartiment basal par du milieu de différenciation. Ce dernier est composé de BEBM (Bronchial Epithelial cell Basal Medium) (LONZA, Walkersville, USA) et de DMEM High Glucose (Gibco BRL) (1/1 vol/vol) supplémenté avec 0,5 ng/mL d'EGF, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'insuline, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'hydrocortisone, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de transferrine, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'épinéphrine, 6,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triiodothyronine, 0,13 mg/mL d'extrait pituitaire bovin (Cambrex), 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA, 0,1 μM d'acide rétinoïque (Sigma Aldrich), 100 U/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine. Toutes les cultures ont été réalisées 37 °C en atmosphère humide en présence de 5 % de CO_2 . Les milieux de culture ont été remplacés toutes les 48 heures.

(2) Remodelages de l'épithélium respiratoire humain

Les remodelages de type hyperplasie sécrétoire et de type métaplasie malpighienne sont observés fréquemment au sein de l'épithélium respiratoire des patients atteints de maladies respiratoires chroniques inflammatoires. Afin d'étudier les mécanismes de ces remodelages, deux modèles de cultures *in vitro* ont été mis au point sur la base de la culture en interface air-liquide.

(a) Modèle de culture aboutissant à la formation d'une hyperplasie sécrétoire

Lorsque les cellules épithéliales respiratoires ensemencées sur les membranes poreuses ont atteint la confluence, le milieu du compartiment inférieur a été remplacé par du milieu de différenciation complet supplémenté en interleukine 13 (IL-13) à 20 ng/mL (MACS, Miltenyi Biotec) (Laoukili *et al.*, 2001).

(b) Modèle de culture aboutissant à la formation d'une métaplasie malpighienne

Pour obtenir des cultures de cellules épithéliales respiratoires présentant une métaplasie malpighienne, le milieu de différenciation a été modifié par diminution de la concentration d'acide rétinoïque de 0,1 μM à 0,05 μM (Sigma Aldrich).

B. Etude des sécrétions des cellules épithéliales respiratoires au cours de la régénération et du remodelage.

1. Recueil des sécrétions apicales des cultures

Afin d'étudier la régénération normale et les remodelages de l'épithélium respiratoire, les cultures en IAL ont été analysées à différentes phases de culture : le jour du passage en condition air-liquide ou J0, après 5 jours de culture (J5), puis à J15 et enfin lorsque l'épithélium respiratoire est bien différencié ou remodelé après environ 30 jours de culture.

A ces différents stades de différenciation, les sécrétions apicales ont été collectées: après rinçage des cultures au PBS stérile (Gibco, Fisher Biobloc), 100 µL de milieu de différenciation non complétement ont été ajoutés dans le compartiment apical. Après 2 heures d'incubation à 37 °C, le milieu apical a été recueilli, centrifugé 5 minutes à 12000 rpm, 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants ont ensuite été conservés à -80°C.

Les membranes de culture des cellules épithéliales ont été congelées à -80 °C pour des études histologiques ultérieures.

2. Dosage de la concentration en protéines totales des sécrétions

Les surnageants des cultures de cellules épithéliales CF et non-CF recueillis à J0, J5, J15 et J30 ont été analysés afin de déterminer la concentration en protéines totales grâce au kit BC Uptima Assay (Interchim, Montluçon, France) qui repose sur la méthode du Biuret. La densité optique (DO) a été mesurée à 562 nm sur le lecteur de microplaque Xenius (Safas, Monaco). La concentration en protéines totales a ensuite été déterminée grâce à une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) (SIGMA, Aldrich). Les valeurs sont exprimées en µg de protéines totales / mL. La gamme, ainsi que les échantillons, ont été dosés en triplicat.

C. Etude histologique

1. Coupe des blocs

Les membranes de culture de cellules épithéliales respiratoires CF et non-CF ont été incluses dans l'OCT (Optimum Cutting Temperature compound) (TissueTek, Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, PaysBas) puis cryofixées dans les vapeurs d'azote. Les blocs cryofixés ont été conservés à -80 °C.

Pour l'étude histologique des épithélia, les blocs cryofixés contenant les membranes ont été coupés en sections fines de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Leica Microsystems, Nussloch, Allemagne). Les coupes ont été déposées sur des lames de microscopie SuperFrost (O. Kinder GmbH, Allemagne) et conservées à -20 °C pour une étude ultérieure en histologie ou en immunohistochimie.

2. Coloration histologique des cultures en IAL

Les cryocoupes ont été décongelées à température ambiante puis colorées selon trois protocoles.

a) Coloration à l'Hématoxyline de Harris

Une coloration à l'hématoxyline de Harris (Shandon, Cergy, France) a été réalisée afin d'obtenir une observation rapide des cellules épithéliales.

b) Coloration à l'hématoxyline / éosine

Une coloration à l'hématoxyline-éosine a également été réalisée sur les cryocoupes grâce au kit Rapid-Chrome Frozen Sections Staining Kit (Shandon, Cergy Pontoise, France). Cette coloration, plus stable peut être conservée après montage de la cryocoupe sous lamelle de verre dans de l'Eukitt (O. Kindler, Freiburg, Allemagne). Les lames ainsi préparées ont été conservées à température ambiante.

c) Coloration bleu Alcian / acide périodique Schiff

Les cellules épithéliales sécrétoires ont été colorées grâce à la coloration spécifique acide périodique Schiff / Bleu Alcian. Les coupes ont été incubées dans une solution contenant du bleu Alcian puis traitées avec de l'acide périodique à 0,5 % puis avec une solution de Schiff. Enfin, les noyaux ont été colorés par une solution d'hématéine puis différenciés par l'acide trichloroacétique et l'eau lithiée. Les lames ont été rincées à l'eau déminéralisée entre chaque traitement. Les coupes colorées ont été ensuite déshydratées puis montées sous lamelle en Eukitt et conservées à température ambiante.

3. Immunohistochimie

a) Anticorps utilisés

Les anticorps utilisés ont été : l'anti-CK13 monoclonal de souris (1/1000; clone KS-1A3; Sigma Aldrich) pour la détection des cellules basales, l'anti- β -tubuline monoclonal de souris (1/3000; IgG2b clone KMX-1, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) pour la détection des cellules ciliées, l'anti-MUC5AC monoclonal de souris (1/100; clone NCL; Novocastra, Newcastle, Royaume Uni). La prolifération cellulaire a été analysée avec l'anti-Ki-67 monoclonal de souris (1/10; clone MIB-1; DakoCytomation, Carpentaria, Etats-Unis). L'analyse de la différenciation ciliée a été réalisée par marquage avec l'anticorps anti-FOXJ1 monoclonal de souris (1/1000, anticorps gracieusement fourni par le Pr Steven BRODY (Washington University School of Medicine, St Louis, Etats Unis).

La révélation de ces anticorps a été réalisée grâce à des anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin (IgG H+L, 1/200) conjugués à l'Alexa Fluor 488 ou 594 (Molecular Probes; Eugene, Etat Unis).

b) Mode opératoire

Les immunomarquages ont été réalisés sur les coupes préalablement décongelées et séchées à température ambiante. Les étapes de marquage en immunofluorescence ont été effectuées de la manière suivante :

Mode opératoire	Réactifs/Solution	Durée
Blocage des sites non spécifiques de reconnaissance des anticorps	PBS-BSA 3 %	60 minutes
Anticorps primaire	Anticorps dilué dans le PBS-BSA 3 %	Toute la nuit à 4 °C
Rinçages	PBS	3 fois 5 minutes
Anticorps secondaires	Anticorps dilué dans le PBS-BSA 3 %	45 minutes
Contre-coloration des noyaux	Hématoxyline de Harris ou DAPI	Quelques secondes ou 10 minutes
Rinçages	Eau du robinet ou PBS	Quelques secondes ou 3 fois 5 minutes

Tableau 2 : Protocole de détection protéique par immunohistochimie

Des contrôles négatifs ont été réalisés en remplaçant chaque anticorps primaire par une solution de PBS/BSA 3 %.

Les lames ont finalement été montées sous lamelle avec la solution de conservation AquaPoly/Mount (Polysciences, Warrington, PA) puis conservées à 4 °C à l'abri de la lumière pour une acquisition ultérieure des images à l'aide d'une caméra CDD (charge coupled device) montée sur un microscope Axioscope équipé du logiciel CoolSNAP (Roper Scientific, Evry, France).

c) Quantification cellulaire

La prolifération cellulaire a été détectée par immunomarquage de Ki67 qui est un marqueur nucléaire. La vitesse de différenciation ciliée a été quantifiée par immunomarquage nucléaire de FOXJ1 qui est un marqueur nucléaire de différenciation des cellules ciliées. Les hyperplasies de cellules basales et de cellules sécrétoires ont été évaluées par la détection des cellules exprimant respectivement le marqueur CK13 et le marqueur MUC5AC.

Les marquages de la CK13, de MUC5AC, FOXJ1 et Ki67 ont été réalisés aux différents stades de la régénération et du remodelage CF et non-CF.

Les noyaux cellulaires ont été marqués grâce au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (SIGMA, Aldrich). Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules positives par micromètre de membrane basale ($\mu\text{m}/\text{MB}$) ou par rapport au nombre de cellules totales.

D. Analyse des sécrétions protéiques

1. Analyse et dosage protéique par la technologie Luminex®

a) Principe du dosage par la technologie Luminex®

Le dosage protéique par la technologie Luminex® repose sur le principe de la cytométrie en flux. Cette technique utilise des microsphères fluorescentes qui vont être couplées à leur surface à des antigènes reconnaissant la protéine d'intérêt. Deux lasers, un rouge et un vert vont détecter respectivement la bille et la protéine d'intérêt. Le laser rouge va définir de manière précise l'identité de la protéine et le laser vert va détecter l'interaction antigène-anticorps. Ainsi, plusieurs dizaines de protéines différentes peuvent être analysées de manière simultanée à partir d'un même faible volume d'échantillon (Figure 1).

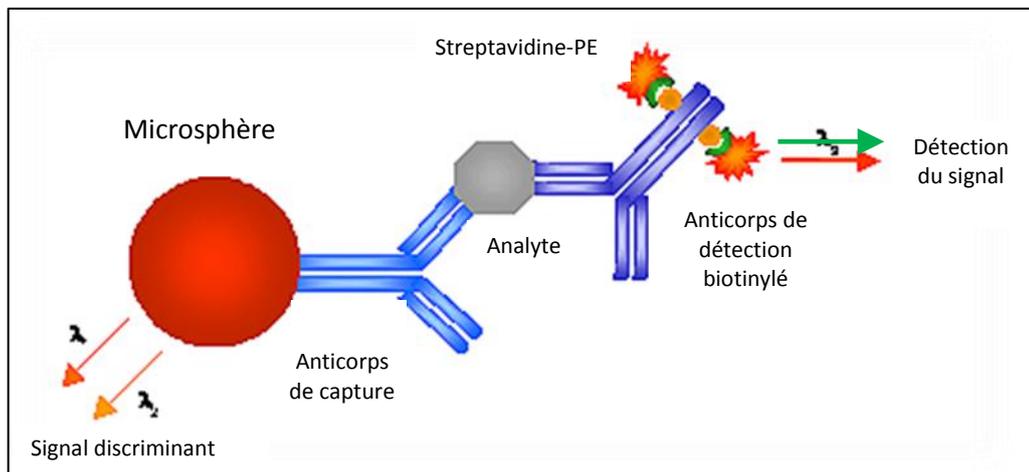


Figure 1 : Principe de détection des protéines par la technologie Luminex®

b) Mode opératoire

Différentes interleukines et protéines pro-inflammatoires ont été quantifiées dans les surnageants de culture IAL CF et non-CF : GM-CSF, INF γ , IL1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-12, IL-13, IL-17, IP-10, MCP-1, TNF- α , EGF et Fractalkine. Le dosage a été réalisé grâce au kit de détection protéique Milliplex™ Human Cytokine (Millipore, France).

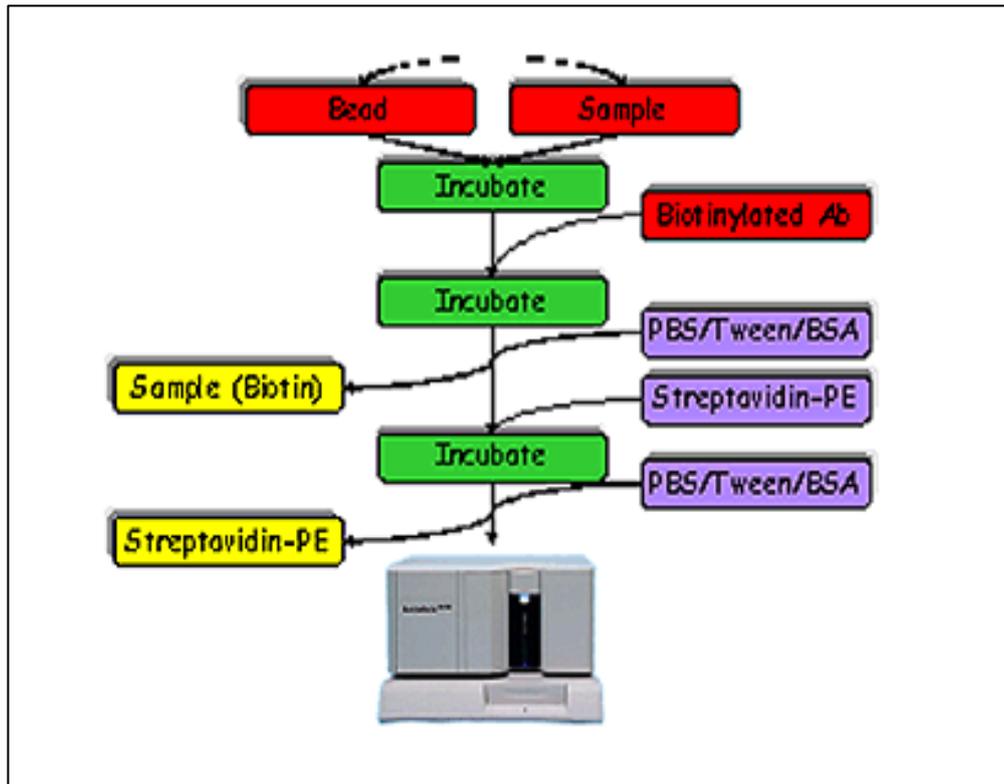


Figure 2 : Protocole de dosage des protéines par la technologie Luminex®

Les billes sont incubées avec les échantillons à analyser. Après un protocole expérimental de type ELISA (Figure 2), les résultats sont obtenus par lecture sur un Luminex qui, grâce à un module de pipetage et de gestion des fluides, aspire les échantillons contenant les billes en suspension dans une veine liquide de manière à ce qu'elles soient analysées les unes à la suite des autres (analogie avec la cytométrie de flux) par excitation des deux lasers.

La quantité de protéines est déterminée à partir de la mesure de l'intensité de fluorescence médiane rapportée à la gamme étalon. Les résultats du dosage sont exprimés en pg de la protéine d'intérêt / mg de protéines totales.

2. Dosage par la technique ELISA de la β -défensine, le SLPI et la LL37

La concentration en β -défensine, SLPI et LL37 dans les surnageants des cultures normales ou remodelées CF ou non CF a été évaluée par ELISA, selon le protocole du fournisseur.

Les kits utilisés ont été : ELISA-LL37 et ELISA-SLPI (Hycult Biotech, Clinisciences, Montrouge, France) et ELISA- β -défensine (Phoenix Pharmaceutical Inc, Strasbourg, France).

La densité optique (DO) est mesurée à 450 nm sur un lecteur de microplaque Xenius (Safas, Monaco) et la quantité de protéine d'intérêt a été déterminée à partir de la mesure de la DO mesurée rapportée à la gamme étalon. Les résultats des dosages sont exprimés en picogramme de protéine par milligramme de protéines totales.

E. Etude des propriétés fonctionnelles

1. Test de survie bactérienne au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire humain

La capacité bactéricide des sécrétions des cellules épithéliales au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire a été analysée par l'étude de la survie des souches de *Staphylococcus aureus*.

Les souches ont été repiquées sur des géloses TSA. Leur pureté a été vérifiée après 24 heures d'incubation à 37°C. Les colonies bactériennes ont alors été ensemencées dans un TSB et incubées 24 heures sous agitation à 1200 rpm à 37 °C. Une suspension bactérienne de 2 mL a été réensemencée dans un bouillon TSB et incubée 2 heures sous agitation à 1200 rpm à 37 °C pour atteindre la phase exponentielle de croissance bactérienne. Les bactéries ont alors été lavées successivement avec du PBS (GIBCO, Invitrogen) et de l'eau après une centrifugation à 3500 rpm, 15 minutes à 4 °C. La solution bactérienne a été diluée dans l'eau stérile afin d'obtenir une suspension à 500 CFU/mL.

Les surnageants collectés au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire ont été dilués au 25^{ème} dans du milieu de différenciation non complétement. Deux microlitres de suspension bactérienne ont été mis en contact avec 30 µL de chaque surnageant dans une microplaque 96 puits pendant 2 heures 30 minutes sous agitation à 60 rpm à 37 °C. A l'issue, chaque solution a été étalée sur une gélose TSA.

Les colonies bactériennes ont été comptées après 24 heures d'incubation à 37 °C. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie bactérienne par rapport à la référence obtenue pour le surnageant récupéré à J0.

Un contrôle a été effectué en incubant les bactéries avec du milieu de culture n'ayant jamais été en contact avec des cellules épithéliales respiratoires.

2. Etude des propriétés électrophysiologiques dans les cultures normales ou remodelées de cellules épithéliales respiratoires CF ou non CF

a) Etude des propriétés bioélectriques par la méthode de la chambre de Ussing

(1) Principe de la technique de la Chambre de Ussing :

Cette technique de mesure électrophysiologique a été mise au point par Ussing et Zerahn en 1951 (Ussing & Zerahn, 1951). Elle permet de mesurer le courant de court-circuit (I_{sc}) à travers une membrane biologique. On peut ainsi distinguer les transports actifs des transports passifs des ions à travers ces membranes.

La chambre d'Ussing permet d'analyser, *in vitro*, le transport des ions à travers un tissu. Différents paramètres électriques caractérisant ce tissu peuvent être mesurés : la différence de potentiel transépithélial (DDP), la résistance transépithéliale en appliquant la loi de Ohm (R) ainsi que les variations du courant du court circuit (ΔI_{sc}).

(2) Matériels utilisés

Pour réaliser cette étude, un dispositif de chambres de Ussing verticales a été utilisé comprenant différents éléments (Figure 3) :

- les chambres qui sont constituées de 2 éléments transparents en plexiglas qui déterminent un compartiment apical (ou muqueux) et un compartiment basal (ou séreux). La culture cellulaire sur membrane poreuse est insérée entre ces 2 compartiments ;
- deux zones de réservoir contenant le milieu tampon thermostaté en permanence à 37 °C à l'aide d'un support chauffant. L'oxygénation des cellules sur le filtre dans la chambre de Ussing ainsi que l'homogénéisation des liquides dans les 2 compartiments est assurée par un bullage d'oxygène à débit constant ;

- le dispositif de mesure des paramètres électriques. Chaque chambre est reliée par un pont électrolytique d'agar à des électrodes. Ces électrodes sont reliées à l'amplificateur (WPI). Le signal de sortie est enregistré et traité par le système d'acquisition Data Trax (Word Precision Instrument, v 1.804).

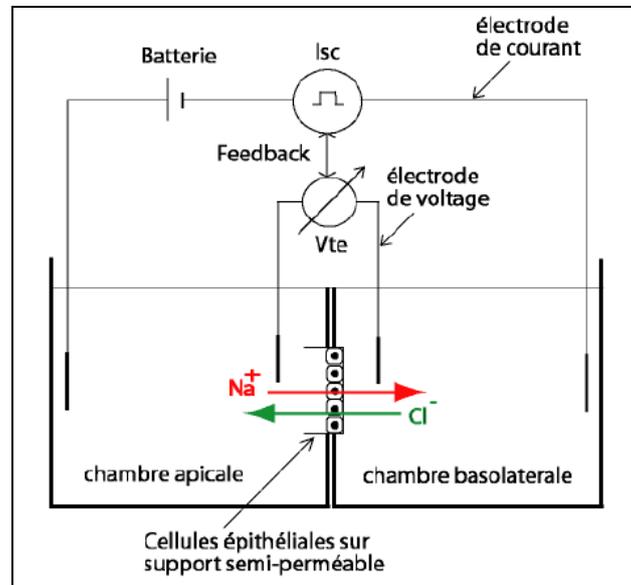


Figure 3 : Schéma descriptif du montage de la chambre de Ussing

(3) Solutions utilisées lors des mesures

Le milieu HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (GIBCO, Invitrogen) a été utilisé dans les compartiments apical et basolatéral. Il s'agit d'une solution saline composée de : CaCl_2 1,26 mM, MgCl_2 0,493 mM, MgSO_4 1 mM, KCl 5,33 mM, KH_2PO_4 0,441 mM, NaCO_3 4,17 mM, NaCl 137.93 mM, Na_2PO_4 0,338 mM et D-glucose 5,56 mM.

La fonctionnalité du canal CFTR des épithélia respiratoires humains régénérés et remodelés a été déterminée grâce à l'utilisation de deux modulateurs pharmacologiques :

Amiloride : Bloqueur des canaux épithéliaux sodiques apicaux amiloride sensible (SIGMA, Aldrich), il est utilisé à une concentration finale de 10^{-4} M ;

Forskoline : Activateur de la sécrétion de chlore AMPc dépendante, il est utilisé à une concentration finale de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (SIGMA, Aldrich).

(4) Protocole

Pour les expériences en chambres de Ussing, les cellules épithéliales ont été cultivées sur filtres perméables (Costar, 12 mm, 0,4 mm pore) et montées en chambre après découpage au bistouri de la membrane poreuse.

Les deux faces de l'épithélium ont été baignées dans du milieu HBSS pour un temps d'équilibre de 10 min à 37 °C. Après cette période de stabilisation, la résistance transépithéliale a été mesurée après imposition d'un courant de 30 mV puis ont été ajoutées successivement l'amiloride et la forskoline dans le bain apical. Le courant de court circuit a été mesuré après l'ajout de chaque modulateur pharmacologique.

F. Analyses statistiques

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm écart type. Le test non-paramétrique de Mann et Whitney ainsi que le test t ont été utilisés pour les analyses statistiques. Le test de ANOVA a été utilisé pour comparer les sécrétions obtenues entre les différentes conditions de culture et le génotype CF ou non CF des épithélia. Lorsque la variabilité des patients était trop importante nous avons utilisé le test de Kruskal Wallis afin de déterminer une tendance d'évolution des sécrétions protéiques. Une différence significative a été définie pour $p \leq 0,05$.

IV. Régénération de l'épithélium bronchique CF dans un contexte exempt d'infection et d'inflammation exogène

Des travaux du laboratoire réalisés en 2007, dans un modèle de xénogreffe humanisé dans la souris nude, ont permis d'analyser la dynamique de régénération de l'épithélium respiratoire humain de type CF et de conclure qu'en absence de toute infection, elle était retardée et aboutissait à la reconstitution d'un épithélium remodelé (Hajj *et al.*, 2007). En effet, les résultats ont montré que la régénération épithéliale bronchique CF, bien que se déroulant en quatre étapes distinctes : 1) d'étalement et de migration cellulaire ; 2) de prolifération cellulaire aboutissant à la formation d'une métaplasie malpighienne transitoire ; 3) de pseudostratification épithéliale ; et 4) de redifférenciation cellulaire, montre une hyperprolifération cellulaire et un allongement du stade de métaplasie malpighienne aboutissant à un retard de différenciation cellulaire.

De plus, l'épithélium régénéré est significativement plus haut que l'épithélium régénéré à partir de cellules non CF, et présente une hyperplasie des cellules basales. Le modèle de xénogreffe bronchique humanisé dans la souris nude présente un contexte de régénération exempt de toute infection bactérienne ou virale, mais pas de la composante inflammatoire qui ne peut être contrôlée dans ce modèle *in vivo*.

Afin de déterminer l'impact de la composante inflammatoire sur la dynamique de régénération de l'épithélium bronchique CF, nous avons utilisé un modèle de culture cellulaire *in vitro* en interface air-liquide (IAL) permettant d'étudier la régénération, non seulement dans un contexte exempt d'infection, mais aussi exempt d'inflammation exogène.

A. Régénération de l'épithélium bronchique non CF en culture en IAL

Nous nous sommes basés sur les travaux de la littérature (de Jong *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1996) pour réaliser la culture *in vitro* en IAL des cellules épithéliales issues de polypes nasaux humains. Comme le montre le modèle *in vivo* de xénogreffe dans la souris nude, nous pouvons assister dans le modèle *in vitro* à la régénération de l'épithélium bronchique en quatre étapes, que

l'analyse histologique des cultures nous a permis de définir (Figure 1). Au stade J0, jour du passage des cultures en interface air-liquide, seule une monocouche de cellules dédifférenciées étalées est mise en évidence par coloration à l'Hématoxyline de Harris (Figure 1A). A l'issue de 5 jours de culture en IAL (stade J5), nous observons un épithélium pluristratifié avec formation d'une métaplasie malpighienne transitoire (Figure 1B), puis une pseudostratification de l'épithélium à 15 jours de culture en IAL (Figure 1C ; stade J15). Enfin, à 30 jours de culture en IAL (stade J30), nous pouvons observer la régénération d'un épithélium bronchique mucociliaire bien différencié (Figure 1D).

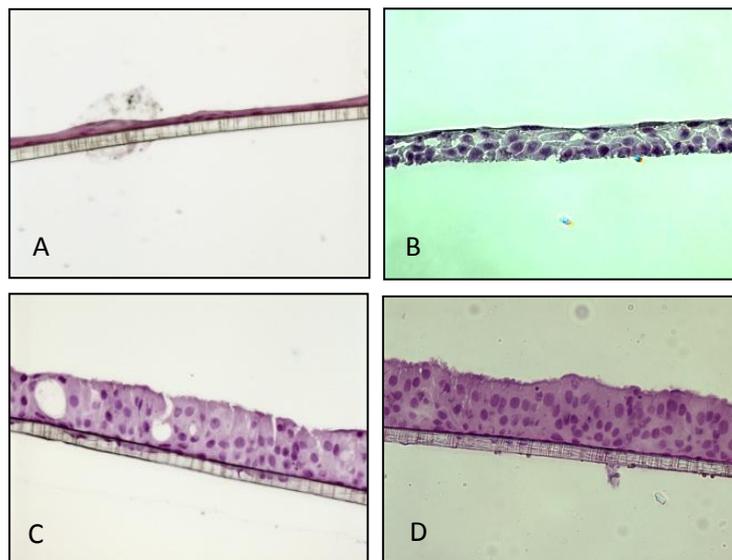


Figure 1 : Dynamique de la régénération épithéliale bronchique non CF.

Coloration à l'Hématoxyline de Harris de sections de culture en IAL aux stades J0 (A), J5 (B), J15 (C) et J30 (D) (analyse réalisée sur 5 patients non CF, Objectif x20).

Nous avons identifié les différents types cellulaires constituant les épithélia régénérés dans ce modèle par une détection immunohistochimique de marqueurs spécifiques (Figure 2). Nous pouvons mettre en évidence la présence de cellules basales spécifiquement marquées avec l'anticorps anti-cytokératine 13 (CK13) (Figure 2A), de cellules ciliées exprimant la β -tubuline (Figure 2B) ainsi que de rares cellules sécrétoires détectées par l'anticorps anti MUC5AC (Figure 2C).

Stade J30

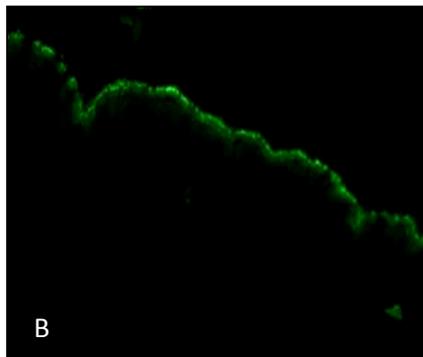
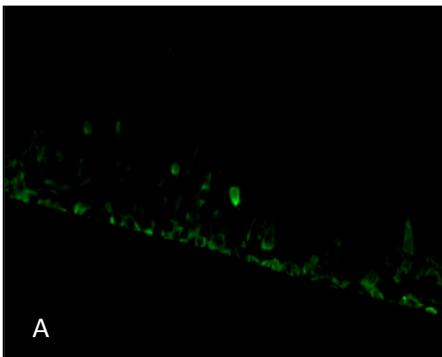


Figure 2 : Caractérisation de l'épithélium bronchique régénéré non CF au stade J30 de culture en IAL.

Détection immunohistochimique de la CK13 (A), de la β -tubuline (B) et de MUC5AC (C) sur des sections de culture en IAL au stade J30. Objectif x20

B. Régénération de l'épithélium bronchique CF en culture en IAL

1. Régénération de l'épithélium bronchique CF

Dans le modèle de culture en IAL, la régénération de l'épithélium bronchique CF se déroule selon les quatre stades définis dans le cas de la régénération non CF (Figure 3). Nous pouvons observer, au stade J0, de culture en IAL, la présence d'une monocouche de cellules dédifférenciées étalées (Figure

3A). Au stade J5 (Figure 3B), l'épithélium est pluristratifié et forme une métaplasie malpighienne transitoire (B). Après 15 jours de culture en IAL (Figure 3C), l'épithélium se pseudostratifie, et après 30 jours de culture en IAL (Figure 3D), nous obtenons la régénération d'un épithélium mucociliaire bien différencié.

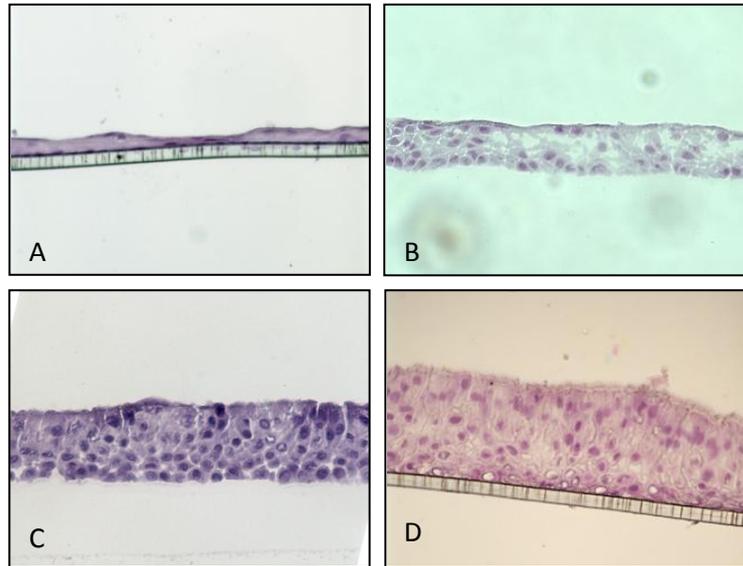


Figure 3 : Dynamique de la régénération épithéliale bronchique CF.

Coloration à l'Hémaroxyline de Harris de sections de culture en IAL aux stades J0 (A), J5 (B), J15 (C) et J30 (D) (analyse réalisée sur 5 patients CF). Objectif x 20

2. Analyse de la dynamique de régénération de l'épithélium bronchique CF en culture en IAL.

a) Etude du retard de différenciation

Afin de déterminer s'il existe un retard dans la différenciation épithéliale au cours de la régénération de l'épithélium bronchique CF, nous avons étudié l'expression de la protéine FOXJ1 en immunohistochimie. Ce facteur de transcription est une protéine détectée dans les cellules épithéliales avant l'apparition des premiers cils, et son expression est maintenue dans les cellules ciliées (Blatt *et al.*, 1999). Nous avons étudié l'expression de FOXJ1 au cours des différents stades de la régénération CF et avons comparé les résultats obtenus avec les résultats acquis lors de l'étude de la régénération épithéliale non CF. Aucune expression de FOXJ1 n'est détectable au cours des stades

J0 et J5 dans les régénérations non CF et CF, mais nous avons pu mettre en évidence la présence d'un marquage à partir du stade J15 dans ces cultures (Figure 4). Le nombre de cellules FOXJ1 positives sur des sections de cultures en IAL CF et non CF a été quantifié.

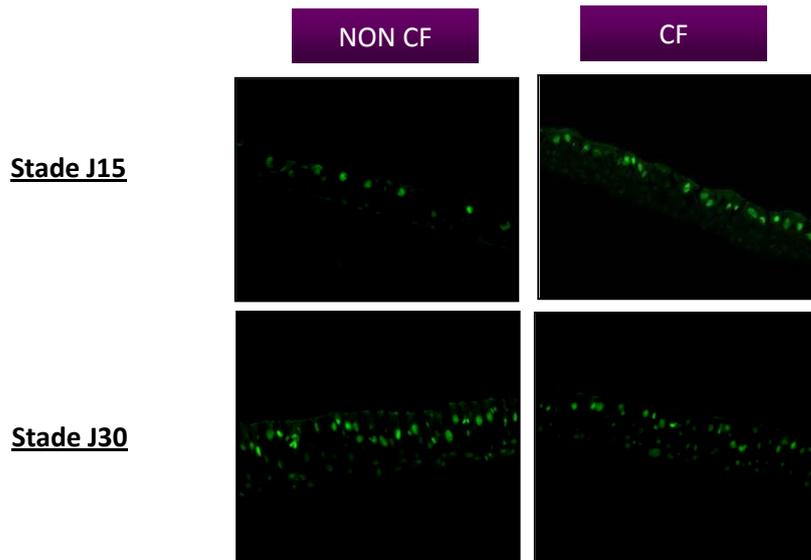


Figure 4 : Expression de FOXJ1 par les épithélia non CF et CF aux stades J15 et J30 de culture en IAL.

Détection immunohistochimique de FOXJ1 sur des sections de culture en IAL aux stades de régénération J15 et J30 (analyse réalisée sur 5 patients CF et 5 patients non CF). Objectif x20

La quantification du nombre de cellules exprimant FOXJ1 au stade J15 de la régénération en IAL (en nombre de cellules/ μm de membrane ou en pourcentage du nombre total de cellules épithéliales), montre une différence significative ($p < 0,05$). Nous avons pu dénombrer 3,6 fois et 2,9 fois moins de cellules FOXJ1 positives, respectivement, dans le cas de la régénération CF. Cette différence n'est plus observable au stade J30 pour lequel le nombre de cellules FOXJ1 positives est similaire dans les cultures CF et non CF (Figure 5).

