

#### 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

### **Thomas JOLLY**

Soutenue publiquement le 07 décembre 2010

### IDENTIFICATION, ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES CANDIDATES DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE HUMAIN ADULTE

Directeur de thèse Mlle le Docteur Christelle CORAUX

### **Devant le jury :**

- Mmele Professeur Patricia LEMARCHAND (Nantes)M.le Professeur Jean-François BERNAUDIN (Paris)Mmele Professeur Carole PLANES (Bobigny)M.le Professeur Philippe NGUYEN (Reims)M.le Professeur Philippe BIREMBAUT (Reims)
- Mlle. le Docteur Christelle CORAUX (Reims)

Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM 514 de Reims, dirigée par le Docteur Edith PUCHELLE puis dans l'unité INSERM 903 dirigée par le Professeur Philippe BIREMBAUT. Je les remercie de m'avoir accueilli pendant ces quatre années au sein de leur laboratoire. Je suis en particulier reconnaissant envers le professeur Philippe Birembaut d'avoir accepté de faire partie du jury d'évaluation de ce travail.

Je remercie vivement le Docteur Christelle CORAUX qui a dirigé cette thèse, pour son encadrement, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils.

J'exprime mes remerciements sincères aux Professeurs Patricia LEMARCHAND et Jean-François BERNAUDIN d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur scientifique.

Je voudrais aussi remercier les Professeurs Carole PLANES et Philippe NGUYEN de participer au jury d'évaluation de mon travail de thèse.

Je souhaite grandement remercier le Docteur Richard LENAOUR pour m'avoir initié à la joie et aux aléas de la cytométrie en flux, pour sa disponibilité ainsi que sa capacité à répondre à mes très nombreuses questions, et surtout pour son aide inestimable lors de nos rendez-vous d'analyses et de tris cellulaires. A cette occasion, j'exprime ma gratitude aux techniciens de BD Biosciences pour leurs fréquents dépannages dans le cadre des nombreuses, diverses et variées pannes ou casses subies par le FACS Aria.

Je souhaite également remercier sincèrement tous les membres de l'unité INSERM 903 : tout d'abord, Michel ABELY pour m'avoir trouvé la possibilité d'être financé et de réaliser une quatrième année de thèse ; Myriam POLETTE, Béatrice NAWROCKY-RABY, Jean-Marie TOURNIER, Véronique DALSTEIN, Claire KILEZTKY, pour leurs conseils et leurs disponibilités ; Eymeric LAGONOTTE pour son aide précieuse dans la réalisation des coupes en paraffine des épithélia régénérés, Stéphanie CAUDROY pour m'avoir encadré au cours de cette année de monitorat et Jean-Marie ZAHM pour sa grande disponibilité et réactivité dans la gestion efficace et rapide de mes nombreux soucis informatiques. Un grand merci à vous tous avec qui j'ai passé de bons et très bons moments pendant la thèse et lors de nos petites soirées et sorties : Alex, Kahina (droit au but !), Audrey, Emilie, Arnaud, Kamel, Grégoire, Julien; à Annie et Henriette pour leur bonne humeur, leur sympathie et leur écoute, et Simon, pour ces soirées à thèmes du mardi, pour m'avoir fait redécouvrir les joies d'un match du stade de REIMS ou pour ce séjour Strasbourgeois et cet inoubliable leçon de peignage de barbe, que tu m'as donnée.

Un énoooooorme merki à Steven et Sarah pour leur très grande aide, pour m'avoir supporté, conseillé et pour m'avoir fait beaucoup rire (une belle panoplie d'imitations) et passer de très bons moments, notamment notre week-end de folie à Montauban que je n'oublierai pas ! Je suis très heureux de vous avoir connus et serai toujours là pour vous, n'en doutez pas !

Jacqueline, y a tellement de choses à dire qu'on pourrait en écrire un livre !!! Je suis très content de t'avoir connue, toujours présente et disponible pendant ces quatre ans quand j'avais besoin d'un conseil ou d'un coup de main. Tu m'as toujours proposé ton aide et m'as reboosté quand les résultats et le moral n'était pas là ! Enfin, merki pour ces dépannages informatiques incessants, cette folle année de monitorat où on s'est bien marré, ces séjours en congrès et pour m'avoir convié à célébrer ton mariage. Je serai toujours là pour toi. Simplement merci !

Je tiens bien sûr à remercier la région Champagne-Ardenne et l'association des Amis de l'American Memorial Hospital de REIMS pour leur financement tout au long de mes quatre années de thèse.

Je souhaite remercier grandement Fred et Aurore pour leur soutien de très très longue date, leur amitié sans faille, le chocolat et les apéros réconfortant que vous m'avez apportés, et pour avoir fait de moi, avec un immense honneur, un parrain comblé (il est trop mignon mon pti poussin Raphaël).

Merci à Chloé, Steeve, Olivia (et leur petite Rose), ainsi que mes beaux-parents, mes beau-frère et belle-sœur pour leur amitié, leurs encouragements et leur soutien.

Je remercie de tout mon cœur mes parents, mes grands parents, Emilie et mon frère Guillaume qui ont su me transmettre leur persévérance et leur passion du travail. Merci d'avoir cru en moi à chaque seconde et de m'avoir épaulé, supporté et donné la possibilité de réaliser mes projets dans les meilleures conditions.

Je te remercie Flavie, de m'avoir supporté pendant ces quatre ans de thèse, de m'avoir soutenu dans les moments délicats, de m'avoir conseillé et écouté, et surtout de m'avoir remis en place quand c'était nécessaire. Merci de ta patience, de partager ma vie, toi qui as pris beaucoup en charge surtout à la fin de cette thèse et d'avoir fait de moi un homme comblé avec l'arrivée un peu en avance de notre petite Léonie. Papa te dit également merci ma puce pour tes sourires et tes câlins si réconfortants, je suis tellement fier de toi !

# SOMMAIRE

PUBLICA	TION	IS ET COMMUNICATIONS	1
LISTE DES	S ABF	REVIATIONS	4
LISTE DES	s fig	GURES	7
LISTE DES	S TAE	BLEAUX	10
Ι.	PRE	ESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	11
Α.	But	ts du travail de thèse	11
В.	Des	scription des différents chapitres du manuscrit	13
II.	INT	RODUCTION GENERALE	14
A.	APF	PAREIL RESPIRATOIRE	14
1.	Anat	tomie de l'appareil respiratoire	15
2.	Histo	ologie de l'épithélium respiratoire	17
a)	Epit	ithélium trachéo-bronchique	17
	(1)	L'épithélium de surface trachéo-bronchique	17
	(a)	) Cellules caliciformes	18
	(b)	) Cellules ciliées	19
	(c)	) Cellules parabasales ou intermédiaires	20
	(d)	l) Cellules basales	20
	(2)	Les glandes sous-muqueuses	22
	(a)	) Epithélium bordant les canaux ciliés	23
	(b)	) Cellules séreuses	23
	(c)	) Cellules muqueuses	24
	(d)	l) Cellules myoépithéliales	24
b)	Epit	ithélium bronchiolaire	24
	(1)	Cellules neuro-endocrines	25
	(2)	Cellules de Clara	26
c)	Epit	ithélium alvéolaire	27
	(1)	Pneumocytes de type I	28
	(2)	Pneumocytes de type II	29
3.	Systè	èmes de défense épithéliaux	29
a)	Bar	rrière mécanique : Les jonctions intercellulaires	30

	(1)	Jonctions serrées ou zonula occludens	30
	(2)	Jonctions intermédiaires ou zonula adherens	31
	(3)	Desmosomes ou macula adherens	31
	(4)	Jonctions communicantes ou gap junctions	32
	(5)	Hémidesmosomes	32
b	) La d	clairance mucociliaire	33
	(1)	Liquide de surface	33
	(a)	) Liquide périciliaire	33
	(b	) Le mucus	34
	(2)	Le battement ciliaire	35
С	) Les	transports d'ions	35
	(1)	Le transport de chlore	36
	(2)	Le transport de sodium	37
	(3)	Le transport de potassium	38
	(4)	Autres transporteurs	38
	(5)	Récapitulation des transports transépithéliaux	39
d	) Pep	otides de défense anti-microbiens et cellules immunitaires	39
	(1)	Peptides à activité anti-microbienne	39
	(2)	Défense immunitaire	41
В.	CEL	LULES SOUCHES	42
1.	Cara	ctéristiques des cellules souches	42
2.	Class	sification des cellules souches selon leur potentiel de différenciation	42
3.	Les o	lifférentes cellules souches	45
а	) Les	cellules souches embryonnaires	45
	(1)	Généralités	45
	(2)	CSE et épithélium respiratoire	46
а	) iPS	(Induced pluripotent stem-cells)	46
а	) Cel	lules souches adultes ou somatiques	49
	(1)	Généralités	49
	(2)	Hiérarchie des cellules souches adultes	51
	(3)	Cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire	53
	(a)	) Différences structurales et histologiques pulmonaires inter-espèces	53

(b)	Cellules souches endogènes	54
(i)	Cellules souches/progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique	56
(a	) Les cellules sécrétoires	56
(b	) Les cellules basales	57
(c	) Cellules basales ou cellules sécrétoires ?	59
(ii)	Cellules souches/progénitrices de l'épithélium bronchiolaire	61
(iii)	Cellules souches de la jonction bronchiolo-alvéolaire	63
(iv)	Cellules progénitrices de l'épithélium alvéolaire	65
(v)	Side population pulmonaire	67
(vi)	Notion de niches et régulation des cellules souches de l'épithélium respiratoire	68
(c)	Cellules souches exogènes	71
(i)	Concept de plasticité des cellules souches adultes	72
(ii)	Implication des cellules souches exogènes au niveau pulmonaire	73
III. IDENTIF BRONCHIOLAIRE I	FICATION DES CELLULES SOUCHES / PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM HUMAIN ADULTE	77
A. MATER	IELS ET METHODES	77
1. Microdis	section des bronchioles humaines	77
2. Dissociat	tion des cellules épithéliales bronchiolaires	77
3. Etude his	stologique	78
a) Fixatior	n des tissus et des membranes de culture en Interface Air-Liquide (IAL)	78
(1) Tis:	sus pulmonaires humains	78
(2) Epi	thelia bronchiolaires régénérés en culture en IAL	78
b) Etudes	histologiques des échantillons biologiques	79
4. Etude d	de l'expression de différents margueurs des cellules épithéliales	
bronchi	iolaires par immunohistochimie et immunocytochimie	79
a) Les anti	icorps utilisés	79
b) Immun	ohistochimie	80
(1) Sur	cultures entières	80
(2) Sur	cryocoupes de tissus pulmonaires	81
(3) Sur	· cellules cytocentrifugées	82
(4) Sur	cellules en suspension	83
5. Analyse	et tri cellulaires par cytométrie en flux	83
a) Principe	2	83

b	) Les	anticorps utilisés	.84
С	) Pré	paration des cellules épithéliales	.84
	(1)	Etude de l'expression de la CK13 et du CD151	.85
	(2)	Caractérisation des cellules cylindriques	.85
	(3)	Tri des cellules basales et cylindriques de l'épithélium bronchiolaire humain	.86
6.	Cult	ure des cellules basales et cylindriques bronchiolaires triées in vitro	.88
а	) Cul	ture cellulaire à l'interface Air-Liquide	.88
b	) Red	cueil des sécrétions apicales de cultures en IAL	.90
7.	Fond	ctionnalité des épithélia régénérés	.90
а	) Etu	de des propriétés bioélectriques des épithélia régénérés en chambre de Ussing	.90
	(1)	Historique	.90
	(2)	Solutions et activateurs pharmacologiques	.91
	(3)	Montage	.91
	(4)	Procédure expérimentale	.92
b	) Fré	quence des battements ciliaires	.92
C	) Cap	pacités de défense anti-bactériennes vis-à-vis de Staphylococcus aureus	.93
	(1)	Souches bactériennes de référence	.93
	(2)	Vérification de la pureté de la souche de Staphylococcus aureus et	
	prép	paration de la suspension bactérienne	.93
	(3)	Protocole expérimental	.93
8.	Anal	yse de la sécrétion de la protéine CC10	.94
а	) Do	sage de la concentration en protéines totales	.94
k	) Do	sage de la protéine CC10 par ELISA	.94
9.	Anal	yses statistiques	.95
В.	RES	SULTATS	.96
1.	Арр	roche expérimentale	.96
2.	Cara mis	ctérisation des cellules composant l'épithélium bronchiolaire humain adulte : se en évidence de la présence de cellules basales	.97
3.	Iden	tification de marqueurs membranaires spécifiques des cellules épithéliales	
	bro	onchiolaires humaines	.98
а	) La (	Cavéoline-1α	.99
t	) Le I	Facteur Tissulaire	100
C	) Le (	CD151	102

4.	A	Analyse puis tri des cellules épithéliales bronchiolaires humaines en cytométr	ie en
		flux	104
	a)	Analyse de l'expression du CD151, du FT et de la CK13 par cytométrie en flux.	104
	b)	Tri des cellules épithéliales bronchiolaires par cytométrie en flux	
	(	(1) Tri des cellules basales et des cellules non-basales (cylindriques)	
	(	(2) Contrôle de la pureté des populations triées	
	(	(3) Caractérisation de la population des cellules cylindriques bronchiolaires	
5.	C	Cultures des cellules triées et non triées en interface air-liquide	
6.	F	Fonctionnalité des épithélia bronchiolaires régénérés	114
	a)	Analyse de l'intégrité des épithélia régénérés	114
	b)	Analyse des propriétés électrophysiologiques des épithélia régénérés	116
	c)	Analyse de la fréquence des battements ciliaires	117
	d)	Capacités de défense anti-bactériennes vis-à-vis de Staphylococcus aureus	118
	e)	Analyse de la sécrétion de la protéine CC10	
C.		DISCUSSION	120
IV.		IDENTIFICATION DE SOUS-POPULATION(S) DES CELLULES BASALES	DE
L'EPITI	HEL	LIUM DES VOIES AERIENNES PROXIMALES HUMAINES ADULTES	127
Α.		MATERIELS ET METHODES	127
1.	Т	Tissus des voies respiratoires humaines : Polypes nasaux	127
2.	۵	Dissociation des cellules épithéliales	127
3.	۵	Détection par immunocyto / histochimie de marqueurs potentiels de	sous-
	,	populations de cellules basales	
	a)	Fixation des tissus de voies respiratoires humaines et des cultures en IAL	
	(a	Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence	
	(	(1) Les anticorps utilises	
	( ۲	(2) Marquages immunohistochimiques sur cryocoupes de tissus respirat humains et de membranes de culture en IAL	oires 129
	(	(3) Marquage immunocytochimique sur cellules cytocentrifugées	
4.	C	Cytométrie en flux	130
	a)	Les anticorps utilisés	131
	b)	) Tri des cellules épithéliales	
5.	C	Culture cellulaire à l'interface air/liquide	
6.	E	Etude de la capacité de croissance clonale des cellules basales triées	132

a) Réa	alisation de tests de clonogénicité	132
(1)	Principe	132
(2)	Support cellulaire nourricier : les cellules STO	133
(3)	Réalisation des tests de clonogénicité	133
(4)	Caractérisation des clones en Passage O par un marquage	
imm	nunocytochimique	135
(a)	) Les anticorps utilisés :	135
(b	) Protocole expérimental	135
b) Etu respira	ude de la capacité des cellules basales à générer un réseau de glandes	136
(1)	Préparation des gels de Collagène de type I	136
(2)	Protocole expérimental	136
7. Anal	lyses statistiques	137
B. RES	SULTATS	138
1. Dém	narche expérimentale	138
2. Tri d	les cellules épithéliales basales respiratoires par cytométrie en flux	138
3. Disci ide	rimination de marqueurs des cellules basales bronchiques humaines adultes : ntification de potentielles sous-populations	141
a) Ana tissulai	alyse de l'expression de marqueurs « génériques » de cellules souches ires humaines	141
(1)	BCRP-1	141
(2)	CD133	142
(3)	CD34	142
b) Ma la littéi	arqueurs potentiels de l'épithélium de voies aériennes humaines identifiés dans rature	143
c) Ma	arqueurs spécifiques des cellules basales de l'épithélium respiratoire humain	145
(1)	La Cavéoline-1α	145
(2)	ΔNp63	147
(3)	СК14	148
4. Déte	ermination de la présence d'éventuelles sous-populations au sein des cellules	
bas	sales de l'épithélium respiratoire : tests de clonogénicité	149
a) Gér	nération de clones in vitro par les cellules basales triées	149

b) éj	) Caractérisation en immunocytochimie des clones générés à partir de cellules pithéliales non triées	152	
5.	Etude de la capacité des cellules basales à générer un réseau de glandes respiratoires	154	
C.	DISCUSSION	.157	
V.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	.165	
BIBLIOGRAPHIE			