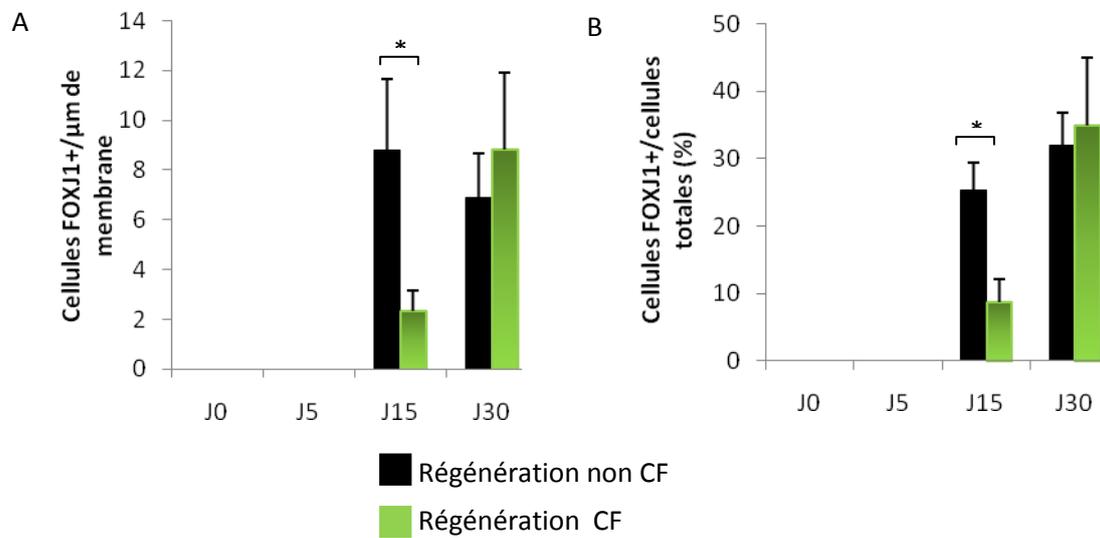


Figure 5 : Quantification du nombre de cellules exprimant FOXJ1 au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

L'expression de la protéine FOXJ1 a été analysée par immunohistochimie sur des coupes de culture en IAL. Le nombre de cellules FOXJ1 positives a été quantifié par micromètre de membrane (A) et par rapport au nombre de cellules totales (B). (* $p < 0,05$)

b) Mesure de la hauteur des épithélia régénérés

Nous avons mesuré la hauteur des épithélia régénérés à partir de cellules non CF (A) et CF (B) dans le modèle de culture en IAL au stade J30 (Figure 6). Nous avons observé que la hauteur de l'épithélium différencié CF est significativement ($p < 0,05$) plus importante ($238,2 \pm 37,9 \mu\text{m}$) que celle de l'épithélium différencié non CF ($103,5 \pm 9,2 \mu\text{m}$) (Figure 7).

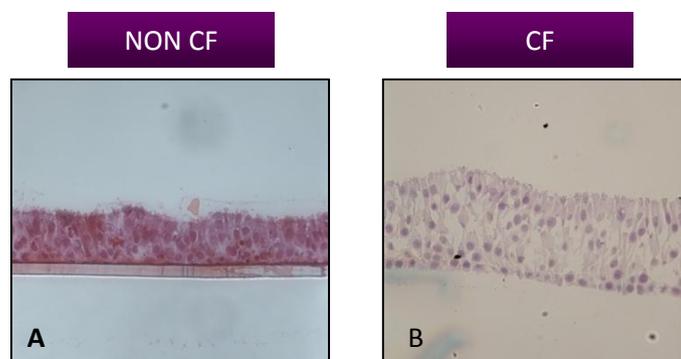


Figure 6 : Etude histologique des épithélia non CF et CF au stade J30 de culture en IAL.

Coloration à l'Hématoxyline de Harris de sections de culture non CF (A) et CF (B) en IAL au stade J30 (analyse réalisée sur 5 patients non CF et 5 patients CF) (Objectif x20).

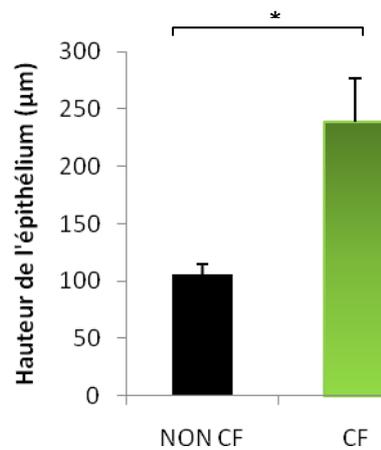


Figure 7 : Mesure de la hauteur de l'épithélium non CF et CF au stade J30 de culture en IAL

Mesure de la hauteur de l'épithélium bronchique non CF et CF dans le modèle de culture IAL au stade J30, et exprimée en µm (* $p < 0,05$)

c) Quantification du nombre de cellules basales

Nous avons étudié et quantifié (Figure 8) le nombre de cellules basales exprimant la cytokératine 13 par immunohistochimie, dans les épithélia régénérés à partir de cellules non CF et CF, à 30 jours de culture en IAL. La détection immunohistochimique de la CK13 semble montrer un nombre plus important de cellules basales dans les épithélia CF que dans les épithélia non CF.

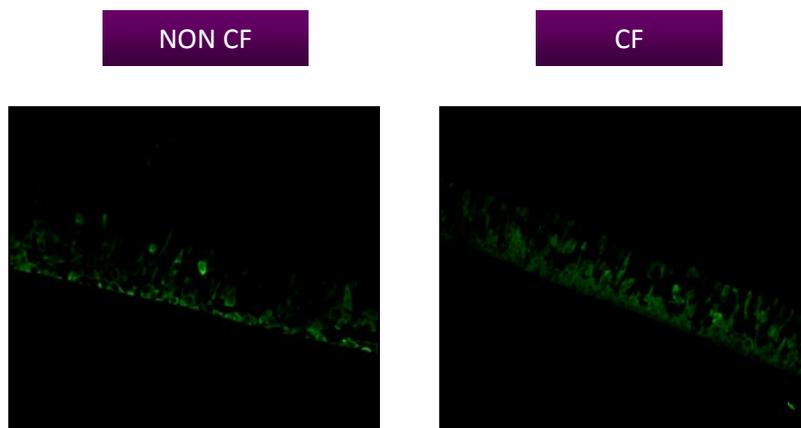


Figure 8 : Expression de la CK13 dans les épithélia non CF et CF au stade J30 de culture en IAL.

Détection immunohistochimie de la CK13 sur des sections de culture en IAL au stade de régénération J30 (analyse réalisée sur 5 patients CF et 5 patients non CF). (Objectif x20).

La quantification du nombre de cellules basales exprimant la cytokératine 13 dans les épithélia non CF et CF montre la présence d'un nombre significativement plus important ($p < 0,05$) de ces cellules dans les cultures CF ($158,7 \pm 48,3$ cellules CK13+/ μm de membrane) que dans les cultures non CF ($75,1 \pm 22$ cellules CK13+/ μm de membrane) (Figure 9).

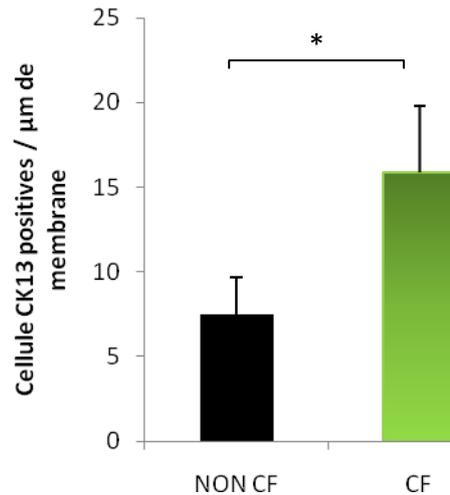


Figure 9 : Quantification du nombre de cellules exprimant la CK13 dans l'épithélium bronchique non CF et CF au stade J30 de culture IAL.

L'expression de la CK13 a été analysée par immunohistochimie. Le nombre de cellules CK13 positives a été quantifié à 30 jours de culture en IAL. ($*p < 0,05$)

d) Quantification du nombre de cellules caliciformes

La détection immunohistochimique et la quantification du nombre de cellules caliciformes exprimant MUC5AC n'ont pas montré de différence entre les cultures régénérées CF et non CF au stade J30 de culture en IAL.

e) Analyse de la prolifération cellulaire

Nous avons quantifié la prolifération cellulaire au cours de la régénération épithéliale CF et non CF aux stades J0, J5, J15 et J30 de culture en IAL, par détection immunohistochimique de l'antigène Ki67 mettant en évidence le noyau des cellules en cours de division, et par comptabilisation des cellules positives.

La quantification du nombre de cellules exprimant Ki67 montre une diminution du nombre de cellules proliférantes au cours de la régénération CF et non CF ($p < 0,05$).

Ces résultats montrent que la prolifération cellulaire dans le cas de la régénération normale CF est active de manière prolongée dans le temps. Cependant, au cours de la régénération CF, la quantité de cellules Ki67 positives est significativement ($p < 0,05$) plus faible au stade J5 (30,4% de cellules Ki67 positives / cellules totales) que dans les cultures non CF au même stade (46,4% de cellules Ki67 positives / cellules totales). A l'inverse, au stade J15 de culture en IAL, la quantité de cellules Ki67 positives est significativement ($p < 0,05$) plus importante dans les cultures CF (28,6% Ki67 positives/ cellules totales) que dans les cultures non CF (14,9% Ki67 positives/ cellules totales) (Figure 10A). Lorsque le nombre de cellules Ki67 positives est analysé par μm de membrane (Figure 10B), nous pouvons observer un pic de prolifération à J5 pour les cultures non CF et à J15 pour les cultures CF.

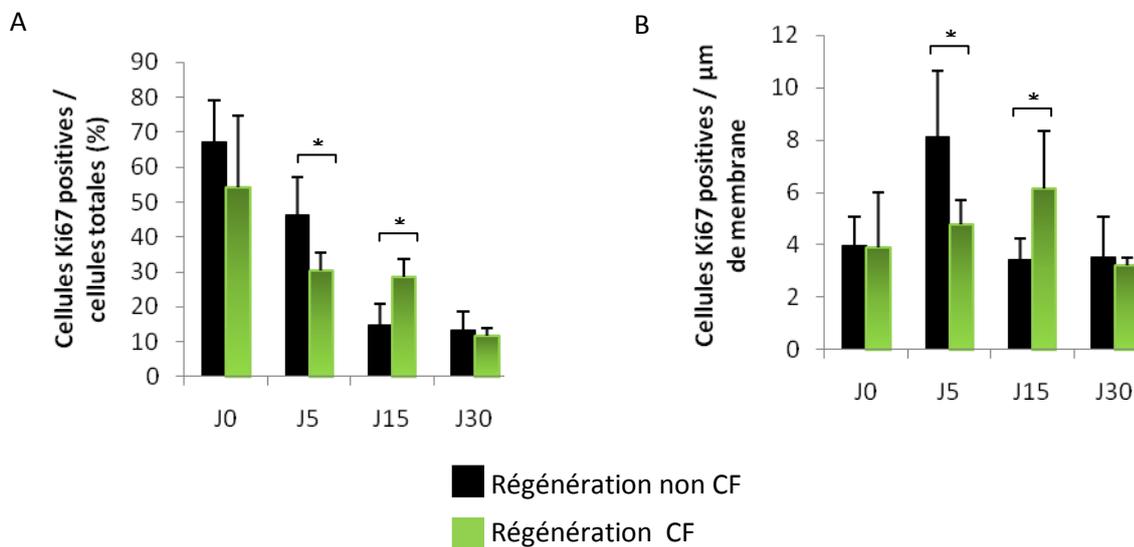


Figure 10 : Quantification du nombre de cellules exprimant le Ki67 dans l'épithélium bronchique non CF et CF au stade J30 de culture IAL.

L'expression du Ki67 a été analysée par immunohistochimie sur des coupes de culture en IAL. Les cellules Ki67 positives ont été quantifiées par rapport au nombre de cellules totales (A) et en micromètre de membrane basale (B.) ($*p < 0,05$)

f) Conclusion

La quantification du nombre de cellules FOXJ1 positives indique que le nombre de cellules engagées dans la ciliogénèse ou différenciées en cellules ciliées est significativement moins important au cours des premiers jours de la différenciation épithéliale CF et indique un retard dans le processus de différenciation ciliée des cellules CF.

Nos résultats montrent qu'en dehors de tout contexte infectieux et inflammatoire exogène, l'épithélium bronchique CF régénéré est remodelé, et présente une hyperplasie de cellules basales.

Enfin, la quantification de l'expression de l'antigène Ki67 montre un retard de la prolifération cellulaire dans les cultures CF, par rapport aux cultures non CF.

L'ensemble de ces résultats ont été reportées dans le tableau 3

C. DISCUSSION

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus de régénération de l'épithélium bronchique CF dans un modèle *in vitro* de culture des cellules épithéliales en interface air-liquide (IAL), afin de déterminer si le remodelage observé chez les patients atteints de mucoviscidose (CF) était lié au contexte inflammatoire extrêmement présent chez ces patients.

En effet, de nombreuses études ont rapporté la présence de remodelage au sein de l'épithélium bronchique chez les patients CF. Les études de l'histologie des épithélia bronchiques réalisées chez ces patients indiquent la présence très fréquente de zones d'hyperplasie des cellules basales, de métaplasie malpighienne mais également d'hyperplasies des cellules sécrétoires (Rock *et al.*, 2010). Cependant, peu d'études ont étudié les mécanismes impliqués dans la dynamique de ces remaniements épithéliaux. Afin de déterminer l'influence de la composante infectieuse inhérente à la maladie dans le processus de remodelage épithélial bronchique, Hajj *et al.*, ont démontré, en 2007, dans un modèle de xénogreffe humanisé dans la souris, que le processus de régénération de l'épithélium bronchique CF, en dehors de toute infection bactérienne, est retardé, présente une étape d'hyperprolifération cellulaire accompagnée d'un allongement de l'étape de métaplasie malpighienne transitoire préalable à la redifférenciation cellulaire, et aboutit à la reconstitution d'un épithélium remodelé, plus haut qu'un épithélium bronchique restauré à partir de cellules épithéliales non CF, et présentant une hyperplasie des cellules basales (Hajj *et al.*, 2007). Cette étude a donc démontré que l'infection bactérienne n'explique pas, à elle seule, le remodelage de l'épithélium bronchique observé chez les patients CF.

L'hypothèse d'une implication de la composante inflammatoire exogène à l'épithélium bronchique n'étant pas exclue dans les résultats obtenus par Hajj *et al.*, nous avons étudié le processus de régénération de l'épithélium CF dans un modèle *in vitro* de culture en interface air-liquide afin de nous affranchir, non seulement de la composante infectieuse, mais également de la composante inflammatoire exogène. Nos résultats montrent que dans ce contexte, la régénération de l'épithélium bronchique CF est retardée. En effet, la quantification du nombre de cellules exprimant le facteur de transcription FOXJ1 montre que le nombre de ces cellules est

significativement plus élevé dans les cultures des cellules épithéliales non-CF que dans les cultures des cellules épithéliales CF au même stade de la culture, soit au stade J15, lorsque les cellules commencent à se différencier. Le facteur de transcription FOXJ1 est particulièrement impliqué dans la régulation de la différenciation et dans le maintien de l'état différencié des cellules ciliées. Ce membre de la famille winged-helix/forkhead est ainsi détecté dans les cellules épithéliales avant l'apparition des premiers cils, et reste exprimé dans les cellules ciliées différenciées exprimant la tubuline $\beta 4$ (Blatt *et al.*, 1999). Ainsi, le déficit en cellules exprimant FOXJ1 au stade J15 de la culture des cellules épithéliales CF indique, soit un nombre moins important de cellules en cours de différenciation ciliée, soit un nombre moins important de cellules épithéliales déjà différenciées en cellules ciliées. La quantification du nombre de cellules exprimant FOXJ1 dans les cultures au stade J30 montrant qu'il n'y a pas de différence entre les cultures de cellules épithéliales CF et non-CF, nos résultats suggèrent donc qu'il y a bien un retard dans la différenciation cellulaire pour les cellules épithéliales CF. Ce résultat est totalement concordant avec le travail réalisé par Hajj *et al.*, en 2007, rapportant un retard de régénération de l'épithélium bronchique CF dans le modèle de xénotransgreffe dans la souris nude (Hajj *et al.*, 2007). Ces données suggèrent donc que ni l'infection bactérienne ni l'inflammation bronchique ne sont responsables du retard de régénération observé pour les cellules issues de patients CF. Ce phénomène de retard de régénération de l'épithélium bronchique chez les patients CF pourrait avoir deux conséquences importantes : d'une part, l'épithélium CF ne restaurerait pas assez rapidement ses fonctions de défense comme la clairance mucociliaire et la sécrétion de molécules antibactériennes après lésion épithéliale, et d'autre part, la susceptibilité de l'épithélium à une infection bactérienne serait accrue. En effet, des travaux du laboratoire ont montré que, durant sa réparation, l'épithélium bronchique expose des récepteurs qui seront reconnus par certaines bactéries pathogènes comme *P. aeruginosa* et *H. influenzae* (Plotkowski *et al.*, 1996; de Bentzmann *et al.*, 1996a; de Bentzmann *et al.*, 1996b). Ces bactéries vont en outre produire des facteurs de virulence bactériens qui vont augmenter la perméabilité de l'épithélium de surface (Azghani, 1996; Virkola *et al.*, 1996). Ainsi, plus la régénération de l'épithélium bronchique est lente, plus sa susceptibilité à l'infection bactérienne va être accrue.

Nos résultats montrent également que l'épithélium bronchique régénéré à partir des cellules CF en culture en IAL ne présente pas de différence significative du nombre de cellules caliciformes, par rapport à un épithélium régénéré à partir de cellules non-CF. Plusieurs études non quantitatives ont décrit une hyperplasie des cellules caliciformes dans l'épithélium bronchique des patients CF (Hauber *et al.*, 2004; Bedrossian *et al.*, 1976). Cependant, des conclusions inverses ont été

rapportées par Danel *et al.*, au niveau de brossages nasaux (Danel *et al.*, 1996) et par Voynow *et al.*, dans des tissus bronchiques CF (Voynow *et al.*, 2005) De plus, il a été récemment montré que le nombre de cellules caliciformes, mises en évidence par leur expression de la mucine MUC 5AC est similaire dans les polypes nasaux CF et non CF (Martinez-Anton *et al.*, 2006). Il est important de noter que la plupart des tissus CF utilisés pour les études de quantification du nombre de cellules caliciformes et d'expression des mucines ont été obtenus chez des patients CF infectés et inflammés à différents stades de la maladie, compromettant la comparaison avec les patients contrôles non-CF. Nos résultats sont concordants avec plusieurs études (Danel *et al.*, 1996 ; Hubeau *et al.*, 2001), et en particulier avec les travaux de Sturgess et Imries qui ont rapporté que le nombre de cellules caliciformes n'est pas modifié dans les voies aériennes de fœtus humains CF non infectés (Sturgess et Imrie, 1982). En outre, nos résultats sont similaires aux données de Hajj *et al.*, rapportant que, dans le modèle de xénogreffe dans la souris nude, le nombre de cellules caliciformes est équivalent dans les greffons portant des cellules non-CF et des cellules CF bien qu'une composante inflammatoire soit présente, mais de façon similaire pour les deux types de greffons (Hajj *et al.*, 2007). La composante inflammatoire semble donc jouer un rôle majeur dans l'hyperplasie des cellules caliciformes. En effet, il a été rapporté une corrélation entre l'inflammation, en particulier le pourcentage de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire, et l'hyperplasie des cellules mucipares chez les patients souffrant de bronchite chronique (Spurzem *et al.*, 1991). En outre, Foster *et al.* ont montré, en 2010, que l'élastase du neutrophile entraîne une hyperplasie mucipare au niveau des voies aériennes (Foster *et al.*, 2010). Enfin, il a été très récemment rapporté, chez la souris, une hyperplasie des cellules caliciformes en réponse à l'IL-13, médiateur important de l'asthme (Turner *et al.*, 2010). Ces données, ainsi que les résultats de nos travaux, suggèrent que l'hyperplasie mucipare couramment observée chez les patients CF, est liée à l'environnement inflammatoire et infectieux inhérent à la pathologie. Cet environnement étant absent dans le modèle de culture en IAL que nous avons utilisé, nous n'observons pas d'hyperplasie des cellules caliciformes dans les cultures réalisées à partir de cellules épithéliales CF.

Nos travaux ont, de plus, mis en évidence un nombre significativement plus important de cellules exprimant la CK13 dans les cultures de cellules épithéliales CF que dans les cultures de cellules épithéliales non-CF au stade J30 de la régénération, montrant le développement d'une hyperplasie des cellules basales. Ce résultat est concordant avec les données de la littérature rapportant une hyperplasie des cellules basales dans l'épithélium bronchique des patients CF (Brézillon *et al.*, 1997 ; Voynow *et al.*, 2005) ainsi que des patients souffrant de pathologies

respiratoires inflammatoires comme la bronchite chronique (Polosukhin, 2001). La régénération de l'épithélium bronchique à partir de cellules épithéliales CF dans le modèle *in vivo* de xéno greffe dans la souris nude a également mis en évidence ce phénomène d'hyperplasie des cellules basales (Hajj *et al.*, 2007). Cependant, le modèle de culture *in vitro* des cellules épithéliales bronchiques en IAL étant dépourvu de contexte inflammatoire exogène, nos résultats suggèrent que l'hyperplasie des cellules basales observée chez les patients CF n'est pas entièrement liée à l'inflammation tissulaire inhérente à la pathologie.

L'hyperprolifération cellulaire est généralement associée à la pathologie de la CF (Leigh *et al.*, 1995 ; Voynow *et al.*, 2005) ainsi qu'à d'autres pathologies respiratoires inflammatoires (Chilosi *et al.*, 2002), où le compartiment prolifératif a été identifié au niveau des cellules basales épithéliales. Cette hyperprolifération cellulaire a également été rapportée par Hajj *et al.*, en 2007, lors de l'analyse de la régénération de l'épithélium bronchique CF. Dans cette étude *in vivo*, l'hyperprolifération cellulaire est précoce, dès 5 jours de greffe, puis disparaît au cours de la pseudostratification et de la différenciation épithéliale (Hajj *et al.*, 2007). Dans notre étude utilisant le modèle de culture des cellules épithéliales en IAL, un pic de prolifération cellulaire est observé au stade J5 dans les cultures non-CF, et au stade J15 dans les cultures CF. Cependant, aucune hyperprolifération des cellules CF ne peut être détectée au cours de la régénération, le nombre de cellules exprimant l'antigène Ki-67 au stade J15 dans les cultures de cellules CF n'étant pas différent du nombre de cellules Ki-67 positives au stade J5 dans les cultures de cellules non-CF. Cette observation suggère que le contexte inflammatoire présent chez les patients CF ou souffrant de pathologies respiratoires chroniques, ainsi que dans le modèle de régénération de l'épithélium bronchique dans la souris nude est, au moins en partie, responsable de l'hyperprolifération cellulaire observée au niveau de l'épithélium bronchique.

Il est cependant intéressant de noter que, contrairement à ce qui a pu être observé dans le modèle *in vivo* de xéno greffe (Hajj *et al.*, 2007), la prolifération cellulaire est retardée dans les cultures de cellules épithéliales CF, en comparaison des cultures de cellules épithéliales non-CF. La prolifération cellulaire, phénomène général de la réparation/régénération tissulaire, étant un préambule à la redifférenciation cellulaire, le retard de prolifération cellulaire observée dans le modèle utilisé pour notre étude pourrait expliquer le retard de régénération de l'épithélium bronchique CF.

Enfin, notre étude montre que, de façon similaire à ce qui est observé dans le modèle de régénération de l'épithélium bronchique dans la souris nude (Hajj *et al.*, 2007), l'épithélium CF régénéré au stade J30 en culture en IAL est remodelé. Non seulement il présente une hyperplasie des cellules basales, mais il est également significativement plus haut que l'épithélium non-CF régénéré au même stade. Nos résultats sont également concordants avec les données présentées par Voynow *et al.*, en 2005, qui ont rapporté que, dans les tissus pulmonaires inflammatoires et infectés CF obtenus lors de transplantations, la hauteur de l'épithélium bronchique CF est deux fois supérieure à celle de l'épithélium non-CF (Voynow *et al.*, 2005). Tiddens *et al.*, ont également mis en évidence une augmentation de la hauteur de l'épithélium CF par rapport à l'épithélium de patients atteints de BPCO, maladie respiratoire hautement inflammatoire (Tiddens *et al.*, 2000). Enfin, la hauteur de l'épithélium bronchique n'est pas différente entre les patients asthmatiques et les sujets sains (Shebani *et al.*, 2005). Ces données de la littérature, associées à nos propres observations, suggèrent que l'augmentation de la hauteur de l'épithélium bronchique chez les patients CF n'est pas liée au contexte inflammatoire présent chez ces patients, mais semblerait être plutôt liée au défaut même de CFTR.

En conclusion de la première partie de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence, qu'en dehors de tout contexte infectieux et inflammatoire exogène, la régénération de l'épithélium bronchique CF est anormale, retardée, et aboutit à la reconstitution d'un épithélium remodelé, ce qui semble suggérer que le défaut même de CFTR serait à l'origine du défaut de régénération de l'épithélium bronchique chez les sujets CF.

V. Remodelage de l'épithélium CF/ non CF

A. Modèles de remodelage de l'épithélium CF / non CF

Le remodelage de l'épithélium bronchique est un phénomène majeur qui peut être très fréquemment observé, en particulier chez les patients souffrant de pathologies inflammatoires chroniques comme la mucoviscidose. Chez ces patients, il est fréquent d'observer des zones épithéliales présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires ou une métaplasie malpighienne.

Cependant, la caractérisation moléculaire de ces remodelages ainsi que leur impact sur la fonctionnalité épithéliale ont été très peu étudiés. Ils font l'objet de la deuxième partie de ce travail de thèse.

1. Modèle de remodelage aboutissant à une hyperplasie des cellules sécrétoires

Dans le but d'étudier le remodelage des épithélia bronchiques non CF et CF, nous avons mis au point un modèle de remaniement épithélial aboutissant à la formation d'une hyperplasie mucipare. Ce remodelage a été induit par addition d'interleukine 13 (IL-13) dans le milieu de culture de différenciation. En effet, il a été décrit dans la littérature que l'IL-13 augmentait le nombre de cellules sécrétoires dans les cultures en IAL (Laoukili *et al.*, 2001).

Dans ce modèle de génération d'hyperplasie mucipare, nous avons observé les mêmes stades de régénération que lors d'une régénération normale.

Au stade J0, jour du passage en air liquide, seule une monocouche cellulaire est mise en évidence par coloration à l'hématoxyline de Harris. A l'issus de 5 jours de culture (stade J5), nous avons la formation d'une métaplasie malpighienne qui est une structure transitoire. Puis, nous observons un stade de pseudostratification cellulaire à 15 jours de culture (stade J15). Enfin, à 30 jours de culture (stade J30), nous avons un épithélium bronchique présentant des zones d'hyperplasies sécrétoires.

Nous avons caractérisé les épithélia obtenus au stade J30 (Figure 11). Nous avons mis en évidence par coloration histologique BA-PAS (A) la présence d'un grand nombre de cellules sécrétoires, également identifiées par un marquage de la mucine MUC5AC en immunohistochimie (B).

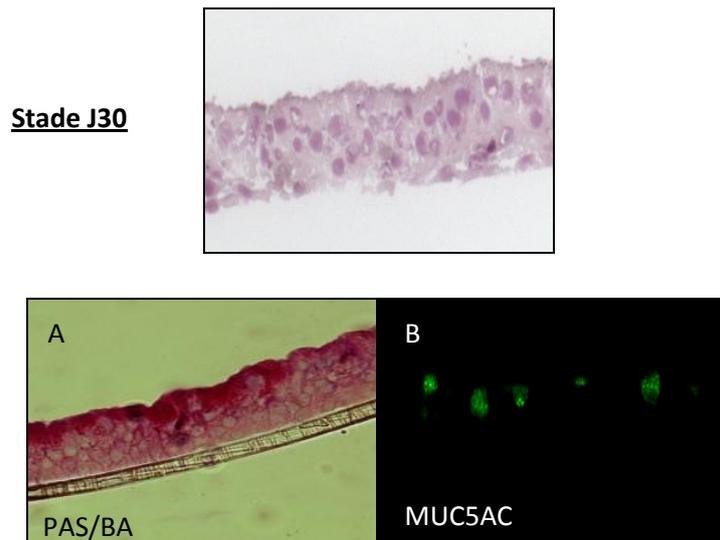


Figure 11: Caractérisation de l'hyperplasie sécrétoire non CF au stade J30 de culture en IAL

Mise en évidence des cellules sécrétoires par la coloration Bleu Alcian - PAS (A) et par détection immunohistochimique de MUC5AC (B) sur des sections de culture en IAL au stade J30 en présence d'IL13. (Objectif x20)

2. Modèle de remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

Nous avons également mis au point un modèle de remodelage épithélial aboutissant à la formation d'un épithélium bronchique de type malpighien. L'acide rétinoïque a été décrit comme un facteur essentiel à la différenciation de l'épithélium respiratoire (Kaartinen *et al.*, 1993). Nous avons donc diminué de moitié sa concentration dans le milieu de culture de différenciation afin d'obtenir une métaplasie malpighienne stable, une absence totale d'acide rétinoïque aboutissant à une métaplasie malpighienne à un stade très avancé.

Nos résultats (Figure 12) montrent que l'épithélium obtenu à J30 de culture en IAL dans ces conditions est pluristratifié, avec la présence de ponts d'union caractéristiques entre les cellules épithéliales (Figure 5A) ; De plus, nous pouvons observer que l'ensemble des cellules expriment la CK13 (B) ainsi que la transglutaminase 1, spécifique des cellules en cours de différenciation squameuse (C).

Stade J30

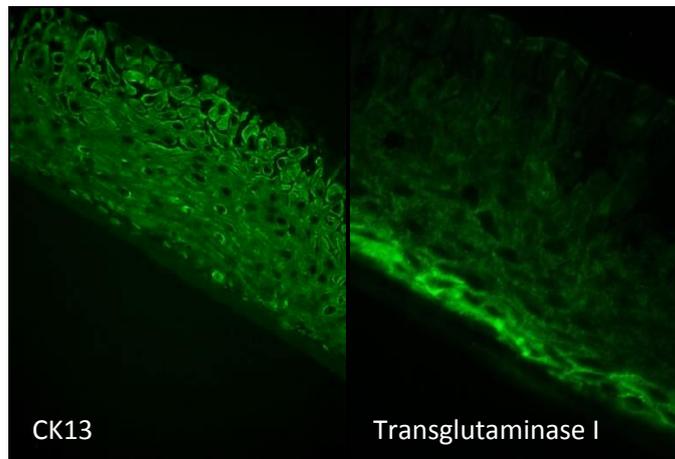
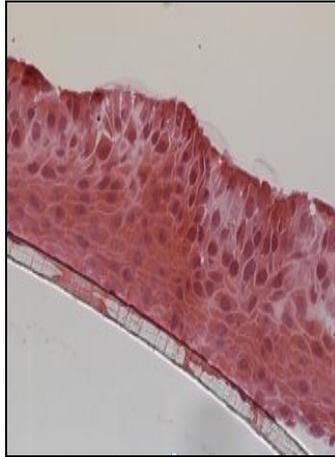


Figure 12 : Caractérisation de la métaplasie malpighienne non CF au stade J30 de culture en IAL

Détection Immunohistochimique de la CK13 (objectif x20) et de la transglutaminase I (objectif x40) sur des sections de culture en IAL au stade J30 de culture en présence d'une concentration diminuée d'acide rétinoïque.

B. Propriétés électrophysiologiques des épithélia non CF et CF régénérés et remodelés

La sécrétion de chlore est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques de l'épithélium bronchique, notamment dans la clairance mucociliaire et les propriétés défensives vis à vis des pathogènes. Les modifications de la sécrétion des ions chlorures, caractéristiques de la pathologie de la mucoviscidose, ont un impact sur les propriétés rhéologiques du mucus. Nous avons examiné les conséquences du remodelage épithélial sur les transports ioniques en mesurant les

courants de court circuit en chambre de Ussing, ainsi qu'en mesurant la résistance transépithéliale des cultures non CF et CF, remodelées ou non après 30 jours de culture en IAL.

1. Propriétés bioélectriques des épithélia non CF

a) *Mesure du courant de court-circuit*

Le courant de court-circuit (ΔI_{sc}) est mesuré avant toute stimulation puis après l'ajout successif de l'amiloride, inhibiteur des canaux sodiques ENac, puis de la forskoline, activateur du canal CFTR par augmentation d'AMPc intracellulaire.

La valeur mesurée en présence de l'amiloride appliquée au pôle apical est de $-2,3 \pm 1,5 \mu A/cm^2$ pour les cultures non remodelées. L'application de la forskoline indique une valeur de $2,7 \pm 1,8 \mu A/cm^2$. Dans ces conditions, nous avons pu montrer que le canal ENac ainsi que le canal CFTR sont fonctionnels (Figure13).

Dans le cas des cultures présentant une hyperplasie de cellules sécrétoires, la mesure du courant de court circuit indique une valeur de $-17 \pm 1,8 \mu A/cm^2$ après stimulation par l'amiloride, et le courant de court-circuit, après application de la forskoline, est de $3,8 \pm 2,7 \mu A/cm^2$ (Figure 13).

L'analyse du courant de court-circuit dans le cas d'un épithélium présentant une métaplasie squameuse indique une valeur de $-2,9 \pm 2,2 \mu A/cm^2$ après stimulation à l'amiloride et de $-0,6 \pm 2,4 \mu A/cm^2$ après application de la forskoline (Figure 13).

La comparaison des valeurs obtenues suite à la stimulation par l'amiloride montre une augmentation de la valeur du courant de court-circuit dans les épithélia présentant une hyperplasie sécrétoire en comparaison des valeurs obtenues pour un épithélium non remodelé ($p < 0,05$). La réponse des épithélia de type squameux à la stimulation par la forskoline est fortement diminuée bien que la différence reste non significative, par rapport à la réponse d'un épithélium non remanié.

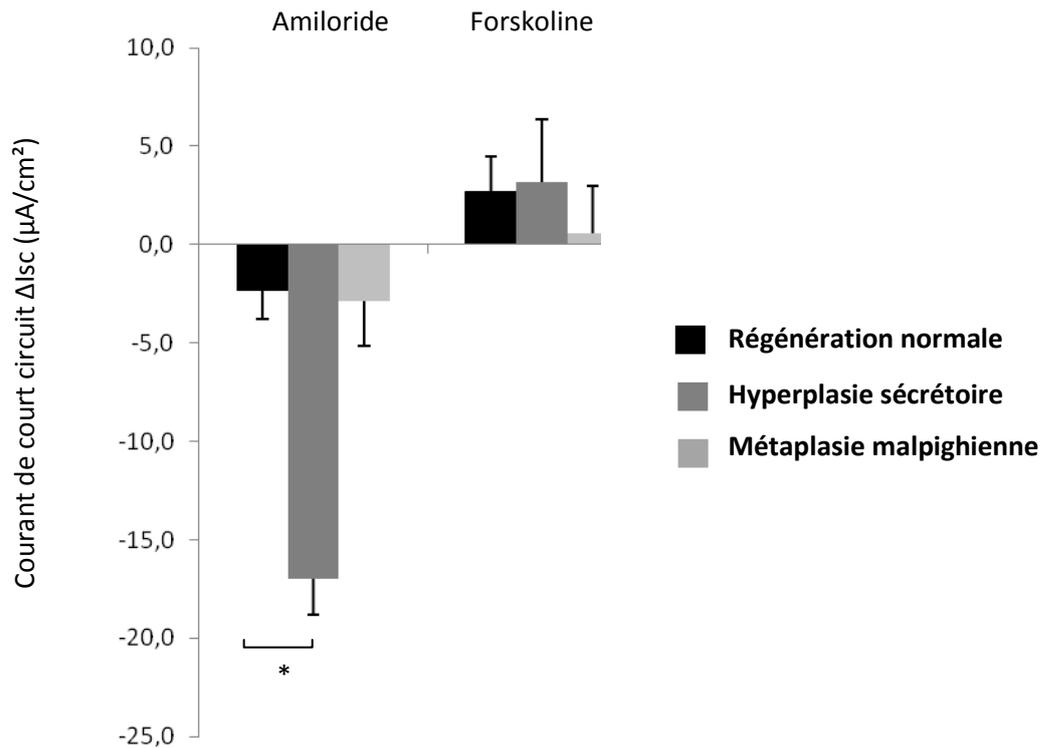


FIGURE 13 : Mesure du courant de court-circuit ΔI_{sc} des épithélia non CF non remodelés et remodelés à J30 de culture en IAL

Mesure en chambre de Ussing après addition apicale d'amiloride (10^{-4} M) puis de forskoline ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M).

b) Mesure de la résistance transépithéliales

En chambre de Ussing, la résistance transépithéliale mesurée dans le cas d'un épithélium non remodelé est de $260,1 \pm 12,2 \Omega/\text{cm}^2$. Dans les cultures présentant une métaplasie de type malpighienne cette valeur est de $252,1 \pm 26,4 \Omega/\text{cm}^2$. Il est à noter que la résistance transépithéliale mesurée dans les cultures présentant une hyperplasie sécrétoire est de $169,9 \pm 19 \Omega/\text{cm}^2$, significativement plus basse que la valeur obtenue par un épithélium non remodelé. ($p < 0,05$) (Figure 14).

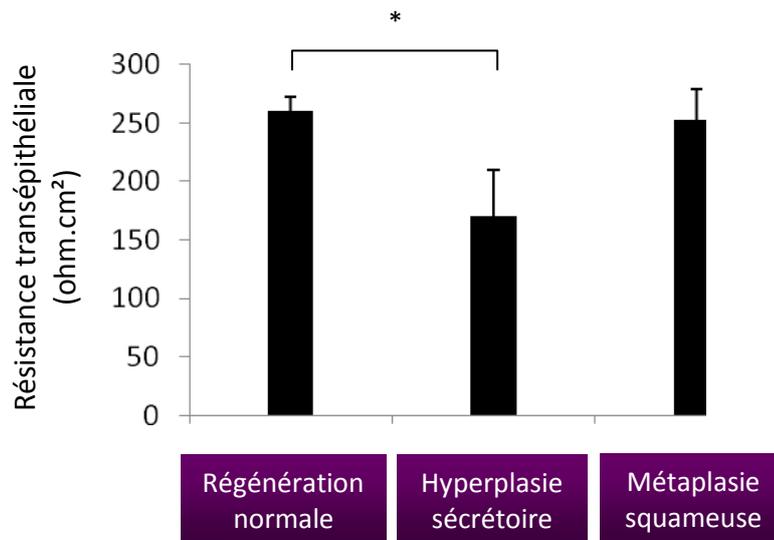


Figure 14 : Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia bronchiques humains non CF non remodelés et remodelés au stade J30 de culture en IAL.

Les résistances transépithéliales ont été mesurées en chambre de Ussing après imposition d'un voltage continu de 30mV.

2. Propriété bioélectriques des épithélia CF

a) *Mesure du courant de court circuit*

La mesure du courant de court circuit des épithélia CF non remodelés indique une valeur de $-13,5 \pm 7,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ suivi d'une réponse négative à la stimulation par la forskoline (Figure 15).

La stimulation par l'amiloride induit un courant de court-circuit significativement ($p < 0,05$) moins important ($-4,3 \pm 1,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) dans un épithélium présentant une hyperplasie sécrétoire et dans un épithélium de type malpighien ($-2,9 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}$) que dans un épithélium non remanié (Figure 15).

L'analyse des courants de court-circuit dans le cas des épithélia CF remodelés n'indique aucune réponse significativement différente, par rapport à un épithélium CF non remodelé suite à la stimulation des cellules épithéliales par la forskoline (Figure 15).

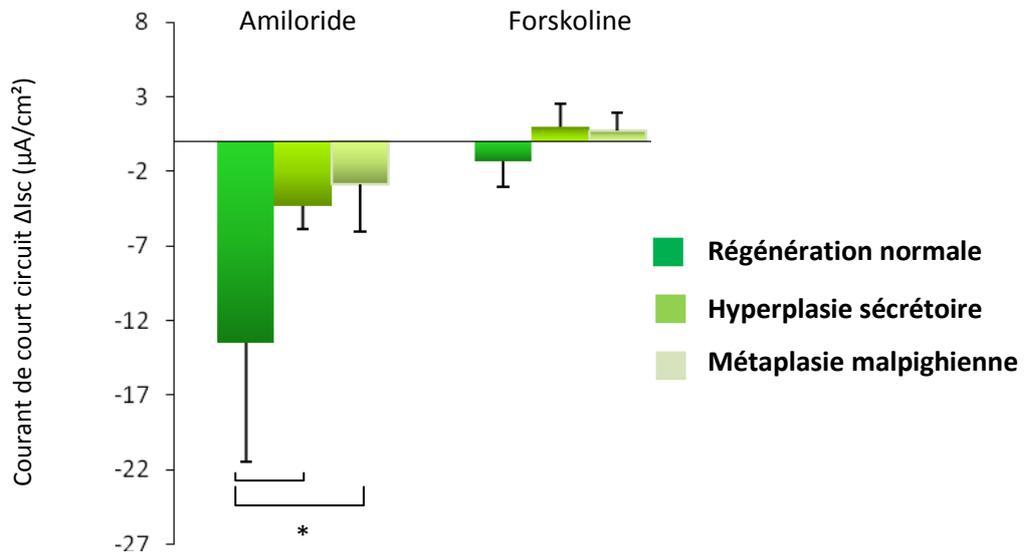


FIGURE 15 : Mesure du courant de court-circuit ΔI_{sc} des épithélia CF non remodelés et remodelés à J30 de culture en IAL.

Mesure en chambre de Ussing après addition apicale d'amiloride (10^{-4} M) puis de forskoline ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M).

b) Mesure de la résistance transépithéliales

La mesure de la résistance transépithéliale des cultures CF non remodelées montre une valeur de $398 \pm 87 \Omega/\text{cm}^2$. La valeur de la résistance transépithéliale des épithélia présentant une hyperplasie sécrétoire n'est pas significativement différente, à l'inverse de celle des épithélia présentant une métaplasie squameuse où la RTE est plus faible que la RTE des épithélia non remodelés CF ($p < 0,05$) (Figure 16).

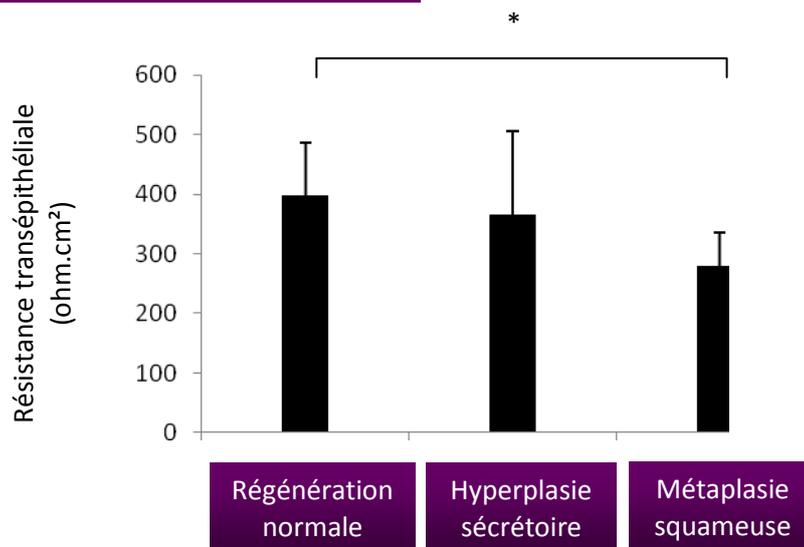


FIGURE 16 : Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia bronchiques humains CF non remodelés et remodelés au stade J30 de la culture en IAL.

Les résistances transépithéliales ont été mesurées par la chambre de Ussing après imposition d'un voltage continu de 30 mV.

3. Propriétés électrophysiologiques des épithélia non CF vs CF

L'analyse des variations du courant de court-circuit ΔI_{sc} des épithélia CF et non CF non remodelés au stade J30 indique des différences significatives suite à la stimulation par l'amiloride, avec une valeur 5 fois plus basse ($p < 0,05$) pour l'épithélium CF (Figure 17).

D'autre part, il est intéressant de noter que les valeurs ΔI_{sc} obtenues dans le cas de d'un épithélium non remodelé CF suite à la stimulation par l'amiloride, sont similaires aux valeurs mesurées pour un épithélium non CF présentant une hyperplasie de cellules sécrétoires.

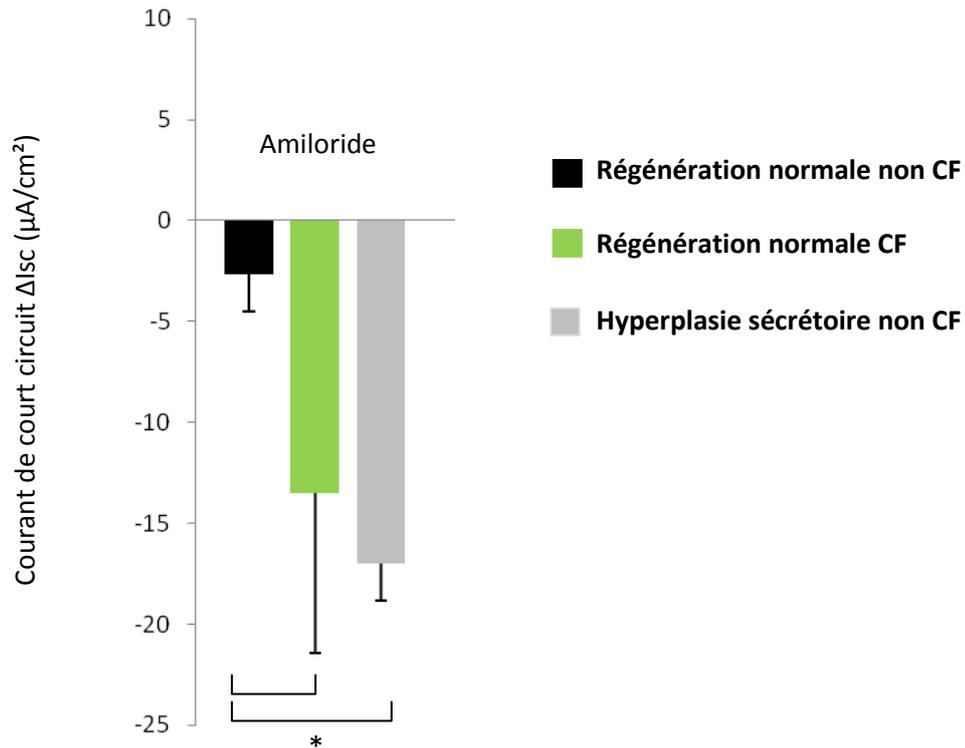


FIGURE 17 : Courant de court circuit ΔI_{sc} , de l'épithélium bronchique humain CF / non remodelé et non CF présentant une hyperplasie sécrétoire au stade J30 de culture en IAL.

Mesure réalisée en chambre de Ussing après addition apicale d'amiloride ($10^{-4}M$).

La mesure des résistances transépithéliales dans les cultures en IAL, montre que les épithélia non remodelés CF ont des valeurs 1,5 fois plus élevés que les cultures non remodelées non CF ($p < 0,05$).

Il en est de même pour les épithélia présentant une hyperplasie sécrétoire, avec une différence d'un facteur de l'ordre de 1,98 ($p < 0,05$) (Tableau 1).

$\Omega.cm^2$	Epithélium non remodelé	Hyperplasie sécrétoire	Métaplasie malpighienne
NON CF	260 ± 12	169 ± 46	252 ± 26
CF	398 ± 87	336 ± 138	278 ± 56

Tableau 1 : Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia non CF et CF, non remodelés et remodelés au stade J30 de culture en IAL.

Mesures réalisées en chambre de Ussing après imposition d'un voltage continu de 30mV.

C. Propriétés de défense antibactérienne des épithélia régénérés et remodelés non CF et CF

L'épithélium bronchique humain est normalement capable de se défendre vis-à-vis des pathogènes. En effet, les cellules épithéliales respiratoires sécrètent de nombreux facteurs intervenant dans la défense antibactérienne. Afin d'étudier cette capacité de défense, nous avons déterminé la capacité bactéricide des sécrétions des cellules épithéliales bronchiques, au cours de la régénération et du remodelage des épithélia non CF et CF. Cette étude a été réalisée à partir de prélèvements issus de quatre patients CF et de quatre patients non CF. Les sécrétions apicales, ont été collectées aux quatre différents stades de régénération, puis mis en contact avec la souche bactérienne de *S. aureus*.

La survie de *S. aureus* a été évaluée après dénombrement des bactéries qui ont survécu suite à l'exposition aux sécrétions des cultures de cellules épithéliales CF et non CF.

1. Capacité de défense des épithélia non CF

a) Propriétés défensives des épithélia non CF non remodelés

Nous avons déterminé, par des tests de bactéricidie, la capacité de défense antibactérienne des cellules épithéliales au stade J0, jour du passage en condition air-liquide, en analysant la survie de *S. aureus*.

Le dénombrement des colonies bactériennes, après incubation des sécrétions épithéliales avec la suspension bactérienne, indique une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de bactéries par rapport aux résultats obtenus avec une solution de milieu de culture contrôle n'ayant pas été en contact avec les cellules épithéliales (Figure 18).

Nous avons ensuite évalué l'évolution de cette défense antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* au cours des différentes étapes de la régénération normale de l'épithélium bronchique non CF. Cette analyse a été réalisée de manière comparative par rapport à la survie bactérienne à J0 (Figure 19).

L'analyse de la survie bactérienne dans le modèle de régénération épithéliale non CF montre que la défense antibactérienne est mise en place progressivement durant la reconstitution de

l'épithélium bronchique. Après une étape J5 au cours de laquelle, les cellules ne semblent pas produire de molécules bactéricides, la survie bactérienne diminue significativement de 51,8% au stade J15 ($p < 0,05$) et de 86% au stade J30 ($p < 0,05$).

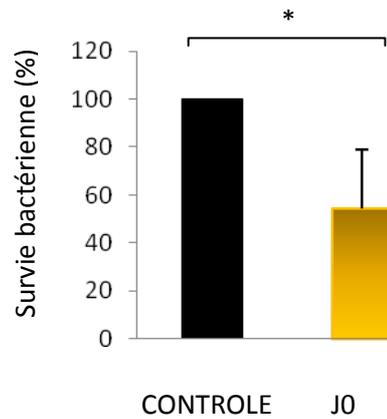


Figure 18 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non remodelées non CF au stade J0.

Comptage des colonies bactériennes après incubation des bactéries avec les surnageants de culture au stade J0; le contrôle a été réalisé avec un milieu n'ayant pas été en contact avec les cellules. La survie bactérienne a été rapportée à la valeur contrôle et exprimée en pourcentage (* $p < 0,05$).

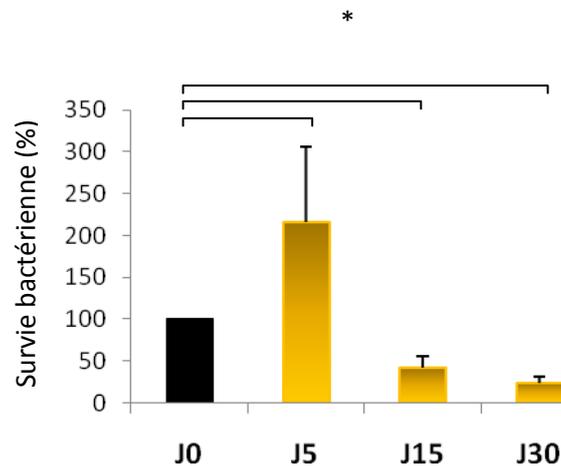


Figure 19 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non remodelées non CF au cours de la régénération

Comptage des colonies bactériennes après incubation des bactéries avec les surnageants de culture aux stades J0, J5, J15 et J30 ; la survie bactérienne a été rapportée à la valeur obtenue à J0 et exprimée en pourcentage (* $p < 0,05$).

b) Propriétés des épithélia non CF remodelés

Nous avons par la suite, testé la capacité de défense antibactérienne des cellules épithéliales non CF au cours de la régénération aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires ou à une métaplasie malpighienne. Selon le même protocole, nous avons évalué les propriétés antibactériennes des sécrétions des épithélia remodelés en comparant les valeurs obtenues, à chaque étape de la régénération, aux valeurs obtenues lors de la régénération normale non CF (Figure 20).

Dans le cas de la régénération épithéliale menant à l'hyperplasie de cellules sécrétoires, l'analyse de la survie de *S. aureus* indique que la défense antibactérienne est significativement plus importante au stade J5 ($p < 0,05$) et au stade J30 ($p < 0,05$) avec respectivement un taux de survie bactérienne moindre de 50 % et 80 % par rapport aux taux observés dans le cas de la régénération normale de l'épithélium bronchique.

Durant le remodelage épithélial aboutissant à la métaplasie squameuse, la survie bactérienne ne présente pas de différence significative durant les deux premières étapes de la régénération, par rapport aux résultats obtenus au cours de la régénération normale. Cependant, il y a une diminution significative de la capacité défensive de 62% à J30 ($p < 0,05$) en comparaison des valeurs obtenues dans le cas d'un épithélium bien différencié.

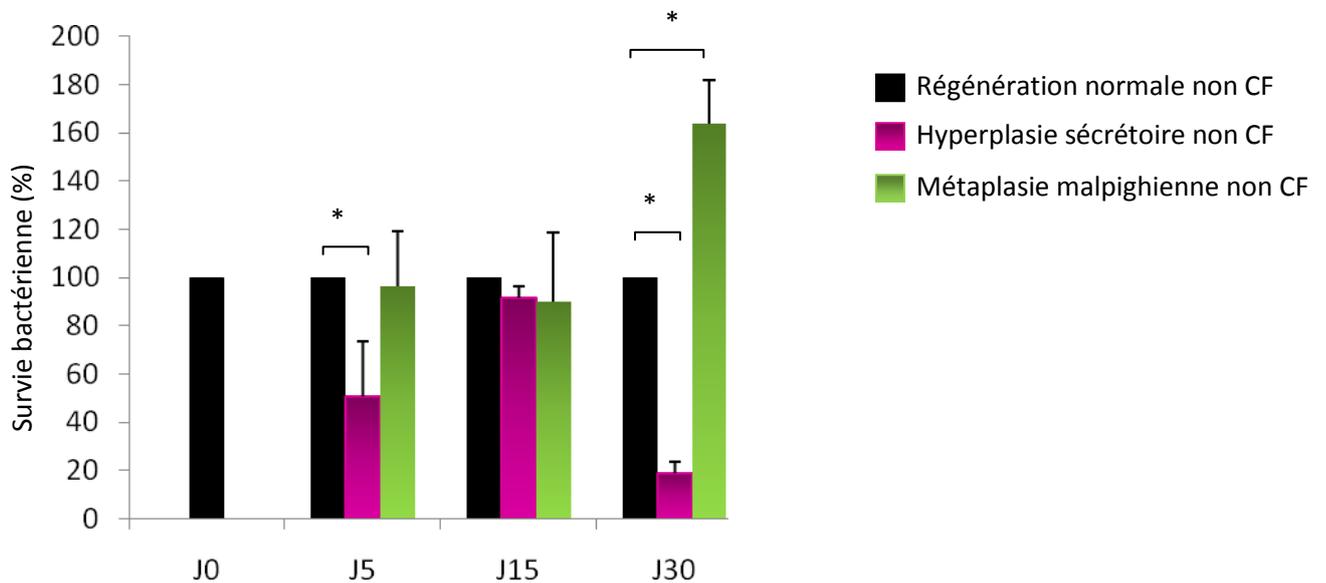


Figure 20 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non CF au cours du remodelage de l'épithélium bronchique.

Les colonies bactériennes ont été comptées après incubation des bactéries avec les surnageants de cultures aux stades J0, J5, J15 et J30 ; Les valeurs ont été rapportées aux valeurs obtenues au cours de la régénération normale à chaque stade et exprimées en pourcentage (* $p < 0,05$).

2. Capacité de défense des épithélia CF

a) Propriétés défensives des épithélia CF non remodelés

Nous avons poursuivi notre étude en déterminant si les propriétés défensives vis-à-vis de *S. aureus* sont altérées durant la régénération normale d'un épithélium bronchique CF. Nous avons donc évalué la survie bactérienne de *S. aureus* au cours des différents étapes de la régénération normale CF en comparant les valeurs obtenues, à chaque stade, avec les valeurs obtenues au cours de la régénération normale non CF (Figure 21).

Nos résultats montrent que, hormis à J5 où l'épithélium CF semble être apte à se défendre avec une diminution significative ($p < 0,05$) de la survie bactérienne de 64%, les sécrétions des cellules épithéliales CF montrent un défaut d'activité bactéricide de 144% à J15 ($p < 0,05$) et 75% à J30 ($p < 0,05$).

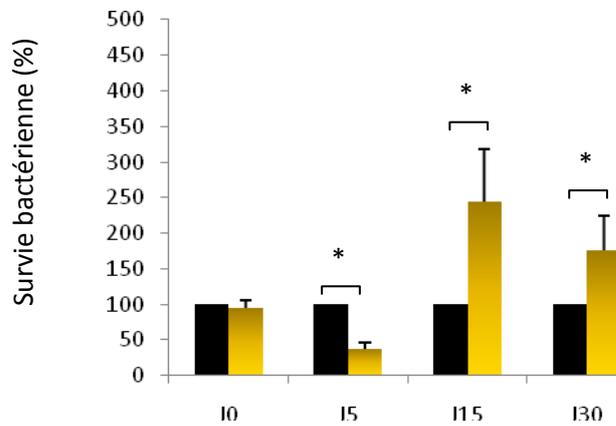


Figure 21 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures non remodelées CF au cours de la régénération.

Les colonies bactériennes ont été comptées après incubation des bactéries avec les surnageants de cultures aux stades J0, J5, J15 et J30 ; Les valeurs ont été rapportées aux valeurs obtenues au cours de la régénération normale non CF à chaque stade, et exprimées en pourcentage (* $p < 0.05$).

b) Propriétés défensives des épithélia CF remodelés

Nos résultats (Figure 22) montrent que hormis à J5 où l'épithélium CF semble être apte à se défendre avec une diminution significative ($p < 0,05$) de la survie bactérienne de 75% et de 70% pour les cultures qui aboutissent à une hyperplasie mucipare et à une métaplasie malpighienne, respectivement. Les sécrétions des cellules épithéliales CF montrent un défaut d'activité bactéricide de 75% et de 70% à J15 ($p < 0,05$), et de 120% et 80% à J30 ($p < 0,05$) pour les cultures qui aboutissent à une hyperplasie mucipare et à une métaplasie malpighienne, respectivement.

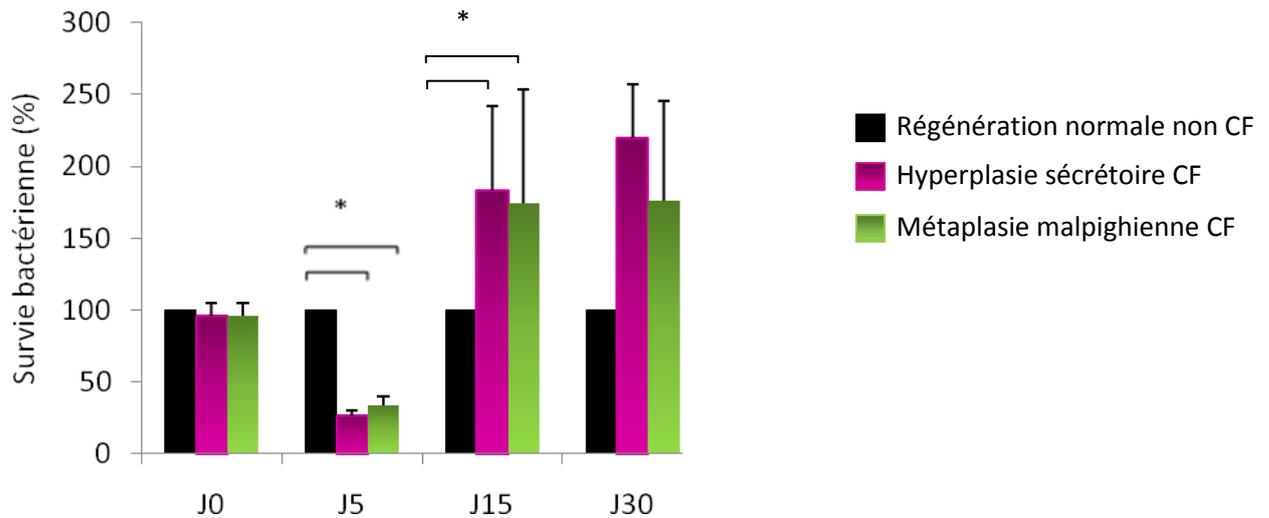


Figure 22 : Survie de *S. aureus* en contact avec les sécrétions des cultures CF au cours du remodelage de l'épithélium bronchique.

Les colonies bactériennes ont été comptées après incubation des bactéries avec les surnageants de cultures aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs ont été rapportées aux valeurs obtenues au cours de la régénération normale non CF à chaque stade et exprimées en pourcentage (* $p < 0,05$).

3. Conclusions

L'ensemble de ces résultats montre que dans un contexte exempt d'infection et d'inflammation exogène, l'épithélium bronchique humain possède des propriétés de défense antibactérienne qui s'établissent progressivement durant le processus de différenciation épithélial. Cependant, il existe un défaut dans cette défense à J5, stade où l'épithélium forme une métaplasie malpighienne transitoire. Cette défense diminue dans le contexte d'un remaniement épithélial aboutissant à la métaplasie squameuse, contrairement au remodelage aboutissant à la formation d'une hyperplasie sécrétoire où les propriétés de défense contre *S. aureus* sont plus élevées.

Dans le cas de la régénération et du remodelage CF, hormis à J5 où l'épithélium CF remodelé ou non est apte à se défendre, l'ensemble des propriétés de défenses antibactériennes vis-à-vis de *S. aureus* sont fortement diminuées y compris lors du développement d'une hyperplasie mucipare.

D. Sécrétion de facteurs antibactériens au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF

Nos résultats ont montré une modulation de la défense antibactérienne au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique, avec un défaut majeur de défense pour les cultures CF. Nous avons tenté d'identifier le facteur mis en cause dans ce phénomène en dosant la cathélicidine LL-37, le SLPI et la β -défensine dans les sécrétions des cultures non CF et CF, remodelées ou non, aux différents stades de culture.

1. Sécrétion de la cathélicidine LL-37

Dans les modèles de régénération normale et de remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF, les taux de LL-37 ont été quantifiés par dosage ELISA. L'analyse de la sécrétion de LL-37 par les cellules épithéliales CF et non CF, que ce soit au cours de la régénération normale ou lors des processus de remodelage, n'indique aucune modification significative du profil de sécrétion de ce facteur, avec en outre un taux de sécrétion extrêmement faible (Figure 23 et 24)

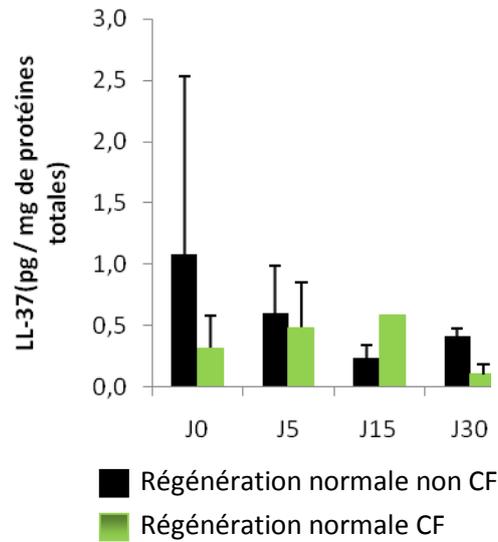


Figure 23 : Sécrétion de LL-37 au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

La sécrétion de LL-37 a été analysée par ELISA dans les surnageants de cultures non CF et CF, aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs sont exprimées en pg de LL-37 / mg de protéines totales.

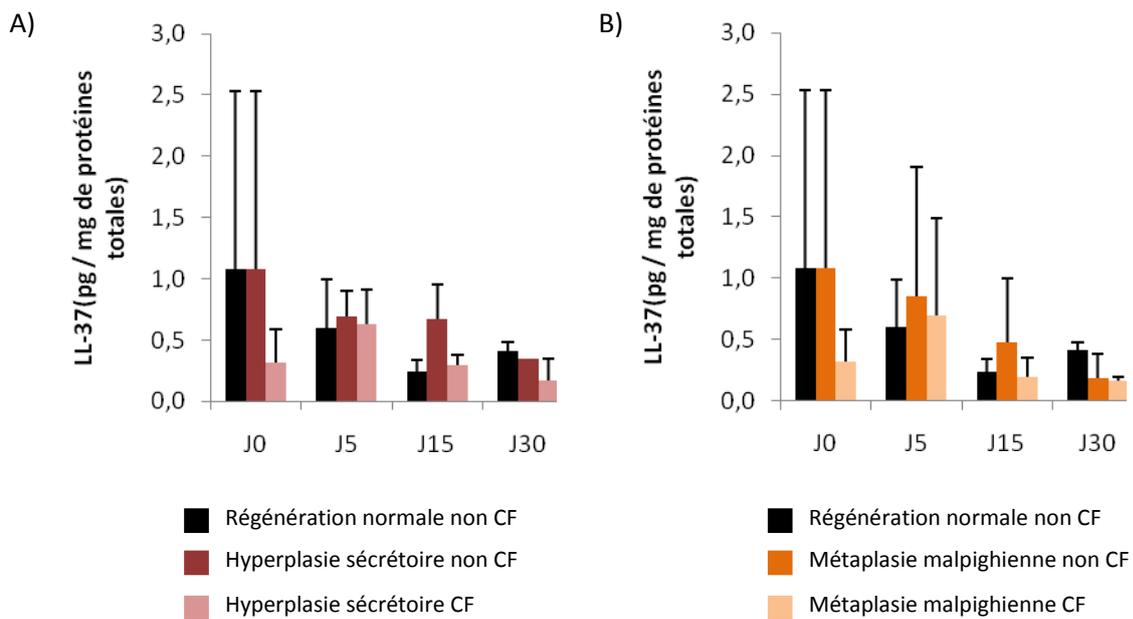


Figure 24 : Sécrétion de LL-37 au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

La sécrétion de LL-37 a été analysée par ELISA dans les surnageants de cultures non CF et CF aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires (A) ou une métaplasie malpighienne (B), aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs sont exprimées en pg de LL-37 / mg de protéines totales.

2. Sécrétion de la β -défensine

La sécrétion de la β -défensine humaine HBD-2 au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique CF et non-CF a été quantifiée par dosage ELISA dans les surnageants de cultures aux différents stades J0, J5, J15 et J30.

a) Sécrétion de la β -défensine au cours de la régénération non CF et CF

La figure 25 montre les niveaux de sécrétion de la β -défensine au cours de la régénération épithéliale normale non CF et CF.

La quantité de β -défensine sécrétée par les cellules épithéliales non CF et CF présente un pic de production au stade J15 avant une diminution importante au stade J30. Cependant, la variabilité entre chaque individu étant importante, les analyses statistiques ne permettent pas de montrer de significativité que ce soit au cours de la régénération non CF, au cours de la régénération CF, ou lorsque l'on compare les valeurs obtenues dans les cultures CF aux valeurs obtenues dans les cultures non CF (Figure 25).

b) Sécrétion de la β -défensine au cours du remodelage non CF et CF

Nous avons ensuite déterminé les niveaux de sécrétions de la β -défensine au cours du remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires dans les cultures des cellules épithéliales bronchiques non CF et CF.

Dans les cultures non CF, nous pouvons observer une augmentation significative de la production de la β -défensine entre les stades J5 et J15 ($p < 0,05$) et une diminution significative de la sécrétion entre les stades J15 et J30 ($p < 0,05$).

Dans les cultures CF, au cours du remodelage aboutissant à une hyperplasie mucipare, la mesure des niveaux de production de la β -défensine indique une augmentation significative entre les stades J0 et

J5 ($p < 0,05$) puis entre les stades J5 et J15 ($p < 0,05$) suivie d'une diminution entre les stades J15 et J30 ($p < 0,05$).

Cependant, il n'y a pas de différence significative quand à la sécrétion de la β -défensine au cours du remodelage CF ou non CF en comparaison de la régénération normale non CF à chacun des stades étudiés (Figure 26A).

Au cours du remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne dans les cultures de cellules épithéliales non CF, il n'existe aucune différence significative de la sécrétion de la β -défensine au cours des différentes étapes du processus.

Au cours du remodelage menant aboutissant à une métaplasie malpighienne dans les cultures de cellules épithéliales CF, bien qu'une augmentation importante de la sécrétion soit observée entre les stades J0 et J5, seule une différence significative entre les stades J0 et J30 peut être mesurée ($p < 0,05$). Il n'y a toutefois pas de différence significative quand à la production de la β -défensine au cours du remodelage CF ou non CF en comparaison de la régénération normale non CF à chacun des stades étudiés (Figure 26B).

c) Sécrétion de la β -défensine dans les cultures CF et non CF

Dans les modèles de culture aboutissant à la régénération ou au remodelage épithélial, les niveaux généraux de sécrétion de la β -défensine sont significativement plus importants dans les cultures de cellules épithéliales bronchiques CF que non CF ($p = 0,006$). En effet, les variations de la production de la β -défensine lors des processus de remodelage menant à une hyperplasie mucipare ou à une métaplasie malpighienne montrent une augmentation significative par rapport aux variations mises en évidence au cours de la régénération normale non CF (respectivement $p = 0,0019$ et $p = 0,0217$).

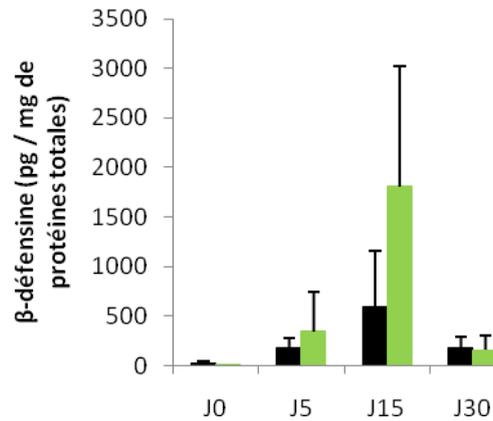


Figure 25 : Sécrétion de la β -défensine au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

La sécrétion de la β -défensine a été analysée par ELISA dans les surnageants de cultures non CF et CF, aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs sont exprimées en pg de β -défensine / mg de protéines totales.