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### **PUBLICATIONS**

- Maouche K, Polette M, Jolly T, Medjber K, Cloëz-Tayarani I, Changeux JP, Burlet H, Terryn C, Coraux C, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM. α7 nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. Am J Pathol, 2009, 175(5):1868-1882.
- 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 EFFECTUEES DANS LE CADRE DE CONGRES

- Jolly T, Le Naour R, 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, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Rev Mal Respir, 2010, 2, 14.
- Roux J, Jolly T, Collet S, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Etude de la régénération et du remodelage de l'épithélium bronchique humain normal et mucoviscidosique. 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.
- Jolly T, Le Naour R, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium ? J. Cystic Fibrosis, 2009, 8, suppl. 2, s90.
- 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, Lingee 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.
- Maouche K, Polette M, Zahm JM, Jolly T, Coraux C, Cloëz-Tayarani I, Birembaut P, Tournier JM. Implication du récepteur nicotinique à l'acétylcholine α7 dans la regeneration de l'épithélium respiratoire humain. Rev Mal Respir, 2008, 25, 36.
- 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

- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium? International Symposium of the Federative Research Institute N°53, 2010, Reims, France.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Forum des jeunes chercheurs de l'IFR53, 2010, Reims, France.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Lung Storming, 9<sup>ème</sup> réunion d'hiver, 2010, Aix en Provence, France.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Journées de Recherche Respiratoire, 2009, Strasbourg, France.
- Jolly T, Le Naour R, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium? 32<sup>nd</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 2009, Brest, France.
- Jolly T, Roux J, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Caractérisation des cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte. Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims, 2008, Reims, France.

### COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

- Jolly T, Le Naour R, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium? 24<sup>th</sup> North American Cystic Fibrosis Conference, 2010, Baltimore, USA.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Journées de Recherche Respiratoire, 2010, Nantes, France.
- Jolly T, Le Naour R, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium? 32<sup>nd</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 2009, Brest, France.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium? International Symposium of the Federative Research Institute N°53, 2010, Reims, France.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? 11<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs en mucoviscidose, 2010, Paris, France.
- Jolly T, Le Naour R, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Cellules basales: cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte? Journées de Recherche Respiratoire, 2009, Strasbourg, France.
- **Jolly T**, Le Naour R, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Are basal cells progenitors of the human bronchiolar epithelium? 32<sup>nd</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 2009, Brest, France.
- Jolly T, Roux J, Collet S, Birembaut P, Coraux C. Caractérisation des cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte. 10<sup>ème</sup> Forum des jeunes chercheurs de la Mucoviscidose, 2009, Paris, France.
- Jolly T, Roux J, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Identification de nouveaux marqueurs des cellules souches/progénitrices candidates de l'épithélium bronchique humain adulte. 9<sup>ème</sup> Forum des jeunes chercheurs de la Mucoviscidose, 2008, Paris, France.
- Jolly T, Roux J, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Caractérisation des cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte. Journées de Recherche Respiratoire, 2008, Grenoble, France.
- Jolly T, Roux J, Lingée S, Birembaut P, Coraux C. Characterization of human airway adult basal cells. International Congress "The Biology of Stem Cells", 2008, Paris, France.

# LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
μg	Microgramme
μm	Micromètre
μl	Microlitre
A	Area
ABC :	ATP Binding Cassette
AMPc :	Adenosine Monophosphate cyclique
AQP :	Aquaporin
ATP :	Adénosine Triphosphate
BADJ :	Bronchioalveolar Duct Junction
BASC :	Bronchioalveolar Stem Cells
Bcrp1:	Breast Cancer Resistance Protein 1
BEBM :	Bronchial Epithelail Cell Basal Medium
BP:	Bullous Pemphigoid antigen
BPCO :	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BrdU :	Bromodéoxyuridine
BSA :	Bovin Serum Albumine
CaCC :	Calcium-activated Chloride Channel
CC10 :	Clara Cell protein de 10 kDa
CCSP :	Clara Cell Secretory Protein
CD :	Cluster of Differentiation
CF :	Cystic Fibrosis (Mucoviscidose)
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CFU :	Colony Forming Unit
CGRP :	Calcitonin Gene-Related Peptide
СК :	Cytokératine
CnT-17 :	CellnTec milieu 17
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone
CSE :	Cellules Souches Embryonnaires
CSH :	Cellules souches Hématopoïétiques
CSM :	Cellules Souches Mésenchymateuses
DAPI :	4',6'-diamino-2-phénylindole
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO :	Diméthyl Sulfoxide
EBP50 :	ERM-Binding Phosphoprotein 50
EDTA :	Ethylene Diamine Tetraacetic acid
EGF :	Epidermal Growth Factor
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENac :	Epithelial Sodium Channel
FITC :	Fluorescéine Isothyocyanate
FIV :	Fécondation In Vitro
Fox:	Forkhead Box
FSC :	Forward Scatter
FT:	Facteur Tissulaire

GDF3 :	Growth Differentiation Factor 3
GFP :	Green Fluorescent Protein
GRP :	Gastrin-Releasing Peptide
GSI-B4 :	Griffonia Simplicifolia Isolectin B4
Н:	Height
hAFSC :	human Amniotic Fluid Stem Cells
HBSS :	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES :	Hydroxy Ethyl Piperazine Ethane Sulfonic Acid
Hz	Hertz
IAL :	Interface Air-Liquide
lg :	Immunoglobuline
IL:	Interleukine
iPS :	Induced Pluripotent Stem cells
JAM :	Junction Adhesion Molecule
KATP:	ATP-dependent K(+) channel
kDa:	kilodalton
Klf-4:	Kruppel-like factor 4
KvLQT1:	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member
LRC :	Label Retaining Cells
MHC-1:	Major histocompatibility complex 1
mm:	Millimètre
MUC :	Mucine
Nanog:	Nanog protein
NBD :	Nucleotide-Binding Domains
NEB :	Neuro-Epithelial Bodies
NGF-R :	Nerve Growth Factor Receptor
NHE:	Echangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
nm:	Nanomètre
Oct :	Octamère binding protein
OCT :	Optimal Cutting Temperature Compound
ORCC :	Outwardly Rectifying Chloride Channel
P450:	450 kDa protein
PAMPs :	Pathogens-associated Molecular Patterns
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PDZ :	PSD-95/SAP-90 Disc-Large, ZO-1 homologous domain
PE:	Phycoérythrine
pH:	potential Hydrogène
piPS :	protein-Induced Pluripoten Stem cells
PK:	Protein Kinase
PN:	Pneumocytes
PNN:	Polynucleaire Neutrophile
PRR :	Pattern-Recognition Receptor
Pten :	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
Sca1:	Stem Cell Antigen-1
Scgb :	Sécrétoglobine
SLPI :	Secretory Leukoproteinase Inhibitor

Sry-related high mobility group box Sox : SP: Surfactant Protein SSC : Side Scatter Stage Specific Embryonic Antigen SSEA : STM: Segment Transmembranaire SVF: Sérum de veau fœtal Teratocarcinoma-derived growth factor 1 TDGF1:  $TGF-\beta$ : Transforming Growth Factor beta TNF- $\alpha$ : **Tumor Necrosis Factor alpha** Tra-1: **Tumor Rejection Antigen** TSA : Gélose Trypticase Soja **Bouillon Trypticase Soja** TSB : W : Width WT : Wild Type Zonula Occludens ZO :

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Schéma général de l'appareil respiratoire humain.
- Figure 2: Architecture des voies aériennes humaines.
- **Figure 3:** Les alvéoles pulmonaires sont situées à l'extrémité des bronchioles et permettent les échanges gazeux.
- **Figure 4:** Représentation schématique des épithélia glandulaire et de surface bordant les voies aériennes et alvéolaires humaines.
- **Figure 5:** Morphologie des cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission.
- **Figure 6:** Morphologie des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission.
- Figure 7: Epithélium bronchique humain observé en microscopie électronique à transmission.
- **Figure 8:** Identification de cellules de Clara au sein d'un épithélium bronchiolaire proximale de rat.
- Figure 9: Mise en évidence des cellules épithéliales alvéolaires.
- Figure 10: Représentation schématique des différents types de jonctions au niveau des cellules épithéliales.
- Figure 11: Schéma récapitulant les différents types de cellules souches.
- Figure 12: Schéma représentant différents types de cellules souches unipotentes.
- Figure 13: Principales stratégies d'obtention des cellules souches pluripotentes induites (iPS).
- **Figure 14:** Comparaison schématique de la structure et de l'organisation épithéliale des poumons humains et murins.
- **Figure 15:** Représentation schématique des voies de conduction et respiratoires, montrant les différentes niches de cellules souches pulmonaires établies chez la souris.
- **Figure 16:** Mécanismes potentiels impliqués au cours de la réparation de l'épithélium trachéobronchique murin.
- Figure 17: Modèle schématique d'homéostasie de l'épithélium pulmonaire distal.
- **Figure 18:** Modèle schématique montrant l'influence de signaux paracrines sur le comportement des cellules basales au sein des niches.
- Figure 19: Schéma de culture en interface air-liquide.

- Figure 20: Schéma de la démarche expérimentale suivie.
- **Figure 21:** Caractérisation des cellules composant l'épithélium bronchiolaire humain adulte par immunohistochimie.
- **Figure 22:** Expression de la Cavéoline-1 $\alpha$  (Cav-1 $\alpha$ ) par les cellules basales bronchiolaires humaines.
- Figure 23: Expression du Facteur Tissulaire (FT) par les cellules basales bronchiolaires.
- Figure 24: Expression du CD151 par les cellules basales.
- Figure 25: Validation de l'expression du CD151 par les cellules basales cytocentrifugées ou en suspension.
- Figure 26: Localisation de la population des cellules basales par cytométrie en flux.
- Figure 27: Tri des cellules épithéliales bronchiolaires par cytométrie en flux.
- **Figure 28:** Analyse par cytométrie en flux et immunocytochimie de la pureté des populations cellulaires bronchiolaires épithéliales triées.
- Figure 29: Caractérisation des cellules cylindriques triées par immunocytochimie.
- **Figure 30:** Caractérisation des cellules cylindriques par cytométrie en flux : Quantification des différentes sous-populations épithéliales constituant les cellules cylindriques.
- **Figure 31:** Capacités d'adhérence et de prolifération des cellules épithéliales bronchiolaires non triées et triées.
- **Figure 32:** Capacité de régénération d'un épithélium bronchiolaire in vitro à partir des cellules épithéliales bronchiolaires non triées et triées.
- Figure 33: Expression de la protéine ZO-1 par les épithélia bronchiolaires régénérés.
- Figure 34: Résistance transépithéliale des épithélia bronchiolaires régénérés.
- Figure 35: Propriétés bioélectriques des épithélia bronchiolaires régénérés.
- Figure 36: Fréquence de battements ciliaires des épithélia bronchiolaires régénérés.
- Figure 37: Capacité bactéricide des épithélia bronchiolaires régénérés.
- Figure 38: Sécrétion de la CC10 par les épithélia bronchiolaires régénérés.
- Figure 39: Schéma de réalisation de tests de clonogénicité sur supports cellulaires nourriciers.
- Figure 40: Tri des cellules épithéliales basales de polypes nasaux par cytométrie en flux.
- Figure 41: Analyse de l'expression du CD34 dans les voies aériennes humaines.
- Figure 42: Analyse de l'expression du CD59, CD46 et de la nestine au niveau de l'épithélium respiratoire humain.
- **Figure 43:** Etude de l'expression de la Cavéoline-1α.

- **Figure 44:** Expression du ΔNp63 par les cellules épithéliales des voies respiratoires bronchiques humaines.
- Figure 45: Expression de la CK14 par les cellules épithéliales des voies aériennes humaines.
- Figure 46: Capacité des cellules basales triées et des cellules épithéliales non triées, à générer des clones.
- **Figure 47:** Caractérisation en immunocytochimie des clones P0, obtenus à partir de cellules épithéliales non triées.
- **Figure 48:** Etude de l'expression de la CK14, par les clones PO obtenus à partir de cellules épithéliales non triées.
- **Figure 49:** Structures multicellulaires obtenues à partir de cellules épithéliales non triées ensemencées sur des gels de collagène de type I.
- **Figure 50:** Structures multicellulaires obtenues après 15 à 35 jours de culture à partir de cellules épithéliales basales triées ensemencées sur des gels de collagène de type I.

# LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau 1:** Les cellules souches adultes décrites dans l'organisme humain.
- **Tableau 2:** Protocole de détection protéique par immunohisto/cytochimie.
- **Tableau 3:** Pourcentage d'obtention des clones aux différents passages, rapporté au nombre decellules ensemencées au départ, ou au nombre de clones PO isolés.

### I. PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

### A. Buts du travail de thèse

Dans les pathologies respiratoires inflammatoires chroniques telles que la Mucoviscidose (CF), l'épithélium bordant les voies respiratoires est fréquemment lésé et doit régénérer sa structure afin de restaurer son intégrité et ses fonctions de défenses. Dans ces pathologies, les lésions épithéliales les plus importantes sont observées au niveau des voies respiratoires bronchiolaires distales. La nature des cellules souches/progénitrices de l'épithélium bronchiolaire a été très largement étudiée au sein de modèles animaux et notamment murins, mettant en évidence la capacité progénitrice des cellules de Clara impliquées dans le renouvellement épithélial, ainsi que la présence de cellules souches épithéliales bronchiolaires résidant au sein de niches situées au niveau des corps neuroépithéliaux (NEBs) et des jonctions bronchiolo-alvéolaires (BADJs) (Reynolds *et al.,* 2000 ; Hong *et al.,* 2001 ; Giangreco *et al.,* 2002). Cependant, la nature des cellules souches souches/progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte reste toujours inconnue.

Dans notre étude, à partir des cellules épithéliales bronchiolaires humaines adultes, nous avons choisi d'étudier le potentiel progéniteur des cellules basales bronchiolaires. Pour cela, nous avons isolé par cytométrie en flux les cellules basales, ainsi que les cellules « nonbasales » (cellules de Clara, ciliées et caliciformes), dans le but de tester leurs capacités à proliférer et régénérer un épithélium bronchiolaire humain différencié et fonctionnel *in vitro,* comparable à un épithélium bronchiolaire natif. Cette étude fait l'objet de la première partie de ce travail de thèse.