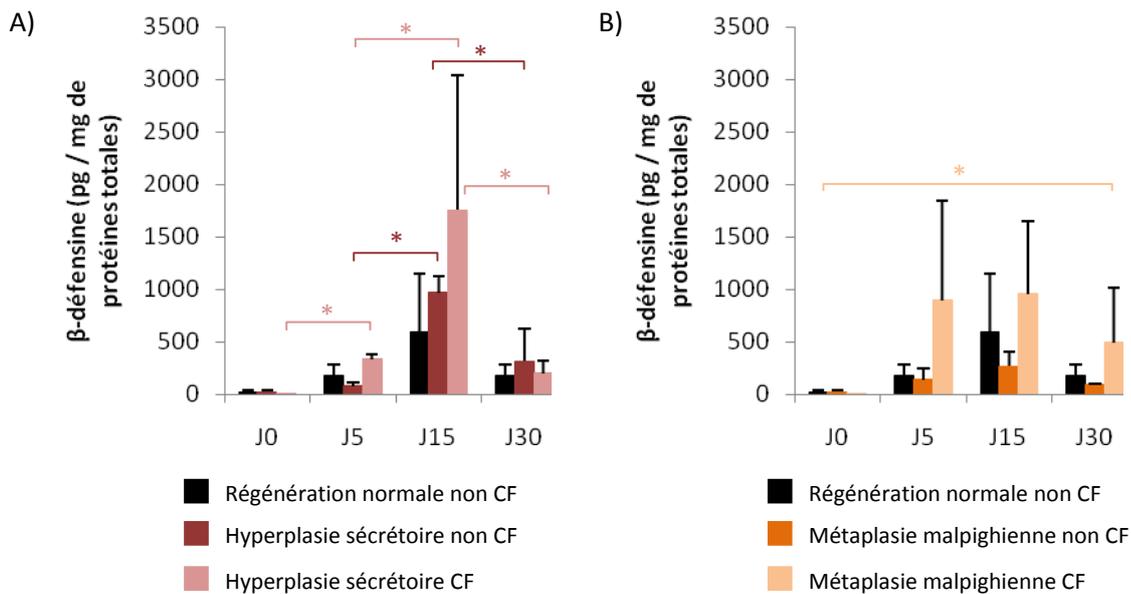


Figure 26 : Sécrétion de la β -défensine au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

La sécrétion a été analysée par ELISA dans les surnageants de cultures non CF et CF aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires (A) ou une métaplasie malpighienne (B), aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs sont exprimées en pg de β -défensine / mg de protéines totales

3. Sécrétion du SLPI

Le facteur antibactérien SLPI est la troisième protéine la plus abondante retrouvée physiologiquement chez l'homme. Le SLPI possède une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Nous nous sommes intéressés à la sécrétion de ce facteur au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

a) Sécrétion du SLPI au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération normale dans les cultures de cellules épithéliales non CF, aucune variation significative de la sécrétion du SLPI n'a pu être observée.

Au cours de la régénération normale dans les cultures de cellules épithéliales CF, les taux de sécrétion du SLPI augmentent significativement entre les stades J5 et J15 ($p < 0,05$) puis restent stables entre les stades J15 et J30 ($p < 0,05$). En outre, il est intéressant de noter une augmentation de la production du SLPI par les cellules épithéliales CF, par rapport aux cellules non CF, au stade J15 de la régénération ($p < 0,05$) (Figure 27).

b) Sécrétion du SLPI au cours du remodelage non CF et CF

Au cours de la régénération aboutissant à une hyperplasie sécrétoire dans les cultures de cellules épithéliales non CF, la sécrétion du SLPI ne présente pas de variation significative entre les stades J5 et J15 par rapport à J0 mais présente une augmentation à J30 ($p < 0,05$ par rapport au J15).

Au cours du remodelage menant à une hyperplasie sécrétoire dans les cultures de cellules épithéliales CF, les niveaux de sécrétion du SLPI présentent une augmentation significative, entre les stades J0 et J15 ($p < 0,05$) puis une diminution significative entre les stades J15 et J30 ($p < 0,05$).

Lorsque l'on compare les taux de production de SLPI dans les cultures CF et non CF aboutissant à une hyperplasie des cellules sécrétoires, avec les taux de sécrétion de SLPI dans les cultures des cellules non CF aboutissant à un épithélium mucociliaire bien différencié, pour chaque stade de régénération étudiée, aucune variation n'est observée pour les cultures de cellules non CF, mais une différence significative au stade J15 ($p < 0,05$) est décelée pour les cultures de cellules CF (Figure 28A).

Au cours du remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne dans les cultures de cellules épithéliales non CF, les niveaux de production SLPI présentent une augmentation entre les stades J0 et J30. Dans les cultures de cellules épithéliales CF nous assistons à une augmentation significative entre J0 et J5 ($p < 0,05$) puis entre J5 et J15 ($p < 0,05$) de la sécrétion de SLPI.

Lorsque l'on compare les taux de production du SLPI dans les cultures CF et non CF aboutissant à une métaplasie malpighienne, avec les taux de sécrétion de SLPI dans les cultures de cellules non CF aboutissant à un épithélium mucociliaire bien différencié, pour chaque stade de régénération étudié, aucune variation significative n'est observée pour les cultures de cellules non CF, mais une différence significative au stade J15 ($p < 0,05$) est décelée pour les cultures de cellules CF (Figure 28B).

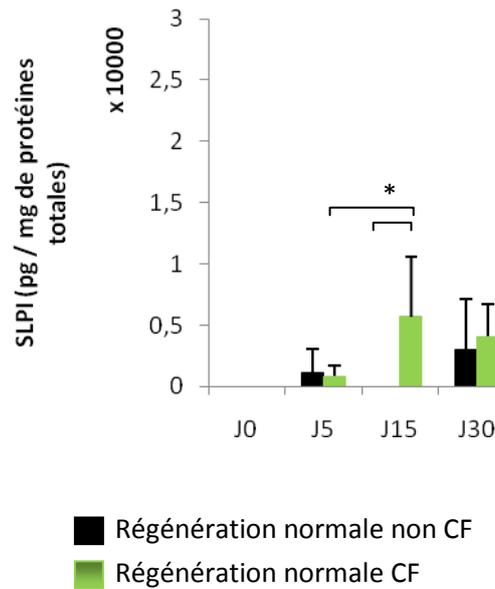


Figure 27 : Sécrétion du SLPI au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF et CF.

La sécrétion a été analysée par ELISA dans les surnageants de cultures non CF et CF, aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs sont exprimées en pg de SLPI / mg de protéines totales.

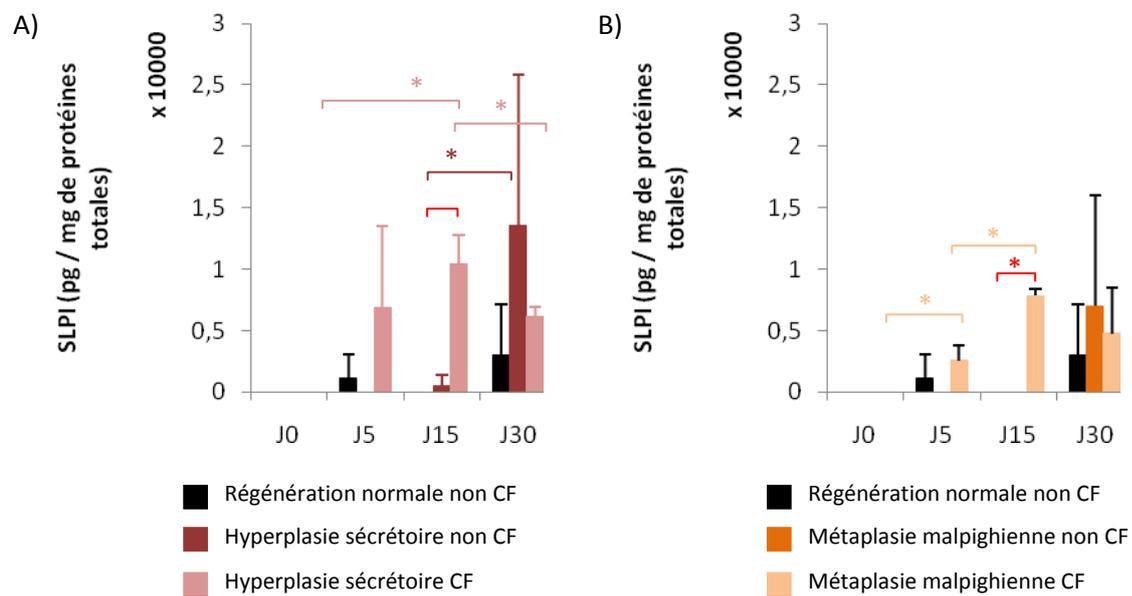


Figure 28 : Sécrétion du SLPI au cours du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF.

Les sécrétions ont été analysées par ELISA dans les surnageants de cultures non CF et CF aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires (A) ou à une métaplasie malpighienne (B), aux stades J0, J5, J15 et J30. Les valeurs sont exprimées en pg de SLPI / mg de protéines totales.

E. Bilan des résultats

L'ensemble des résultats concernant le remodelage de l'épithélium bronchique non CF / CF et la fonctionnalité ont été exposé dans le Tableau 4.

	EPITHELIUM NON CF	EPITHELIUM CF	EPITHELIUM REMODELE NON CF		EPITHELIUM REMODELE CF	
	Régénération normale	Régénération normale	Hyperplasie sécrétoire	Métaplasie malpighienne	Hyperplasie sécrétoire	Métaplasie malpighienne
Défense contre <i>S. aureus</i>	Efficace à J0 puis à partir de J15	Plus de défense à partir du stade J15	Efficace	Non efficace aux stades J5 et J30	Non efficace au stade J30	Non efficace au stade J30
Sécrétion de SLPI	Pas de variation significative	Augmentation à partir du stade J15	Profil similaire	Profil similaire	Plus importante au stade J15	Plus importante au stade J15
Sécrétion de LL-37	Non significative	Non significative	Non significative	Non significative	Non significative	Non significative
Sécrétion de la β -défensine	Pic à J15	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire	Sécrétion plus importante	Sécrétion plus importante
Courants transépithéliaux	ENac fonctionnel : -2,3 \pm 1,5 μA/cm²	ENac dérégulé : -13,5 \pm 7,9 μ A/cm ²	ENac dérégulé : -17 \pm 1,8 μ A/cm ²	ENac fonctionnel : -2,9 \pm 2,2 μ A/cm ²	ENac fonctionnel : -4,3 \pm 1,8 μ A/cm ²	ENac fonctionnel : -2,9 \pm 3,2 μ A/cm ²
	CFTR fonctionnel : 2,7 \pm 1,8 μA/cm²	CFTR non fonctionnel	CFTR fonctionnel : 3,8 \pm 2,7 μ A/cm ²	CFTR fonctionnel : -0,6 \pm 2,4 μ A/cm ²	CFTR non fonctionnel	CFTR non fonctionnel
Résistance transépithéliale	260,1 \pm 12,2 Ω/cm²	398 \pm 87 Ω /cm ²	169,9 \pm 19 Ω /cm ²	252,1 \pm 26,4 Ω /cm ²	366,2 \pm 139,8 Ω /cm ²	278,1 \pm 56,3 Ω /cm ²

Tableau 4 : Bilan de l'étude des fonctionnalités lors du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF comparé à la régénération normale non CF dans un contexte exempt de toute infection et d'inflammation.

VI. Etude du profil de sécrétion des cellules épithéliales au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium respiratoire bronchique non CF et CF

Au cours de cette étude, nous avons étudié la variation des sécrétions protéiques de plusieurs cytokines, chimiokines et facteurs de croissance au cours de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF. Nous avons dosé les protéines dans les surnageants de culture aux différents stades de régénération J0, J5, J15 et J30 grâce à un dosage protéique par Luminex®.

Nous avons déterminé un profil de sécrétion par les cellules épithéliales non CF au cours de la régénération qui nous a servi de référence. Le profil de sécrétion observé pour les épithélia non CF remodelés d'une part et les épithélia CF non remodelés et remodelés d'autre part, ont été comparés à cette référence.

Au cours de cette analyse, nous n'avons pas observé de sécrétion des interleukines (IL) suivantes: IL1- β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 ainsi que de l'interféron γ . En outre, l'IL6, l'IL-7 et le TNF- α ont été décelés dans les surnageants des cultures, mais à des taux extrêmement faibles et puis ne fluctuent pas au cours de la régénération ou du remodelage épithélial.

Nos expériences ont été réalisées sur les surnageants issus de cultures obtenus à partir de trois patients non CF et trois patients CF.

A. Profil de sécrétion de l'interleukine 8

1. Sécrétion de l'interleukine 8 au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération non CF, la sécrétion d'IL-8 est significativement augmentée de 17,9 fois au stade J5 ($p < 0,05$) pour rester ensuite à un taux constant jusqu'au stade J30.

De même au cours de la régénération CF, la sécrétion d'IL-8 présente une augmentation de 13,3 fois au stade J5 par rapport à J0 ($p < 0,05$) puis le taux d'IL-8 reste constant jusqu'au stade J30 (Figure 29A).

Ainsi, le niveau de sécrétion de l'IL-8 est similaire aux stades J0 et J5, puis est 1,9 fois moins élevé au stade J15 ($p < 0,05$) dans les surnageants CF que dans les surnageants non CF (Figure 29A).

2. Sécrétion de l'interleukine 8 au cours du remodelage non CF et CF

Nous avons pu observer qu'il n'y a aucune différence significative entre les quantités d'IL-8 sécrétées par les cellules épithéliales non CF et CF au cours du remodelage aboutissant à une hyperplasie sécrétoire (Figure 29B) ou une métaplasie malpighienne (Figure 29C), et les quantités d'IL-8 sécrétées par les cellules épithéliales au cours de la régénération normale non CF. En effet, nous avons un profil de sécrétion similaire au cours de la régénération et du remodelage non CF.

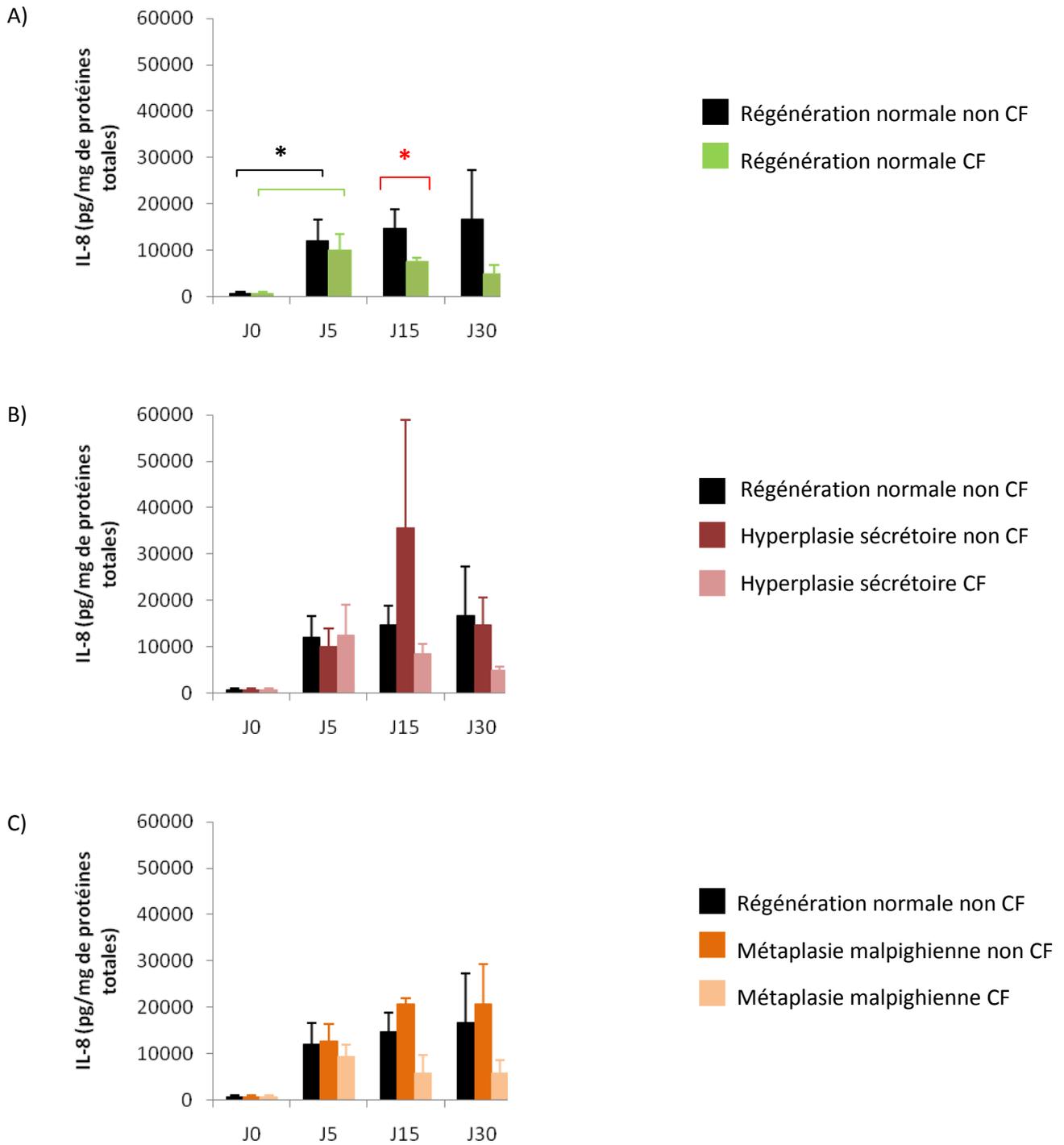


Figure 29: Sécrétion d'IL-8 au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

- A. Régénération normale non CF et CF
- B. Remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires
- C. Remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

B. Profil de sécrétion de l'EGF

1. Sécrétion de l'EGF au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération non CF, la quantité d'EGF reste à un niveau basal jusqu'au stade J5 puis augmente significativement de 6 fois par rapport au stade J0 ($p < 0,05$) et reste à un taux élevé constant jusqu'au stade J30 ($p < 0,05$ par rapport à J0).

L'analyse de la sécrétion d'EGF dans les surnageants des cultures CF indique un profil similaire de sécrétion par rapport au profil observé pour les cultures non CF ($p < 0,05$ entre J15 et J0, et entre J30 et J0) (Figure 30A).

2. Sécrétion d'EGF au cours du remodelage non CF et CF

Au cours du remodelage menant à une hyperplasie de cellules sécrétoires dans les cultures non CF, nous n'observons pas de modulation de la sécrétion d'EGF par rapport à la régénération normale.

A l'inverse, dans les cultures CF aboutissant à une hyperplasie mucipare, bien qu'il ne soit pas observé de différence significative aux stades J0, J5 et J30, une diminution significative ($p < 0,05$) de 2,2 fois de la sécrétion d'EGF est observées à J15, comparativement à la sécrétion d'EGF par les cellules non CF au même stade (Figure 30B).

Enfin, au cours du remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne dans les cultures non CF et CF, aucune variation significative de la sécrétion d'EGF n'a pu être détectée, par rapport à la régénération normale non CF, hormis au stade J15 ($p < 0,05$) (Figure 30C).

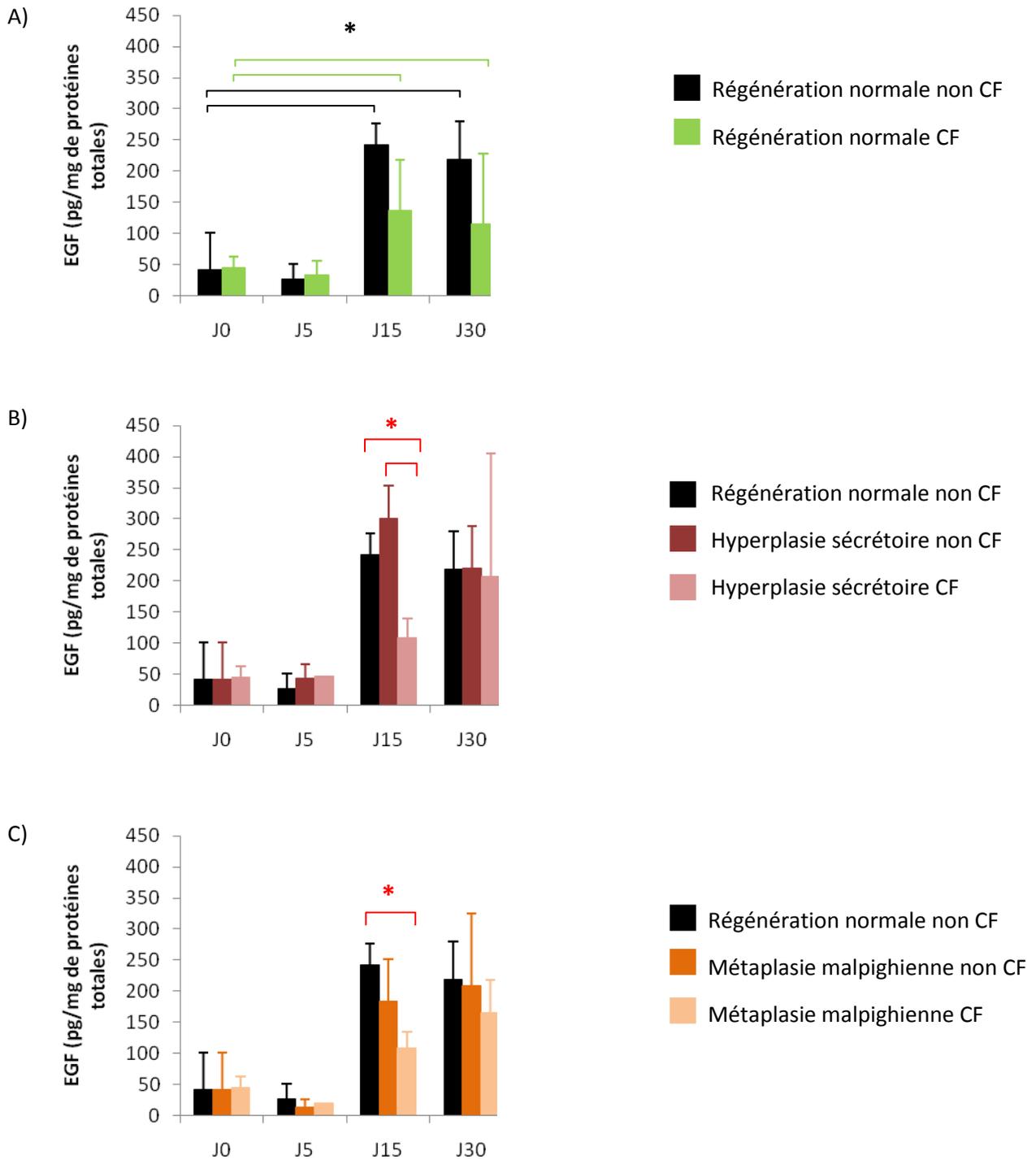


FIGURE 30 : Sécrétion d'EGF au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

- A. Régénération normale non CF et CF
- B. Remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires
- C. Remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

C. Profil de sécrétion de MCP-1

1. Sécrétion de MCP-1 au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération de l'épithélium bronchique non CF, l'analyse de la sécrétion de MCP-1 indique une augmentation au cours des différents stades de régénération épithéliale ($p < 0,05$) avec un taux 4,3 fois plus élevé au stade J15 ($p < 0,05$) et 19,9 fois plus élevé au stade J30 ($p < 0,05$) par rapport au stade J0 (Figure 31A).

L'étude des taux de sécrétion de MCP-1 dans les surnageants de cultures de cellules CF ne permet pas de montrer une augmentation significative au cours du temps ($p = 0,06$). De même, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative de sécrétion de MCP-1 entre les cellules CF et non CF, à chaque stade de la régénération.

2. Sécrétion de MCP-1 au cours du remodelage non CF et CF

Au cours de la régénération aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires CF ou non-CF, le profil de sécrétion de MCP-1 est similaire au profil de sécrétion observé au cours de la régénération normale non CF. En effet, nous avons une augmentation de la sécrétion de MPC-1 au cours du temps ($p = 0,026$ dans les surnageants CF et $p = 0,0249$ dans les surnageants non CF ; test de Kruskal Wallis) (Figure 31B).

Au cours de la régénération aboutissant à la métaplasie malpighienne de cellules CF ou non CF, nous n'avons pas mis en évidence de variation significative des quantités de MCP-1 sécrétées par rapport aux quantités produites au cours de la régénération normale non CF (Figure 31C).

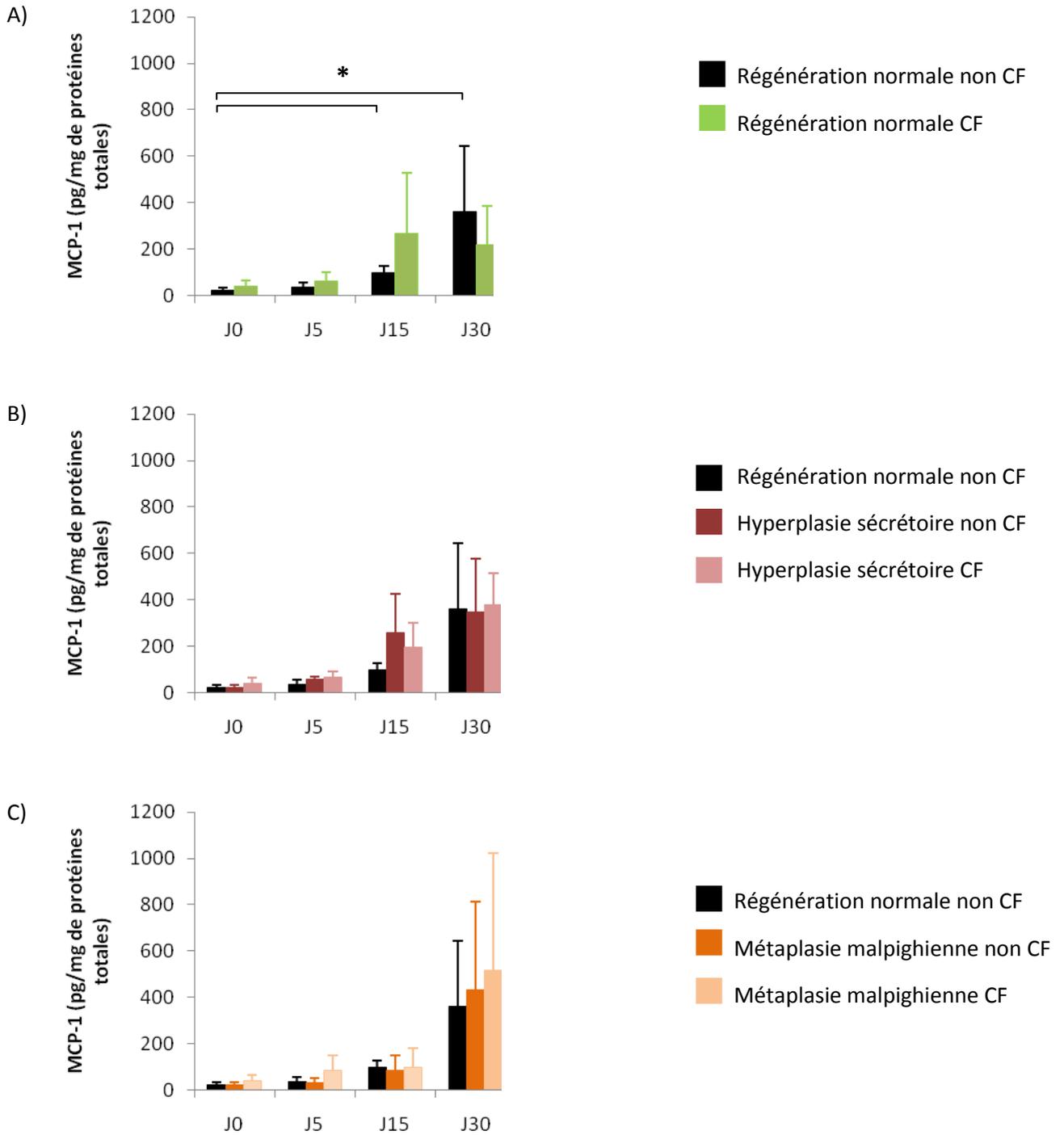


FIGURE 31 : Sécrétion de MCP-1 au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

- A. Régénération normale non CF et CF
- B. Remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires
- C. Remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

D. Profil de sécrétion de l'IP-10

1. Sécrétion de l'IP-10 au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération non CF, nous avons pu observer une augmentation significative à J5 ($p < 0,05$) suivi d'un pic de sécrétion au stade J15 où la concentration d'IP10 est significativement plus élevée qu'au stade J0 ($p < 0,05$), puis la sécrétion d'IP-10 reste stable jusqu'à J30 (Figure 32A)

Au cours de la régénération CF, nous avons pu montrer un profil de sécrétion présentant un pic de sécrétion de l'IP10 au stade J5 ($p < 0,05$), un taux restant stable entre J5 et J15 puis une diminution significative entre J15 et J30 ($p < 0,05$).

L'étude de la sécrétion d'IP10 dans les surnageants de cultures CF et non CF indique une différence significative entre les deux groupes au stade J30 ($p < 0,05$).

2. Sécrétion de l'IP-10 au cours du remodelage non CF et CF

Au cours de la régénération aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires dans les cultures non CF, aucune variation significative de la sécrétion d'IP-10 n'est décelable de J0 à J15 par rapport au profil observé lors de la régénération non CF. Malgré une production d'IP-10 élevée au stade J5, la variabilité entre chaque patient ne permet pas de conclure à une production significativement plus importante dans les cultures CF.

Enfin, une diminution significative des sécrétions de l'IP-10 tant CF que non CF est mise évidence au stade J30 par rapport aux valeurs obtenues à ce même stade dans les cultures non CF ($p < 0,05$) (Figure 32B).

Enfin, lors du remaniement menant à une métaplasie malpighienne, les quantités d'IP-10 produites par les cellules non CF ne varient pas, par rapport aux quantités dosées lors de la régénération normale. Dans les cultures CF, seule une diminution significative de 15,5 fois ($p < 0,05$) de la sécrétion d'IP-10 peut être mise en évidence au stade J30, en comparaison de la valeur observée dans les cultures non CF normales au même stade (Figure 32C).

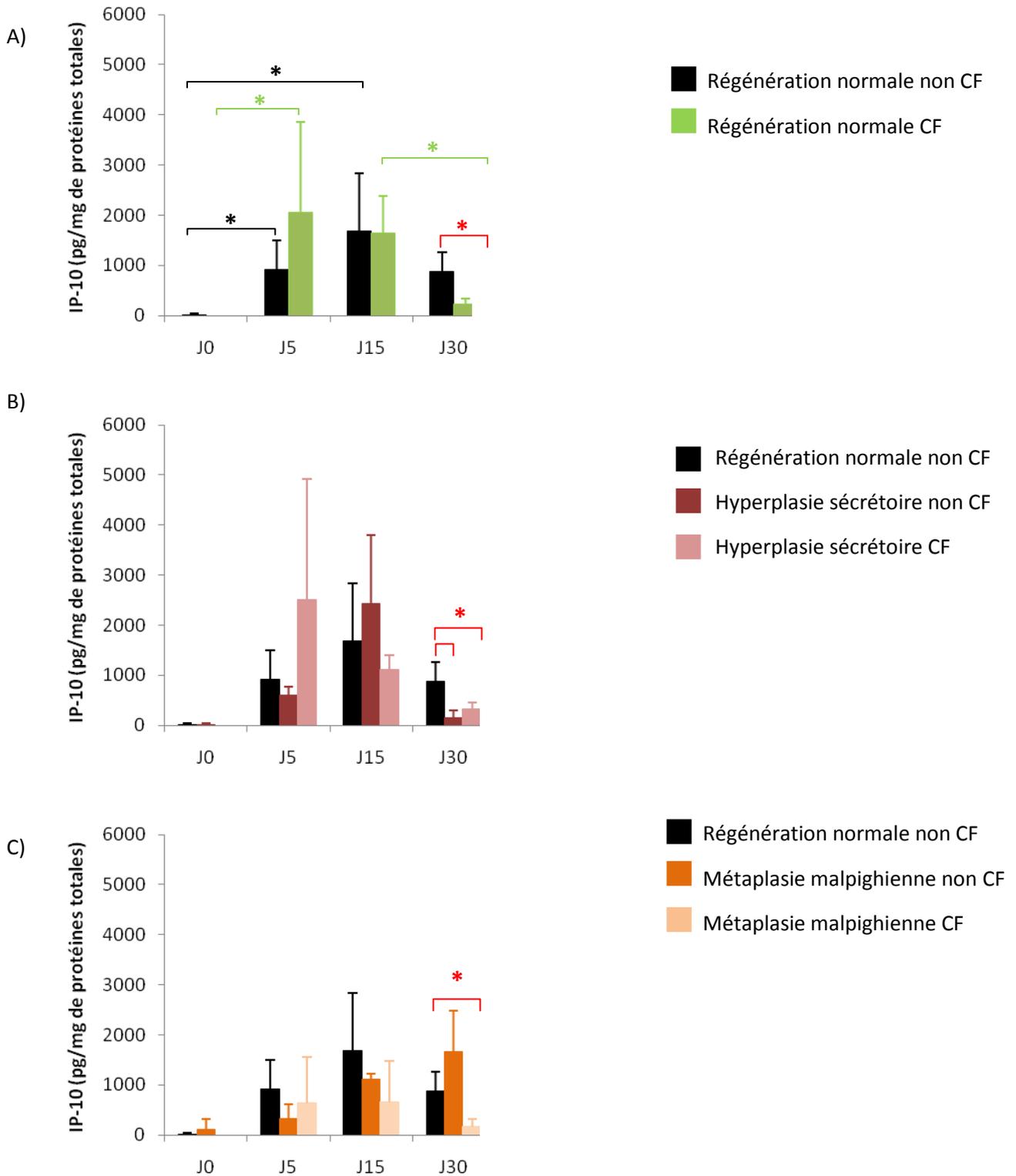


FIGURE 32 : Sécrétion d'IP-10 au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

- A. Régénération normale non CF et CF
- B. Remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires
- C. Remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

E. Profil de sécrétion du GM-CSF

1. Sécrétion du GMCSF au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération non CF, la sécrétion de GMCSF présente un pic au stade J15 ($p < 0,05$ entre J0 et J5 et entre J5 et J15) puis diminue significativement entre J15 et J30 ($p < 0,05$) (Figure 33A).

Au cours de la régénération CF, la sécrétion de GM-CSF présente un pic de production au stade J5, avec une augmentation de 161,5 fois par rapport à J0 ($p < 0,05$), puis le taux de sécrétion diminue ($p < 0,05$) pour rester à un taux stable entre les stades J15 et J30.

Le niveau de sécrétion du GMCSF est 1,9 fois plus élevé au stade J5 ($p < 0,05$) et 7,6 fois moins élevé au stade J15 ($p < 0,05$) dans les surnageants CF que dans les surnageants non CF (Figure 33A).

2. Sécrétion de GMCSF au cours du remodelage non CF et CF

L'analyse de la sécrétion du GMCSF au cours de la régénération aboutissant à une hyperplasie mucipare montre qu'il n'y a pas de différence significative de la sécrétion par les cellules CF et non CF, en comparaison de la sécrétion de cette cytokine par les cellules non CF au cours de la régénération normale (Figure 33B).

Au cours de la régénération aboutissant à une métaplasie malpighienne, hormis une diminution significative ($p < 0,05$) de 5,7 fois au stade J15 dans les surnageants de cultures CF par rapport aux surnageants des cultures non CF non remodelés, aucune autre différence n'a été mise en évidence (Figure 33C).

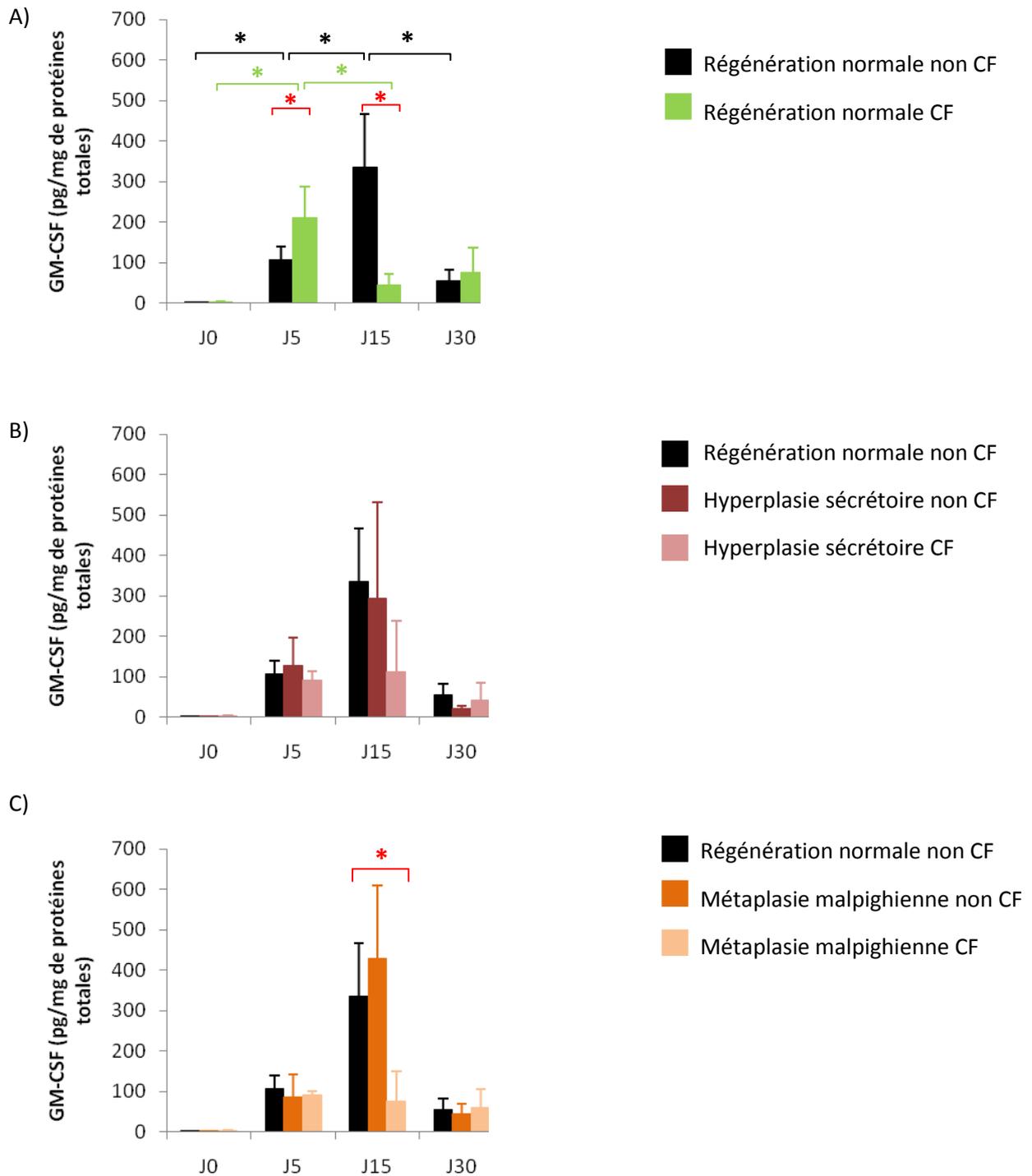


FIGURE 33 : Sécrétion du GM CSF au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

- A. Régénération normale non CF et CF
- B. Remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires
- C. Remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

F. Profil de sécrétion de la fractalkine

1. Sécrétion de la fractalkine au cours de la régénération non CF et CF

Au cours de la régénération non CF, la quantité de fractalkine sécrétée par les cellules épithéliales augmente significativement au stade J30 ($p < 0,05$) par rapport à J0.

Au cours de la régénération CF, la sécrétion de la fractalkine reste à un taux basale entre J0 et J5, présente une augmentation significative au stade J15 ($p < 0,05$) puis le taux reste constant.

Le niveau de sécrétion de la fractalkine est similaire aux stades J0, J5 et J30, mais est 4,2 fois plus élevé au stade J15 ($p < 0,05$) dans les surnageants CF par rapport aux surnageants non CF (Figure 34A).

2. Sécrétion de la fractalkine au cours du remodelage non CF et CF

Au cours de la régénération aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires dans les cultures CF et non CF, le profil de sécrétion de la fractalkine est similaire au profil observé au cours de la régénération normale CF et non CF. Hormis une augmentation significative de la fractalkine au stade J15 ($p < 0,05$ pour les cellules non CF et CF), aucune modulation de la sécrétion de cette chimiokine n'est mise en évidence, en comparaison du profil de sécrétion observé au cours de la régénération normale non CF (Figure 34B).

Au cours de la régénération aboutissant à une métaplasie malpighienne dans les cultures CF et non CF, aucune variation significative de la production de la fractalkine n'est mise en évidence par rapport au profil de sécrétion obtenu au cours de la régénération normale non CF (Figure 34C).

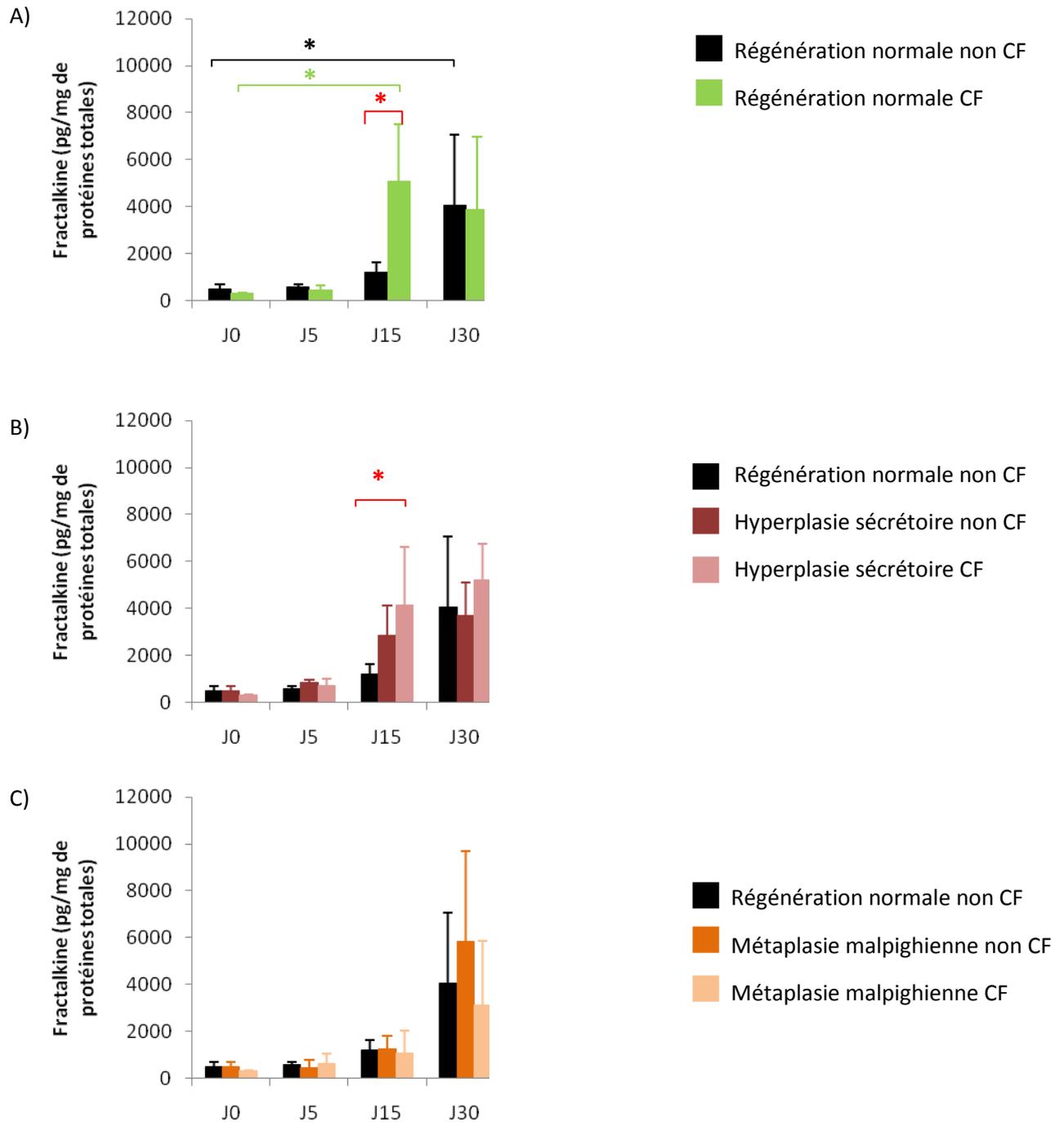


FIGURE 34 : Sécrétion de la fractalkine au cours de la régénération et du remodelage non CF et CF

- A. Régénération normale non CF et CF
- B. Remodelage aboutissant à une hyperplasie de cellules sécrétoires
- C. Remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne

G. Bilan des résultats

L'ensemble des résultats concernant le remodelage de l'épithélium bronchique non CF / CF et les profils de sécrétion protéique ont été exposé dans le Tableau 5.

	EPITHELIUM NON CF	EPITHELIUM CF	EPITHELIUM REMODELE NON CF		EPITHELIUM REMODELE CF	
	Régénération normale	Régénération normale	Hyperplasie sécrétoire	Métaplasie malpighienne	Hyperplasie sécrétoire	Métaplasie malpighienne
IL-8	Augmente à J5 puis reste stable	Même profil mais taux moins élevé au stade J15	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire
GM-CSF	Pic à J15	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire	Diminution au stade J15
EGF	Augmente à J15 puis reste stable	Profil similaire	Profil similaire	Diminution au stade J15	Profil similaire	Diminution au stade J15
IP-10	Augmente à J15 puis reste stable	Pic à J5	Diminution au stade J30	Profil similaire	Diminution au stade J30	Diminution au stade J30
MCP-1	Augmente à J15 puis reste stable	Pas de différence significative à chaque stade	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire	Profil similaire
Fractalkine	Augmente au stade J30	Augmentation dès J15	Profil similaire	Profil similaire	Augmentation au stade J15	Profil similaire

Tableau 5 : Bilan de l'étude des profils de sécrétions lors du remodelage de l'épithélium bronchique non CF et CF comparé à la régénération normale non CF dans un contexte exempt de toute infection et d'inflammation.

H. Discussion

Le remodelage de l'épithélium bronchique est un phénomène majeur qui peut être très fréquemment observé, en particulier chez les patients souffrant de pathologies inflammatoires chroniques comme la CF (Rock *et al.*, 2010 ; Hauber *et al.*, 2004 ; Konradova *et al.*, 1982 ; Bedrossian *et al.*, 1976). Cependant, la caractérisation moléculaire ainsi que l'impact de ce remodelage épithélial sur la fonctionnalité de l'épithélium bronchique ont été très peu étudiés. C'est pourquoi nous avons choisi de les analyser dans la deuxième partie de ce travail de thèse. Les principales propriétés fonctionnelles de l'épithélium sont d'ordres défensifs, par le biais du développement de l'intégrité épithéliale, de la clairance mucociliaire et de la production de peptides de défense antimicrobienne.

Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques des cultures de cellules épithéliales bronchiques CF et non CF ayant abouti à la reconstitution d'un épithélium mucociliaire bien différencié ou à un épithélium remodelé présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires ou une métaplasie malpighienne. Les cellules épithéliales bronchiques ont la capacité d'absorber et de sécréter des ions qui ont une fonction primordiale dans la défense de l'épithélium respiratoire. En effet, une régulation des transports est nécessaire afin de maintenir des concentrations ioniques adéquates de part et d'autre des compartiments cellulaires et transépithéliaux (Sleigh, 1989). Ces flux ioniques, ainsi que les mouvements d'eau qui leur sont associés, sont à l'origine de la régulation du volume du mucus et du liquide périciliaire (Tarran *et al.*, 2004). La dérégulation des transports ioniques est à l'origine de pathologies telles que la CF (Boucher, 2004). De plus, la régulation des transports est essentielle pour le maintien d'une concentration ionique appropriée au bon fonctionnement de certains peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales respiratoires tels que les défensines ou le SLPI (Ganz, 2002 ; Travis *et al.*, 2000) .

Nous avons testé, en chambre de Ussing, la fonctionnalité des transports ioniques (Ussing et Zerahn, 1951), ainsi que l'intégrité des épithélia régénérés ou remodelés CF et non-CF en mesurant la résistance transépithéliale, reflet de l'état de cohésion intercellulaire de la barrière épithéliale.

Les mesures du courant de court circuit dans les cultures de cellules épithéliales bronchiques non-CF ayant régénéré un épithélium mucociliaire bien différencié ont permis de mettre en évidence la présence de canaux sodiques fonctionnels, en l'occurrence le canal ENaC, par l'intermédiaire de la stimulation par l'amiloride, un modulateur pharmacologique de ces canaux. De même, l'activation d'une sécrétion de chlore AMPc-dépendante suite à une stimulation de ces cultures par la forskoline,

a démontré la présence de canaux CFTR fonctionnels, d'une façon similaire à ce qui a été décrit dans la littérature (Blouquit *et al.*, 2006). A l'inverse, les mesures du courant de court circuit dans les cultures de cellules épithéliales bronchiques CF ayant régénéré un épithélium mucociliaire bien différencié montrent une réponse plus importante à la stimulation par l'amiloride et un défaut de sécrétion de chlore suite à une activation par la forskoline. Les épithélia bronchiques de patients CF sont caractérisés par une augmentation du courant Na^+ en parallèle d'une absence de sécrétion d'ions Cl^- dépendante de l'AMPc (Hummler *et al.*, 1996). En effet, lorsque les cellules épithéliales CF sont stimulées par l'amiloride, une absorption rapide des ions Na^+ est observée (Knowles *et al.*, 1983 ; Boucher, 2004), due à l'absence des canaux CFTR fonctionnels à la membrane apicale des cellules ciliées empêchant toute régulation des canaux ENac (Stutts *et al.*, 1997; Konstas *et al.*, 2003). Nos résultats sont donc concordants avec ces données de la littérature et indiquent que même si, au sein d'un épithélium bronchique CF bien différencié, la présence de CFTR au pôle apical des cellules ciliées peut être détectée comme il a été rapporté par Hajj *et al.*, dans son étude de la régénération de l'épithélium bronchique CF dans un modèle de xéno greffe dans la souris nude (Hajj *et al.*, 2007), ces canaux CFTR ne sont pas fonctionnels.

Lorsque l'on étudie les courants ioniques après stimulation par l'amiloride des canaux ENac dans les cultures de cellules épithéliales ayant développé un épithélium présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires, nous pouvons observer, pour les cultures CF, des valeurs de courant de court circuit similaires aux valeurs mesurées dans les cultures non-CF sans hyperplasie mucipare. A l'inverse, les cultures de cellules épithéliales non-CF ayant développé une hyperplasie des cellules sécrétoires présentent des valeurs de courant de court circuit similaires aux valeurs mesurées dans les cultures de cellules CF non remodelées. Comme il a été décrit dans la littérature que l'hyper-absorption des ions Na^+ n'est pas due à une augmentation du nombre de canaux ENac (Burch *et al.*, 1995), nos résultats peuvent s'expliquer par le fait que, dans un épithélium présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires, le nombre de cellules ciliées soit moins important que dans un épithélium mucociliaire bien différencié. Par ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse que, dans le cas des cultures de cellules non-CF, la régulation des canaux ENac par les canaux CFTR fonctionnels soit moindre, et que dans le cas des cultures de cellules CF, la dérégulation des canaux ENac par l'absence de canaux CFTR fonctionnels soit moindre également. Cependant, il est intéressant de noter que lorsque l'on mesure les courants ioniques après stimulation par la forskoline des canaux CFTR dans les cultures de cellules épithéliales non-CF ayant développé un épithélium présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires, nous n'observons pas de diminution de la sécrétion de chlore comme notre hypothèse présentée plus haut pourrait le suggérer. Ce résultat peut toutefois être expliqué par une étude de la littérature rapportant que les canaux ENac peuvent également réguler

les canaux CFTR. En effet, des expériences de coexpression d'ENac et de CFTR ont montré que la présence d'ENac induit une augmentation du nombre de canaux CFTR actifs et une augmentation de leur probabilité d'ouverture (Jiang *et al.*, 2000).

Lorsque l'on étudie les courants ioniques après stimulation par l'amiloride des canaux ENac dans les cultures de cellules épithéliales ayant développé un épithélium présentant une métaplasie malpighienne, nous pouvons observer, pour les cultures non-CF, des valeurs de courant de court circuit similaires aux valeurs mesurées dans les cultures non-CF non remodelées. Cette observation est concordante avec les données de la littérature rapportant l'expression et la fonctionnalité du canal ENac dans les épithélia malpighiens tels que l'œsophage, où la combinaison des sous-unités α , β , γ et δ a été mise en évidence, générant un courant Na^+ amiloride sensible (Yamamura *et al.*, 2008). Dans les cultures de cellules épithéliales CF présentant une métaplasie squameuse, les valeurs mesurées du courant de court-circuit suite à une stimulation par l'amiloride sont significativement augmentée par rapport aux valeurs mesurées dans l'épithélium CF mucociliaire bien différencié. Là encore, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'épithélium malpighien ne présentant pas de cellules ciliées, ou très peu, la dérégulation des canaux ENac par l'absence de canaux CFTR fonctionnels soit moindre que dans les cultures CF mucociliaires bien différenciées. Enfin, la mesure du courant de court circuit dans les cultures de cellules épithéliales non-CF présentant une métaplasie malpighienne suite à une stimulation des canaux CFTR par la forskoline montre une diminution significative de la sécrétion de Cl^- expliquée par le déficit de ces épithélia en cellules ciliées, ainsi que par un défaut d'expression de CFTR par les cellules d'un épithélium respiratoire présentant un remodelage de type métaplasie malpighienne (Brezillon *et al.*, 1995; Brézillon *et al.*, 1997).

Nous avons également évalué l'intégrité des épithélia non-CF et CF, remodelés ou non, en mesurant la résistance transépithéliale (RTE). Nos résultats indiquent des valeurs de RTE significativement plus élevées dans les cultures mucociliaires bien différenciées CF que dans les cultures non-CF. Notre observation est conforme aux observations réalisées par Willumsen *et al.*, (Willumsen et Boucher, 1992 ; Willumsen et Boucher, 1989). Nos expériences montrent, en outre, que si, au sein des cultures de cellules épithéliales bronchiques non-CF, nous observons une diminution de la RTE en cas d'hyperplasie mucipare, aucune variation n'est détectée en cas de métaplasie malpighienne. A l'inverse, dans les cultures de cellules épithéliales CF, aucune modification de la RTE n'est mesurable en cas d'hyperplasie mucipare alors qu'une diminution significative est détectée en cas de métaplasie malpighienne. Ces résultats suggèrent une fragilité différente de la barrière épithéliale CF et de la barrière épithéliale non-CF en cas de remodelage.

En conclusion, notre étude montre que, en dehors de tout contexte infectieux et inflammatoire exogène, les propriétés bioélectriques de l'épithélium bronchique sont perturbées en cas de remodelage épithélial, avec des variations plus prononcées pour les cultures de cellules CF, ces modifications pouvant entraîner, consécutivement, l'altération des fonctions de défense épithéliale.

La régulation des transports ioniques étant essentielle pour le maintien d'un environnement adéquat au bon fonctionnement de certains peptides de défense antimicrobienne sécrétés par les cellules épithéliales bronchique, nous avons évalué la capacité de défense antibactérienne des sécrétions des épithélia non-CF et CF, remodelés ou non. En effet, l'épithélium bronchique humain est naturellement apte à se défendre vis-à-vis des pathogènes inhalés pouvant entraîner une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale. Face aux agressions bactériennes, l'épithélium bronchique a la capacité de produire et sécréter des peptides antibactériens (Ganz, 2002). Cependant, chez les patients atteints de pathologies respiratoires inflammatoires chroniques, et en particulier chez les patients CF, de nombreuses lésions épithéliales peuvent être observées, souvent corrélées à la présence de pathogènes. Afin de déterminer l'influence du remodelage dans le défaut de défense antibactérienne de l'épithélium bronchique, nous avons évalué, dans un contexte dépourvu d'inflammation exogène, la capacité bactéricide des sécrétions des cultures cellulaires tout au long de la régénération aboutissant à la reconstitution d'un épithélium mucociliaire bien différencié, présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires ou une métaplasie malpighienne, vis-à-vis de *S. aureus*, pathogène fréquemment observé dans les voies aériennes humaines, et un des premiers pathogènes détectés chez les patients CF (Gibson *et al.*, 2003).

Les résultats des tests de bactéricidie que nous avons effectués montrent que, lors de la régénération d'un épithélium mucociliaire bien différencié à partir de cellules non-CF, les cellules épithéliales sont capables d'instaurer une défense antibactérienne dès le stade J0 de la régénération, lorsque les cellules sont totalement indifférenciées, défense qui va progressivement augmenter pour atteindre son maximum au stade final de la régénération et de la différenciation cellulaire à J30. Aucune étude dans la littérature n'avait décrit, jusqu'à ce jour, la dynamique de mise en place des capacités de défense antibactérienne des cellules bronchiques au cours de la régénération épithéliale. La capacité de défense des cellules épithéliales bronchiques différenciées a toutefois été bien documentée. En 1996, des travaux menés par Smith *et al.*, ont montré que les cellules épithéliales sont capables de lyser des bactéries mises en contact directement avec le pôle apical des

cellules épithéliales bronchiques (Smith *et al.*, 1996). De plus, la production de nombreux peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales bronchique a également été rapportée (pour revue, Ganz, 2002). Cependant, il a été démontré que l'environnement ionique de ces peptides joue un rôle majeur dans leur fonctionnalité (Travis *et al.*, 2000).

Il est intéressant de noter la diminution de la défense antibactérienne que nous avons pu observer au stade J5 de la régénération aboutissant à la reconstitution d'un épithélium mucociliaire bien différencié à partir des cellules épithéliales non-CF. A ce stade, l'analyse histologique des cultures montre la présence d'une métaplasie malpighienne qui va se développer de façon transitoire au cours de la régénération. Cet épithélium malpighien semble donc agir comme une barrière physique (RTE normale) mais pas chimique (défaut de production de peptides antimicrobiens). Cette observation est à corrélérer avec les résultats obtenus pour les cultures de cellules épithéliales non CF générant une métaplasie malpighienne stable. En effet, dans l'épithélium remodelé squameux au stade J30, nous avons pu observer une diminution significative de la capacité bactéricide des surnageants épithéliaux, en comparaison de la capacité des surnageants des cultures mucociliaires au même stade, indiquant un défaut majeur de défense antimicrobienne. Il faut également rappeler que nous avons pu mettre en évidence, dans ces même cultures squameuses de cellules épithéliales bronchiques non-CF, non pas un défaut d'absorption de Na⁺ par les canaux ENaC, mais un défaut de sécrétion de Cl⁻ par les canaux CFTR. Cette altération pourrait être responsable de la génération d'un environnement ionique inapproprié au bon fonctionnement de certains peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales bronchiques. En effet, nous avons analysé la sécrétion de trois peptides impliqués dans les propriétés bactéricides du fluide bronchique : la cathélicidine LL37, la β -défensine et le SLPI. Ces trois facteurs sont naturellement produits dans le liquide de surface de l'épithélium respiratoire (McCray et Bentley, 1997 ; Singh *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 1998b). Le dosage de la cathélicidine LL-37 dans les surnageants de cultures n'a pas permis d'obtenir de taux de production significatif. En effet, les concentrations évaluées dans les surnageants des cultures non remodelées ou remodelées sont de l'ordre de 10³ fois moins élevées que la concentration minimum inhibitrice estimée pour une activité antibactérienne (Bals *et al.*, 1999). En outre, les dosages de la β -défensine et du SLPI n'ont pas montré de modification significative de la sécrétion de ces facteurs au cours du remodelage aboutissant à une métaplasie malpighienne, bien qu'une augmentation de la production de SLPI ait été rapportée dans les cultures de cellules épithéliales bronchiques commerciales dans les même conditions (Gray *et al.*, 1996), augmentation que nous n'avons pas détectée. A la lumière de ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être avancées : 1) si la quantité de ces facteurs antimicrobiens n'est pas modulée au cours du remodelage, il se peut que ce soit leur fonctionnalité qui soit altérée, en particulier par un environnement ionique inapproprié ; 2) la

production d'autres peptides de défense antibactériens pourraient être modulée au cours du remodelage épithélial et cette modulation pourrait être impliquée dans le défaut de défense antibactérienne. Par exemple, il a été démontré que la β -défensine est plus efficace vis-à-vis de *S. aureus* lorsqu'elle agit en combinaison avec la lactoferrine (Bals *et al.*, 1998).

Nos travaux ont également pu mettre en évidence que dans les cultures de cellules épithéliales non-CF aboutissant à une hyperplasie des cellules sécrétoires, les sécrétions épithéliales présentent une activité bactéricide plus importante que les sécrétions des cultures mucociliaires non remodelées, en particulier au stade final de la régénération à J30. La plupart des peptides antimicrobiens étant décrits pour être produits par les cellules sécrétrices de l'épithélium bronchique, cette augmentation de la défense antimicrobienne peut être corrélée à l'augmentation du nombre de cellules caliciformes dans les cultures.

Dans les cultures de cellules épithéliales CF, l'analyse des capacités bactéricides des surnageants prélevés au cours de la régénération aboutissant à un épithélium mucociliaire bien différencié indique un défaut majeur de la défense antimicrobienne, qui est général tout au long de la régénération et s'établit dès le stade J0 de la régénération. Cette observation est concordante avec les données de la littérature rapportant que les cellules épithéliales des voies aériennes chez les patients CF sont incapables de clairer les bactéries (Smith *et al.*, 1996) en particulier car l'environnement ionique du fluide bronchique est inadapté au fonctionnement des peptides antimicrobiens (Wine *et al.*, 1997 ; Travis *et al.*, 1999 ; Ganz, 2002). Cette altération de la capacité de défense antibactérienne est également observable au cours du remodelage épithélial CF, non seulement aboutissant à la formation d'une métaplasie malpighienne, mais aussi dans le cas de la régénération d'une hyperplasie des cellules sécrétoires. Cette dernière observation suggère que les sécrétions des cellules caliciformes CF seraient, soit déficientes en peptides antibactériens, soit que ces peptides antimicrobiens seraient inactifs. Cette dernière hypothèse semble être la plus plausible. En effet, bien que le dosage de la cathélicidine LL-37 dans les surnageants de cultures n'a pas permis d'obtenir de taux de production significatif, la production de la β -défensine, quand à elle, est généralement plus importante dans les cultures de cellules CF, y compris dans les épithélia présentant une hyperplasie des cellules sécrétoires, et le SLPI est sécrété de façon significativement plus importante par les cellules épithéliales CF que par les cellules non-CF au stade J15 de la régénération aboutissant à une hyperplasie mucipare. Cette hypothèse de la non-fonctionnalité des peptides antimicrobiens est d'autant plus plausible qu'il a été démontré, par exemple, que l'activité de la β -défensine 2 (ou HBD-2) et du SLPI est dépendante de la concentration NaCl du liquide de surface bronchique ou du milieu environnant (Bals *et al.*, 1998).

En conclusion, notre étude montre que, en dehors de tout contexte infectieux et inflammatoire exogène, le remodelage de l'épithélium bronchique entraîne une altération des propriétés de défense antibactérienne des sécrétions épithéliales, avec un abolissement complet de ces capacités antimicrobiennes dans les cultures de cellules CF. Ces altérations peuvent être à l'origine des infections bactériennes soutenues observées, non seulement chez les patients CF, mais également chez les patients non-CF présentant un remodelage de l'épithélium bronchique de type métaplasie malpighienne.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous avons analysé les profils de sécrétion d'un panel de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance par les cellules épithéliales bronchiques CF et non CF, au cours de la régénération aboutissant à la reconstitution d'un épithélium mucociliaire bien différencié ou à la formation d'une hyperplasie mucipare ou d'une métaplasie malpighienne, afin de déterminer si le remodelage, en dehors de toute stimulation inflammatoire exogène et de toute infection bactérienne, s'accompagne de la modulation de ces facteurs et si ces facteurs pourraient être à l'origine de l'altération des propriétés de défense des épithélia CF et/ou remodelés.

Dans le contexte non inflammatoire et non infectieux de nos cultures cellulaires, bon nombre des facteurs étudiés se sont avérés être totalement absents, ou présent de façon infime dans les sécrétions épithéliales tant CF que non-CF, et que l'épithélium soit remodelé ou non.

L'IL-8 (ou CXCL8) est une chimiokine pro-inflammatoire retrouvée à de fortes concentrations dans les sécrétions bronchiques des patients CF présentant ou non une infection pulmonaire (Bonfield *et al.*, 1999; Muhlebach *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1995; Tirouvanziam *et al.*, 2000). Il s'agit d'un puissant chemoattractant pour les neutrophiles qui ont un effet délétère en contribuant aux lésions des voies aériennes (Nakamura *et al.*, 1992). En plus de son implication dans les processus inflammatoires, l'IL-8 est également impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques et physiopathologiques telles que l'hyperprolifération et la migration cellulaires (Mukaida, 2003). L'analyse de la sécrétion de l'IL-8 par les cellules bronchiques humaines au cours de la régénération épithéliale dans un modèle de xénogreffe de la souris nude a montré une hypersécrétion de l'IL-8 par les cellules CF, et a suggéré l'implication de cette cytokine dans l'hyperprolifération cellulaire observée au cours de la reconstitution épithéliale (Hajj *et al.*, 2007). Dans le modèle de régénération épithéliale *in vitro* en IAL en absence d'infection et d'inflammation exogène, nous avons pu détecter

une augmentation significative de la sécrétion de l'IL-8 à partir du stade J5 de la régénération aboutissant à la formation d'un épithélium mucociliaire bien différencié tant à partir des cellules non-CF que des cellules CF. De plus, après une sécrétion significativement plus importante au stade J15 de la régénération dans les cultures non CF, nous n'avons plus détecté de différence de production de l'IL-8 entre les cellules CF et les cellules non-CF au stade J30 de régénération. Ces résultats sont concordants avec les données obtenues par Wiszniewski *et al.*, dans un modèle de co-culture en IAL cellules épithéliales bronchiques/fibroblastes démontrant une sécrétion d'IL-8 similaire par les cellules épithéliales non CF et CF (Wiszniewski *et al.*, 2006). Cette absence d'hypersécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques CF pourrait expliquer l'absence d'hyperprolifération cellulaire que nous avons rapportée dans la première partie de notre travail de thèse, mais n'explique toutefois pas le retard de prolifération observé dans notre étude. L'analyse des taux de sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales non-CF et CF au cours de la régénération aboutissant à un épithélium remodelé montre un profil de production de cette chimiokine similaire au profil de sécrétion mis en évidence au cours de la régénération d'un épithélium mucociliaire bien différencié non-CF. Ce résultat semble indiquer que les mécanismes cellulaires impliqués dans ces remaniements épithéliaux, en absence de toute stimulation par des facteurs infectieux ou inflammatoires exogènes, ne modifient pas les capacités de sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales tant non CF que CF. Cependant, il est intéressant de noter que dans les cultures de cellules CF aboutissant à un remodelage épithélial, les taux de sécrétion de l'IL-8 sont beaucoup plus faibles que les taux de sécrétion de l'IL-8 dans les cultures de cellules non-CF aboutissant à ces mêmes épithélia remodelés, et ce, dès le stade J15 de la régénération. Cette observation semble suggérer que malgré tout, le remodelage de l'épithélium bronchique CF entraîne un défaut de sécrétion de l'IL-8 qui ne semble pas être à l'origine des défaut de fonctionnalité épithéliale, dans la mesure où il a été démontré l'absence d'influence de l'IL-8 sur les flux ioniques dans le colon distal humain (Bode *et al.*, 1998).

Nous avons également analysé la sécrétion de la chimiokine MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein-1 ou CCL2) par les cellules épithéliales non-CF et CF au cours de la régénération aboutissant à un épithélium mucociliaire bien différencié ou à un épithélium remodelé. MCP-1 est sécrétée par les cellules endothéliales, les macrophages, les fibroblastes et les cellules épithéliales, et agit sur les monocytes et les lymphocytes ainsi que les basophiles dont elle entraîne la dégranulation. Outre ces implications dans la réponse immunitaire et l'inflammation, MCP-1 participe également au processus de réparation épithéliale. En effet, cette chimiokine, hypersécrétée suite à une lésion (Crosby et Waters, 2010), va, via son récepteur CCR2 présent à la surface

membranaire des cellules épithéliales, être essentielle au processus de réépithélialisation de la barrière alvéolaire après une lésion (Christensen *et al.*, 2004). Cependant, il est à noter que Rao *et al.*, ont rapporté que les taux de MCP-1 sont plus importants dans la circulation systémique et dans les expectorations des patients CF que chez les sujets sains (Rao *et al.*, 2009). L'analyse des taux de sécrétion de MCP-1 par les cellules épithéliales non-CF et CF au cours de la régénération aboutissant à la reconstitution d'un épithélium mucociliaire bien différencié montre que la production générale de cette chimiokine augmente au cours de la régénération non-CF mais, bien qu'augmentant également, ne présentent pas de variations qui soient significatives au cours de la régénération CF. L'accroissement de la sécrétion de MCP-1 par les cellules épithéliales en culture en IAL semble correspondre à la mise place progressive d'une fonction de défense par production de facteur chimio-attractants pour les cellules immunitaires, mais pourrait également signifier l'implication de cette chimiokine dans la réparation/régénération de l'épithélium bronchique dans les cultures tant non-CF que CF. En outre, dans le contexte de notre étude de la régénération et du remodelage épithélial *in vitro* dans un environnement exempt d'infection et d'inflammation exogène, la chimiokine MCP-1 ne semble pas jouer de rôle majeur dans les processus de remodelage épithélial. En effet, aucune variation significative du taux de production de MCP-1 n'a pu être mise en évidence au cours du remodelage épithélial, ni dans les cultures de cellules non-CF, ni dans les cultures de cellules CF. La présence de fortes concentrations de MCP-1 chez les patients CF semble donc être corrélée à l'environnement inflammatoire et/ou infectieux inhérent à la pathologie, et absent dans nos conditions de culture.

L'IP-10 (Interferon-inducible protein-10 ou CXCL10) est une chimiokine possédant une activité chimio-attractante pour les monocytes, les macrophages, les cellules T et NK ainsi que pour les cellules dendritiques. En plus d'une activité anti-tumorale, elle a la capacité d'inhiber l'angiogénèse (Dufour *et al.*, 2002 ; Angiolillo *et al.*, 1995). Il a été montré que l'IP-10, exprimée par les kératinocytes, intervient de manière tardive dans le processus de régénération épithéliale (Yates *et al.*, 2009) via l'activation de son récepteur CXCR3 (Yates *et al.*, 2007). Bien qu'il ait été rapporté une implication de l'IP-10 dans l'inhibition de la prolifération des cellules tubulaires rénales, des cellules épithéliales de prostate et des cellules endothéliales (Luster *et al.*, 1995; Nagpal *et al.*, 2006; Furuichi *et al.*, 2008), cette chimiokine ne semble pas jouer un tel rôle au cours de la régénération de l'épithélium bronchique humain. En effet nous avons observé une augmentation significative de la sécrétion d'IP-10 au stade J5 dans les cultures non-CF et CF puis un taux qui augmente encore ou reste stable au stade J15, période pendant laquelle la prolifération cellulaire s'effectue. Nous avons

également montré que les taux de sécrétions d'IP-10 diminuent de façon précoce au cours de la régénération CF aboutissant à la reconstitution d'un épithélium mucociliaire bien différencié, dès le stade J15, contrairement à ce qui peut être observé dans les cultures de cellules épithéliales non-CF où la production d'IP-10 reste stable. La diminution de la sécrétion d'IP-10, au cours de la régénération de l'épithélium mucociliaire CF, pourrait être impliquée dans le retard de régénération observé au sein de ces cultures. Toutefois, l'IP-10 ne semble pas jouer de rôle prépondérant dans le remodelage épithélial. En effet, aucune modification du profil de sécrétion de l'IP-10 par les cellules épithéliales non-CF ou CF n'a pu être mise en évidence au cours de la génération d'une hyperplasie des cellules sécrétoires, et au cours du développement d'une métaplasie malpighienne seule une diminution significative de la quantité d'IP-10 produite par les cellules CF au stade J30 a pu être décelée. Cette diminution est cependant difficilement corrélable au remodelage épithélial ou au défaut de fonctionnalité de l'épithélium remodelé.