En outre, chez l'animal, l'identification des cellules souches de l'épithélium trachéobronchique a été réalisée *in vivo*, dans un contexte de lésion de l'épithélium à l'origine de la régénération de celui-ci. Dans ces études, les auteurs ont mis en évidence les populations cellulaires capables de proliférer, de se différencier puis de régénérer un épithélium mature différencié, à l'aide d'un traçage génétique ou à partir de l'incorporation de BrdU (LRC). Ces études ont identifié la population des cellules basales en temps que population de cellules progénitrices au sein de laquelle serait présente une rare sous-population de cellules souches située au sein de sa niche spécifique, montrant des capacités de différenciation multipotentes, ainsi qu'une capacité à générer de larges colonies *in vitro* après leur isolement.

En 2007, une étude menée au sein de notre laboratoire a montré que les cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte exprimaient spécifiquement deux marqueurs membranaires : le Facteur Tissulaire et le CD151. Isolées par cytométrie en flux sur la base de l'expression de ces deux marqueurs, les cellules basales purifiées se sont montrées capables de régénérer un épithélium respiratoire mucociliaire bien différencié, *in vitro* (culture en IAL) et *in vivo* (xénogreffe humanisée de la souris nude). De plus, ces cellules présentaient une forte activité enzymatique de la télomérase (Hajj *et al.,* 2007), comparativement aux cellules cylindriques (cellules ciliées et sécrétoires), ne présentant pas ces capacités régénératives. Une autre étude récemment menée par Rock *et al.* en 2009, a également démontré la capacité des cellules basales purifiées (expression spécifique du NGF-R et de l'intégrine  $\alpha$ 6), à proliférer et à générer, *in vitro*, un épithélium respiratoire différencié en utilisant un modèle de sphéroïde (Rock *et al.,* 2009).

Ces études démontrent que, chez l'homme, les cellules basales sont les cellules progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique. Cependant, pour le moment, aucune étude n'a pu identifier la présence des rares cellules souches de l'épithélium bronchique humain adulte. Le but de la seconde partie de ce travail de thèse a été de tenter de mettre en évidence la présence d'une ou de plusieurs sous-population(s) candidate(s) au statut de cellules souches, au sein de la population des cellules basales bronchiques humaines adultes.

### B. Description des différents chapitres du manuscrit

Le manuscrit sera divisé en quatre parties distinctes :

- B.II. INTRODUCTION GENERALE: Dans cette partie, nous aborderons d'abord, la > description anatomique de l'appareil respiratoire, ainsi que l'histologie de l'épithélium bordant les voies aériennes et alvéolaires. Nous décrirons également les différents mécanismes de défense de cet épithélium, en termes de barrière cohésive, jonctionnelle et étanche, le mécanisme d'épuration mucociliaire, les différents types de transports d'eau et d'ions, ainsi que les peptides de défenses anti-microbiens sécrétés associés au système de défense immunitaire, permettant l'élimination de pathogènes ou d'aérocontaminants contenus dans l'air inspiré. Dans un deuxième temps, nous évoquerons les différents types de cellules souches, ainsi que leurs potentiels d'autorenouvellement et de différenciation associés. Nous détaillerons les cellules épithéliales candidates au statut de cellules souches/progénitrices tissulaires endogènes, également exogènes avec la notion de plasticité qui leur est associée. Enfin, nous introduirons la notion de niches ou microenvironnements confinés, ainsi que les données établies dans la littérature concernant la régulation du comportement des cellules souches épithéliales respiratoires.
- B.III. IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES/PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM BRONCHIOLAIRE HUMAIN ADULTE : Dans cette partie, nous décrirons les matériels et les méthodes qui sont associées, ainsi que tous les résultats obtenus concernant l'identification de cette population candidate au statut de cellules souches/progénitrices. Les résultats seront ensuite discutés, et font l'objet d'un article en cours de soumission.
- > B.IV. IDENTIFICATION DE SOUS-POPULATION(S) DES CELLULES BASALES DES VOIES AERIENNES SUPERIEURES HUMAINES ADULTES : Nous donnerons une description des matériels et des méthodes utilisées. Nous montrerons ensuite les résultats obtenus, et les discuterons à la fin de cette partie.
- > *B.V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES* : Nous établirons les aboutissants de ce travail ainsi que les potentielles applications donnant suite à cette étude.

### II. INTRODUCTION GENERALE

### A. APPAREIL RESPIRATOIRE

La respiration a pour but d'oxygéner le sang et d'en capter puis d'en éliminer le CO<sub>2</sub>. L'air est amené vers la portion respiratoire du poumon par les voies aériennes. Les échanges gazeux entre l'air et le sang se déroulent uniquement au niveau des alvéoles respiratoires. En contact permanent avec l'air ambiant, la muqueuse respiratoire est exposée à de multiples aérocontaminants, produits toxiques ou agents pathogènes tels que les bactéries ou les virus. Ces contaminants inhalés devront être éliminés pour assurer la bonne qualité de l'air qui arrive dans les alvéoles. Cette fonction est réalisée par l'épithélium respiratoire ainsi que par le mucus qui le recouvre, en constituant une barrière physique et biochimique de protection grâce aux propriétés mécaniques du mucus et au système de transport mucociliaire, appelé clairance mucociliaire.

Le renouvellement cellulaire de l'épithélium respiratoire normal est relativement lent. Cependant, l'intégrité de la muqueuse qui borde les voies aériennes humaines peut être sévèrement altérée par l'inhalation d'agents exogènes ou dans des pathologies respiratoires inflammatoires chroniques telles que la mucoviscidose (Cystic Fibrosis, CF), la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) ou l'Asthme. La réponse de l'épithélium respiratoire vis-à-vis d'une agression se traduit par une succession d'évènements pouvant varier du remodelage épithélial à la desquamation partielle de l'épithélium, pouvant aller jusqu'à la dénudation complète de la lame basale. L'épithélium respiratoire doit donc régénérer sa structure afin de restaurer son intégrité et ses capacités défensives. Cette régénération implique les cellules souches/progénitrices tissulaires.

### 1. Anatomie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est composé des voies aériennes extra-pulmonaires regroupant les fosses nasales, le pharynx, le larynx, la trachée et les bronches souches, des voies aériennes intra-pulmonaires comprenant les bronches et les bronchioles, et des alvéoles pulmonaires (Figure 1).



Figure 1: Schéma général de l'appareil respiratoire humain (http://infovisual.info).

L'appareil respiratoire comporte une portion conductrice d'air et une portion respiratoire. La portion conductrice, des cavités nasales aux bronchioles terminales, a pour fonction la conduction et le conditionnement de l'air. La portion respiratoire distale, composée des alvéoles, constituera la zone des échanges gazeux entre l'air et le sang au niveau de la barrière alvéolo-capillaire.

La muqueuse qui tapisse la lumière des voies aériennes, est composée d'un épithélium ancré à une lame basale constituée essentiellement de collagène et de laminine, et d'un chorion sous-jacent richement vascularisé composé en majorité de fibres de collagènes et de fibres élastiques. Au niveau bronchique, entre la lame basale et le cartilage sous-jacent, s'insère une tunique musculaire lisse responsable de la contraction musculaire qui permet de réguler le flux aérien lors de l'inspiration et de l'expiration. Enfin l'adventice, couche la plus externe, est composé d'un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux ainsi que des nerfs.

Au sein de la portion conductrice, les voies aériennes se divisent de manière dichotomique. La trachée (1<sup>ère</sup> génération) va se diviser pour donner naissance à deux bronches souches droite et gauche s'enfonçant dans leur poumon respectif au niveau du hile. Les deux bronches souches se subdivisent ensuite en bronches lobaires puis segmentaires (2<sup>ème</sup> à 8<sup>ème</sup> génération), qui à leur tour se divisent pour donner les bronchioles mesurant moins de 1 mm de diamètre (8<sup>ème</sup> à 14<sup>ème</sup> génération) puis les bronchioles terminales mesurant moins de 0,5 mm de diamètre (15<sup>ème</sup> à 19<sup>ème</sup> génération) (Figure 2) et constituant la fin des voies de conduction de l'air. Les alvéoles, quant à elles dérivent des bronchioles terminales et constituent la portion respiratoire du poumon (19<sup>ème</sup> à 23<sup>ème</sup> génération) (Figure 3).



Figure 2: Architecture des voies aériennes humaines.

Figure 3: Les alvéoles pulmonaires sont situées à l'extrémité des bronchioles et permettent les échanges gazeux.

virtualmedicalcentre.com

### 2. Histologie de l'épithélium respiratoire

Des cavités nasales jusqu'aux bronchioles, la muqueuse respiratoire est bordée d'un épithélium cylindrique pseudostratifié, subissant une transition vers un épithélium cylindrique simple puis cubique simple (bronchioles terminales). Les alvéoles sont, quant à elles, recouvertes d'un épithélium simple (Figure 4).



Figure 4: Représentation schématique des épithélia glandulaire et de surface bordant les voies aériennes et alvéolaires. L'épithélium trachéo-bronchique de surface est un épithélium pseudostratifié, composé de quatre types cellulaires (cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires et basales). L'épithélium glandulaire est constitué de trois types cellulaires (les cellules à mucus, séreuses et myoépithéliales). L'épithélium bordant les voies bronchiolaires humaines est de type monostratifié et composé des cellules basales, ciliées, neuroépithéliales et de Clara. L'épithélium alvéolaire est de type monostratifié et constitué de trois type l (PN I) et pneumocytes de type II (PN II).

#### a) Epithélium trachéo-bronchique

### (1) L'épithélium de surface trachéo-bronchique

L'épithélium de surface est un épithélium cylindrique pseudostratifié. Chaque cellule présente une surface de contact avec la membrane basale, mais toutes n'atteignent pas la lumière bronchique. Cet épithélium est principalement composé de cellules ciliées, de cellules caliciformes mucosécrétantes, de cellules intermédiaires et de cellules basales (Breeze et Wheeldon, 1977) ainsi que de quelques rares cellules neuro-endocrines. Ces différentes populations cellulaires épithéliales sont reliées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires formant un ensemble cohésif de cellules jouant un rôle de barrière mécanique de protection vis-à-vis des pathogènes inhalés ou des aérocontaminants.

#### (a) Cellules caliciformes

Les cellules sécrétoires ou caliciformes qui s'étendent jusqu'à la lumière (Figure 5), sont observées au niveau de l'épithélium respiratoire humain de surface depuis les voies aériennes proximales jusqu'aux bronchioles. Au niveau de l'épithélium trachéal de surface, leur densité moyenne est comprise entre 6000 et 7000 cellules par mm<sup>2</sup> (Ellefsen et Tos, 1972) puis va diminuer tout au long des voies aériennes jusqu'aux bronchioles. Le temps de renouvellement des cellules caliciformes est estimé à 45 jours (Rogers, 2003). En microscopie électronique en transmission, les cellules caliciformes présentent un cytoplasme peu dense aux électrons, rempli de granules sécrétoires de grandes tailles (800 nm de diamètre en moyenne) (Jeffery et Li, 1997). Ces granules contiennent des glycoprotéines de haut poids moléculaire richement glycosylées appelées mucines, à l'origine de la formation du mucus, qui seront libérés hors des cellules par un mécanisme classique d'exocytose.



**Figure 5: Morphologie des cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission.** L: lumière. MG: Granules sécrétoires; CC: cellule ciliée adjacente (Rogers, 2003).

Le nombre de cellules sécrétoires, ainsi que la quantité de mucus sécrété peuvent augmenter dans un contexte physio-pathologique tel que les bronchites, induites expérimentalement au niveau de modèles murins, par l'inhalation de fumée de cigarettes (Jeffery et Reid, 1981 ; Rogers et Jeffery, 1986).

Dans un contexte de lésion de la muqueuse respiratoire, la capacité de prolifération des cellules sécrétoires murines a été mise en évidence de façon limitée. Ces cellules donneraient ensuite naissance à des cellules ciliées, attribuant ainsi à cette population cellulaire le statut potentiel de cellules progénitrices ou souches épithéliales (Evans *et al.*, 1986). Cependant, une récente étude menée par Turner *et al.* a montré que les cellules caliciformes formées, *in vitro*, en réponse à un traitement à l'IL13, médiateur important dans l'asthme, dérivaient d'une cellule progénitrice exprimant le marqueur de différenciation des cellules ciliées FOXJ1 (Turner *et al.*, 2010).

#### (b) Cellules ciliées

Les cellules ciliées représentent la population cellulaire épithéliale majoritaire de la trachée aux bronchioles, et sont décrites comme étant différenciées de façon terminale, c'est-à-dire incapables de proliférer. Elles présentent à leur pôle apical, des cils vibratiles évalués à environ 200 par cellule ciliée (Sleigh *et al.*, 1988) (Figure 6), ainsi qu'un cytoplasme très riche en mitochondries produisant de l'ATP nécessaire au battement ciliaire. La mesure de la fréquence de battements ciliaires a été évaluée entre 10 et 15 Hz, à partir de cultures d'explants d'épithélia respiratoires humains issus de trachées fœtales ou adultes et de polypes nasaux (Zahm *et al.*, 1990 ; Chilvers et O'Callaghan, 2000).

Les cellules cylindriques ciliées sont ancrées indirectement à la membrane basale, via leur liaison aux cellules basales par des desmosomes (Evans *et al.*, 1989 ; Shebani *et al.*, 2005). Elles vont s'étendre jusqu'à la lumière des voies respiratoires. Leur rôle principal est d'assurer la clairance mucociliaire, c'est-à-dire l'élimination hors des voies aériennes des aérocontaminants piégés dans le mucus, hors des voies aériennes, grâce au battement coordonné de leurs cils apicaux. Les cellules ciliées expriment au niveau de leur membrane plasmique apicale les canaux ENaC (Epithelial Na Channel) et CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Puchelle *et al.*, 1992) permettant le transport spécifique transépithélial des ions sodiques et chlorures respectivement.



Figure 6: Morphologie des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique en transmission.

#### (c) Cellules parabasales ou intermédiaires

Les cellules intermédiaires sont des cellules fusiformes ancrées à la lame basale qui n'atteignent pas la surface de l'épithélium des voies respiratoires. Les cellules intermédiaires ou parabasales ressemblent aux cellules basales en microscopie électronique en transmission (Breeze et Wheeldon, 1977; Mercer *et al.*, 1994). En microscopie optique, les cellules intermédiaires sont définies par l'absence de caractéristiques de cellules ciliées, neuro-endocrines ou sécrétoires (Donnelly *et al.*, 1982 ; Breuer *et al.*, 1990). Dans les voies aériennes humaines de conduction les plus larges (> 4 mm), les cellules parabasales représentent 7 % des cellules épithéliales de surface. Dans les voies de conduction distales (< 0,5 mm), les cellules parabasales sont absentes (Boers *et al.*, 1998).

#### (d) Cellules basales

Les cellules basales sont des petites cellules présentant un rapport noyau sur cytoplasme élevé, observées tout au long de l'épithélium des voies aériennes de conduction chez l'homme. Cependant, leur proportion se réduit depuis les voies aériennes proximales jusqu'aux voies aériennes périphériques (Baldwin, 1994). Chez l'homme, les cellules basales représentent 31 % des cellules d'un épithélium mucociliaire pseudostratifié au niveau des voies aériennes les plus larges (diamètre supérieur à 4 mm) (Figure 7), alors qu'elles ne représentent que 6 % des cellules épithéliales totales des voies aériennes distales (Boers *et al.,* 1998).



Figure 7: Epithélium bronchique humain observé en microscopie électronique à transmission. B= couche de cellules basales. Barre = 10 μm (Shebani *et al.,* 2005).

Les cellules basales sont attachées à la lame basale par l'intermédiaire des hémidesmosomes situés à leur pôle basal et ne sont pas en contact avec la lumière des voies aériennes (Evans et Moller, 1991). Elles couvrent chez l'homme, à peu près 90 % de la surface de la lame basale bronchique (Mercer *et al.*, 1994) en formant une couche cellulaire continue qui va se fragmenter en clusters pour finalement aboutir à une distribution isolée dans les voies respiratoires les plus distales (Nakajima *et al.*, 1998). Les cellules basales sont attachées aux cellules cylindriques ciliées et sécrétoires (Evans et Plopper, 1988; Evans *et al.*, 1989) par l'intermédiaire de desmosomes (Baldwin, 1994), permettant d'ancrer les cellules cylindriques indirectement à la membrane basale, (Evans *et al.*, 1989; Shebani *et al.*, 2005), stabilisant ainsi la structure épithéliale.

Les cellules basales sont le dernier type cellulaire à apparaitre au cours de la génération de l'épithélium respiratoire (Tyler *et al.,* 1989), puisque le développement des cellules basales se déroule après la naissance. Il est dépendant de la protéine nucléaire p63, homologue du facteur de transcription p53 (suppresseur de tumeur). Au sein des voies respiratoires, une étude menée sur des souris p63<sup>-/-</sup> a mis en évidence le rôle critique de cette protéine dans la morphogénèse de l'épithélium respiratoire dans la mesure où l'invalidation de p63 entraine la formation d'un épithélium respiratoire cylindrique cilié déficient en cellules basales (Daniely *et al.,* 2004).

Les cellules basales de l'épithélium bronchique mature humain expriment spécifiquement des récepteurs de types nicotiniques (Tournier *et al.*, 2006), ainsi que différentes cytokératines, filaments intermédiaires du cytosquelette, telles que la cytokératine 5 (CK5) (Daniely *et al.*, 2004), la cytokératine 13 (CK13) (Dupuit *et al.*, 1995) ou la cytokératine 17 (CK17) (Nakajima *et al.*, 1998). La cytokératine 14 (CK14), quant à elle présente un profil d'expression particulier. Mise en évidence dans l'ensemble des cellules basales d'un épithélium respiratoire en cours de régénération, elle devient un évènement rare, exprimée au niveau de quelques cellules basales dans l'épithélium bronchique mature (Nakajima *et al.*, 1998). Le nombre de cellules exprimant la CK14 est également augmenté au sein des cellules basales murines durant le processus de réparation épithélial suivant une lésion (Hong *et al.*, 2004a; Hong *et al.*, 2004b). Ce résultat met en évidence la présence d'une sous-population de cellules basales exprimant la CK14 et présentant le potentiel de restaurer un épithélium complètement différencié et via des capacités de différenciation unipotentes et multipotentes. Cette capacité souche/progénitrice des cellules basales sera détaillée dans le paragraphe II. B. 3. c. 3. b. i. b.

#### (2) Les glandes sous-muqueuses

Les glandes sont des structures sécrétoires majeures, présentes au sein de la sousmuqueuse au niveau des voies aériennes cartilagineuses. Les glandes sous-muqueuses sont composées de tubules et acini séreux, d'acini muqueux ou séromuqueux, de tubules interconnectés et de canaux collecteurs. Elles sont situées sous l'épithélium respiratoire et reliées à celui-ci par des canaux recouverts d'un épithélium de type cylindrique cilié (Jeffery, 1983). Les produits de sécrétion s'accumulent au sein des canaux collecteurs, qui, avec les canaux ciliaires, vont connecter chaque réseau glandulaire à la lumière des voies aériennes (Meyrick *et al.*, 1969). Ces glandes présentent un rôle important dans l'immunité innée en sécrétant, au niveau de la lumière des voies aériennes, des facteurs antibactériens et du mucus impliqués dans la maintenance de la fonction pulmonaire normale.

Les cellules séreuses et muqueuses sont les deux types cellulaires prédominants de l'épithélium glandulaire chez les mammifères, qui compte également des cellules myoépithéliales.

#### (a) Epithélium bordant les canaux ciliés

L'épithélium canalaire est un épithélium de type pseudostratifié, semblable et en continuité avec l'épithélium trachéo-bronchique (Meyrick *et al.,* 1969). Des études menées chez la souris ont montré que, dans un contexte de lésion de l'épithélium respiratoire induite par des agents chimiques, les canaux ciliés des glandes de la sous-muqueuse représentent une niche de cellules souches/progénitrices de l'épithélium des voies aériennes proximales (voir paragraphe II.B.3.c.3.b.i.b) (Borthwick *et al.,* 2001a ; Engelhardt, 2001).

#### (b) Cellules séreuses

Les cellules séreuses contiennent de petits granules denses aux électrons, situés au pôle apical, contenant des facteurs de défense antimicrobienne comme le composant sécrétoire de l'immunoglobuline A (IgA), la lactoferrine, le lysozyme, l'inhibiteur bronchique des leucoprotéases, ou les glycoaminoglycanes (Brandtzaeg, 1974 ; Bowes et Corrin, 1977 ; Bowes *et al.*, 1981 ; Kramps *et al.*, 1981). Elles sont également impliquées dans le mécanisme de sécrétion d'eau (Meyrick et Reid, 1970 ; Basbaum *et al.*, 1990). Les cellules séreuses sont majoritairement identifiées au niveau de l'épithélium glandulaire. Cependant, des cellules « serous-like » ont été également mises en évidence au niveau de l'épithélium de surface recouvrant les bronchioles humaines (Rogers *et al.*, 1993).

#### (c) Cellules muqueuses

Les cellules muqueuses présentent des granules de sécrétion opaques aux électrons contenant des mucines (Meyrick et Reid, 1970). Dans les conditions physiologiques, les cellules glandulaires muqueuses sécrètent la plus grande partie du mucus qui recouvre les voies respiratoires, par un mécanisme d'exocytose des granules de sécrétion. Les cellules muqueuses expriment spécifiquement les mucines MUC-5B et MUC-7 (Sharma *et al.,* 1998), mais également la mucine MUC-5AC (Groneberg *et al.,* 2002) aussi exprimée par les cellules caliciformes au niveau de l'épithélium de surface. Les glycoprotéines de haut poids moléculaires MUC-5AC et MUC-5B représentent les mucines majoritaires impliquées dans la constitution du mucus.

#### (d) Cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales, de formes allongées, entourent les glandes de la sousmuqueuse et sont situées à la base de l'épithélium glandulaire en contact avec la lame basale. Elles présentent des propriétés de cellules épithéliales et de cellules musculaires contractiles. En se contractant, elles exercent une pression qui permet de réduire le volume de la lumière glandulaire et de faciliter la libération des granules sécrétoires par les cellules glandulaires en direction du canal cilié puis vers la lumière des voies aériennes. Les cellules myoépithéliales expriment l' $\alpha$ -actine caractéristique des fibres musculaires lisses mais également la neurokinine-1 (récepteur de la substance P). Ce récepteur est activé par les tachinines sécrétées par les cellules inflammatoires, ainsi que par les terminaisons nerveuses proches des glandes de la sous-muqueuse, médiant la libération des sécrétions par les glandes (Springer *et al.,* 2005).

#### b) Epithélium bronchiolaire

L'épithélium bronchiolaire humain est un épithélium cylindrique présentant une à deux couches de cellules qui va évoluer en un épithélium cuboïde monocouche constitué uniquement de cellules ciliées et de cellules de Clara au niveau des bronchioles terminales. Suivant les espèces, l'épithélium bronchiolaire est constitué de plusieurs types cellulaires en

proportions différentes. Chez l'homme, l'épithélium bordant les voies bronchiolaires est composé de cellules ciliées, de cellules de Clara (spécifiquement observées au niveau de l'épithélium bronchiolaire humain mais présentes tout au long de l'arbre respiratoire chez la souris), de cellules neuro-endocrines, de cellules caliciformes et de quelques cellules basales moins nombreuses qu'au niveau des voies aériennes trachéo-bronchiques (présentes tout au long de l'arbre respiratoire chez l'homme, absentes dans l'épithélium bronchiolaire chez la souris).

#### (1) Cellules neuro-endocrines

De formes pyramidales, ressemblant morphologiquement aux cellules basales, les cellules neuro-endocrines sont en contact avec la lame basale et présentent des granules de sécrétion au pôle basal ainsi que des prolongements cytoplasmiques atteignant la lumière des voies respiratoires (Weichselbaum et al., 2005). Les cellules neuro-endocrines sont rares (1 pour 2500 cellules épithéliales (Gosney et al., 1988)), localisées tout le long de l'épithélium des voies aériennes, et principalement au niveau de l'épithélium bronchiolaire (Boers et al., 1996). Ces cellules sont observées isolées ou regroupées sous forme d'îlots innervés, nommés corps neuro-épithéliaux (NEB), localisés principalement au niveau des zones de bifurcation des voies aériennes. Les cellules neuro-endocrines expriment différents marqueurs tels que la chromogranine A, la CGRP (calcitonin gene-related peptide (Cadieux et al., 1986)), la GRP (gastrin-releasing peptide (Jaramillo et al., 1995)), la calcitonine (Azzadin et al., 2001)), la sérotonine ou la cholecystokinine. Les peptides et les amines sécrétés par les cellules neuro-endocrines ont montré leurs implications au cours du développement pulmonaire fœtal en modulant la morphogénèse branchée (Sunday et al., 1990). La régénération de l'épithélium bronchiolaire chroniquement lésé est associée à une augmentation du nombre de cellules neuro-endocrines par NEB et du nombre de NEB le long de l'épithélium (Stevens et al., 1997). Au sein des NEB, les cellules neuro-endocrines (CGRP<sup>+</sup>) murines sont capables d'entrer en prolifération, suite à une lésion (Reynolds et al., 2000). Cependant, elles sont incapables de régénérer l'épithélium bronchiolaire (voir le paragraphe II.B.3.c.3.b.ii).
## (2) Cellules de Clara

Les cellules de Clara ou cellules sécrétoires bronchiolaires non-ciliées (décrites par Kölliker en 1881 chez le lapin et Clara M. en 1937 chez l'homme), sont retrouvées au niveau de l'épithélium bronchiolaire chez les mammifères et notamment l'homme, où elles représentent environ 11 % des cellules épithéliales des bronchioles terminales (Boers *et al.*, 1999) (Figure 8).



Figure 8: Identification de cellules de Clara au sein d'un épithélium bronchiolaire proximale de rat (flèche) en microscopie électronique à balayage (A), entourées de cellules ciliées (barre =  $10 \mu m$ ).

(B) Microscopie électronique à transmission des cellules de Clara des bronchioles terminales.
M=Mitochondries, S=Granules sécrétoires, RER=Réticulum Endoplasmique Rugueux,
N=Noyau basal (Reynolds et Malkinson, 2010).

Elles sont observées cependant au niveau des voies aériennes trachéo-bronchiques de quelques espèces comme la souris. Les cellules de Clara humaines présentent un pôle apical en dôme faisant saillie dans la lumière bronchiolaire et entourées de cellules ciliées. Elles sont également caractérisées par la présence d'un important réticulum endoplasmique rugueux, de très nombreuses mitochondries apicales et de grains de sécrétion d'environ 0,3 μm de diamètre proches de la membrane plasmique bordant la lumière (Singh et Katyal, 1997).

Les cellules de Clara sécrètent de manière spécifique une protéine multifonctionnelle de la famille des sécrétoglobines (Scgb1a1), référencée chez l'homme et le lapin comme Utéroglobine, et comme CCSP (Clara cell secretory protein) ou CC10 (Clara cell 10, protéine évaluée à 10kDa) chez les rongeurs (Singh et al., 1988). La protéine CCSP présente la capacité de moduler la susceptibilité épithéliale aux lésions induites par des gaz oxydants (Plopper et al., 2006), et des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires (Dierynck et al., 1996; Mantile et al., 1993). En effet, une étude récente menée en 2010, indique que les cellules de Clara sont capables, à travers la régulation du comportement des macrophages, d'atténuer l'inflammation et qu'une diminution de la fonction sécrétoire des cellules de Clara serait un facteur prépondérant dans l'augmentation de l'intensité de l'inflammation pulmonaire observée dans les maladies pulmonaires chroniques (Snyder et al., 2010). Les cellules de Clara expriment le cytochrome P450 à activité enzymatique monooxygénase, responsable de la détoxification des xénobiotiques et des substances inhalées (Widdicombe et Pack, 1982). Chez la souris, des cellules de Clara variantes, déficientes en cytochrome P450 2F2, sont localisées au niveau des NEB et de la jonction bronchioloalvéolaire. Ces cellules seraient impliquées dans la régénération de l'épithélium bronchiolaire (Hong et al., 2001; Giangreco et al., 2002) (voir les paragraphes II.B.3.c.3.b.ii et iii).

#### c) Epithélium alvéolaire

Au niveau du parenchyme pulmonaire, 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) (Figure 9). A l'état normal, quelques éléments cellulaires, notamment les macrophages, sont retrouvés dans la lumière alvéolaire, en se déplaçant sur la paroi alvéolaire immergés dans le surfactant. Le surfactant, composé de 85 à 90 % de lipides, de 10 % de protéines et de 2 % de carbohydrates (King et Clements, 1972), constitue un film très mince qui recouvre la totalité de la surface de l'intérieur des alvéoles. Cette substance possède des capacités tensioactives, empêchant le collapsus des alvéoles en diminuant les tensions de surface de celles-ci. Le surfactant joue également un rôle important dans la défense immunitaire du poumon en stimulant la phagocytose et la capacité de migration des macrophages alvéolaires (Hoffman *et al.,* 1987).



Figure 9: Mise en évidence des cellules épithéliales alvéolaires.

PN I: Pneumocytes de type I; PN II: Pneumocytes de type II.

## (1) Pneumocytes de type I

Les pneumocytes de type I sont des cellules larges et très aplaties (50 à 100  $\mu$ m de diamètre) couvrant environ 95 % de la surface épithéliale alvéolaire (Stone *et al.,* 1992). Longtemps, les PN I ont été décrites comme des cellules biologiquement inactives, totalement différenciées et impliquées dans le passage d'air passif vers les capillaires (barrière air-sang). De récentes études mettent en évidence des caractéristiques morphologiques de cellules métaboliquement actives, telles que la présence de mitochondries, un appareil de Golgi important, de nombreuses cavéoles ainsi que la présence de microvilli. Les PN I sont également impliqués dans le maintien du fluide de surface, dans le transport d'eau et d'ions chez le rat, en exprimant différentes sous-unités du canal sodique ENaC, et de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Johnson *et al.,* 2002). Récemment, il a été

suggéré une implication potentielle de ces cellules dans la réparation de l'épithélium alvéolaire (Gonzalez *et al.,* 2009).