La fractalkine (ou CX3CL1) est une chimiokine dont la sécrétion est associée au contexte inflammatoire pulmonaire (Zhang et Patel, 2010). Elle est responsable de la migration constitutive des monocytes sanguins et est activée par les cytokines pro-inflammatoires (Rao *et al.*, 2009). La fractalkine est retrouvée à des taux importants dans les pathologies pulmonaires telles que la BPCO (McComb *et al.*, 2008 ; Rao *et al.*, 2009 ; Ning *et al.*, 2004) mais aucune d'augmentation significative du taux de fractalkine n'a pu être décelée dans la circulation systémique ou dans les expectorations des patients CF (Rao *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation des taux de sécrétion de la fractalkine au cours de la régénération normale non CF et CF avec une production plus importante au stade J15 pour les cellules épithéliales CF. Il a été démontré dans la littérature que l'INF γ induit une augmentation de la sécrétion de fractalkine par les cellules épithéliales bronchiques (Fujimoto *et al.*, 2001). Dans notre étude, il ne semble pas que l'augmentation de sécrétion de cette chimiokine observée au cours de la régénération non-CF et CF soit imputable à l'INF γ qui n'a pas présenté de production significative, que ce soit dans les cultures de cellules non-CF ou CF. En outre, la fractalkine ne semble pas être impliquée dans les mécanismes de remodelage de l'épithélium bronchique, tant non-CF que CF, aucune modification du profil de sécrétion de cette chimiokine n'ayant été mise en évidence au cours de la génération d'une hyperplasie mucipare ou d'une métaplasie malpighienne. Nos résultats semblent donc suggérer que les cellules épithéliales bronchiques, au cours de la régénération d'un épithélium mucociliaire ou du remodelage épithélial, créent leur propre environnement inflammatoire.

L'EGF (Epidermal Growth Factor), est un facteur de croissance qui agit via le récepteur EGFR, récepteur tyrosine kinase. L'EGF stimule la réparation épithéliale bronchique dans les cultures de lignées cellulaires ou de cellules primaires (Puddicombe *et al.*, 2000; Zahm *et al.*, 1993). En effet, l'EGF accélère la réparation des lésions épithéliales en modulant la migration cellulaire, un inhibiteur de la voie EGFR tyrosine kinase entraînant un blocage de la réépithélialisation (White *et al.*, 1999; Puddicombe *et al.*, 2000). De plus, Barrow *et al.* ont suggéré que l'EGF et le PDGF (*platelet-derived growth factor*) favorisent la régénération de l'épithélium respiratoire, en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales respiratoires (Barrow *et al.*, 1993). L'EGF semble donc, dans nos cultures non-CF et CF, stimuler la régénération épithéliale, non en modulant la migration ou la prolifération cellulaires, mais en agissant sur le mécanisme de différenciation des cellules épithéliales. En effet, nous avons observé une augmentation significative de la sécrétion de ce facteur de croissance par les cellules épithéliales non-CF et CF à partir du stade J15 de la régénération. Nos résultats suggèrent en outre que l'EGF produit par les cellules épithéliales elles-mêmes ne semble pas être impliqué dans le remaniement épithélial, aucune variation de la sécrétion de ce facteur de croissance n'ayant été mise en évidence au cours du remodelage aboutissant à la génération d'une hyperplasie mucipare ou d'une métaplasie malpighienne.

Le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) est un facteur de croissance sécrété par les macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules épithéliales pulmonaires (Cakarova *et al.*, 2009). Le GM-CSF renforce les fonctions antimicrobiennes des éosinophiles et des macrophages, ainsi que des polynucléaires neutrophiles par un accroissement du chimiotactisme et de leur capacité phagocytaire. Il augmente en outre l'activité anti-tumorale de ces cellules immunitaires (Gomez-Cambronero *et al.*, 2003). Ainsi, le GM-CSF peut être sécrété par les cellules épithéliales respiratoires et induire l'activation de la dégranulation des neutrophiles au site inflammatoire. Dans les tissus inflammatoires des patients ayant développé des polypes nasaux, ce facteur de croissance ne présente pas de différence significative quand à son expression chez les patients CF en comparaison des patients non-CF (Nunes *et al.*, 2009). N'ayant pas mis en évidence de différence significative de la sécrétion du GM-CSF par les cellules épithéliales non-CF et CF, nos résultats sont concordants avec cette étude de la littérature. Bien qu'il ait été rapporté que le GM-CSF, sécrété par les cellules épithéliales suite à une activation par le $TNF\alpha$, soit impliqué dans la réparation de la barrière alvéolaire en stimulant la prolifération cellulaire épithéliale (Cakarova *et al.*, 2009), il ne semble pas que ce facteur de

croissance joue le même rôle au cours de la régénération de l'épithélium bronchique, tant non-CF que CF. En effet, nous avons observé que, bien qu'une augmentation significative de la sécrétion de GM-CSF soit détectée dans les cultures de cellules non-CF dès le stade J5 de la régénération, cette hypersécrétion se poursuit jusqu'au stade J15, lorsque la prolifération cellulaire s'atténue. De plus, dans les cultures de cellules épithéliales CF, une augmentation significative de la production de GM-CSF est décelée dès le stade J5 de la régénération, suivie d'une diminution significative au stade J15, lorsque la prolifération cellulaire s'effectue. En outre, le GM-CSF produit par les cellules épithéliales elles-mêmes ne semble pas être impliqué dans le remaniement épithélial, aucune variation de la sécrétion de ce facteur de croissance n'ayant été mise en évidence au cours du remodelage des cultures de cellules non-CF ou CF. La sécrétion de GM-CSF par les cellules épithéliales non-CF et CF en culture en IAL, en particulier au stade J15 de la régénération et du remodelage épithélial, pourrait correspondre à la mise place d'une fonction de défense par production de facteur chimio-attractants pour les cellules immunitaires.

En conclusion, notre étude montre que, en dehors de tout contexte infectieux et inflammatoire exogène, aucun des facteurs de croissance, chimiokines ou cytokines étudiés ne semble impliqué dans le remodelage de l'épithélium bronchique humain, tant dans les cultures de cellules épithéliales non-CF que CF.

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail de cette thèse s'est articulé autour de deux études complémentaires qui concernent la régénération de l'épithélium bronchique humain, la première s'intéressant aux mécanismes de régénération de l'épithélium CF, et la deuxième s'intéressant aux mécanismes du remodelage de l'épithélium bronchique tant CF que non-CF. Nous avons conçu notre démarche sur le fait que la CF est une maladie caractérisée par des remaniements et des lésions de l'épithélium bronchique, qui doit régénérer sa structure pour restaurer ses fonctions de défense. Dans un premier temps, nous nous sommes interrogés sur l'origine des remaniements observés dans la CF et dans un deuxième temps, nous avons cherché à évaluer l'impact du remodelage épithélial sur la fonctionnalité épithéliale.

Dans notre étude, nous avons montré que, indépendamment de toute infection bactérienne et de toute inflammation exogène, la régénération de l'épithélium bronchique CF est retardée, par rapport à la régénération non-CF, et que l'épithélium CF régénéré est remanié. Cette étude fait suite aux travaux de Hajj *et al.*, en 2007, montrant le même phénomène dans un modèle de xéno greffe dans la souris nude et concluant que les remaniements épithéliaux observés chez les patients CF sont dus, au moins en partie, à un mécanisme dérégulé de la régénération de l'épithélium (Hajj *et al.*, 2007). Nous avons utilisé, pour nos travaux, un modèle de régénération de l'épithélium bronchique *in vitro*, afin de nous affranchir, non seulement de la composante infectieuse, mais aussi de la composante inflammatoire présente dans le modèle *in vivo* utilisé par Hajj *et al.*. Nos résultats montrent que, non seulement l'infection, mais aussi l'inflammation, inhérentes à la pathologie de la CF ne sont pas entièrement responsables des remaniements épithéliaux observés chez les patients CF, mais bien à une dérégulation du mécanisme de la régénération épithéliale. Ce phénomène peut toutefois être accentué par l'infection ou l'inflammation. En effet, il est bien connu que l'infection bactérienne ou virale, de même que l'inflammation tissulaire entraînent souvent des remaniements cellulaires (Holtzman *et al.*, 1998 ; Kajon *et al.*, 2003 ; Aoshiba et Nagai, 2004). Nos résultats semblent donc suggérer un rôle de la mutation de CFTR dans les anomalies de la régénération observées dans la CF. Il sera donc judicieux, pour étudier notre hypothèse, de corriger le défaut génique de cellules CF par transduction avec un vecteur lentiviral codant pour la protéine CFTR native (Castillon *et al.*, 2004 ; Shoji *et al.*, 1990) et de déterminer l'effet de la correction de CFTR sur

la régénération de l'épithélium CF, en la comparant à la régénération épithéliale à partir de cellules CF non corrigées, et de cellules non-CF.

Il est à noter que, dans un contexte exempt d'infection et d'inflammation exogène, la régénération de l'épithélium CF bronchique est non seulement retardée, mais qu'elle aboutit à la reconstitution d'un épithélium remodelé dont la fonctionnalité, en termes de transports ioniques transépithéliaux et de défense anti-bactérienne, est altérée. Cette observation suggère que même si CFTR est correctement localisé au niveau des cellules épithéliales CF dans le cas d'un épithélium mucociliaire différencié comme cela a été décrit dans la littérature (Hajj *et al.*, 2007 ; Brezillon *et al.*, 1997 ; Dupuit *et al.*, 1995), ce canal chlore ne fonctionne pas, avec pour conséquence le défaut de défense anti-infectieuse qui est généralement rapporté dans la littérature (Boucher, 2004 ; Ganz, 2002). La encore, la correction du défaut génique de cellules CF permettra de déterminer l'effet de la correction de CFTR, non seulement sur la normalisation de la régénération épithéliale mais aussi sur la restauration d'un épithélium non remanié et fonctionnel.

Nos résultats montrent également que, dans un contexte dépourvu d'infection bactérienne et d'inflammation exogène, le remodelage épithélial affecte les propriétés électrophysiologiques des épithélia CF et non CF. En effet, nous avons montré que les flux ioniques de sodium et de chlore sont perturbés, avec des altérations plus importantes pour les cultures de cellules épithéliales bronchiques CF. L'environnement ionique ayant une incidence directe sur l'activité des molécules antimicrobiennes produites naturellement par les cellules épithéliales bronchiques, ces modifications des courants ioniques peuvent entraîner l'altération des fonctions de défense épithéliale. En effet, nos résultats ont permis de montrer que le remodelage de l'épithélium bronchique, même non CF, et plus particulièrement le développement d'une métaplasie malpighienne, entraîne une altération des propriétés de défense antibactérienne de l'épithélium bronchique. Ces altérations peuvent être à l'origine des infections bactériennes soutenues observées, non seulement chez les patients CF, mais également chez les patients non-CF présentant un remodelage de l'épithélium bronchique de type métaplasie malpighienne (Eldika et Sethi, 2006 ; Murphy, 2006). Enfin, le remodelage de l'épithélium, tant non-CF que CF ne semble pas être lié une modification de la sécrétion des facteurs de croissance, chimiokines ou cytokines que nous avons étudiés, aucun de ces facteurs ne présentant de variation significative de production au cours du remodelage, en comparaison des taux de sécrétion observés au cours de la régénération d'un épithélium mucociliaire différencié. Bien que le panel de facteurs étudiés ait été important (17 facteurs au total, facteurs généralement décrits pour être retrouvés chez les patients CF), peu de modulations significatives ont pu être mises en évidence. Il

est à noter que nous avons été confrontés à une très grande variabilité des résultats, due à la grande variabilité interpatient qui est couramment décrite dans les études utilisant des cellules primaires issues de patients. Il nous faudra donc élargir notre champ d'investigation, en termes de facteurs potentiellement impliqués dans la régénération et le remodelage épithélial bronchique, ainsi qu'augmenter le nombre de cultures issues de patients différents afin de limiter la variabilité interpatient. Cette étude pourra permettre d'identifier des facteurs modulateurs du remodelage épithélial qui ouvriront des pistes de recherche de molécules thérapeutiques pro-régénératrices pouvant favoriser la reconstitution d'un épithélium bronchique mucociliaire non remodelé et fonctionnel.

BIBLIOGRAPHIE

AARBIOU J, ERTMANN M, VAN WETERING S, VAN NOORT P, ROOK D, RABE KF, LITVINOV SV, et al.

Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro.

J Leukoc Biol. 2002 Jul;72(1):167-74.

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

Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am Respir Cell Mol Biol.* 2004 Feb;30(2):193-201

AIKAWA T, SHIMURA S, SASAKI H, EBINA M, TAKISHIMA T.

Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack.

Chest. 1992 Apr;101(4):916-21.

ANDERSEN DH

Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study.

Am J Dis Child. 1938;56(2):344-399.

ANDERSEN DH, HODGES RG.

Celiac syndrome: V. Genetics of Cystic Fibrosis of the Pancreas With a Consideration of Etiology.

Am J Dis Child. 1946; 72: 62-80.

ANDERSON MP, GREGORY RJ, THOMPSON S, SOUZA DW, PAUL S, MULLIGAN RC et al.

Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity.

Science. 1991 Jul 12;253(5016):202-5

ANGIOLILLO AL, SGADARI C, TAUB DD, LIAO F, FARBER JM, MAHESHWARI S et al.

Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.

J Exp Med. 1995 Jul 1;182(1):155-62.

AOSHIBA K ET ATSUSHI N

Differences in airway remodeling between asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

Clin Rev Allergy Immunol. 2004; 27 (1):35-43.

ARMSTRONG DS, GRIMWOOD K, CARLIN JB, CARZINO R, GUTIÉRREZ JP, HULL J, et al.

Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med. 156(4) 1997: 1197-1204.

ATHERTON HC, JONES G, DANAHAY H.

IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003; 285 (3): L730-739

AZGHANI AO

Pseudomonas aeruginosa and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1996 Jul;15(1):132-40.

BALFOUR-LYNN IM, LAVERTY A, DINWIDDIE R.

Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis.
Arch Dis Child. 1996 Oct;75(4):319-22.

BALLARD ST, INGLIS SK.

Liquid secretion properties of airway submucosal glands.
J Physiol. 2004 Apr 1;556(Pt 1):1-10

BALOUGH K, MCCUBBIN M, WEINBERGER M, SMITS W, AHRENS R, FICK R.

The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis.
Pediatr Pulmonol. 1995 Aug;20(2):63-70.

BALS R, WANG X, WU Z, FREEMAN T, BAFNA V, ZASLOFF M, WILSON JM.

Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.
J Clin Invest. 1998 Sep 1;102(5):874-80.

BALS R, WANG X, ZASLOFF M, WILSON JM.

The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 4;95(16):9541-6.

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

Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model.
J Clin Invest. 1999 Apr;103(8):1113-7.

BARDOU O, TRINH NT, BROCHIERO E.

K⁺ channels and lung epithelial physiology.
Med Sci (Paris). 2009 Apr;25(4):391-7.

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

Growth factors accelerate epithelial repair in sheep trachea.
Lung. 1993;171(6):335-44.

BASBAUM C, JANY B, ET FINKBEINER WE.

The serous cell.
Annu Rev Physiol 52: 97-113.

BASBAUM C ET JANY B

Plasticity of the airway epithelium.
Am J Physiol 259: L38 - L46.

BEDROSSIAN CW, GREENBERG SD, SINGER DB, HANSEN JJ, ROSENBERG HS.

The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups.
Hum Pathol. 1976 Mar;7(2):195-204.

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. 1996 Oct;154(4 Pt 2):S155-62.

DE BENTZMANN S, ROGER P, DUPUIT F, BAJOLET-LAUDINAT O, FUCHEY C, PLOTKOWSKI MC, PUCHELLE E.

Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells.

Infection and Immunity. 1996 May;64(5):1582-8.

BERGER H A, WELSH M J.

Electrolyte transport in the lungs.

Hospital Practice (Office Ed.). 1991 Mar;26(3):53-59.

BLATT EN, YAN XH, WUERFFEL MK, HAMILOS DL, BRODY SL.

Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Aug;21(2):168-76.

BLOUQUIT S, REGNIER A, DANNHOFFER L, FERMANIAN C, NALINE E, BOUCHER R, CHINET T.

Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med. 2006 Aug 1;174(3):299-305.

BODE H, SCHMITZ H, FROMM M, SCHOLZ P, RIECKEN E O, SCHULZKE J D.

IL-1beta and TNF-alpha, but not IFN-alpha, IFN-gamma, IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon.

Cytokine. 1998 Jun;10(6):457-465.

BOERS JE, AMBERGEN AW, THUNNISSEN FB.

Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium.

Am J Respir Crit Care Med. 1998 Jun;157(6 Pt 1):2000-6.

BOISVIEUX-ULRICH E, LAINE MC, SANDOZ D.

Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium.

Cell and Tissue Research. 1990 Mar;259(3):443-54.

BOISVIEUX-ULRICH E, LE PECHON-VALLEE C, MILLION K, BAEZA-SQUIBAN A, HOUCINE O, GUENNOU C, et al..

Differential effects of several retinoid receptor-selective ligands on squamous differentiation and apoptosis in airway epithelial cells.

Cell and Tissue Research. 2000 Apr;300(1):67-81.

BOLTON SJ, PINNION K, OREFFO V, FOSTER M, PINKERTON KE.

Characterisation of the proximal airway squamous metaplasia induced by chronic tobacco smoke exposure in spontaneously hypertensive rats.

Respir Res. 2009 Nov 24;10(1):118.

BONFIELD TL, KONSTAN MW, BERGER M.

Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis.

The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1999 Jul;104(1):72-8.

BONFIELD TL, PANUSKA JR, KONSTAN MW, HILLIARD KA, HILLIARD JB, GHNAIM H, BERGER M.

Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs.

Am J Respir Crit Care Med. 1995 Dec;152(6 Pt 1):2111-8.

BORRADORI L, SONNENBERG A.

Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases.
Current Opinion in Cell Biology. 1996 Oct;8(5):647-56.

BORTHWICK LA, MCILROY EI, GOROWIEC MR, BRODLIE M, JOHNSON GE, WARD C, et al.

Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair.
American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2010 Mar;10(3):498-509.

BOUCHER RC.

Human airway ion transport. Part two.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994 Aug;150(2):581-93.

BOUCHER RC.

Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia.
Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. 2003 Jan;445(4):495-8.

BOUCHER RC.

New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.
The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2004 Jan;23(1):146-58.

BOUCHER RC, STUTTS MJ, KNOWLES MR, CANTLEY L, GATZY JT.

Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation.
The Journal of Clinical Investigation. 1986 Nov;78(5):1245-52.

BREEZE RG, WHELDON EB.

The cells of the pulmonary airways.
The American Review of Respiratory Disease. 1977 oct;116(4):705-777.

BREZILLON S, DUPUIT F, HINNRSKY J, MARCHAND V, KÄLIN N, TÜMMLER B, PUCHELLE E.

Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non-cystic fibrosis patients.
Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology. 1995 Feb;72(2):191-200.

BRÉZILLON S, HAMM H, HEILMANN M, SCHÄFERS HJ, HINNRSKY J, WAGNER TO, et al.

Decreased expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in remodeled airway epithelium from lung transplanted patients.
Human Pathology. 1997 Aug;28(8):944-52.

BRÉZILLON S, ZAHM JM, PIERROT D, GAILLARD D, HINNRSKY J, MILLART H, et al.

ATP depletion induces a loss of respiratory epithelium functional integrity and down-regulates CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) expression.
The Journal of Biological Chemistry. 1997 Oct 31;272(44):27830-8.

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.
Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology. 1996 Mar;74(3):658-69.

BURCH LH, TALBOT CR, KNOWLES MR, CANESSA CM, ROSSIER BC, BOUCHER RC.

Relative expression of the human epithelial Na⁺ channel subunits in normal and cystic fibrosis airways.

Am J Physiol. 1995 Aug;269(2 Pt 1):C511-8.

BURGEL PR, NADEL JA.

Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium.

Thorax. 2004 Nov;59(11):992-6.

CAKAROVA L, MARSH LM, WILHELM J, MAYER K, GRIMMINGER F, SEEGER W, et al.

Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2009 Sep 15;180(6):521-32.

CANESSA CM, SCHILD L, BUELL G, THORENS B, GAUTSCHI I, HORISBERGER JD, et al.

Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits.

Nature. 1994 Feb 3;367(6462):463-7.

CASTILLON N, AVRIL-DELPLANQUE A, CORAUX C, DELEND A, PEULT B, DANOS O, PUCHELLE E.

Regeneration of a well-differentiated human airway surface epithelium by spheroid and lentivirus vector-transduced airway cells.

J Gene Med. 2004 Aug;6(8):846-56.

CASTILLON N, HINNRASKY J, ZAHM JM, KAPLAN H, BONNET N, CORLIEU P, et al.

Polarized expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and associated epithelial proteins during the regeneration of human airway surface epithelium in three-dimensional culture.

Lab Invest. 2002 Aug;82(8):989-98

CASTRANOVA V, RABOVSKY J, TUCKER JH, MILES PR.

The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte.

Toxicol Appl Pharmacol. 1988 May;93(3):472-83.

CHAMBERS LA, ROLLINS BM, TARRAN R.

Liquid movement across the surface epithelium of large airways.

Respir Physiol Neurobiol. 2007 Dec 15;159(3):256-70. Epub 2007 Jun 17.

CHAMBON P.

A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.

FASEB J. 1996 Jul;10(9):940-54.

CHERTOV O, MICHIEL DF, XU L, WANG JM, TANI K, MURPHY WJ, et al.

Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils.

J Biol Chem. 1996 Feb 9;271(6):2935-40.

CHHIN B, NEGRE D, MERROT O, PHAM J, TOURNEUR Y, RESSNIKOFF D, et al.

Ciliary beating recovery in deficient human airway epithelial cells after lentivirus ex vivo gene therapy.

PLoS Genet. 2009 Mar;5(3):e1000422.

CHILOSI M, POLETTI V, MURER B, LESTANI M, CANCELLIERI A, MONTAGNA L, et al.

Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63.

Lab Invest. 2002 Oct;82(10):1335-45

CHILVERS MA, O'CALLAGHAN C.

Local mucociliary defence mechanisms.

Paediatr Respir Rev. 2000 Mar;1(1):27-34.

CHMIEL JF, DAVIS PB.

State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?

Respir Res. 2003;4:8.

CHRISTENSEN PJ, DU M, MOORE B, MORRIS S, TOEWS GB, PAINE R.

Expression and functional implications of CCR2 expression on murine alveolar epithelial cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Jan;286(1):L68-72.

CHRISTENSEN TG, BLANCHARD GC, NOLLEY G, HAYES JA.

Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in the lower respiratory tract of the guinea pig.

Cell and Tissue Research. 1981;214(2):407-15.

CHRISTENSEN TG, HAYES JA.

Endogenous peroxidase in the conducting airways of hamsters: morphologic evidence of synthesis and secretion.

The American Review of Respiratory Disease. 1982 Mar;125(3):341-6.

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.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2004 Nov;31(5):528-37.

CLARK AB, RANDELL SH, NETTESHEIM P, GRAY TE, BAGNELL B, OSTROWSKI LE.

Regulation of ciliated cell differentiation in cultures of rat tracheal epithelial cells.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1995 Mar;12(3):329-38.

CLEMENTS JA.

Lung surfactant: a personal perspective.

Annual Review of Physiology. 1997;59:1-21.

CONWAY BA, VENU V, SPEERT DP.

Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the Burkholderia cepacia complex.

Journal of Bacteriology. 2002 Oct;184(20):5678-85.

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.

The Journal of Pathology. 2005 Jun;206(2):160-9.

CORAUX C, KILEZTKY C, POLETTE M, HINNRSKY J, ZAHM JM, DEVILLIER P, et al...

Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2004 May;30(5):605-12.

COTTEN JF, WELSH MJ.

Covalent modification of the regulatory domain irreversibly stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

The Journal of Biological Chemistry. 1997 Oct 10;272(41):25617-22.

CROSBY LM, WATERS CM.

Epithelial repair mechanisms in the lung.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010 Jun;298(6):L715-31.

DANEL C, ERZURUM SC, MCELVANEY NG, CRYSTAL RG.

Quantitative assessment of the epithelial and inflammatory cell populations in large airways of normals and individuals with cystic fibrosis.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1996 Jan;153(1):362-8.

DANIELY Y, LIAO G, DIXON D, LINNOILA RI, LORI A, RANDELL SH, et al...

Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium.

American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2004 Jul;287(1):C171-81.

DAVIES DE.

The role of the epithelium in airway remodeling in asthma.

Proceedings of the American Thoracic Society. 2009 Dec;6(8):678-82.

DAVIES JC, BILTON D.

Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis.

Respiratory Care. 2009 May;54(5):628-40.

DAVIS CW, LAZAROWSKI E.

Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling.

Respiratory Physiology & Neurobiology. 2008 Nov 30;163(1-3):208-13.

DE BRAEKELEER M, ALLARD C, LEBLANC JP, SIMARD F, AUBIN G.

Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation.

Human Genetics. 1997 Dec;101(2):208-11.

DELPLANQUE A, CORAUX C, TIROUVANZIAM R, KHAZAAL I, PUCHELLE E, AMBROS P, et al...

Epithelial stem cell-mediated development of the human respiratory mucosa in SCID mice.

Journal of Cell Science. 2000 Mar;113 (Pt 5):767-78.

DEVALIA JL, SAPSFORD RJ, CUNDELL DR, RUSZNAK C, CAMPBELL AM, DAVIES RJ.

Human bronchial epithelial cell dysfunction following in vitro exposure to nitrogen dioxide.

The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 1993 Oct;6(9):1308-16.

DI SANT'AGNESE PA, DARLING RC, PERERA GA, SHEA E.

Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease.

Pediatrics. 1953 Nov;12(5):549-63.

DOHAR JE, STOOL SE.

Respiratory mucosa wound healing and its management. An overview.
Otolaryngologic Clinics of North America. 1995 Oct;28(5):897-912.

DONNELLY GM, HAACK DG, HEIRD CS.

Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue.
Cell and Tissue Kinetics. 1982 Mar;15(2):119-30.

DÖRING G.

Cystic fibrosis respiratory infections: interactions between bacteria and host defence.
Monaldi Arch Chest Dis. 1997 Aug;52(4):363-6.

DUFOUR JH, DZIEJMAN M, LIU MT, LEUNG JH, LANE TE, LUSTER AD.

IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking.
Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950). 2002 Apr 1;168(7):3195-204.

DUNSMORE SE, SAARIALHO-KERE UK, ROBY JD, WILSON CL, MATRISIAN LM, WELGUS HG, et al..

Matrilysin expression and function in airway epithelium.
The Journal of Clinical Investigation. 1998 Oct 1;102(7):1321-31.

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.
American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. 2000 Jan;278(1):L165-76.

DYE JA, ADLER KB.

Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract.
Thorax. 1994 Aug;49(8):825-34.

ECELBARGER CA, KIM GH, WADE JB, KNEPPER MA.

Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin.
Experimental Neurology. 2001 Oct;171(2):227-34.

ELDIKA N, SETHI S.

Role of nontypeable Haemophilus influenzae in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease.
Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2006 Mar;12(2):118-24.

ELLEFSEN P, TOS M.

Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae.
Anatomischer Anzeiger. 1972;130(5):501-20.

ERJEFÄLT JS, ERJEFÄLT I, SUNDLER F, PERSSON CG.

In vivo restitution of airway epithelium.
Cell and Tissue Research. 1995 Aug;281(2):305-16.

ERJEFÄLT JS, SUNDLER F, PERSSON CG.

Epithelial barrier formation by airway basal cells.
Thorax. 1997 Mar;52(3):213-7.

ESCOTTE S, CATUSSE C, CORAUX C, PUCHELLE E.

Reconstitution of human airway tissue in the humanized xenograft model.

Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society. 2004 Aug;3(2):63-5.

EVANS MJ, VAN WINKLE LS, FANUCCHI MV, PLOPPER CG.

Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium.

Experimental Lung Research. 2001 Jul-Aug;27(5):401-15.

FARBER S, SHWACHMAN H, MADDOCK CL.

Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic enzyme activity and the celiac syndrome.

Journal of Clinical Investigation. 1943 Nov;22(6):827-38.

FARQUHAR MG, PALADE GE.

Junctional complexes in various epithelia.

The Journal of Cell Biology. 1963 May;17:375-412.

FINKBEINER WE, ZLOCK LT, MEHDI I, WIDDICOMBE JH.

Cultures of human tracheal gland cells of mucous or serous phenotype.

In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal. 2010 May;46(5):450-6.

FU XW, NURSE CA, WONG V, CUTZ E.

Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit.

The Journal of Physiology. 2002 Mar 1;539(Pt 2):503-10.

FUJIMOTO K, IMAIZUMI T, YOSHIDA H, TAKANASHI S, OKUMURA K, SATOH K.

Interferon-gamma stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2001 Aug;25(2):233-8.

FURUICHI K, WADA T, KITAJIKMA S, TOYAMA T, OKUMURA T, HARA A, et al.

IFN-inducible protein 10 (CXCL10) regulates tubular cell proliferation in renal ischemia-reperfusion injury.

Nephron. Experimental Nephrology. 2008;109(1):c29-38.

GANZ T.

Defensins and host defense.

Science (New York, N.Y.). 1999 Oct 15;286(5439):420-1.

GANZ T.

Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract.

The Journal of Clinical Investigation. 2002 Mar;109(6):693-7.

GANZ T.

Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity.

Nature Reviews. Immunology. 2003 Sep;3(9):710-20.

GARROD DR.

Desmosomes and hemidesmosomes.

Current Opinion in Cell Biology. 1993 Feb;5(1):30-40.

GAUTHIER F, FRYKSMARK U, OHLSSON K, BIETH JG.

Kinetics of the inhibition of leukocyte elastase by the bronchial inhibitor.
Biochimica Et Biophysica Acta. 1982 Jan 18;700(2):178-83.

GERSON C, SABATER J, SCURI M, TORBATI A, COFFEY R, ABRAHAM JW, et al.

The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2000 Jun;22(6):665-71.

GIBSON RL, BURNS JL, RAMSEY BW.

Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2003 Oct 15;168(8):918-51.

GOMEZ-CAMBRONERO J, HORN J, PAUL CC, BAUMANN MA.

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is a Chemoattractant Cytokine for Human Neutrophils: Involvement of the Ribosomal p70 S6 Kinase Signaling Pathway.
J Immunol. 2003 Dec 15;171(12):6846-55.

GOMPERTS BN, GONG-COOPER X, HACKETT BP.

Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells.
Journal of Cell Science. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1329-37.

GOODMAN MR, LINK DW, BROWN WR, NAKANE PK.

Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium.
The American Review of Respiratory Disease. 1981 Jan;123(1):115-9.

GOVAN JR, NELSON JW.

Microbiology of lung infection in cystic fibrosis.
British Medical Bulletin. 1992 Oct;48(4):912-30.

GRAY TE, GUZMAN K, DAVIS CW, ABDULLAH LH, NETTESHEIM P.

Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1996 Jan;14(1):104-12.

GREEN KJ, GAUDRY CA.

Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?
Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 2000 Dec;1(3):208-16.

GREEN KJ, JONES JC.

Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components.
The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1996 Jun;10(8):871-81.

GRÜNIG G, WARNOCK M, WAKIL AE, VENKAYYA R, BROMBACHER F, RENNICK DM, et al.

Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma.
Science (New York, N.Y.). 1998 Dec 18;282(5397):2261-3.

GUMBINER B, LOWENKOPF T, APATIRA D.

Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991 Apr 15;88(8):3460-4.

GUMBINER BM.

Breaking through the tight junction barrier.
The Journal of Cell Biology. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1631-3.

HAARDT M, BENHAROUGA M, LECHARDEUR D, KARTNER N, LUKACS GL.

C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation.
The Journal of Biological Chemistry. 1999 Jul 30;274(31):21873-7.

HAAS M, FORBUSH B.

The Na-K-Cl cotransporters.
Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 1998 Apr;30(2):161-72.

HAAS M, FORBUSH B.

The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia.
Annual Review of Physiology. 2000;62:515-34.

HAAS M, MCBRAYER DG, YANKASKAS JR.

Dual mechanisms for Na-K-Cl cotransport regulation in airway epithelial cells.
The American Journal of Physiology. 1993 Jan;264(1 Pt 1):C189-200.

HAJJ R, LESIMPLE P, NAWROCKI-RABY B, BIREMBAUT P, PUCHELLE E, CORAUX C.

Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis.
The Journal of Pathology. 2007 Feb;211(3):340-50.

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. 2007 Jan;25(1):139-48.

HANRAHAN JW, WIOLAND MA.

Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function.
Proceedings of the American Thoracic Society. 2004;1(1):17-21.

HARVEY BJ, EHRENFELD J.

Epithelial pH and ion transport regulation by proton pumps and exchangers.
Ciba Foundation Symposium. 1988;139:139-64.

HARWIG SS, GANZ T, LEHRER RI.

Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing.
Methods in Enzymology. 1994;236:160-72.

HASKINS J, GU L, WITTCHEN ES, HIBBARD J, STEVENSON BR.

ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin.
The Journal of Cell Biology. 1998 Apr 6;141(1):199-208.

HASWELL LE, HEWITT K, THORNE D, RICHTER A, GAÇA MD.

Cigarette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: a potential model of goblet cell hyperplasia.
Toxicol In Vitro. 2010 Apr;24(3):981-7.

HAUBER HP, TSICOPOULOS A, WALLAERT B, GRIFFIN S, MCELVANEY NG, DAIGNEAULT P, et al.
Expression of HCLCA1 in cystic fibrosis lungs is associated with mucus overproduction.
The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2004 Jun;23(6):846-50.

HENKE MO, RATJEN F.
Mucolytics in cystic fibrosis.
Paediatric Respiratory Reviews. 2007 Mar;8(1):24-9.

HIATT PW, GRACE SC, KOZINETZ CA, RABOUDI SH, TREECE DG, TABER LH, et al.
Effects of viral lower respiratory tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis.
Pediatrics. 1999 Mar;103(3):619-26.

HIBI K, TRINK B, PATTURAJAN M, WESTRA WH, CABALLERO OL, HILL DE, et al.
AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000 May 9;97(10):5462-7.

HICKS W JR, HALL LA, TRISTRAM DA, GARDELLA JA, BRIGHT FV, HARD R, et al.
Interleukin-1 facilitates airway epithelial migration in response to injury.
The Laryngoscope. 2003 Feb;113(2):243-7.

HIEMSTRA PS, FERNIE-KING BA, MCMICHAEL J, LACHMANN PJ, SALLENAVE JM.
Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics.
Current Pharmaceutical Design. 2004;10(23):2891-905.

HIGGINS CF.
ABC transporters: from microorganisms to man.
Annual Review of Cell Biology. 1992;8:67-113.

HIGHSMITH WE, BURCH LH, ZHOU Z, OLSEN JC, BOAT TE, SPOCK A, et al.
A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations.
The New England Journal of Medicine. 1994 Oct 13;331(15):974-80.

HOLTZMAN MJ, LOOK DC, SAMPATH D, CASTRO M, KOGA T, WALTER MJ.
Control of epithelial immune-response genes and implications for airway immunity and inflammation.
Proceedings of the Association of American Physicians. 1998 Jan-Feb;110(1):1-11.

HOVENBERG HW, DAVIES JR, HERRMANN A, LINDÉN CJ, CARLSTEDT I.
MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions.
Glycoconjugate Journal. 1996 Oct;13(5):839-47.

HOYER-FENDER S.
Centriole maturation and transformation to basal body.
Seminars in Cell & Developmental Biology. 2010 Apr;21(2):142-7.

HUANG T, YOU Y, SPOOR MS, RICHER EJ, KUDVA VV, PAIGE RC, et al.
Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells.

Journal of Cell Science. 2003 Dec 15;116(24):4935-45.

HUBEAU C, PUCHELLE E, GAILLARD D.

Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis.

J Allergy Clin Immunol. 2001 Oct;108(4):524-9.

HUBEAU C, LORENZATO M, COUETIL JP, HUBERT D, DUSSER D, PUCHELLE E, GAILLARD D.

Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa.

Clin Exp Immunol. 2001 Apr;124(1):69-76.

HUMMLER E, BARKER P, GATZY J, BEERMANN F, VERDUMO C, SCHMIDT A, et al.

Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice.

Nature Genetics. 1996 Mar;12(3):325-8.

JAIN R, PAN J, DRISCOLL JA, WISNER JW, HUANG T, GUNSTEN SP, et al.

The Temporal Relationship Between Primary and Motile Ciliogenesis in Airway Epithelial Cells.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2010 Jan 29.

JEFFERY PK.

Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands.

The American Review of Respiratory Disease. 1983 Aug;128(2):S14-20.

JEFFERY PK, LI D.

Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes.

The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 1997 Jul;10(7):1655-62.

JESAITIS LA, GOODENOUGH DA.

Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein.

The Journal of Cell Biology. 1994 Mar;124(6):949-61.

JETTEN AM.

Growth and differentiation factors in tracheobronchial epithelium.

The American Journal of Physiology. 1991 Jun;260(6 Pt 1):L361-73.

JETTEN AM, SHIRLEY JE.

Characterization of transglutaminase activity in rabbit tracheal epithelial cells. Regulation by retinoids.

The Journal of Biological Chemistry. 1986 Nov 15;261(32):15097-101.

JETTEN AM, VOLLBERG TM, NERVI C, GEORGE MD.

Positive and negative regulation of proliferation and differentiation in tracheobronchial epithelial cells.

The American Review of Respiratory Disease. 1990 Dec;142(6 Pt 2):S36-9.

JONES JC, HOPKINSON SB, GOLDFINGER LE.

Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 1998 Jun;20(6):488-94.

DE JONG PM, VAN STERKENBURG MA, HESSELING SC, KEMPENAAR JA, MULDER AA, MOMMAAS AM, et al.

Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1994 Mar;10(3):271-7.

JORGENSEN PL, NIELSEN JM, RASMUSSEN JH, PEDERSEN PA.

Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na,K-ATPase.
Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum. 1998 Aug;643:79-87.

JORGENSEN PL, HAKANSSON KO, KARLISH SJ.

Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions.
Annual Review of Physiology. 2003;65:817-49.

KAARTINEN L, NETTESHEIM P, ADLER KB, RANDELL SH.

Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro.
In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal. 1993 Jun;29A(6):481-92.

KAHL BC, BELLING G, REICHELT R, HERRMANN M, PROCTOR RA, PETERS G.

Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation.
Journal of Clinical Microbiology. 2003 Jan;41(1):410-3.

KAJON AE, GIGLIOTTI AP, HARROD KS.

Acute inflammatory response and remodeling of airway epithelium after subspecies B1 human adenovirus infection of the mouse lower respiratory tract.
J Med Virol. 2003. Oct;71(2):233-44.

KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A, et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.
Science. 1989 Sep 8;245(4922):1073-80.

KEREM E.

Mutation specific therapy in CF.
Paediatr Respir Rev. 2006;7(1):S166-9.

KHAN TZ, WAGENER JS, BOST T, MARTINEZ J, ACCURSO FJ, RICHES DW.

Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.
Am J Respir Crit Care Med. 1995 Apr;151(4):1075-82.

KIM JY, SAJJAN US, KRASAN GP, LIPUMA JJ.

Disruption of tight junctions during traversal of the respiratory epithelium by *Burkholderia cenocepacia*.
Infect Immun. 2005 Nov;73(11):7107-12.

VAN KLINKEN BJ, EINERHAND AW, BÜLLER HA, DEKKER J.

The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins.
Glycobiology. 1998 Jan;8(1):67-75.

KNOWLES MR, STUTTS MJ, SPOCK A, FISCHER N, GATZY JT, BOUCHER RC.

Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium.

Science. 1983 Sep 9;221(4615):1067-70.

KONRÁDOVÁ V, VAVROVÁ V, HLOUSKOVÁ Z, COPOVÁ M, TOMÁNEK A, HOUSTĚK J.

Ultrastructure of bronchial epithelium in children with chronic or recurrent respiratory diseases.

Eur J Respir Dis. 1982 Nov;63(6):516-25.

KONSTAN MW, BERGER M.

Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology.

Pediatr Pulmonol. 1997 Aug;24(2):137-42; discussion 159-61.

KONSTAN MW, CHENG PW, BOAT TF.

A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium.

Exp Lung Res. 1982 May;3(2):175-81.

KONSTAS AA, KOCH JP, KORBMACHER C.

cAMP-dependent activation of CFTR inhibits the epithelial sodium channel (ENaC) without affecting its surface expression.

Pflugers Arch. 2003 Jan;445(4):513-21.

KUMAR NM, GILULA NB.

The gap junction communication channel.

Cell. 1996 Feb 9;84(3):381-8.

KUMMER W, LIPS KS, PFEIL U.

The epithelial cholinergic system of the airways.

Histochem Cell Biol. 2008 Aug;130(2):219-34.

KUSTER B, SHAINSKAYA A, PU HX, GOLDSHLEGER R, BLOSTEIN R, MANN M, et al.

A new variant of the gamma subunit of renal Na,K-ATPase. Identification by mass spectrometry, antibody binding, and expression in cultured cells.

J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18441-6.

LAMB D, REID L.

Mitotic rates, goblet cell increase and histochemical changes in mucus in rat bronchial epithelium during exposure to sulphur dioxide.

J Pathol Bacteriol. 1968 Jul;96(1):97-111.

LAMB D, REID L.

Goblet cell increase in rat bronchial epithelium after exposure to cigarette and cigar tobacco smoke.

Br Med J. 1969 Jan 4;1(5635):33-5.

LAMBLIN C, SAELENS T, BERGOIN C, WALLAERT B.

The common mucosal immune system in respiratory disease.

Rev Mal Respir. 2000 Nov;17(5):941-6.

LAMOTHE J, HUYNH KK, GRINSTEIN S, VALVANO MA.

Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles.

Cell Microbiol. 2007 Jan;9(1):40-53.

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 Dec;108(12):1817-24.

LAZARD DS, MOORE A, HUPERTAN V, MARTIN C, ESCABASSE V, DREYFUS P, et al.

Muco-ciliary differentiation of nasal epithelial cells is decreased after wound healing in vitro. *Allergy.* 2009 Aug;64(8):1136-43.

LEE JJ, LIU D, LEE JS, KURIE JM, KHURI FR, IBARGUEN H, et al.

Long-term impact of smoking on lung epithelial proliferation in current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Jul 18;93(14):1081-8.

LEGRAND C, GILLES C, ZAHM JM, POLETTE M, BUISSON AC, KAPLAN H, et al.

Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol.* 1999 Jul 26;146(2):517-29.

LEIGH MW, KYLANDER JE, YANKASKAS JR, BOUCHER RC.

Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995 Jun;12(6):605-12.

LENANDER-LUMIKARI M.

Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H₂O₂ system. *Oral Microbiol Immunol.* 1992 Oct;7(5):315-20.

LESIMPLE P, VAN SEUNINGEN I, BUISINE MP, COPIN MC, HINZ M, HOFFMANN W, et al.

Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Mar;36(3):296-303.

LESSIE TG, HENDRICKSON W, MANNING BD, DEVEREUX R.

Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 Nov 1;144(2-3):117-28.

LEVAY PF, VILJOEN M.

Lactoferrin: a general review. *Haematologica.* 1995 May-Jun;80(3):252-67.

LI JD, DOHRMAN AF, GALLUP M, MIYATA S, GUM JR, KIM YS, et al.

Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 4;94(3):967-72.

LINNOILA RI.

Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Invest.* 2006 May;86(5):425-44.

LÖNNERDAL B, IYER S.

Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:93-110.

LUSTER AD, GREENBERG SM, LEDER P.

The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4

and inhibits endothelial cell proliferation.
J Exp Med. 1995 Jul 1;182(1):219-31.

MACNEE W.

Oxidants/antioxidants and COPD.
Chest. 2000 May;117(5):303S-17S.

MACNEE W.

Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.
Clin Chest Med. 2007 Sep;28(3):479-513, v.

MAMMEL MC, BOROS SJ.

Airway damage and mechanical ventilation: a review and commentary.
Pediatr Pulmonol. 1987 Nov-Dec;3(6):443-7.

MAOUCHE K, POLETTE M, JOLLY T, MEDJBER K, CLOËZ-TAYARANI I, CHANGEUX JP, et al.

{alpha}7 nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation.
Am J Pathol. 2009 Nov;175(5):1868-82.

MARTIN E, GANZ T, LEHRER RI.

Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates.
J Leukoc Biol. 1995 Aug;58(2):128-36.

MATTHAY MA, FOLKESSON HG, VERKMAN AS.

Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung.
Am J Physiol. 1996 Apr;270(4 Pt 1):L487-503.

MATTHAY MA, ROBRIQUET L, FANG X.

Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury.
Proc Am Thorac Soc. 2005;2(3):206-13.

MCCLEAN S, CALLAGHAN M.

Burkholderia cepacia complex: epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention.
J Med Microbiol. 2009 Jan;58(Pt 1):1-12.

MCCOMB JG, RANGANATHAN M, LIU XH, PILEWSKI JM, RAY P, WATKINS SC, et al.

CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1+ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema.
Am J Pathol. 2008 Oct;173(4):949-61.

MCCRAY PB, BENTLEY L.

Human airway epithelia express a beta-defensin.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 Mar;16(3):343-9.

MCGUIRE JK, LI Q, PARKS WC.

Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium.
Am J Pathol. 2003 Jun;162(6):1831-43.

MELROSE J, GHOSH P, TAYLOR TK, ANDREWS JL.

The serine proteinase inhibitory proteins of the human intervertebral disc: their isolation, characterization and variation with ageing and degeneration.
Matrix. 1992 Dec;12(6):456-70.

MERCER RR, RUSSELL ML, ROGGLI VL, CRAPO JD.

Cell number and distribution in human and rat airways.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1994 Jun;10(6):613-24.

METZ-BOUTIGUE MH, JOLLÈS J, MAZURIER J, SCHOENTGEN F, LEGRAND D, SPIK G, et al.

Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins.
Eur J Biochem. 1984 Dec 17;145(3):659-76.

VON MEYERINCK L, SCHERER G, ADLKOEFER F, WENZEL-HARTUNG R, BRUNE H, THOMAS C.

Exposure of rats and hamsters to sidestream smoke from cigarettes in a subchronic inhalation study.
Exp Pathol. 1989;37(1-4):186-9.

MEYRICK B, REID L.

Ultrastructure of cells in the human bronchial submucosal glands.
J Anat. 1970 Sep;107(Pt 2):281-99.

MEYRICK B, STURGESS JM, REID L.

A reconstruction of the duct system and secretory tubules of the human bronchial submucosal gland.
Thorax. 1969 Nov;24(6):729-36.

MITHAL A, EMERY JL.

Squamous metaplasia of the tracheal epithelium in children.
Thorax. 1976 Apr;31(2):167-71.

MOHAN R, CHINTALA SK, JUNG JC, VILLAR WV, MCCABE F, RUSSO LA, et al.

Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration.
J Biol Chem. 2002 Jan 18;277(3):2065-72.

MONIAUX N, NOLLET S, PORCHET N, DEGAND P, LAINE A, AUBERT JP.

Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin.
Biochem J. 1999 Mar 1;338 (Pt 2):325-33.

MOORE RA, HANCOCK RE.

Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance.
Antimicrob Agents Chemother. 1986 Dec;30(6):923-6.

MORRIS AP, CUNNINGHAM SA, TOUSSON A, BENOS DJ, FRIZZELL RA.

Polarization-dependent apical membrane CFTR targeting underlies cAMP-stimulated Cl⁻ secretion in epithelial cells.
Am J Physiol. 1994 Jan;266(1 Pt 1):C254-68.

MUHLEBACH MS, STEWART PW, LEIGH MW, NOAH TL.

Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients.
Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jul;160(1):186-91.

MUKAIDA N.

Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Apr;284(4):L566-77.

MUNRO NC, BARKER A, RUTMAN A, TAYLOR G, WATSON D, MCDONALD-GIBSON WJ, et al.

Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on in vivo tracheal mucus velocity.
J Appl Physiol. 1989 Jul;67(1):316-23.

MURATA K, OTA S, NIKI T, GOTO A, LI CP, RURIKO UM, et al.

p63 - Key molecule in the early phase of epithelial abnormality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 2007 Dec;83(3):367-76.

MURPHY CJ, FOSTER BA, MANNIS MJ, SELSTED ME, REID TW.

Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts.
J Cell Physiol. 1993 May;155(2):408-13.

MURPHY TF.

The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.
Curr Opin Infect Dis. 2006 Jun;19(3):225-30.

NAGPAL ML, DAVIS J, LIN T.

Overexpression of CXCL10 in human prostate LNCaP cells activates its receptor (CXCR3) expression and inhibits cell proliferation.
Biochim Biophys Acta. 2006 Sep;1762(9):811-8.

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 May;89(5):1478-84.

NING W, LI CJ, KAMINSKI N, FEGHALI-BOSTWICK CA, ALBER SM, DI YP, et al.

Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 12;101(41):14895-900.

NUNES FB, BECKER CG, BECKER HM, ARAUJO RN, GUIMARÃES RE.

Cytokines profile in cystic fibrosis patients with nasal polyps.
Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord). 2009;130(3):163-7.

OLSEN CE, LIGUORI AE, ZONG Y, LANTZ RC, BURGESS JL, BOITANO S.

Arsenic upregulates MMP-9 and inhibits wound repair in human airway epithelial cells.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Aug;295(2):L293-302.

OPPENHEIM JJ, BIRAGYN A, KWAK LW, YANG D.

Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity.
Ann Rheum Dis. 2003 Nov;62(2):ii17-21.

ORLOWSKI J, GRINSTEIN S.

Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells.
J Biol Chem. 1997 Sep 5;272(36):22373-6.

ORLOWSKI J, GRINSTEIN S.

Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family.
Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):549-65.

PAN J, LUK C, KENT G, CUTZ E, YEGER H.

Pulmonary neuroendocrine cells, airway innervation, and smooth muscle are altered in Cfr null mice.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Sep;35(3):320-6.

PAPI A, CASONI G, CARAMORI G, GUZZINATI I, BOSCHETTO P, RAVENNA F, et al.

COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma.
Thorax. 2004 Aug;59(8):679-81.

PARADISO AM.

Identification of Na(+)-H+ exchange in human normal and cystic fibrotic ciliated airway epithelium.
Am J Physiol. 1992 Jun;262(6 Pt 1):L757-64.

PARKS WC, LÓPEZ-BOADO YS, WILSON CL.

Matrilysin in epithelial repair and defense.
Chest. 2001 Jul;120(1):36S-41S.

PEREZ-MORENO M, JAMORA C, FUCHS E.

Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions.
Cell. 2003 Feb 21;112(4):535-48.

PESCI EC, IGLEWSKI BH.

The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing.
Trends Microbiol. 1997 Apr;5(4):132-4; discussion 134-5.

PETECCHIA L, SABATINI F, VARESI L, CAMOIRANO A, USAI C, PEZZOLO A, et al.

Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway.
Chest. 2009 Jun;135(6):1502-12.

PIN I, BRÉMONT F, CLÉMENT A, SARDET A.

Management of pulmonary involvement in mucoviscidosis in the child.
Arch Pediatr. 2001 Dec;8(5):856s-883s.

PIORUNEK T, MARSZALEK A, BICZYSKO W, GOZDZIK J, COFTA S, SEGET M.

Correlation between the stage of cystic fibrosis and the level of morphological changes in adult patients.
J Physiol Pharmacol. 2008 Dec;59(6):565-72.

PLOTKOWSKI MC, TOURNIER JM, PUCHELLE E.

Pseudomonas aeruginosa strains possess specific adhesins for laminin.
Infect Immun. 1996 Feb;64(2):600-5.

POLOSUKHIN VV.

Ultrastructural of the bronchial epithelium in chronic inflammation.

Ultrastruct Pathol. 2001 Mar-Apr;25(2):119-28.

POPPER L, KNORR D.

Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate-system.

Nahrung. 1997 Feb;41(1):29-33.

POURTOIS M, BINET C, VAN TIEGHEM N, COURTOIS P, VANDENABBELE A, THIRY L.

Inhibition of HIV infectivity by lactoperoxidase-produced hypothiocyanite.

J Biol Buccale. 1990 Dec;18(4):251-3.

PUCHELLE E, ZAHM JM, DUVIVIER C.

Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucous transport properties.

Biorheology. 1983;20(2):239-49.

PUCHELLE E, ZAHM JM, TOURNIER JM, CORAUX C.

Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease.

Proc Am Thorac Soc. 2006 Nov;3(8):726-33.

PUDDICOMBE SM, POLOSA R, RICHTER A, KRISHNA MT, HOWARTH PH, HOLGATE ST, et al.

Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma.

FASEB J. 2000 Jul;14(10):1362-74.

PUTNEY LK, BARBER DL.

Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G₂/M entry and transition.

J Biol Chem. 2003 Nov 7;278(45):44645-9.

QU BH, STRICKLAND EH, THOMAS PJ.

Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding.

J Biol Chem. 1997 Jun 20;272(25):15739-44.

QUINTON PM.

Possible mechanisms of stimulus-induced vacuolation in serous cells of tracheal secretory glands.

Am J Physiol. 1981 Jul;241(1):C25-32.

QUINTON PM, BIJMAN J.

Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis.

N Engl J Med. 1983 May 19;308(20):1185-9.

RANDELL SH.

Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease.

Proc Am Thorac Soc. 2006 Nov;3(8):718-25.

RAO GN, SARDET C, POUYSSEGUR J, BERK BC.

Na⁺/H⁺ antiporter gene expression increases during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL60 cells.

J Cell Physiol. 1992 May;151(2):361-6.

RAO S, WRIGHT AK, MONTIERO W, ZIEGLER-HEITBROCK L, GRIGG J.

Monocyte chemoattractant chemokines in cystic fibrosis.
J Cyst Fibros. 2009 Mar;8(2):97-103.

RAO SP, SIKORA L, HOSSEINKHANI MR, PINKERTON KE, SRIRAMARAO P.

Exposure to environmental tobacco smoke induces angiogenesis and leukocyte trafficking in lung microvessels.
Exp Lung Res. 2009 Mar;35(2):119-35.

REGAMEY N, JEFFERY PK, ALTON EW, BUSH A, DAVIES JC.

Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis.
Thorax. 2010 Oct 1.

REYNOLDS SD, GIANGRECO A, POWER JH, STRIPP BR.

Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration.
Am J Pathol. 2000 Jan;156(1):269-78.

RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.
Science. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.

ROCK JR, ONAITIS MW, RAWLINS EL, LU Y, CLARK CP, XUE Y, et al...

Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12771-5.

ROCK JR, RANDELL SH, HOGAN BL.

Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling.
Dis Model Mech. 2010 Sep-Oct;3(9-10):545-56.

ROMAN J, KOVAL M.

Control of lung epithelial growth by a nicotinic acetylcholine receptor: the other side of the coin.
Am J Pathol. 2009 Nov;175(5):1799-801.

ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M, et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.
Science. 1989 Sep 8;245(4922):1059-65.

ROSE AS, PRAZMA J, RANDELL SH, BAGGETT HC, LANE AP, PILLSBURY HC.

Nitric oxide mediates mucin secretion in endotoxin-induced otitis media with effusion.
Otolaryngol Head Neck Surg. 1997 Mar;116(3):308-16.

ROSE MC.

Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases.
Am J Physiol. 1992 Oct;263(4 Pt 1):L413-29.

ROSE MC, NICKOLA TJ, VOYNOW JA.

Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2001 Nov;25(5):533-7.

ROSE MC, VOYNOW JA.

Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease.
Physiol Rev. 2006 Jan;86(1):245-78.

SAEZ JC, SPRAY DC, NAIRN AC, HERTZBERG E, GREENGARD P, BENNETT MV.

cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Apr;83(8):2473-7.

SAIMAN L, SIEGEL J.

Infection control in cystic fibrosis.

Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):57-71.

SAINI LS, GALSWORTHY SB, JOHN MA, VALVANO MA.

Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation.

Microbiology. 1999 Dec;145 (Pt 12):3465-75.

SAJJAN U, WANG Q, ZHAO Y, GRUENERT DC, HERSHENSON MB.

Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells.

Am J Respir Crit Care Med. 2008 Dec 15;178(12):1271-81.

SAJJAN US, YANG JH, HERSHENSON MB, LIPUMA JJ.

Intracellular trafficking and replication of *Burkholderia cenocepacia* in human cystic fibrosis airway epithelial cells.

Cell Microbiol. 2006 Sep;8(9):1456-66.

SANDERSON MJ, SLEIGH MA.

Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony.

J Cell Sci. 1981 Feb;47:331-47.

SAVLA U, WATERS CM.

Mechanical strain inhibits repair of airway epithelium in vitro.

Am J Physiol. 1998 Jun;274(6 Pt 1):L883-92.

SCHWARZ MA, OWARIBE K, KARTENBECK J, FRANKE WW.

Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components.

Annu Rev Cell Biol. 1990;6:461-91.

SCHWIEBERT EM, EGAN ME, HWANG TH, FULMER SB, ALLEN SS, CUTTING GR, et al.

CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP.

Cell. 1995 Jun 30;81(7):1063-73.

SEVERSON JM, KETTER GW, BELSON TP, PAEGLE RD, TOOILL RJ.

Experimental induction of squamous metaplasia in the dog trachea with cuffed endotracheal tubes.

Otolaryngol Head Neck Surg. 1982 Sep-Oct;90(5):555-60.

SHEBANI E, SHAHANA S, JANSON C, ROOMANS GM.

Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma.

Tissue Cell. 2005 Apr;37(2):145-52.

SHEEHAN JK, HOWARD M, RICHARDSON PS, LONGWILL T, THORNTON DJ.

Physical characterization of a low-charge glycoform of the MUC5B mucin comprising the gel-phase of an asthmatic respiratory mucous plug.

Biochem J. 1999 Mar 1;338(2):507-13.

SHEN BQ, PANOS RJ, HANSEN-GUZMÁN K, WIDDICOMBE JH, MRSNY RJ.

Hepatocyte growth factor stimulates the differentiation of human tracheal epithelia in vitro.

Am J Physiol. 1997 Jun;272(6):L1115-20.

SHEPPARD DN, RICH DP, OSTEDGAARD LS, GREGORY RJ, SMITH AE, WELSH MJ.

Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties.

Nature. 1993 Mar 11;362(6416):160-4.

SHIM JJ, DABBAGH K, UEKI IF, DAO-PICK T, BURGEL PR, TAKEYAMA K, et al.

IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Jan;280(1):L134-40.

SHIMURA S, SASAKI T, SASAKI H, TAKISHIMA T.

Contractility of isolated single submucosal gland from trachea.

J Appl Physiol. 1986 Apr;60(4):1237-47.

SHIN JH, NAMKUNG W, KIM CH, CHOI JY, YOO JB, LEE KD, et al.

Expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms in normal human nasal epithelial cells and functional activity of Na⁺/H⁺ exchanger 1 in intracellular pH regulation.

Acta Otolaryngol. 2005 Mar;125(3):286-92.

SHOJI S, RICKARD KA, TAKIZAWA H, ERTL RF, LINDER J, RENNARD SI.

Lung fibroblasts produce growth stimulatory activity for bronchial epithelial cells.

Am Rev Respir Dis. 1990 Feb;141(2):433-9.

SINGH G, SINGH J, KATYAL SL, BROWN WE, KRAMPS JA, PARADIS IL, et al.

Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein.

J Histochem Cytochem. 1988 Jan;36(1):73-80.

SINGH PK, JIA HP, WILES K, HESSELBERTH J, LIU L, CONWAY BA, et al.

Production of beta-defensins by human airway epithelia.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 8;95(25):14961-6.

SLEIGH MA.

Adaptations of ciliary systems for the propulsion of water and mucus.

Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 1989;94(2):359-64.

SMITH JJ, TRAVIS SM, GREENBERG EP, WELSH MJ.

Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid.

Cell. 1996 Apr 19;85(2):229-36.

SPURZEM JR, THOMPSON AB, DAUGHTON DM, MUELLER M, LINDER J, RENNARD SI.

Chronic inflammation is associated with an increased proportion of goblet cells recovered by bronchial lavage.

Chest. 1991 Aug;100(2):389-93.

STAEHELIN LA.

Structure and function of intercellular junctions.
Int Rev Cytol. 1974;39:191-283.

STEVENSON BR, SILICIANO JD, MOOSEKER MS, GOODENOUGH DA.

Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia.
J Cell Biol. 1986 Sep;103(3):755-66.

STRIPP BR, REYNOLDS SD.

Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium.
Proc Am Thorac Soc. 2008 Apr 15;5(3):328-33.

STURGESS J, IMRIE J.

Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants.
Am J Pathol. 1982 Mar;106(3):303-11.

STUTMAN HR, LIEBERMAN JM, NUSSBAUM E, MARKS MI.

Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial.
J Pediatr. 2002 Mar;140(3):299-305.

STUTTS MJ, ROSSIER BC, BOUCHER RC.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics.
J Biol Chem. 1997 May 30;272(22):14037-40.

STUTTS MJ, SCHWAB JH, CHEN MG, KNOWLES MR, BOUCHER RC.

Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on bronchial epithelial ion transport.
Am Rev Respir Dis. 1986 Jul;134(1):17-21.

SUNDAY ME, HUA J, DAI HB, NUSRAT A, TORDAY JS.

Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1990 Sep;3(3):199-205.

SWEADNER KJ, WETZEL RK, ARYSTARKHOVA E.

Genomic organization of the human FXD2 gene encoding the gamma subunit of the Na,K-ATPase.
Biochem Biophys Res Commun. 2000 Dec 9;279(1):196-201.

TABLAN OC, MARTONE WJ, DOERSHUK CF, STERN RC, THOMASSEN MJ, KLINGER JD, et al.

Colonization of the respiratory tract with *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis. Risk factors and outcomes.
Chest. 1987 Apr;91(4):527-32.

TAKEYAMA K, DABBAGH K, JEONG SHIM J, DAO-PICK T, UEKI IF, NADEL JA.

Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils.
J Immunol. 2000 Feb 1;164(3):1546-52.

TARRAN R, GRUBB BR, GATZY JT, DAVIS CW, BOUCHER RC.

The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway

surface liquid volume and composition.
J Gen Physiol. 2001 Aug;118(2):223-36.

TENOVUO J, HANNUKSELA S, LENANDER-LUMIKARI M.

Effects of delmopinol on antimicrobial peroxidase systems and lysozyme in vitro and in human whole saliva.

Eur J Oral Sci. 1995 Aug;103(4):247-52.

TIAN D, ZHU M, CHEN WS, LI JS, WU RL, WANG X.

Role of glycogen synthase kinase 3 in squamous differentiation induced by cigarette smoke in porcine tracheobronchial epithelial cells.

Food Chem Toxicol. 2006 Sep;44(9):1590-6.

TIDDENS HA, KOOPMAN LP, LAMBERT RK, ELLIOTT WM, HOP WC, VAN DER MARK TW, et al.

Cartilaginous airway wall dimensions and airway resistance in cystic fibrosis lungs.

Eur Respir J. 2000 Apr;15(4):735-42.

TIROUVANZIAM R, DE BENTZMANN S, HUBEAU C, HINNRASKY J, JACQUOT J, PEAULT B, PUCHELLE E.

Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Aug;23(2):121-7.

TRAVIS SM, ANDERSON NN, FORSYTH WR, ESPIRITU C, CONWAY BD, GREENBERG EP, et al.

Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides.

Infect Immun. 2000 May;68(5):2748-55.

TRINH NT, PRIVE A, KHEIR L, BOURRET JC, HIJAZI T, AMRAEI MG, et al.

Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Oct;293(4):L870-82.

TRINH NT, PRIVÉ A, MAILLÉ E, NOËL J, BROCHIERO E.

EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Nov;295(5):L866-80..

TSURUTA D, HOPKINSON SB, JONES JC.

Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells.

Cell Motil Cytoskeleton. 2003 Feb;54(2):122-34.

TURNER J, ROGER J, FITAU J, COMBE D, GIDDINGS J, VAN HEEKE G, JONES CE.

Goblet Cells are Derived from a FOXJ1-Expressing Progenitor in a Human Airway Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Jun 10.

USSING HH ET ZERAHN K.

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol Scand. 1951 Aug 25;23(2-3):110-27.

VAN KLINKEN BJ, BÜLLER HA, EINERHAND AW, DEKKER J

Identification of mucins using metabolic labeling, immunoprecipitation, and gel electrophoresis.

Methods Mol Biol. 2000;125:239-47.

VERGANI P, LOCKLESS SW, NAIRN AC, GADSBY DC.

CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains.
Nature. 2005 Feb 24;433(7028):876-80.

VERMEER PD, EINWALTER LA, MONINGER TO, ROKHLINA T, KERN JA, ZABNER J, WELSH MJ.
Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor.
Nature. 2003 Mar 20;422(6929):322-6.

VIRKOLA R, LÄHTEENMÄKI K, EBERHARD T, KUUSELA P, VAN ALPHEN L, ULLBERG M, KORHONEN TK.
Interaction of Haemophilus influenzae with the mammalian extracellular matrix.
J Infect Dis. 1996 May;173(5):1137-47.

VOYNOW JA, FISCHER BM, ROBERTS BC, PROIA AD.
Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways.
Am J Respir Crit Care Med. 2005 Oct 15;172(8):1013-8.

WANG H, LIU X, UMINO T, SKÖLD CM, ZHU Y, KOHYAMA T, et al.
Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2001 Dec;25(6):772-9.

WANG H, SINGH D, FLIEGEL L.
The Na⁺/H⁺ antiporter potentiates growth and retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.
J Biol Chem. 1997 Oct 17;272(42):26545-9.

WANNER, A, M SALATHE, ET T G O'RIORDAN.
Mucociliary clearance in the airways.
Am J Respir Crit Care Med. 1996 Dec;154(6 Pt 1):1868-902.

WARBURTON D, WUENSCHALL C, FLORES-DELGADO G, ANDERSON K.
Commitment and differentiation of lung cell lineages.
Biochem Cell Biol. 1998;76(6):971-95.

WATERS CM, SAVLA U.
Keratinocyte growth factor accelerates wound closure in airway epithelium during cyclic mechanical strain.
J Cell Physiol. 1999 Dec;181(3):424-32.

WATT FM, GREEN H.
Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures.
J Cell Biol. 1981 Sep;90(3):738-42.

WHITE SR, DORSCHIED DR, RABE KF, WOJCIK KR, HAMANN KJ.
Role of very late adhesion integrins in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers after mechanical injury.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Apr;20(4):787-96.

WICKSTRÖM C, DAVIES JR, ERIKSEN GV, VEERMAN EC, CARLSTEDT I.
MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage.
Biochem J. 1998 Sep 15;334 (Pt 3):685-93.

WIDDICOMBE JH, BASTACKY SJ, WU DX, LEE CY.

Regulation of depth and composition of airway surface liquid.
Eur Respir J. 1997 Dec;10(12):2892-7.

WIJKSTROM-FREI C, EL-CHEMALY S, ALI-RACHEDI R, GERSON C, COBAS MA, FORTEZA R, et al.

Lactoperoxidase and human airway host defense.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Aug;29(2):206-12.

WILLIAMS SJ, MUNSTER DJ, QUIN RJ, GOTLEY DC, MCGUCKIN MA.

The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced.
Biochem Biophys Res Commun. 1999 Jul 22;261(1):83-9.

WILLIAMS SJ, WRESCHNER DH, TRAN M, EYRE HJ, SUTHERLAND GR, MCGUCKIN MA.

Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells.
J Biol Chem. 2001 May 25;276(21):18327-36.

WILLS-KARP M, LUYIMBAZI J, XU X, SCHOFIELD B, NEBEN TY, KARP CL, DONALDSON DD.

Interleukin-13: central mediator of allergic asthma.
Science. 1998 Dec 18;282(5397):2258-61.

WILLUMSEN NJ, BOUCHER RC.

Shunt resistance and ion permeabilities in normal and cystic fibrosis airway epithelia.
Am J Physiol. 1989 May;256(5 Pt 1):C1054-63.

WILLUMSEN NJ, BOUCHER RC.

Intracellular pH and its relationship to regulation of ion transport in normal and cystic fibrosis human nasal epithelia.
J Physiol. 1992 Sep;455:247-69.

WILSON R, COLE PJ.

The effect of bacterial products on ciliary function.
Am Rev Respir Dis. 1988 Dec;138(6 Pt 2):S49-53.

WILSON R, ROBERTS D, COLE P.

Effect of bacterial products on human ciliary function in vitro.
Thorax. 1985 Feb;40(2):125-31.

WISZNIEWSKI L, JORNOT L, DUDEZ T, PAGANO A, ROCHAT T, LACROIX JS, et al.

Long-Term Cultures of Polarized Airway Epithelial Cells from Patients with Cystic Fibrosis.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Jan;34(1):39-48.

YAMAMURA H, UGAWA S, UEDA T, NAGAO M, JOH T, SHIMADA S.

Epithelial Na⁺ channel delta subunit is an acid sensor in the human oesophagus.
Eur J Pharmacol. 2008 Dec 14;600(1-3):32-6.

YATES CC, WHALEY D, KULASEKERAN P, HANCOCK WW, LU B, BODNAR R, et al.

Delayed and deficient dermal maturation in mice lacking the CXCR3 ELR-negative CXC chemokine receptor.
Am J Pathol. 2007 Aug;171(2):484-95.

YATES CC, WHALEY D, HOODA S, HEBDA PA, BODNAR RJ, WELLS A.

Delayed reepithelialization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3.

Wound Repair Regen. 2009 Jan-Feb;17(1):34-41.

YOUNGSON C, NURSE C, YEGER H, CUTZ E.

Oxygen sensing in airway chemoreceptors.

Nature. 1993 Sep 9;365(6442):153-5.

ZAHM JM, CHEVILLARD M, PUCHELLE E.

Wound repair of human surface respiratory epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1991 Sep;5(3):242-8.

ZAHM JM, DEBORDEAUX C, RABY B, KLOSSEK JM, BONNET N, PUCHELLE E.

Motogenic effect of recombinant HGF on airway epithelial cells during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium.

J Cell Physiol. 2000 Dec;185(3):447-53.

ZAHM JM, GAILLARD D, DUPUIT F, HINNRSKY J, PORTEOUS D, DORIN JR, PUCHELLE E.

Early alterations in airway mucociliary clearance and inflammation of the lamina propria in CF mice.

Am J Physiol. 1997 Mar;272(3 Pt 1):C853-9.