#### (2) Pneumocytes de type II

Les PN II sont de formes cuboïdes, bordant approximativement 5 % de la surface des alvéoles pulmonaires et représentant 60 % des cellules épithéliales alvéolaires (Castranova *et al.,* 1988). Leur cytoplasme est riche en organites, présentant un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi important, ainsi que des organites spécifiques, appelés corps lamellaires, permettant le stockage du surfactant qu'elles synthétisent. Le surfactant alvéolaire, dont la fraction protéique représentant 10 %, est composée principalement de SP-A et SP-D (Surfactant Protein), protéines de type hydrophile présentant la capacité de moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Pastva *et al.,* 2007), ainsi que de SP-B et SP-C de type hydrophobe plutôt impliquées dans la réduction des tensions de surface alvéolaire (Nogee, 2004).

Les PN II prolifèrent durant le stade embryonnaire et fœtal mais chez l'adulte, en l'absence de lésions présentent des caractéristiques de cellules différenciées matures ne se divisant pas (Ulich *et al.*, 1994). Outre leur rôle dans la production du surfactant, les PN II présentent des capacités de cellules souches de l'épithélium alvéolaire (voir le paragraphe II.B.3.c.3.b.iv).

#### 3. Systèmes de défense épithéliaux

L'épithélium présente différents mécanismes de défense, tels que son rôle de barrière cohésive traduit par de nombreux systèmes de jonctions intercellulaires, la sécrétion du mucus piégeant les aérocontaminants, associée au battement des cils des cellules ciliées (clairance mucociliaire), ainsi que la sécrétion de facteurs de défenses anti-microbiens à large spectre associés à une réponse immunitaire adaptée.

### a) Barrière mécanique : Les jonctions intercellulaires

L'intégrité de la barrière épithéliale est assurée par plusieurs complexes jonctionnels intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les desmosomes et les jonctions communicantes. L'ancrage de l'épithélium à la membrane basale implique l'établissement de complexes multiprotéiques appelés hémidesmosomes (Figure 10).



## Figure 10: Représentation schématique des différents types de jonctions au niveau des cellules épithéliales.

Les jonctions serrées, séparant le pôle apical du pôle basolatéral, assurent l'étanchéité de l'épithélium. Les jonctions adhérentes ainsi que les desmosomes garantissent la cohésion de l'épithélium, et les jonctions communicantes permettent une communication directe entre des cytoplasmes de cellules adjacentes, en assurant le couplage physiologique entre cellesci. Les hémidesmosomes assurent l'ancrage des cellules épithéliales à la membrane basale.

## (1) Jonctions serrées ou zonula occludens

Les jonctions serrées assurent l'étanchéité de l'épithélium. Elles sont localisées au niveau apical de la membrane baso-latérale, en entourant entièrement les cellules

épithéliales cylindriques (Godfrey, 1997). Elles forment une barrière sélective qui régule le passage de molécules chargées hydrophiles comme les ions à travers l'espace para-cellulaire (Godfrey *et al.,* 1992). Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires telles que les claudines, l'occludine ou les JAM (Junctional Adhesion Molecule), assemblées à des protéines de la plaque cytoplasmique formée des protéines ZO-1, ZO-2 ou ZO-3 (ZO pour *zonula occludens*), liées au cytosquelette d'actine ou à des protéines régulatrices. Elles séparent le pôle apical du pôle baso-latéral des cellules, maintenant une distribution asymétrique des composants membranaires et développant la polarité membranaire (Tsukita *et al.,* 2001).

#### (2) Jonctions intermédiaires ou zonula adherens

Les jonctions intermédiaires (jonctions adhérentes ou zonula adherens) sont localisées immédiatement sous les jonctions serrées, au niveau de la membrane baso-latérale des cellules épithéliales cylindriques. Elles sont formées par un réseau de glycoprotéines transmembranaires, dont la majorité fait partie de la superfamille des cadhérines (Ivanov *et al.,* 2001), et notamment la Cadhérine-E, principale protéine impliquée dans ces jonctions (Yamada et Nelson, 2007). Les glycoprotéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine via caténines, vinculine ou actinine  $\alpha$  (Franke *et al.,* 1989; Yamada et Geiger, 1997). Les jonctions intermédiaires sont formées par l'interaction Ca<sup>2+</sup>-dépendante des cadhérines transmembranaires des cellules adjacentes.

#### (3) Desmosomes ou macula adherens

Egalement appelés *macula adherens*, situés au niveau de la membrane baso-latérale sous les jonctions adhérentes, les desmosomes relient fermement les cellules cylindriques ciliées et sécrétoires aux cellules basales (Evans *et al.*, 1989). Les desmosomes sont composés de desmoplakines, de plakoglobine et de plakophilines, protéines cytoplasmiques reliant des cadhérines de types desmogléines et desmocollines, aux filaments intermédiaires de cytokératines (Garrod *et al.*, 1996 ; Kottke *et al.*, 2006).

#### (4) Jonctions communicantes ou gap junctions

Les jonctions communicantes (*gap junctions*) constituent des complexes jonctionnels multiprotéiques en formes de canaux qui ont pour rôle d'assurer une communication directe entre les cytoplasmes de cellules adjacentes (Falk, 2000a). Elles sont constituées de molécules transmembranaires appelées connexines, s'assemblant en hexamères pour former des hémi-canaux appelés connexons. Lorsque les connexons de deux cellules adjacentes s'associent, un canal central se forme, laissant passer des molécules de moins de 1 à 1,5 kDa (De Maio *et al.,* 2002). Ces jonctions permettent des échanges passifs d'ions, ainsi que le transport d'eau ou de métabolites à travers l'épithélium (Falk, 2000b).

Au niveau de l'épithélium différencié et polarisé des voies aériennes humaines, une communication intercellulaire entre les cellules ciliées, exprimant la connexine 30, ainsi qu'entre les cellules ciliées et basales (exprimant majoritairement la connexine 31) a été mise en évidence (Wiszniewski *et al.,* 2007).

#### (5) Hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont des complexes protéiques qui établissent l'ancrage de l'épithélium à la membrane basale sous-jacente, via l'attachement du pôle basal des cellules basales (Nakajima *et al.,* 1998). Similaires à des demi-desmosomes, ils sont asymétriques et contiennent des intégrines en place des cadhérines. Les hémidesmosomes sont constitués des intégrines hétérodimériques  $\alpha$ 6β4 interagissant avec la laminine 5 de la lame basale, des protéines BP180 (BP pour bullous pemphigoid antigens, aussi appelé collagène XVII), et d'une plaque dense intracellulaire principalement composée de desmoplakine. Les filaments de cytokératine du cytosquelette convergent au niveau de cette plaque (Garrod, 1993) (Green et Jones, 1996). On trouve également au niveau des hémidesmosomes, le CD151, tétraspanine associée aux intégrines  $\alpha$ 6β4, composant majeur des structures préhémidesmosomes, impliqué dans la formation et la stabilité des hémidesmosomes (Sterk *et al.,* 2000).

#### b) La clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est considérée comme le premier mécanisme de défense inné des voies aériennes (Knowles et Boucher, 2002). L'épithélium bordant les voies aériennes est recouvert d'un mucus piégeant les débris ou pathogènes inhalés et va les évacuer hors des voies aériennes à l'aide du battement coordonné et orienté des cils. Ce mécanisme contribue à remonter le mucus des voies aériennes distales vers la trachée, puis vers les voies digestives au niveau du pharynx où il sera éliminé par déglutition ou par la toux (Zahm *et al.,* 1989). L'efficacité de l'épuration mucociliaire est dépendante d'un équilibre idéal entre un système coordonné de transport d'eau et d'ions, la structure, la quantité et les qualités viscoélastiques du mucus, le nombre de cellules ciliées, la fréquence des battements et le mouvement coordonné et orienté des cils (Puchelle *et al.,* 1987; Randell et Boucher, 2006).

#### (1) Liquide de surface

Le liquide de surface couvrant l'épithélium des voies aériennes, est composé de glycoprotéines, de glycoaminoglycanes, de protéines, d'antiprotéases, d'antioxydants, d'eau et d'ions (King et Rubin, 1999). Il présente deux composantes : une phase « sol » liquidienne, sur laquelle repose une phase « gel » ou mucus.

#### (a) Liquide périciliaire

La phase « sol » ou liquide périciliaire est une phase aqueuse, lubrifiante et de viscosité faible, dans laquelle battent les cils vibratiles. Les mouvements ioniques transépithéliaux sont à l'origine de ce liquide en entrainant des mouvements d'eau par osmolarité à travers la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales des voies aériennes (Sleigh *et al.*, 1988 ; Smith et Welsh, 1993). Le liquide périciliaire présente une épaisseur constante finement régulée par les transports ioniques transépithéliaux essentiels pour un transport de mucus efficace (Tarran, 2004).

Le liquide périciliaire aurait pour rôle d'éviter l'adhérence des mucines épithéliales membranaires, notamment de MUC-1 et MUC-4, avec les mucines composant la phase

« gel » (Knowles et Boucher, 2002). En outre, la régulation de la composition du liquide périciliaire par les cellules épithéliales est essentielle au maintien d'un environnement adéquat pour l'efficacité d'action des peptides anti-microbiens sécrétés par l'épithélium respiratoire (Ganz, 2002; Travis *et al.*, 1999).

#### (b) Le mucus

La phase « gel » ou mucus, plus superficielle et dense, est un matériel biologique complexe. Il est composé de 95 % d'eau, de 2 à 3 % de protéines et glycoprotéines, d'1 % de lipides et d'1 % de minéraux ou d'ions. Il est caractérisé par différents paramètres rhéologiques tels que la viscosité et l'élasticité, directement responsables de la capacité de transport du mucus par les cils (King, 1987). La phase « gel » peut être également caractérisée par des propriétés de filance, d'adhésivité et de mouillabilité, ces deux dernières contribuant aux propriétés d'interface optimale entre le mucus et l'épithélium respiratoire. Ainsi, une faible adhésivité et une bonne mouillabilité vont faciliter le transport mucociliaire (Zahm *et al.*, 1989). Les principales molécules intervenant dans l'architecture tridimensionnelle et dans les propriétés rhéologiques du mucus sont les mucines, qui constituent une famille hétérogène de glycoprotéines de haut poids moléculaire retrouvées associées à la membrane ou sécrétées. Les mucines sécrétées possèdent de très nombreux groupements O-glycanniques et sont organisées en polymères formant un réseau macromoléculaire tridimensionnel très complexe par l'établissement de ponts dissulfures (Gum, 1992).

Le mucus est principalement composé des polymères de MUC-5AC, de MUC-5B (Thornton *et al.,* 1996; Buisine *et al.,* 1999) et en moindre quantité de MUC-2 au niveau de l'épithélium bronchique (Vinall *et al.,* 2000). Le mucus va piéger de manière aspécifique les aérocontaminants et les pathogènes inhalés. De plus, les mucines sécrétées possèdent dans leur structure de très nombreux résidus sucrés différents au niveau de leurs chaines glycanniques, créant des sites spécifiques d'adhérence pour une grande variété de pathogènes inhalés (Lamblin *et al.,* 1991).

De par son rôle dans les transports d'eau et d'ions, l'épithélium respiratoire va également contrôler la composition du mucus en électrolytes et son degré d'hydratation. Le

mucus présente la capacité de servir de réservoir liquidien au liquide périciliaire sous-jacent. Il a été mis en évidence qu'une perte ou un apport de soluté au liquide de surface menait à la réduction ou l'augmentation sélective du volume de la phase « gel » en préservant la hauteur du liquide périciliaire et donc en conséquence le maintien du transport de mucus optimal (Tarran *et al.*, 2001).

#### (2) Le battement ciliaire

Les cils sont constitués de 9 doublets de microtubules à la périphérie du cil et deux microtubules formant l'axe central de l'axonème, selon le schéma « 9+2 ». Les doublets de microtubules, reliés les uns aux autres par des ponts de nexine, et présentant des bras de dynéine, sont ancrés aux cellules grâce à des structures nommées corps basaux. Les cils battent grâce au glissement des doublets de microtubules assuré par le déplacement des bras de dynéine entre des doublets adjacents, de façon dépendante de l'hydrolyse de l'ATP (Wanner *et al.,* 1996).

Au cours du battement coordonné et orienté des cils, l'extrémité du cil érigé pénètre avec une vitesse de l'ordre de 800  $\mu$ m/s à l'intérieur de la phase « gel ». Cette phase active durant laquelle les cils se déploient et entrent en contact avec le mucus permettant le mouvement unidirectionnel du mucus à la surface des voies aériennes. Cette phase est suivie d'une phase dite passive au cours de laquelle les cils vont se replier dans la phase « sol » selon un mouvement de rotation, puis retrouver leurs positions initiales (Sleigh *et al.*, 1988).

#### c) Les transports d'ions

Les transports d'ions sont réalisés par des canaux ioniques formés par des protéines transmembranaires. Ces transports d'ions peuvent être passifs, selon un gradient électrochimique, ou actifs réalisés par des pompes nécessitant un apport énergétique (ATP). Les transports ioniques sont à l'origine de gradients électrochimiques de part et d'autre de la membrane cellulaire. Ils sont responsables de l'existence d'un potentiel de membrane et sont impliqués également dans les phénomènes de sécrétion ou d'absorption d'eau à travers la membrane épithéliale. L'épithélium respiratoire humain va présenter, à l'état basal, une absorption de sodium (Na<sup>+</sup>) par les canaux sodiques apicaux, entraînant le passage paracellulaire de chlore (Cl<sup>-</sup>) ainsi qu'une absorption d'eau par osmolarité (Tarran, 2004).

#### (1) Le transport de chlore

Plusieurs types de canaux chlorures ont été identifiés au niveau des membranes apicales et basolatérales des cellules de l'épithélium respiratoire, et notamment le canal CFTR.

La protéine CFTR est une protéine transmembranaire de 170 kDa codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 7 (Riordan *et al.,* 1989), observée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales pulmonaires. CFTR est un canal chlorure dont l'activité est régulée par l'AMPc, appartenant à la famille des protéines de transport ABC (ATP Binding Cassette). CFTR est composé de deux domaines à 6 segments transmembranaires, deux domaines cytosoliques NBD1 et NBD2 (NBDs : *Nucleotide-binding domains*) de liaison aux nucléotides (sites de fixation de l'ATP), et un domaine de régulation R (R domain) présentant des sites potentiels de phosphorylation pour les protéines kinases A et C (Hanrahan et Wioland, 2004).

L'activation du canal dépend de la phosphorylation du domaine R et de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP sur les domaines NBD1 et 2. Au niveau pharmacologique, le canal CFTR est activé par une grande diversité de composés chimiques incluant des agonistes de l'adenylate cyclase tels que la forskoline (Schultz *et al.,* 1997).

En plus de son rôle dans le transport de Cl<sup>-</sup>, CFTR régule négativement le transport sodique transépithélial par les canaux sodiques ENaC (Briel *et al.*, 1998 ; Stutts *et al.*, 1995). CFTR contrôle également l'activité d'autres canaux Cl<sup>-</sup> et des canaux K<sup>+</sup> (Kunzelmann et Schreiber, 1999). CFTR, au niveau de la membrane apicale, s'associe pour former un complexe multiprotéique, à des protéines reliées au cytosquelette d'actine telles que l'ezrine ou l'EBP50 (ERM-binding phosphoprotein 50) présentant un domaine de liaison PDZ (PSD-95/SAP- 90, Discs-large, ZO-1 homologous domain) à partir de sa séquence C-terminale (Short *et al.*, 1998). Ainsi, toute modification de la structure du cytosquelette pourra être transmise à CFTR.