ZAHM JM, KAPLAN H, HERARD AL, DORIOT F, PIERROT D, SOMELETTE P, ET PUCHELLE E.

Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium.

Cell Motil Cytoskeleton. 1997;37(1):33-43.

ZAHM JM, PIERROT D, PUCHELLE E.

Epidermal growth factor promotes wound repair of human respiratory epithelium.

Wound Repair Regen. 1993 Jul;1(3):175-80.

ZAHM JM, PIERROT D, VAQUEZ-GIROD S, DUVIVIER C, KING M, ET PUCHELLE E.

The role of mucus sol phase in clearance by simulated cough.

Biorheology. 1989;26(4):747-52.

ZHANG J, PATEL JM.

Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases.

Int J Clin Exp Med. 2010 Aug 10;3(3):233-44.

ZHANG Y, YANKASKAS J, WILSON J, ENGELHARDT JF.

In vivo analysis of fluid transport in cystic fibrosis airway epithelia of bronchial xenografts.

Am J Physiol. 1996 May;270(5 Pt 1):C1326-35.

Epithelial Cell–Extracellular Matrix Interactions and Stem Cells in Airway Epithelial Regeneration

Christelle Coraux¹, Jacqueline Roux¹, Thomas Jolly¹, and Philippe Birembaut¹

¹INSERM, UMRS 903, CHU Hôpital Maison Blanche, Reims, France

In healthy subjects, the respiratory epithelium forms a continuous lining to the airways and to the environment, and plays a unique role as a barrier against external deleterious agents to protect the airways from the insults. In respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), chronic bronchitis, or asthma, the airway epithelium is frequently remodeled and injured, leading to the impairment of its defense functions. The rapid restoration of the epithelial barrier is crucial for these patients. The complete regeneration of the airway epithelium is a complex phenomenon, including not only the epithelial wound repair but also the epithelial differentiation to reconstitute a fully well differentiated and functional epithelium. The regeneration implies two partners: the epithelial stem/progenitor cells and factors able to regulate this process. Among these factors, epithelial cells–extracellular matrix (ECM) interactions play a crucial role. The secretion of a provisional ECM, the cell–ECM relationships through epithelial receptors, and the remodeling of the ECM by proteases (mainly matrix metalloproteinases) contribute not only to airway epithelial repair by modulating epithelial cell migration and proliferation, but also to the differentiation of repairing cells leading to the complete restoration of the wounded epithelium. A better characterization of resident stem cells and of effectors of the regeneration process is an essential prerequisite to propose new regenerative therapeutics to patients suffering from infectious/inflammatory respiratory diseases.

Keywords: airway epithelium; regeneration; matrix metalloproteinases; stem cells

The lungs represent the most important surface of contact with the external milieu. In humans, it corresponds to an area of between 50 and 100 m². During normal breathing, the airways daily transport to the lung 10,000 liters of environmental air, which is frequently contaminated with a variety of pollutants, particles, bacteria, and viruses that are deposited in the airways. The respiratory epithelium, forming a continuous lining to the airways and to the environment, plays a unique role as a protective physical and functional barrier to external deleterious agents by elaboration of a series of defense mechanisms developed to protect the airways from the insults. The diversity of the cells composing the airway epithelium is adapted to assume these defense functions. The distribution of cell types within the epithelium varies along the airways. The epithelial surface of the cartilaginous airways (trachea, bronchi) is mainly composed of ciliated cells, which, with basal cells and a small percentage of goblet cells, form a pseudostratified columnar structure. The ciliated cells occupy the majority of the luminal surface, and basal

cells cover almost the totality of the basement membrane. This mucociliary epithelium extends into glandular ducts that emerge in submucosal glands composed of secretory mucous and serous cells (1). The distal noncartilaginous airways (bronchioles) are lined by an epithelium becoming more columnar and constituted by ciliated, basal, and secretory Clara cells. In the most distal bronchioles, only Clara cells are identified (2). The airway epithelial defense system is assumed by different functions, including features of the epithelium contributing to the epithelial barrier integrity, coordinated secretion and ciliary beating leading to an effective mucociliary clearance, and secretion of molecules with antibacterial, antioxidant, and antiprotease activities.

AIRWAY EPITHELIAL REGENERATION

Despite an efficient airway epithelial defense system, disruption of mucociliary clearance due to inhaled particles or pathogens, or caused by infectious and/or inflammatory respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), chronic bronchitis, or asthma, leads to more or less extensive changes in the architecture of the airway walls, leading in turn to the impairment of the epithelial defense functions. The lesions can vary from the epithelial structure remodeling with generation of basal and/or goblet cell hyperplasia and/or squamous metaplasia, or the loss of the epithelial integrity by disruption of the intercellular junctions, partial shedding of epithelial cells with some basal cells still attached to the basement membrane, or complete denudation of the basement membrane (Figure 1).

Airway Epithelial Regeneration: a Complex Process

To restore its functions, the airway epithelium has to rapidly repair the injuries and regenerate its structure *ad integrum*. The regeneration process is a complex phenomenon that quickly starts after the lesion occurred. Sequentially, epithelial cells at the wound edge dedifferentiate, acquiring a phenotype called “repair cells” (3), spread, then migrate to cover the denuded area. In animal models, it has been demonstrated that re-epithelialization of the injured basement membrane is due to cell migration rather than cell proliferation at first. After migration, epithelial cells in the repairing area start to proliferate. At this step, although the wound is closed, the epithelial integrity is still not restored (4, 5). Then, the repairing epithelium forms a transitory squamous metaplasia followed by a progressive redifferentiation to restore a pseudostratified and functional mucociliary epithelium (6).

Recent studies have examined, using a global approach, the program that mediates regeneration of the human airway epithelium *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, this genetic program has been defined using fiberoptic bronchoscopy and mechanical brushing to denude the airway epithelium of normal individuals, followed by sequential sample of the same regions at Days 7 and 14 after injury, and microarray analysis to compare relative mRNA levels of the samples to that of resting noninjured epithelium. At Day 7, among the 1,196 significantly modulated genes, the repair transcriptome is dominated by cell cycle, signal

(Received in original form January 24, 2008; accepted in final form June 3, 2008)

This work was supported by grants from INSERM, Association Vaincre la Mucoviscidose, Cancéropôle Grand-Est, Adult Stem Cells Thematic Concerted Action (INSERM, French Ministry of Research, Juvenile diabetes research).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Christelle Coraux, Ph.D., INSERM UMRS 903, Centre Hospitalier Universitaire Maison Blanche, 45 rue Cognacq Jay, 51092 Reims Cedex, France. E-mail: christelle.coraux@univ-reims.fr

Proc Am Thorac Soc Vol 5, pp 689–694, 2008
DOI: 10.1513/pats.200801-010AW
Internet address: www.atsjournals.org

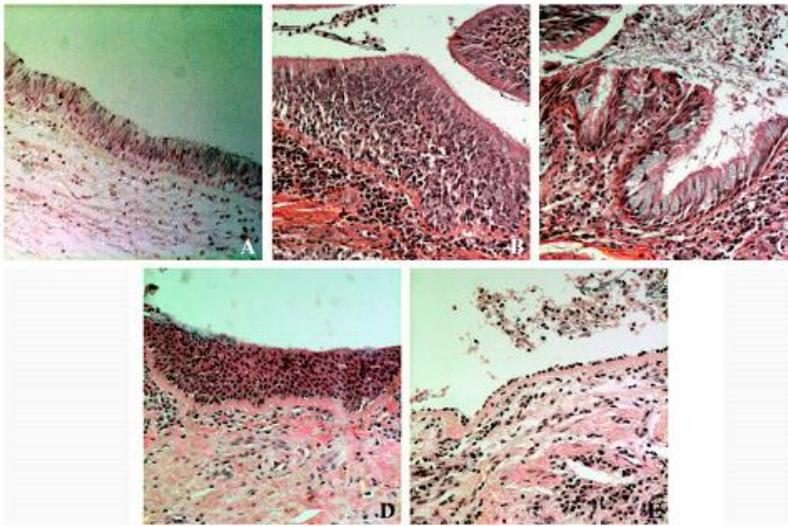


Figure 1. Airway epithelial remodeling and injuries. In patients suffering from infectious/inflammatory diseases, the airway epithelium exhibits frequent areas of (B) basal cell and (C) goblet cell hyperplasia, (D) squamous metaplasia, and (E) epithelial shedding with basal cells still attached to the basement membrane (E). (A) Nonremodeled airway epithelium.

transduction, metabolism and transport, and transcription genes, the majority of differentially expressed cell cycle genes belonging to the G2 and M phases, suggesting that the proliferating cells are relatively synchronized 7 days after injury. At Day 14 after injury, the transcription profile is similar to that of resting noninjured airway epithelium (7). *In vitro*, Ross and coworkers have grown bronchial epithelial cells at the air-liquid interface over a 28-day period to identify genes involved in mucociliary differentiation. They identified over 2,000 genes that displayed at least statistically significant twofold changes in expression during time course, among them genes involved in cell adhesion, immunity, transport, and cilia formation. In particular, they have highlighted networks containing genes involved in transforming growth factor (TGF)- β , WNT/ β -catenin, and epidermal growth

factor (EGF) receptor pathways, suggesting potential roles for these families in airway epithelia (8).

The cellular and molecular factors involved in the repair and regeneration of the airway epithelium are numerous. During this process, the airway epithelium has the ability to modulate the wound healing and reconstitution of the epithelial barrier, mainly through the secretion of extracellular matrix proteins, and interactions with and remodeling of the secreted migratory provisional extracellular matrix. Besides releasing pro-inflammatory cytokines and chemokines, the surviving epithelial cells and the cells of the epithelial environment secrete factors contributing to airway repair and regeneration, including modulators of cell migration, remodeling of the extracellular matrix (ECM), and cell proliferation and differentiation (9).

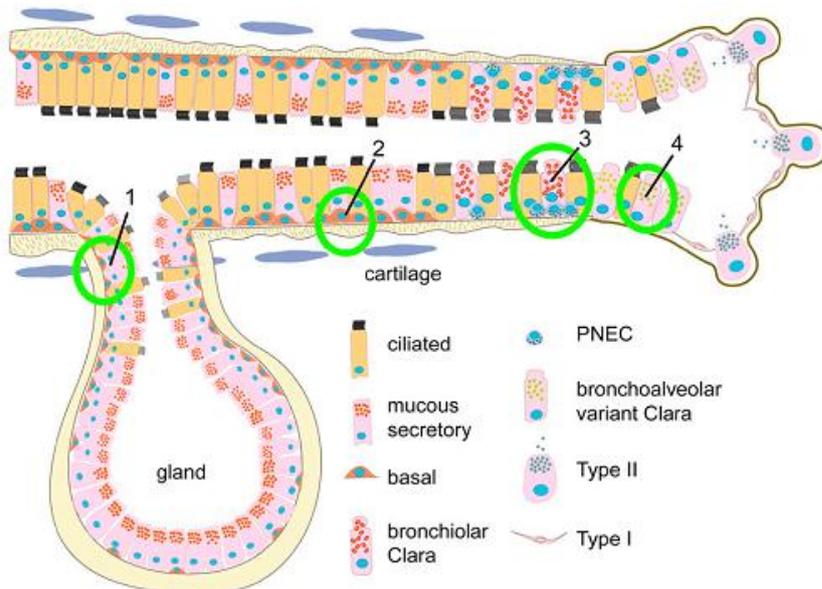


Figure 2. Representation of reported stem cell niches in the animal airways. (1) Basal cells in the glandular ducts. (2) Basal cells in the surface airway epithelium in the intercartilaginous areas. (3) Pollutant-resistant Clara cells in neuroepithelial bodies. (4) Pollutant-resistant Clara cells at the bronchioalveolar duct junctions. Reprinted by permission from Reference 53.

Epithelial Cell-ECM Interactions Modulate Wound Repair

The re-epithelialization process involves several steps, including spreading and migration of cells at the wound edge into the denuded surface and cell proliferation to repopulate the wound site. Interactions between epithelial cells themselves and with ECM may be of primary importance in directing repair of injury.

Matrix proteins and epithelial cell receptors. These processes are mediated by ECM constituents, ligands for cellular receptors such as integrins. Each integrin is composed of an α and a β subunit, the heterodimers mediating cell-cell interactions and cell-ECM adhesion to one or more matrix proteins. The use of blocking antibodies directed against integrin subunits has shown that β_1 -integrins are necessary to the rapid migration of airway epithelial cells on type IV collagen and laminin-1 and -2, and that α_2 , α_3 , and α_6 -integrin subunits are directly involved in epithelial cell migration on type IV collagen (10). After airway epithelial damage, epithelial cells at the edge of injury appear to flatten and migrate on the provisional matrix of the wound, including the inflammatory glycoproteins fibronectin and vitronectin as well as components of the basement membrane such as laminin and type IV collagen. Matrix proteins can stimulate migration of airway epithelial cells, in particular the cellular fibronectin (11). *In vivo* and *in vitro*, fibronectin is deposited at the airway cell-matrix interface during the wound repair process. The incubation of wounded cultures with anti-fibronectin-blocking antibodies impairs the wound closure, and $\alpha_5\beta_1$ -integrins, receptors of fibronectin, are up-regulated in the migrating cells of the repairing area (12, 13). Moreover, fibronectin variants involved in airway mucosa wound repair are age-dependently differentially expressed (14), and during its polymerization in the ECM, the fibronectin exposes biologically active matricryptic sites, among them the III-1 site that exhibits the stimulatory role of small airway epithelial cell motility (15). As nonintegrin receptors, carbohydrates on the epithelial cell surface play an important role in cell-cell and cell-substrate interactions. Cell surface N-glycosylation, particularly terminal fucosylation, has a functional role in airway epithelial repair process (16): inhibition of α -dystroglycan binding to laminin attenuates cell migration and spreading after mechanical injury (17), and blockade $\alpha_{1,6}$ -fucose (18) or sialyl Lewis^x (19) prevents epithelial wound repair.

Matrix metalloproteinases. During airway epithelial cell spreading and migration to re-epithelialize the wounded area, cells interact with ECM proteins through focal and primordial contacts that enable the anchorage by which the cells can exert traction on the matrix. These contacts are transient structures: cell movement implies the formation of new sites of adhesion to the ECM at the front of the migrating cells and the release of adhesion sites at the back of these cells. MMPs are directly involved in airway epithelial wound repair, especially in the remodeling of the provisional matrix secreted by repairing cells. MMP-9 (gelatinase B) plays a key role in the migration of bronchial epithelial cells during wound healing. MMP-9 is overexpressed by basal migratory cells at the wound edge, and addition to the culture medium during the repair process of a monoclonal antibody known to inhibit MMP-9 activation, or prevention of its activation, results in decreased speed of wound closure or its complete abolition (20, 21). MMP-3 and MMP-11, also called stromelysin 1 and 3, are exclusively expressed by repairing basal airway epithelial cells that also expressed the mesenchymal marker vimentin, suggesting that stromelysins are involved in epithelial cell migration and ECM remodeling during wound healing and that migrating repairing cells acquire a mesenchymal phenotype necessary for cell migration (22). Unlike most MMPs, MMP-7 is constitutively expressed by airway epithelial cells, where it functions in host

defense by activating the latent form of defensins (23). However, in case of airway epithelial injury, MMP-7 is overexpressed by repairing cells, epithelial migration is reduced by a hydroxamate inhibitor of MMP catalytic activity, and re-epithelialization in tracheas from MMP-7-null mice is essentially blocked (24). MMP-7 could also act during epithelial repair by mediating the shedding of the ectodomain of E-cadherin required for epithelial repair (25). Together, these data highlight the crucial role of MMP-7 in airway epithelial wound repair. Beside their involvement in cell migration during airway epithelial wound closure, MMPs could also modulate the repair process by influencing cell proliferation. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a protease produced by airway epithelial cells. The impaired airway epithelial repair in MT1-MMP-knockout mice after naphthalene treatment has been recently reported, MT1-MMP being required for the proliferative response in distal airway epithelial cells through keratinocyte growth factor (KGF) receptor, but not epidermal growth factor (EGF) receptor signaling pathway (26). The involvement of MMP-2 and MMP-9 in cell proliferation has also been demonstrated, as tracheal cartilage-conditioned medium-derived MMP2 and -9 inhibit respiratory epithelial cell attachment to type I collagen and impair their proliferation, whereas addition of MMP inhibitors to cartilage culture conditioned media does not inhibit epithelial cell growth (27).

Endogenous and exogenous modulators of epithelial cell-ECM interactions. After injury, airway epithelial cells are able to produce effectors of cell migration modulating cell-ECM interactions. The production of matrix molecules, and particularly fibronectin, is influenced by inflammatory mediators secreted in case of epithelial wound, such as transforming growth factor (TGF)- β or tumor necrosis factor (TNF)- α (28, 29). The matrix production by epithelial cells seems to be probably influenced by mediators released from epithelial cells themselves as well as from the inflammatory cells of the airways (30). Moreover, airway epithelial sheet migration over matrix-coated dishes is impaired by treatment with TGF- β due to the enhancement of cell adhesion via integrins (31) and $\alpha_v\beta_8$ integrin-activated TGF- β 1 delays the degree of wound closure (32). On the other hand, an inducing role for TGF- β 1 on airway epithelial wound repair has also been demonstrated by addition of TGF- β 1 that speeds epithelial repair through up-regulation of MMP-2 (33).

Some exogenous factors are able to modulate airway epithelial wound healing. NO, at low concentration, promotes airway epithelial cell migration and wound repair, associated with increased localized expression and activation of MMP-9 in cells at the wound edge, the NOS-derived NO contributing to airway epithelial repair through mechanisms dependent and independent of the cGMP-dependent protein kinase. Moreover, inhibition of NOS completely abolishes the action of NO (34). Purinergic receptor stimulation by extracellular ATP is also a critical determinant of epithelial cell migration and repair after injury, and is associated with activation of ERK1/2 and MMP-9 requiring the activation of Duox1 (35). Pollution plays also a critical role in airway epithelial wound repair. Indeed, diesel exhaust particles (DEP) exposure reduces airway epithelial wound repair in a dose-dependent manner, not only by altering cell proliferation, but also by inducing a reduction in the expression of α_3 - and β_1 -integrin subunit as well as of the hyaluronic acid nonintegrin receptor CD44, and a decreased production of MMP-1 leading to increased cell-ECM adhesion capacity (36). Airway infections alter the wound healing process. For example, *P. aeruginosa* virulence factors, especially elastase, impede airway epithelial wound repair by slowing the cell migration velocity due to the altered actin cytoskeleton

polymerization in the lamellipodia of cells at the wound edge, and by causing an imbalance between pro- and activated forms of MMP-2 via its overactivation and the decrease of its specific tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 expression (37).

Epithelial Cell-ECM Interactions Modulate Cell Differentiation

After injury, the complete regeneration of the airway epithelium implies, not only re-epithelialization of the denuded basement membrane, but also the reestablishment of the epithelial integrity and the cell redifferentiation to restore the airway epithelial functions. While the involvement of airway epithelial cell-ECM interactions during the wound repair has been extensively studied, their modulation of the epithelial differentiation is poorly documented. Some rare data have suggested that, in addition to their involvement in epithelial cell migration and wound closure, MMPs could be involved in cell differentiation. In particular, MMP-7 and MMP-9 influence airway epithelial reconstitution by modulating the mucociliary differentiation in an *in vivo* model of airway epithelial regeneration. In a humanized xenograft model allowing recapitulation of the sequence of cellular events leading to the regeneration of the airway epithelial barrier (i.e., epithelial cell adhesion, spreading, migration, proliferation, and differentiation), expression and secretion of epithelial MMP-7 and -9 progressively increase during the regeneration time course and are localized at the apical surface of the well-regenerated airway epithelium. More interestingly, incubation of epithelial cells with inhibitors of these MMPs during the regeneration process leads to a default of mucociliary differentiation and to the generation of a remodeled airway epithelium exhibiting squamous metaplasia with areas of basal cell hyperplasia, demonstrating the crucial role of MMP-7 and MMP-9 in the human airway epithelial mucociliary differentiation (38). In the same xenograft model using noninfected CF cells, the airway epithelial regeneration is delayed as mucociliary differentiation is obtained 1 week later than in non-CF grafts, and leads to the generation of a remodeled airway epithelium with pronounced height increase and basal cell hyperplasia, this CF regeneration process being associated with a deregulated pattern of expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, and IL-8 (39).

RESIDENT STEM/PROGENITOR CELLS

The repair of injuries and the regeneration of the epithelial structure involve stem and progenitor cells. Stem cells are quiescent undifferentiated cells able to divide slowly but indefinitely under particular conditions such as injury, to self-renew for the entire lifespan and to give rise to less proliferative committed daughter cells, called transient amplifying cells or progenitor cells, which will differentiate to form all the cell types of the tissue. Much evidence supports the presence of stem and/or progenitor cells in the airways: although the proliferation index is less than 0.2% in healthy human bronchial epithelium, it greatly increases in some respiratory diseases such as CF (40). Moreover, some experiments showed the ability of airway epithelial cells to reform the complete array of tracheal/bronchial epithelial cells after epithelial wound (3). Despite these results, airway epithelial stem cells are not well characterized, particularly in humans.

Although the concept of a single stem cell common to the epithelium of the whole respiratory organ has been proposed (41), it is now suggested that each subdivision of the lung possesses its own stem cell (Figure 2). In tracheas and bronchi of rodents, basal and secretory cells were first considered as candidate for stem or progenitor cells status due to their proliferation capacity and ability to reconstitute in xenograft models,

after their dedifferentiation into a similar highly proliferative phenotype called "poorly differentiated cells," a pseudostratified mucociliary airway epithelium (42) developing a subepithelial respiratory gland network (43). Although basal and secretory cells appear to be involved in epithelial restitution after injury in animal models, it is now suggested that only basal cells represent the stem cell compartment of the airway epithelium. Basal cells exhibit clonal growth as well as a greater colony-forming efficiency than secretory cells (44). In mouse after epithelial damage, slow-cycling long-term bromodeoxyuridine (BrdU) label-retaining cells are identified as basal cells in the glandular ducts and in foci near cartilage-intercartilage junctions in the surface airway epithelium, leading to the evidence of stem cell niches (45), and are composed of subsets capable of either multipotent or unipotent differentiation leading to the restoration of a fully differentiated airway epithelium (46). In humans, few data are available. In human fetal tracheas, both basal cells and suprabasal cells are endowed with a similar potential to regenerate a fully differentiated airway epithelium after isolation and seeding in a humanized xenograft model in SCID mice (47). Different results have been obtained in human adult airway epithelium. We have recently demonstrated that, in contrast to the observation made in fetal tracheas, only purified adult basal cells are able to reconstitute a fully mature and functional airway epithelium, secretory cells being incapable of adhering, proliferating, or regenerating the epithelium (48), suggesting that adult secretory cells are more mature than fetal secretory cells and have lost their progenitor potential.

In the terminal bronchioles, 15% of proliferating airway epithelial cells are Clara cells, and in the respiratory bronchioles, this number increases up to 44% (49). The nature of the bronchiolar epithelial stem cells has been studied exclusively in animal models, especially in mouse. Although CCSP-expressing cells (Clara cells) and calcitonin gene-related peptide (CGRP)-expressing cells (neuroendocrines cells) localized in neuroepithelial bodies are able to proliferate after bronchiolar epithelial injury, only a subset of pollutant-resistant Clara cells deficient in cytochrome P450 2F2, localized at these particular areas as well as at the bronchioalveolar junctions, are able to reconstitute the bronchiolar airway epithelium and can be considered as stem cells of the bronchioles (50, 51). More recently, the concept of "one stem cell for each lung subdivision" has been questioned: Kim and coworkers have isolated at the bronchioalveolar duct junction an epithelial population resistant to bronchiolar and alveolar damages, able to proliferate after injury *in vivo* and to give rise, not only to Clara cells, but also to type I and type II pneumocytes *in vitro*, highlighting their stem cell properties of both bronchiolar and alveolar epithelia (52). Although the nature of stem/progenitor cells in rodent bronchiolar airway epithelium is well documented, it remains to be clearly determined in humans.

WAYS FOR THE STUDY OF HUMAN AIRWAY EPITHELIAL REGENERATION

Lesions of the airway epithelium are invalidating for patients with infectious/inflammatory respiratory diseases. They lead to a more or less rapid decline of their respiratory capacity. The fast and complete restoration of the airway epithelial structure and functions is essential for these patients. Considering the constant increasing number of people suffering from respiratory troubles, it is important to better understand the airway epithelial regeneration process to propose efficient therapies for these people. A variety of animal models (dogs, rabbits, rats, mice, etc.) have been developed to analyze the repair process of the airway epithelium after injury from different sources (oxidants, bacterial or viral infection, mechanical injury, etc.). These animal models

highlight a common process of epithelial repair and regeneration, including sequential steps of spreading and migration of the basal cells neighboring the wound, dedifferentiation of repairing cells, active mitosis followed by epithelial squamous metaplasia, and progressive redifferentiation with a final step of ciliogenesis and goblet cell differentiation representative of the complete regeneration of a mucociliary epithelium. Nevertheless, histologic differences exist between human and animal airways, raising doubts as to the relevance of the latter as models for the study of the human airway epithelium regeneration. For example, mouse tracheal epithelium is mainly composed of ciliated cells and Clara cells, the latter being present only in human distal bronchiolar airways, whereas only few submucosal gland cells are identified at the upper tracheal level in mice when they are identified in human upper and lower airways.

The regeneration process of the human airway epithelium is a complex phenomenon, partly elucidated by the use of animal models. However, some histologic differences between human airways and those of other animal species led to the development of humanized xenograft models in immunodeficient mice to characterize the cellular and molecular events involved in the reconstitution of a fully mature and functional human airway epithelium, as well as to try to identify the stem and progenitor cells implicated in this process. These xenograft models will allow a better knowledge of the mechanisms involved in airway epithelium regeneration and may help to develop regenerative therapeutics, allowing the reconstitution of a functional airway epithelium in numerous respiratory diseases such as asthma, COPD, CF, and chronic bronchitis.

Conflict of Interest Statement: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

References

- Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:S14-S20.
- Plopper CG, Mariassy AT, Wilson DW, Allez JL, Nihio SJ, Nettesheim P. Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species. *Exp Lung Res* 1983;5:281-294.
- Erjefält JS, Korsgren M, Nilsson MC, Sundler F, Persson CG. Prompt epithelial damage and restitution processes in allergen challenged guinea-pig trachea in vivo. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1458-1470.
- Zahm JM, Kaplan H, Hérad AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, Puchelle E. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;37:33-43.
- Hérad AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:624-632.
- McDowell EM, Becci PJ, Schurch W, Trump BF. The respiratory epithelium: VII. Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:995-1008.
- Heguy A, Harvey BG, Leopold PL, Dolgalev I, Raman T, Crystal RG. Response of the human airway epithelium transcriptome to in vivo injury. *Physiol Genomics* 2007;13:139-148.
- Ross AJ, Dailey LA, Brighton LE, Devlin RB. Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:169-185.
- Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA. Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodeling in the airways. *Paediatr Respir Rev* 2004;5:S35-S40.
- White SR, Dorscheid DR, Rabe KF, Wojcik KR, Hamann KJ. Role of very late adhesion integrins in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers after mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:787-796.
- Shoji S, Ertl RF, Linder J, Romberger DJ, Rennard SI. Bronchial epithelial cells produce chemotactic activity for bronchial epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:218-225.
- Hérad AL, Pierrot D, Hinnrasky J, Kaplan H, Sheppard D, Puchelle E, Zahm JM. Fibronectin and its alpha 5 beta 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996;271:L726-L733.
- Pilewski JM, Latoche JD, Arcassoy SM, Albelda SM. Expression of integrin cell adhesion receptors during airway epithelial repair in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997;273:L256-L263.
- Li-Korotky HS, Hebda PA, Lo CY, Dohar JE. Age-dependent differential expression of fibronectin variants in skin and airway mucosal wounds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:919-924.
- Hocking DC, Chang CH. Fibronectin matrix polymerization regulates small airway epithelial cell migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L169-L179.
- Patchell BJ, Wojcik KR, Yang T, White SR, Dorscheid DR. Glycosylation and annexin II cell surface translocation mediate airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L354-L363.
- White S, Wojcik K, Gruenert D, Sun S, Dorscheid D. Airway epithelial cell wound repair mediated by alpha-dystroglycan. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:179-186.
- Adam EC, Holgate S, Lackie PM. Epithelial repair is inhibited by an alpha 5-fucose binding lectin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L462-L468.
- Allahverdiyan S, Wojcik KR, Dorscheid DR. Airway epithelial wound repair: role of carbohydrate sialyl Lewis^x. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L828-L836.
- Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM. Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 1996;166:413-426.
- Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, Birembaut P, Tournier JM. Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol* 1999;146:517-529.
- Buisson AC, Gilles C, Polette M, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM. Wound repair-induced expression of stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. *Lab Invest* 1996;74:658-669.
- Parks WC, Lopez-Boado YS, Wilson CL. Matrilysin in epithelial repair and defense. *Chest* 2001;120:S36-S41.
- Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, Wilson CL, Matrisian LM, Welgus HG, Parks WC. Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest* 1998;102:1321-1331.
- McGuire JK, Li Q, Parks W. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol* 2003;162:1831-1843.
- Atkinson JJ, Toennies HM, Holmbeck K, Senior RM. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is necessary for distal airway epithelial repair and keratinocyte growth factor receptor expression after acute injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L600-L610.
- Sigurdson L, Sen T, Hall L III, Rubinfeld A, Hard R, Gardella J, Bright F, Hicks W. Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:197-200.
- Romberger D, Beckmann J, Claassen L, Ertl R, Rennard S. Modulation of fibronectin production of bovine bronchial epithelial cells by transforming growth factor-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:149-155.
- Ito H, Romberger DJ, Rennard SI, Spurzem JR. TNF-alpha enhances bronchial epithelial cell migration and attachment to fibronectin. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:A46. (abstract).
- Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, Rennard SI. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1995;8:127-149.
- Spurzem JR, Sacco O, Rickard KA, Rennard SI. Transforming growth factor-beta increases adhesion but not migration of bovine bronchial epithelial cells to matrix proteins. *J Lab Clin Med* 1993;122:92-102.
- Neurohr C, Nishimura S, Sheppard D. Activation of transforming growth factor-beta by the integrin alpha 5 beta 1 delays epithelial wound closure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:252-259.
- Lechapt-Zalcman E, Pruliere-Escabasse V, Advenier D, Galiacy S, Charriere-Bertrand C, Coste A, Harf A, d'Ortho MP, Escudier E. Transforming growth factor-beta1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L1277-L1282.
- Bove PF, Wesley UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vliet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:138-146.

35. Wesley UV, Bove PF, Hristova M, McCathy S, van der Vliet A. Airway epithelial cell migration and wound repair by ATP-mediated activation of Dual Oxidase 1. *J Biol Chem* 2007;282:3213-3220.
36. Doornaert B, Leblond V, Galiacy S, Gras G, Planus E, Laurent V, Isabey D, Lafuma C. Negative impact of DEP exposure on human airway epithelial cell adhesion, stiffness, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L119-L132.
37. de Bentzmann S, Polette M, Zahm JM, Hinnrasky J, Kileztky C, Bajolet O, Klossek JM, Filloux A, Ladzunski A, Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing over-activation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab Invest* 2000; 80:209-219.
38. Coraux C, Martinella-Catusse C, Nawrocki-Raby B, Hajj R, Burlet H, Escotte S, Laplace V, Birembaut P, Puchelle E. Differential expression of matrix metalloproteinases and interleukin-8 during regeneration of human airway epithelium in vivo. *J Pathol* 2005;206: 160-169.
39. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 2007;211:340-350.
40. Leigh MW, Kylander JE, Yankaskas JR, Boucher RC. Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:605-612.
41. Emura M. Stem cells of the respiratory epithelium and their in vitro cultivation. *In Vitro Cell Dev Biol* 1977;3:3-14.
42. Liu JY, Nettekheim P, Randell SH. Growth and differentiation of tracheal progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1994; 266:L296-L307.
43. Engelhardt JF, Schlossberg H, Yankaskas JR, Dudus L. Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development* 1995;121:2031-2046.
44. Schoch KG, Lori A, Burns KA, Eldred T, Olsen JC, Randell SH. A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L631-L642.
45. Borthwick DW, Shahbazian M, Todd Krantz Q, Dorin J, Randell SH. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:662-670.
46. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L643-L649.
47. Avril-Delplanque A, Casal I, Castillon N, Hinnrasky J, Puchelle E, Péault B. Aquaporin-3 expression in human fetal airway epithelial progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:992-1001.
48. 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* 2007;25:139-148.
49. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1585-1591.
50. Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:671-681.
51. Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 2002;161:173-182.
52. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121:823-835.
53. Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:718-725.

La mucoviscidose (CF) est caractérisée par une infection et une inflammation qui sont associées à un remodelage et à des lésions de l'épithélium respiratoire de surface bronchique. Cependant, bien qu'il ait été démontré que l'infection ne pouvait pas être totalement responsable de ces remaniements, l'association du remodelage épithélial à l'inflammation ou à un processus anormal de régénération reste mal définie. De même, les mécanismes du remodelage et ses conséquences sur la fonctionnalité épithéliale restent à élucider.

Nos résultats montrent, en utilisant un modèle de culture en interface air-liquide, que la régénération de l'épithélium bronchique CF, en dehors de toute infection bactérienne et de toute inflammation exogène, est retardée et aboutit à la reconstitution d'un épithélium remodelé et présentant une hyperplasie des cellules basales, suggérant l'implication du défaut même de CFTR dans ce phénomène.

De plus, dans ce contexte exempt d'infection et d'inflammation exogène, le remodelage épithélial affecte les propriétés électrophysiologiques des épithélia tant CF que non CF. Les remaniements de l'épithélium bronchique, même non CF, et plus particulièrement le développement d'une métaplasie malpighienne, entraînent, en outre, une altération des propriétés de défense antibactérienne de l'épithélium bronchique. Enfin, le remodelage de l'épithélium bronchique ne semble pas être lié une modification de la sécrétion des 17 facteurs de croissance, chimiokines ou cytokines que nous avons étudiés.

Notre travail constitue un pas significatif dans la compréhension des anomalies survenant au cours de la régénération épithéliale CF et du remodelage de l'épithélium bronchique humain.

Mots clés: Mucoviscidose, régénération, épithélium bronchique, remodelage

Cystic fibrosis is the most frequent genetic disease among Caucasians, characterized by airway epithelial injury and remodeling. However, although it was demonstrated that infection could not be entirely responsible of epithelial remodeling, it is still debated whether this epithelial structure alteration is related to CF-associated inflammation or due to an abnormal regeneration process after injury. In the same manner, the remodeling mechanisms, as well as their consequences on epithelial functionality, remain to be elucidated.

Using an *in vitro* model of culture at the air-liquid interface, our results show that, in absence of infection and exogenous inflammation, the regeneration of the human CF airway epithelium is delayed and leads to the reconstitution of a remodeled epithelium exhibiting basal cell hyperplasia, suggesting the involvement of CFTR in this phenomenon.

Moreover, in this context of culture without infection and exogenous inflammation, the remodeling alters the electrophysiological properties of the non-CF and CF airway epithelia. Bronchial epithelial remodeling, and particularly squamous metaplasia, also gives rise to an alteration of the anti-bacterial defense properties, even in the non-CF cultures. Finally, our results show that airway epithelial remodeling does not seem to be related to a modification in the secretion of the 17 growth factors, chemokines and cytokines we have studied.

Our Study constitutes a significant advance in the comprehension of the abnormalities occurring during the human CF airway epithelial regeneration and the remodeling of the airway epithelium.

Key words: Cystic fibrosis, regeneration, airway epithelium, remodeling