D'autres canaux ont également été mis en évidence dans le transport du Cl<sup>-</sup> au sein de l'épithélium respiratoire, tels que les canaux Cl<sup>-</sup> activés par le Ca<sup>2+</sup> cytosolique (calcium-

dependent chloride channel, CaCC) (Agnel *et al.,* 1999). Ces canaux participent au contrôle de l'hydratation du liquide de surface par les cellules épithéliales (Tarran *et al.,* 2002).

Le canal ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel), régulé par l'AMPc, a été mis en évidence au niveau de la membrane basolatérale de cellules épithéliales respiratoires humaines (Szkotak *et al.*, 2003). Le rôle de ce canal est encore méconnu. Cependant, la sécrétion de bicarbonate (HCO3<sup>-</sup>) serait favorisée par l'ouverture du canal ORCC alors que sa fermeture permettrait la sécrétion de chlore (Xia *et al.*, 1997). Une étude menée par Egan et collaborateurs a montré que l'activation du canal ORCC par la PKA nécessitait la présence d'un canal CFTR fonctionnel (Egan *et al.*, 1992). CFTR régulerait le canal ORCC par un mécanisme autocrine/paracrine impliquant la libération d'ATP (Schwiebert *et al.*, 1995; Schwiebert *et al.*, 1999).

#### (2) Le transport de sodium

Le canal sodique majoritaire situé dans la membrane apicale des cellules, de l'épithélium nasal jusqu'aux alvéoles, est appelé ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel). Ce canal permet l'absorption des ions Na<sup>+</sup> du liquide de surface vers l'intérieur de la cellule. Le canal ENaC est formé de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  associées en multimères. Chaque sous-unité présente deux domaines transmembranaires, un domaine extracellulaire, ainsi que deux domaines amino- et carboxy-terminaux cytoplasmiques impliqués dans la modulation et l'activation du canal ENaC. Celui-ci est inhibé sélectivement par l'amiloride, composé chimique dérivé de la guanidine inhibant l'absorption de sodium de façon réversible et rapide (Garty et Palmer, 1997).

Au niveau de la membrane basolatérale existe également la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, impliquée dans le maintien de l'homéostasie sodique et potassique intracellulaire, permettant l'efflux actif de sodium hors de la cellule, en échange d'ions potassium (K<sup>+</sup>). Le déséquilibre des charges créé par cette activité enzymatique induit une différence de potentiel membranaire favorisant l'absorption continue de Na<sup>+</sup> à la surface apicale des cellules par le canal ENaC. Au niveau de l'épithélium respiratoire, le transport transépithélial du Na<sup>+</sup>, en créant un gradient osmotique de part et d'autre des membranes des cellules, est le moteur permettant la réabsorption du liquide de surface.

#### (3) Le transport de potassium

Le rôle des canaux potassiques est relativement peu étudié mais commence à se développer. Les canaux potassiques sont regroupés en 3 classes en fonction du nombre de segments transmembranaires (STM) qu'ils possèdent : les canaux à 6 STM (regroupant les canaux voltage-dépendant et les canaux activés par le calcium), les canaux à 4 STM et 2 pores et les canaux à 2 STM. 30 à 40 types de canaux K<sup>+</sup> ont été mis en évidence, situés majoritairement au niveau de la membrane basolatérale mais aussi sur la face apicale des cellules de l'épithélium pulmonaire des fosses nasales aux alvéoles.

De manière générale, les canaux potassiques au sein d'épithélia, sont capables de contrôler le potentiel de membrane et de créer un gradient électrochimique favorisant le transport transépithélial des ions Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup>, et de liquide (Urbach *et al.,* 1996). Le canal KvLQT1 (canal à 6 STM, voltage-dépendant) serait activé par l'AMPc et participerait de façon majoritaire au courant potassique basolatéral mesuré en Chambre de Ussing. De plus, le canal KvLQT1 en association avec le canal KATP (ATP-dependent K(+) channel) stimulés par l'activation autocrine du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) semblent impliqués dans le processus de réparation de l'épithélium alvéolaire (Trinh *et al.,* 2007).

#### (4) Autres transporteurs

Quelques autres systèmes de transports d'ions ont été identifiés tels que le cotransporteur  $Na^+/K^+/2Cl^-$  ou l'échangeur cationique  $Na^+/H^+$ . Situé sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires, le cotransporteur  $Na^+/K^+/2Cl^-$  permet de faire entrer des ions chlorures dans la cellule malgré un gradient électrochimique défavorable, afin qu'ils soient excrétés au pôle apical (O'Grady *et al.,* 1987). Il est impliqué, notamment, dans la régulation du volume cellulaire (Haas et Forbush, 2000).

L'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE), également présent à la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires (Paradiso, 1992), permet la régulation et le maintien d'un pH stable. Electroneutre (entrée d'un Na<sup>+</sup> / sortie d'un H<sup>+</sup>), tout comme le cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>, cet échangeur va être activé par une production cellulaire de protons (Harvey et Ehrenfeld, 1988) et inhibé par l'absence de Na<sup>+</sup> extracellulaire ainsi que par l'amiloride (Paris et Pouysségur, 1983).

#### (5) Récapitulation des transports transépithéliaux

Au niveau de l'épithélium des voies aériennes humaines, l'absorption active de Na<sup>+</sup> par le canal ENaC du pôle apical, entraîne une absorption passive de Cl<sup>-</sup> et d'eau (Boucher, 1994a ; Boucher, 1994b). Au niveau du pôle basolatéral, le Na<sup>+</sup> cytosolique est ensuite libéré de la cellule par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase en provoquant une accumulation d'ions K<sup>+</sup> dans le cytoplasme entretenant une différence de potentiel, et réalisant ainsi un gradient électrochimique qui va faciliter l'efflux de K<sup>+</sup> vers l'extérieur de la cellule. Selon leur gradient électrochimique, les ions Cl<sup>-</sup> vont passer par des voies paracellulaires pour garantir l'électroneutralité du système en entrainant également une absorption d'eau (Tarran *et al.,* 2001). La sécrétion des ions Cl<sup>-</sup> par leurs canaux situés à la membrane apicale comme le CFTR ou les CaCC peut également être observée selon un gradient électrochimique entretenu par différents transporteurs de Cl<sup>-</sup> de la membrane basolatérale (cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>).

L'équilibre entre l'absorption de sodium et la sécrétion de chlore permet de contrôler les mouvements d'eau à travers l'épithélium, et contribue à une bonne hydratation des voies aériennes ainsi qu'à une clairance mucociliaire de qualité.

## d) Peptides de défense anti-microbiens et cellules immunitaires

#### (1) Peptides à activité anti-microbienne

La période de clairance des pathogènes par le transport mucociliaire peut prendre quelques heures. Dans ces conditions, les bactéries vont proliférer à la surface des voies aériennes. Cela implique que ce mécanisme seul n'est pas assez efficace pour protéger l'épithélium de toute infection (Knowles et Boucher, 2002). Des substances antimicrobiennes endogènes à large spectre, impliquées dans la défense innée constitutive de l'épithélium (Ganz, 2002), et sécrétées dans le liquide de surface majoritairement par les glandes de la sous-muqueuse (Kaliner, 1991), suppriment la croissance bactérienne durant cette période de clairance. Le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire contient des molécules telles que la transferrine, le lysozyme et le SLPI (secretory leukoproteinase inhibitor), substances anti-microbiennes majeures, ainsi que des défensines et le LL-37 (cathélicidine humaine) en quantités moins importantes (Hiemstra, 2001; Schutte et McCray, 2002).

Le lysozyme, protéine de 15 kDa, est capable de dégrader les peptidoglycanes des parois bactériennes. Cette enzyme est sécrétée majoritairement par les cellules séreuses des glandes de la sous-muqueuse, l'épithélium de surface, ainsi que les macrophages alvéolaires (Konstan *et al.*, 1982).

La transferrine, glycoprotéine de 80 kDa, présente une forte affinité pour le fer. De ce fait, elle possède une capacité bactéricide indirecte, le fer étant un facteur de croissance essentiel au cycle de développement des bactéries. La transferrine est retrouvée au niveau des granules des neutrophiles et sécrétée par les cellules épithéliales séreuses (Bowes *et al.*, 1981).

Le SLPI est une protéine non glycosylée de 12 kDa sécrétée par les cellules séreuses des glandes trachéo-bronchiques (Franken *et al.,* 1980; Lee *et al.,* 1993) ainsi que par les cellules de Clara (Willems *et al.,* 1989). Le SLPI a pour fonction d'inhiber l'élastase neutrophile, en plus de son activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif et négatif.

Les défensines, de 3 à 5 kDa, sont des petits peptides antimicrobiens caractérisés par leur repliement tridimensionnel grâce à six cystéines formant des ponts disulfures. Les défensines forment deux sous-groupes : les défensines  $\alpha$  et  $\beta$ , possèdent un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais aussi contre les champignons et les virus (Koczulla et Bals, 2003). Chez l'homme, les défensines  $\alpha$  vont être présentes dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles. Les  $\beta$ -défensines humaines sont exprimées spécifiquement, au sein des voies aériennes, par les cellules épithéliales (Lehrer et Ganz, 2002), et vont être sécrétées au niveau du liquide de surface bordant le tractus respiratoire (Laube *et al.,* 2006). Enfin, le LL-37 est observé au niveau des granules du neutrophile, des monocytes et des lymphocytes T (Agerberth *et al.*, 2000), ainsi qu'au niveau des cellules de l'épithélium de surface trachéal et des glandes (Bals *et al.*, 1998). Il présente un spectre d'activité antibactérien similaire aux défensines.

#### (2) Défense immunitaire

Afin d'éliminer les nombreux pathogènes, deux types de réponses immunitaires participent à la protection du poumon : les défenses immunitaires innées et acquises. L'immunité innée intervient en tant que première ligne de défense, en induisant une réaction inflammatoire (dès les premières heures suivant l'infection) par les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques ou les polynucléaires neutrophiles (PNN), capables de phagocyter les agents infectieux. Elle intervient également via leurs récepteurs PRRs (Pattern-Recognition Receptors) reconnaissant, sur la paroi des pathogènes, des motifs PAMPs (Pathogens-Associated Molecular Patterns).

Les macrophages, en faible nombre au sein de la lumière respiratoire ou le long des voies aériennes, sont présents majoritairement au niveau des alvéoles. Ces cellules possèdent des fonctions phagocytaires mais également sécrétoires importantes. Elles initient les réponses inflammatoires et immunitaires. Le macrophage alvéolaire est activé au contact des pathogènes, et produit des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), l'IL1- $\beta$  ou l'IL- $\beta$  (IL pour interleukine) ou les chimiokines (notamment l'IL8) à l'origine du recrutement d'autres cellules immunitaires telles que les PNN ou les monocytes/macrophages circulants (Takabayshi *et al.,* 2006).

Les cellules dendritiques ont un rôle présentateur d'antigènes et activent les cellules immunitaires effectrices localisées au niveau de l'épithélium respiratoire (Jahnsen *et al.,* 2006).

Enfin, les PNN sont essentiels à la réponse immunitaire envers les pathogènes (Sibille et Reynolds, 1990). Issus du sang circulant, les PNN peuvent migrer dans les tissus infectés en réponse à la production locale de facteurs chimiotactiques (Nelson *et al.,* 1995).

## **B. CELLULES SOUCHES**

### 1. Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules immatures, définies par deux propriétés spécifiques : leur capacité d'autorenouvellement et leur degré de plasticité (Smith, 2006). En effet, une cellule souche a la capacité de se diviser indéfiniment et à l'identique, pour donner deux cellules « filles » (autorenouvellement), permettant de maintenir en permanence un pool de cellules souches, rapidement mobilisable en cas d'atteintes tissulaires (Smith, 2006). Par division asymétrique, les cellules souches vont donner une cellule souche « fille », ainsi qu'une cellule progénitrice ou cellule d'amplification transitoire, qui va initier un programme de différenciation (Lajtha, 1979). La cellule progénitrice présente une forte capacité de prolifération mais qui reste limitée dans le temps. Elle sera à l'origine des cellules matures et fonctionnelles spécifiques d'un tissu donné (Smith, 2006). Ainsi, après la simple division d'une cellule souche, les deux cellules qui en résultent, vont présenter des propriétés de prolifération et de différenciation différentes, soit par ségrégation de facteurs intrinsèques différents après la séparation cellulaire, soit de par la position de ces cellules dans des microenvironnements distincts appelés niches.

Les cellules souches sont indispensables, au maintien des tissus en assurant le renouvellement des cellules composant ceux-ci (homéostasie) et à la régénération tissulaire après lésion.

# 2. Classification des cellules souches selon leur potentiel de différenciation

Quatre types de cellules souches ont été mis en évidence, selon leur capacité de différenciation. On distingue les cellules souches totipotentes, les cellules souches pluripotentes, les cellules souches multipotentes et les cellules souches unipotentes (Smith, 2006) (Figure 11).



Figure 11: Schéma récapitulant les différents types de cellules souches.

Les cellules souches totipotentes sont les cellules d'un œuf fécondé ou zygote après ses premières divisions, au stade morula 2 à 8 cellules. Ces cellules souches totipotentes, également appelées blastomères, vont être à l'origine, après division de l'ensemble des cellules composant un organisme dans son entier, c'est-à-dire des cellules des trois feuillets embryonnaires qui sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, mais également des cellules des annexes embryonnaires telles que le placenta.

Les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste (embryon de 5 à 7 jours) sont des cellules souches pluripotentes. De ces cellules dérivent les cellules souches embryonnaires (CSE). Elles sont incapables de produire un organisme dans son entier, car elles ne peuvent générer les annexes, et notamment le placenta, développées à partir du trophectoderme (couche cellulaire externe de l'embryon). Cependant, elles peuvent former tous les tissus d'un corps humain en générant les trois feuillets embryonnaires. De récentes études ont mis en évidence la possibilité de reprogrammation de cellules somatiques tissulaires en cellules à capacité de différenciation pluripotentes induites (iPS) par la surexpression de certains facteurs de transcription.

Les cellules souches multipotentes regroupent les cellules souches tissulaires, ou somatiques du fœtus à l'adulte. Toujours capable de s'autorenouveler, ce type de cellules souches présente un potentiel de différenciation plus limité en s'engageant dans une voie de différenciation tissulaire, à l'origine des différentes populations cellulaires composant un tissu. Les cellules souches multipotentes sont des évènements rares et sont impliquées dans l'homéostasie tissulaire. Chez l'adulte, les cellules souches les plus étudiées sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH) originaires de la moelle osseuse, à l'origine du maintien et du renouvellement de toutes les cellules sanguines ou mésenchymateuses engendrant les futures cellules musculaires, adipeuses ou cartilagineuses.

Enfin, les cellules souches unipotentes ne donnent naissance qu'à un seul type de cellules différenciées identiques (Figure 12).





### 3. Les différentes cellules souches

#### a) Les cellules souches embryonnaires

#### (1) Généralités

Historiquement, le concept de cellules souches embryonnaires est apparu suite à l'étude de tératocarcinomes murins, tumeurs présentant une juxtaposition désorganisée de multiples tissus somatiques (Martin, 1980). Les teratocarcinomes pouvaient également être induits par la greffe de blastocystes au niveau de sites ectopiques dans des souris immunodéficientes. Plutôt que de dériver des lignées de cellules pluripotentes tumorales à l'origine de ces tumeurs, quelques équipes, de manière indépendante à partir de 1981, ont dérivé des lignées de cellules souches embryonnaires (CSE) *in vitro* (Martin, 1981; Evans et Kaufman, 1981), et ont établi des conditions de culture appropriées pour ces cellules. Issues de la masse cellulaire interne du blastocyste, les CSE sont pluripotentes, présentant une capacité d'autorenouvellement illimitée *in vitro* à l'état indifférencié. Dans les conditions optimales de culture, les CSE sont capables de générer les différents types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, à l'origine de chacun des tissus d'un organisme adulte (Pera *et al.,* 2000).

Les CSE humaines dérivent d'embryons préimplantatoires surnuméraires au stade de blastocyste, issus de programmes de fécondation *in vitro* (FIV) (Trounson, 2001). Les CSE humaines pluripotentes ont été obtenues en culture pour la première fois en 1998. Ces cellules montraient une capacité de prolifération stable (autorenouvellement) sur une période importante impliquant la voie de signalisation Wnt (Sato *et al.*, 2004), et présentaient une activité de la télomérase (Thomson *et al.*, 1998). Les CSE humaines sont caractérisées par l'expression de marqueurs impliqués dans la pluripotentialité tels que les facteurs de transcription Oct4, Nanog, Sox2, Foxd3, Rex1..., le récepteur du TDGF1 ou le facteur de croissance GDF3 par exemple (Pera et Trounson, 2004). Les CSE humaines peuvent également être caractérisées par l'expression de l'alkaline phosphatase, ou l'activité de la télomérase, en plus des marqueurs spécifiques tels que SSEA-3 et 4 (stage-specific embryonic antigens 3 and 4), Tra-1–60, Tra-1–81 ou le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (MHC-1)... (Stojkovic *et al.*, 2004). Les CSE humaines présentent un grand intérêt

dans le cadre de leur utilisation potentielle en médecine régénérative, de par leur capacité de différenciation pluripotente. Cependant, leur utilisation thérapeutique pose plusieurs problèmes : 1) d'ordre éthique (utilisation d'embryons humains) ; 2) de par leur fort potentiel mitogène et tumorigène, le risque de générer des tumeurs après leur greffe est important ; 3) la possibilité d'un rejet de ces cellules après transplantation n'est pas écarté.

#### (2) CSE et épithélium respiratoire

Les CSE murines sont capables de se différencier, *in vitro*, en cellules alvéolaires, présentant une apparence morphologique de PN II et une expression du SP-C (Denham *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que dans des conditions de culture en interface airliquide, les CSE murines ont la capacité de générer un épithélium fonctionnel, composé de cellules basales, ciliées, intermédiaires et de Clara, similaire à un épithélium trachéobronchique murin natif (Coraux *et al.*, 2005).

Les CSE humaines ont également montré leur capacité de différenciation *in vitro*, en PN II exprimant la protéine du surfactant C avec, en outre, des caractéristiques ultrastructurales de PN II (Samadikuchaksaraei *et al.*, 2006). Cependant, l'efficacité de différenciation reste faible de l'ordre de 2 % de la population totale. Enfin, une étude récente menée en 2009, a montré la capacité des CSE humaines à générer un tissu épithélial pulmonaire *in vitro*, dans des conditions de culture en interface air-liquide favorisant la différenciation de PN I, PN II, cellules de Clara et cellules ciliées (Van Haute *et al.*, 2009).

#### a) iPS (Induced pluripotent stem-cells)

De très récentes études, réalisées depuis 2006, ont montré qu'il était désormais possible de générer des cellules souches pluripotentes, semblables aux CSE, par la reprogrammation génétique de cellules somatiques provenant de différentes espèces. Ce procédé permettrait de générer des cellules pluripotentes directement à partir des propres cellules d'un patient, pour la réparation de ses tissus endommagés, mais également de produire *in vitro*, un répertoire de tissus normaux et pathologiques permettant d'étudier les caractéristiques physiologiques et biologiques des maladies (Park *et al.*, 2008).

La première étude réalisée en 2006, a démontré que l'introduction dans des cellules somatiques des quatre facteurs Oct3/4 (Pou5f1) et Sox2, identifiés dans le maintien de la pluripotence des CSE (Nichols et al., 1998; Avilion et al., 2003), ainsi que c-Myc et Klf4, gènes surexprimés dans de nombreux cas de tumeurs et contribuant à l'autorenouvellement et à la capacité de prolifération rapide des CSE (Li et al., 2005 ; Cartwright et al., 2005), permettait de les reprogrammer en cellules souches pluripotentes induites. Ces cellules, générées à partir de cellules embryonnaires murines ou fibroblastiques adultes, ont été nommées iPS (induced pluripotent stem cells), et présentent les propriétés morphologiques, de prolifération, et d'expression de gènes marqueurs des CSE (Takahashi et Yamanaka, 2006). De nombreuses études ont ensuite montré la capacité de reprogrammation de plusieurs types de cellules somatiques, provenant de différentes espèces et notamment l'Homme. Le processus de reprogrammation nécessite la transduction rétrovirale d'au moins trois des gènes précédemment cités : Oct3/4, Sox2 et Klf4, associée à la suppression de l'activité de p53, obstacle à l'obtention des iPS (Hong *et al.,* 2009). En 2009, une équipe a mis en évidence la potentialité de reprogrammation cellulaire médiée par des protéines recombinantes (les protéines Oct 4, Sox2, Klf4 et c-Myc purifiées, associées à des tags poly-Arginine) pénétrant dans les cellules via la séquence poly-Arginine. Les cellules souches pluripotentes induites par des protéines (piPS) ainsi obtenues à partir de cellules fibroblastiques embryonnaires de souris, présentent une capacité d'autorenouvellement à long terme, ainsi qu'un potentiel de différenciation pluripotent in vitro et in vivo (Zhou et al., 2009) (Figure 13).

Les premiers clones de iPS humaines ont été générés, en parallèle par deux équipes, par transduction de fibroblastes adultes avec deux séries de quatre vecteurs rétroviraux exprimant des facteurs de transcription reprogrammants, Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu *et al.*, 2007) et Oct4, Klf4, Sox2 et c-Myc. Dans cette dernière étude, les iPS humaines obtenues à partir de fibroblastes dermiques sont comparables à des CSE humaines, en termes de morphologie, de prolifération, d'expression d'antigènes de surface ou d'activité de la télomérase (Takahashi *et al.*, 2007). Une étude menée par Huangfu en 2008, a mis en évidence que l'utilisation de facteurs chimiques capables de moduler le statut épigénétique des cellules, tels que l'acide valproïque (inhibiteur des histones desacétylases), permettait la reprogrammation de fibroblastes humains en iPS, avec seulement deux facteurs de transcriptions Oct4 et Sox2 (Huangfu *et al.*, 2008).



Figure 13: Principales stratégies d'obtention des cellules souches pluripotentes induites (iPS). Après l'isolement des cellules humaines (ex: fibroblastes dermiques), les cellules sont amplifiées *in vitro*. L'introduction de facteurs reprogrammants, par transfection, est réalisée à l'aide de vecteurs viraux présentant des combinaisons variées de gènes associés à la pluripotencialité. La sélection puis la propagation des cellules reprogrammées sont nécessaires pour générer des iPS. Les méthodes établies pour la génération des iPS murines et partiellement pour générer des iPS humaines sont indiquées en vert, incluant des stratégies de réduction du nombre de vecteurs viraux reprogrammants, et/ou l'amélioration de l'efficacité de reprogrammation par de petites molécules (ex : Acide valproïque, ...). Une autre méthodologie potentielle d'obtention de cellules reprogrammées (en bleu) se développe, à partir des protéines reprogrammantes (piPS, protein-induced pluripotent stem cells) (d'après Rolletschek et Wobus, 2009).

Cependant, ces études bien que très prometteuses et en plein essor, nécessitent encore de nombreuses avancées avant une utilisation thérapeutique potentielle. Notamment, il est indispensable de déterminer avec précision, le mécanisme de reprogrammation cellulaire par les différents facteurs, et d'éliminer les rétrovirus dans ces procédures. De plus, les iPS comme les CSE humaines, de par leur nature, nécessitent pour leur utilisation en thérapeutique, d'éliminer les risques *in vivo* de formations de tératomes (Rolletschek et Wobus, 2009).

#### a) Cellules souches adultes ou somatiques

Malgré leur importante plasticité, les CSE, ainsi que les iPS sont très délicates à utiliser, d'une part d'un point de vue éthique, et d'autre part du fait de leur pouvoir tumorigène et immunogène. Les études cliniques utilisant la greffe de cellules souches adultes sont de plus en plus fréquentes. Bien que leur capacité de différenciation soit plus restreinte que les CSE, les cellules souches adultes présentent l'avantage de pouvoir être isolées du patient luimême (greffe autologue) pour une utilisation dans le cadre de thérapies cellulaires.

#### (1) Généralités

Les cellules souches adultes sont des évènements rares, localisées généralement au sein d'un microenvironnement confiné appelé niche maintenant ces cellules dans un état quiescent (Fuchs *et al.*, 2004). Les cellules souches adultes sont capables de s'autorenouveler tout au long de la vie mais également de se différencier pour permettre le maintien de l'intégrité physiologique des tissus. De plus, il est difficile de mettre en place des méthodes de culture pour étudier le comportement des cellules souches isolées. L'absence de marqueurs moléculaires bien définis et caractérisés est un frein à leur étude mais reste une condition requise pour leur isolement et leur caractérisation phénotypique et moléculaire.

Différents marqueurs de cellules souches ont cependant pu être identifiés et référencés sur ce site : <u>http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixE.asp</u>. A partir de modèles animaux, différents types de cellules souches adultes ont été identifiés, en s'appuyant sur leur propriété de division lente (autorenouvellement) tout au long de la vie d'un organisme. En effet, l'incorporation de précurseurs nucléotidiques traçables (bromodésoxyuridine (BrdU), ou H<sup>3</sup>-Thymidine) au niveau des cellules en phase S du cycle cellulaire à l'intérieur des tissus, a permis de situer les cellules souches dans leurs niches respectives, et de les distinguer de leur descendance (Whikehart *et al.,* 2005). A l'état

d'équilibre, les cellules d'amplification transitoire, dérivant des cellules souches et présentant un fort pouvoir prolifératif mais à court terme, incorporeront et élimineront très rapidement le BrdU ou la H<sup>3</sup>-Thymidine. Cependant à long terme, seules les cellules souches se divisant lentement resteront marquées. Cette technique met ainsi en évidence les LRC (Label Retaining Cells) correspondant aux cellules souches adultes, au sein de leur microenvironnement spécifique *in vivo*.

La propriété d'efflux du Hoechst 33342 a également été utilisée en tant que stratégie commune d'identification et de purification des cellules souches potentielles de différents tissus, en absence de véritables marqueurs de surface cellulaire. La Side Population, ainsi identifiée peut-être isolée par cytométrie en flux sur la base de cette capacité d'efflux via la glycoprotéine transmembranaire Bcrp1. La première Side Population a été isolée à partir des cellules de la moelle osseuse murine (Goodell *et al.*, 1996). Cette population a ensuite été mise en évidence au niveau de tissus solides tels que le foie, le cœur (Challen et Little, 2006) ou l'épithélium pulmonaire murin (Summer *et al.*, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2007). Cette capacité à effluer le hoechst, ainsi que l'expression de la Bcrp1 (ABCG2 chez l'homme) pourrait représenter un marqueur commun à différentes cellules souches tissulaires (Zhou *et al.*, 2001).

Ainsi, des cellules souches adultes ont pu être mises en évidence dans plusieurs organes ou tissus chez l'homme : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et mésenchymateuses (CSM), les cellules souches neurales, épidermiques ou intestinales (tableau 1). Des cellules souches adultes ont également été identifiées au niveau du pancréas (Ramiya *et al.,* 2000), de la cornée et de la rétine (Tropepe *et al.,* 2000; Yoshida *et al.,* 2006), des glandes mammaires (Dontu *et al.,* 2003), de la pulpe dentaire (Gronthos *et al.,* 2000), du tissu adipeux (Zuk *et al.,* 2001), etc ...

Cellules souches	Localisation	Types de cellules qui	Références
adultes humaines		en derivent	
CSH	Moelle osseuse	Cellules sanguines	(Petersen <i>et al.,</i> 1999;
		Endothéliales	Gussoni <i>et al.,</i> 1999;
		Hépatiques	Lansdorp, 1995;
		Musculaires	Fukushima et Ohkawa,
			1995)
CS Neurales	Cerveau	Neurones	(McKay, 1997;
		Astrocytes	Bjornson <i>et al.,</i> 1999;
		Oligodendrocytes	Murphy <i>et al.,</i> 1997;
		Cellules sanguines	Armstrong et
			Svendsen, 2000)
Cellules souches	Intestinales et	Toutes les cellules	(van Dorp <i>et al.,</i> 1999;
épithéliales	épidermiques	dans les cryptes	Lowell <i>et al.,</i> 2000;
-		intestinales. Toutes les	Wright, 2000; Bach et
		cellules des couches	al., 2000)
		épidermiques	
CSM	Moelle osseuse	Os	(Prockop, 1997;
		Cartilage	Kuznetsov <i>et al.,</i> 1997;
		Tendon	Kopen <i>et al.,</i> 1999;
		Tissu adipeux	Caplan, 1994)
		Muscle	
		Cellules neuronales	
		Cellules stromales	

Tableau 1 : Les cellules souches adultes décrites dans l'organisme humain (Minguell *et al.,*2001).

### (2) Hiérarchie des cellules souches adultes

Deux types de tissus sont à distinguer chez l'homme, caractérisés par le temps nécessaire à leur renouvellement complet. Il existe des tissus à renouvellement rapides, tels que le tissu sanguin ainsi que quelques épithélia (épiderme ou intestinal). Ces tissus, soumis à de fortes contraintes, sont renouvelés en permanence, mettant en évidence la présence et l'implication de cellules souches « actives », à l'origine du renouvellement de l'ensemble des cellules résidentes tissulaires. D'autre part, les tissus à renouvellement lents, comme le foie, les muscles ou l'épithélium bordant les voies aériennes et alvéolaires, présentent des cellules souches « quiescentes », activables à la suite d'une déplétion du pool de cellules progénitrices. La hiérarchie « classique » des cellules souches adultes a été établie à partir de la description du compartiment cellulaire prolifératif de tissus présentant un taux de renouvellement important et permanent, tels que l'épithélium intestinal (Marshman *et al.,* 2002 ; van der Flier et Clevers, 2009), la peau, le follicule pileux ou le compartiment hématopoïétique de la moelle osseuse (Morrison *et al.,* 1995). Dans cette hiérarchie, les cellules souches adultes vont être définies suivant leur fréquence de prolifération ou leur potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces cellules souches se divisent symétriquement pour assurer le maintien du pool de cellules souches tissulaires, mais peuvent également se diviser de manière asymétrique, pour produire une nouvelle cellule souche, ainsi qu'une cellule progénitrice présentant une capacité prolifération. Les cellules progénitrices génèrent ensuite des cellules différenciées spécifiques des tissus.

A la différence des tissus à renouvellement rapide, l'épithélium pulmonaire adulte, bien que constamment soumis aux stress d'aérocontaminants contenus dans l'air, présente un taux de renouvellement lent à l'état normal, évalué à plus de 100 jours au niveau de l'épithélium trachéo-bronchique murin adulte (Blenkinsopp, 1967) (1 % des cellules épithéliales bronchiolaires murines sont en phase S sur une période de 24 heures (Reynolds et al., 2000). La hiérarchie classique des cellules souches telle qu'elle est décrite n'est donc pas simple à mettre en évidence au sein de l'épithélium des voies aériennes et alvéolaires. Quelques protocoles expérimentaux ont été développés chez la souris, dans le but de mimer les lésions à l'origine du mécanisme de réparation de l'épithélium pulmonaire. L'étude du processus de régénération tissulaire a permis d'identifier différentes populations cellulaires capables de proliférer en réponse à ces lésions à tous les étages des voies aériennes et alvéolaires, et capables de régénérer un épithélium mature différencié (Rawlins et Hogan, 2006). Ces cellules constituent un large pool de cellules progénitrices dites facultatives montrant des propriétés de cellules différenciées et fonctionnelles à l'état normal, mais capables d'être activées et de proliférer pour assurer l'homéostasie tissulaire, ainsi que la régénération épithéliale après une lésion (Rawlins et Hogan, 2006; Stripp et Reynolds, 2008). Les épithélia pulmonaires et notamment l'épithélium bronchiolaire (très étudié chez l'animal), font donc partie des tissus présentant une hiérarchie des cellules souches non classique.

## (3) Cellules souches/progénitrices de l'épithélium respiratoire

Durant le processus de développement pulmonaire, l'épithélium bordant les voies respiratoires et de conduction, de l'épithélium trachéo-bronchique aux alvéoles, va établir différentes zones anatomiques fonctionnelles distinctes. Ces zones vont être caractérisées par une composition cellulaire épithéliale unique évoluant tout au long du tractus pulmonaire, ainsi que par un répertoire de cellules souches adultes quiescentes à l'état normal, douées de capacités d'autorenouvellement illimité et de cellules progénitrices facultatives locales à l'origine de l'ensemble des populations cellulaires composant l'épithélium, permettant l'homéostasie tissulaire.

## (a) Différences structurales et histologiques pulmonaires inter-espèces

Jusqu'à présent, les travaux menés sur l'identification des cellules souches ou progénitrices de l'épithélium respiratoire ont principalement été réalisés à partir de modèles d'études *in vivo*, chez la souris, tant au cours de l'homéostasie tissulaire, que dans le cadre du processus de régénération épithéliale induit suite à une lésion. Les cellules souches vont être typiquement observées dans des compartiments spécialisés (niches), à proximité de leur descendance cellulaire. Cependant, il existe des différences histologiques entre les voies aériennes humaines et murines (Liu et Engelhardt, 2008), rendant l'identification des cellules souches souches adultes humaines difficile (Jeffery, 1983).

Chez la souris, les cellules basales sont restreintes à l'épithélium trachéal, le nombre des cellules ciliées diminue tout au long des voies aériennes et les cellules de Clara sont particulièrement abondantes au niveau des voies aériennes surtout bronchiolaires (Pack *et al.,* 1981). L'épithélium trachéo-bronchique humain normal quant à lui est un épithélium pseudostratifié composé en majorité de cellules basales, ciliées et caliciformes, évoluant en un épithélium bronchiolaire cylindrique, composé de quelques cellules basales mais également de cellules ciliées, caliciformes et non ciliées sécrétoires de Clara (Boers *et al.,* 1998; Boers *et al.,* 1999) (Figure 14).



Rock J R et al. Dis. Model. Mech. 2010;3:545-556

Figure 14: Comparaison schématique de la structure et de l'organisation épithéliale des poumons humains et murins (A gauche : le poumon murin, à droite : le poumon humain) (Rock *et al.,* 2010).

#### (b) Cellules souches endogènes

Les cellules souches endogènes sont les cellules résidant au sein des épithélia trachéobronchique, bronchiolaire et alvéolaire. En 1995, Zepeda et son équipe, ont identifié en utilisant un modèle de xénogreffe trachéale chez la souris, une population parmi les cellules épithéliales bronchiques humaines, présentant des propriétés de cellules souches (autorenouvellement important et capacité de différenciation multipotente) sans l'identifier morphologiquement (Zepeda *et al.,* 1995), cette population étant capable de générer un réseau de glandes respiratoires (Engelhardt *et al.,* 1995). Tout au long de l'épithélium respiratoire, différentes populations cellulaires présentant un potentiel souche/progéniteur ont été décrites : les cellules basales des canaux glandulaires, les cellules basales de l'épithélium de surface trachéo-bronchique, les cellules de Clara variantes associées aux NEB dans l'épithélium bronchiolaire, les cellules souches bronchiolo-alvéolaires (BASC) au niveau des jonctions bronchiolo-alvéolaires (BADJ : Bronchio-Alveolar Duct Junction), les PN II au sein de l'épithélium alvéolaire, ainsi que la Side Population pulmonaire (Figure 15).



Figure 15: Représentation schématique des voies de conduction et respiratoires, montrant les différentes niches de cellules souches pulmonaires établies chez la souris (Liu et Engelhardt, 2008).

- > Cellules basales bordant les canaux des glandes de la sous-muqueuse.
- Cellules basales de l'épithélium trachéo-bronchique de surface dans les zones cartilages-intercartilage.
- > Cellules de Clara variantes dans les NEB.
- > BASC au niveau des jonctions bronchio-alvéolaires (BADJ).
- > Pneumocytes de type II dans les alvéoles.

#### (i) Cellules souches/progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique

Dans la littérature, quelques études ont suggéré qu'à la fois, les cellules basales et les cellules sécrétoires (cellules de Clara) murines ou de lapin purifiées par cytométrie en flux ou par élutriation, étaient capables de se dédifférencier en un phénotype similaire « peu différencié » hautement prolifératif, puis de se redifférencier, de proliférer et de régénérer un épithélium mucociliaire complet dans des modèles de xénogreffes trachéales (Liu *et al.,* 1994 ; Randell *et al.,* 1991 ; Nettesheim *et al.,* 1990). D'autres études ont montré que seules les cellules basales trachéales murines ou de lapins peuvent être considérées comme des cellules progénitrices (Ford et Terzaghi-Howe, 1992 ; Inayama *et al.,* 1988), ou que seules les cellules sécrétoires purifiées, régénérant un épithélium composé de cellules basales, ciliées et sécrétoires, représentaient le compartiment des cellules progénitrices majeures, comparées aux cellules basales présentant un stade de différenciation plus avancé (Johnson et Hubbs, 1990).

#### (a) Les cellules sécrétoires

Quelques travaux ont mis en évidence le rôle potentiel des cellules de Clara murines, en tant que cellules progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique (Hong *et al.,* 2001; Stripp, 2008; Reynolds et Malkinson, 2010). Au sein de la trachée, il a été bien établit qu'après une déplétion des cellules de Clara, les cellules basales ont montré leur rôle de cellules progénitrices/souches (Hong *et al.,* 2004b). Cependant, dans le cadre d'une lésion des cellules ciliées au NO<sub>2</sub>, il a été montré que seules les cellules de Clara se divisaient (Evans *et al.,* 1986).

Dans le but d'évaluer la contribution des cellules de Clara Scgb1a1<sup>+</sup> (Secretoglobine 1a1 ou CC10 ou CCSP) au cours du processus d'homéostasie tissulaire ou de réparation de l'épithélium trachéal, des souris transgéniques ont été réalisées permettant le traçage génétique des cellules de Clara. Au cours du développement postnatal ou suite à une lésion par le SO<sub>2</sub>, les cellules de Clara peuvent générer des cellules ciliées. Cependant, bien qu'elles présentent naturellement une capacité de prolifération limitée, ces cellules sont capables de contribuer à la réparation de l'épithélium trachéal murin suite à une lésion, en augmentant leur capacité de prolifération. Ces observations suggèrent que les cellules de Clara représentent des cellules d'amplification transitoires dérivant des cellules souches basales Scgb1a1<sup>-</sup> (Rawlins *et al.,* 2009).

#### (b) Les cellules basales

Il semble désormais bien établi que les cellules basales assurent le rôle de cellules souches/progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique (Snyder *et al.,* 2009). Différentes niches de cellules souches ont été identifiées au sein des voies aériennes trachéo-bronchiques murines : les cellules basales bordant les canaux des glandes de la sous-muqueuse au niveau de la trachée proximale, et les cellules basales de l'épithélium de surface de la trachée inférieure dans les zones cartilage-intercartilage.

La première mise en évidence de cellules souches dans leurs niches potentielles, au sein des voies trachéo-bronchiques murines, a été réalisée par les travaux Borthwick *et al.* en 2001. Après une instillation de détergent (Polydocanol) ou de gaz toxique (SO<sub>2</sub>), responsables de la desquamation totale de l'épithélium de surface de la trachée, suivie d'une injection de BrdU, *in vivo*, les auteurs ont mis en évidence la régénération complète d'un épithélium trachéal pseudo-stratifié différencié. De plus, une sous-population de cellules basales, localisée au sein des canaux des glandes de la sous-muqueuse trachéale supérieure exprimant fortement les cytokératines 5, 14 et 18, et au niveau de l'épithélium trachéal de surface dans les zones cartilage-intercartilage, retient à long terme (supérieur à 95 jours après la lésion) le marquage au BrdU. Cette capacité à retenir le BrdU est une caractéristique des cellules souches se divisant lentement de manière illimitée. Ces cellules sont nommées « label-retaining cells » (LRC) (Borthwick *et al.*, 2001).

De plus, à partir de souris transgéniques exprimant la protéine EGFP sous le contrôle du promoteur de la cytokératine 5 (CK5), il a été démontré que les cellules basales trachéales CK5-GFP<sup>+</sup> présentaient une croissance clonale importante *in vitro*, et étaient localisées *in vivo* dans les niches de LRC décrites par Borthwick *et al.* (Schoch *et al.*, 2004).

Enfin, après une ablation des cellules de Clara par une exposition au Naphtalène, il a été mis en évidence, au sein de l'épithélium lésé, une induction rapide de l'expression de la Cytokératine 14 (CK14) au sein des cellules basales, associée à une hyperplasie de ces mêmes cellules, suivie au bout de 6 jours, d'une réapparition des cellules sécrétoires, suggérant une capacité de différenciation multipotente des cellules basales. En outre, grâce à des souris exprimant la  $\beta$ -Galactosidase sous le contrôle du promoteur de la CK14, la présence, au sein des cellules basales trachéales, d'une sous-population de cellules souches unipotentes mais aussi d'une sous-population de cellules souches multipotentes capables de restaurer des cellules ciliées et des cellules sécrétoires a pu être démontrée (Hong *et al.,* 2004b).

Chez l'homme, au sein des voies aériennes mucoviscidosiques présentant une régénération intense, une étude a identifié que le compartiment épithélial prolifératif caractérisé par l'expression du Ki67, exprimait également les marqueurs spécifiques des cellules basales (CK5, CK14 et Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R)) (Voynow *et al.,* 2005).

De plus, Hicks et son équipe, ont mis en évidence la possibilité d'isoler, par cytométrie en flux, les cellules basales de l'ensemble des cellules épithéliales des voies aériennes humaines supérieures, sur la base de leur expression de la Griffonia simplicifolia isolectin B4 (GSI-B4). Bien que la pureté soit faible, les cellules basales isolées ont proliféré, devenant confluentes en 7 jours sur des membranes recouvertes de collagène de type I (Hicks *et al.,* 1997).

Depuis, quelques études ont montré le potentiel progéniteur des cellules basales des voies trachéo-bronchiques humaines fœtales ou adultes. Dans ces études, des méthodes de purification des cellules basales des voies aériennes ont été développées par cytométrie en flux. Il a été démontré que les cellules basales trachéales humaines fœtales exprimant spécifiquement le canal à eau Aquaporine-3 (AQP-3), isolées par cytométrie en flux, restaurent *in vivo*, un épithélium mucociliaire pseudostratifié et un réseau de glandes respiratoires matures. Cependant, la population purifiée des cellules AQP-3<sup>-</sup> (cellules ciliées et sécrétoires) régénère également un épithélium trachéal mature, mais de façon plus rapide. Ces résultats suggèrent la présence d'une population de cellules progénitrices au sein des cellules AQP-3<sup>-</sup> et de cellules souches au sein des cellules basales AQP-3<sup>+</sup> (Avril-Delplanque *et al., 2*005).

Chez l'adulte, différents marqueurs membranaires spécifiques des cellules basales bronchiques ont été identifiés tels que le CD151 et le Facteur Tissulaire (FT) (Hajj *et al.,* 2007) ou le Nerve Growth Factor receptor (NGF-R) et l'intégrine  $\alpha$ 6 (ITGA-6) (Rock *et al.,* 2009). Isolées par cytométrie en flux sur la base de l'expression de ces deux couples de marqueurs, les cellules basales ont montré une capacité de prolifération et de régénération de l'épithélium mucociliaire mature et fonctionnel, *in vivo*, dans un modèle de xénogreffe (Hajj *et al.*, 2007), *in vitro*, en cultures en Interface Air-Liquide (IAL) (Hajj *et al.*, 2007) ou par la génération de bronchosphères (Rock *et al.*, 2009), contrairement aux cellules cylindriques (cellules ciliées et sécrétoires), n'exprimant aucun de ces marqueurs et ne présentant pas ces capacités. De plus, les cellules basales purifiées présentent une forte activité de la télomérase (Hajj *et al.*, 2007), activité enzymatique détectée au sein des cellules souches et progénitrices tissulaires adultes, démontrant que les cellules basales peuvent bien être considérées comme, au moins, les cellules progénitrices facultatives de l'épithélium bronchique humain adulte.

## (c) Cellules basales ou cellules sécrétoires ?

L'épithélium trachéal murin serait donc maintenu par deux pools de cellules souches/progénitrices : les cellules basales et les cellules de Clara (Figure 16). De plus, il a été récemment démontré que la population des cellules basales est hétérogène et constituée de deux sous-populations : une population de cellules K14<sup>+</sup>/K5<sup>+</sup>/K15<sup>+</sup> (20 % des cellules basales totales) et une population de cellules K14<sup>-</sup>/K5<sup>+</sup>/K15<sup>+</sup>. Il a été mis en évidence que, suite à une lésion de l'épithélium trachéal murin par le naphtalène, la restauration de l'épithélium mature était assurée par les deux sous-populations de cellules basales de manière coordonnée. Au cours de la régénération, les deux sous-populations basales présentent une augmentation de l'expression de la K14 et vont générer un pool de cellules hautement mitotiques et largement distribuées. Cette prolifération est suivie de la différenciation en cellules de Clara et cellules ciliées. Les auteurs postulent que l'induction de l'expression de la K14 serait synonyme d'une cellule activée, capable de se différencier en réponse aux signaux environnementaux. Donc, l'ensemble des cellules basales trachéales murines (K14<sup>+</sup> et K14<sup>-</sup>) pourraient être considérées comme des cellules progénitrices trachéales (Cole *et al.,* 2010).



**Figure 16:** Mécanismes potentiels impliqués au cours de la réparation de l'épithélium trachéo-bronchique murin. Les cellules de Clara sont présentées en bleu, les cellules ciliées en vert, les cellules neuro-endocrines en rose, les cellules basales en orange et les cellules muqueuses des glandes en violet. Les régions riches en vaisseaux sanguins et en nerfs sont indiquées. Les populations de cellules régénératives sont numérotées de 1 à 4. (1) les cellules K14<sup>+</sup>: Cellules basales capables de s'autorenouveler et de se différencier en cellules de Clara et cellules ciliées après l'ablation des cellules de Clara par le Naphtalène. (2) Les LRC, identifiées au niveau des cellules basales des canaux des glandes de la sous-muqueuse et dans l'épithélium de surface des régions intercartillagineuses. (3) Les cellules basales épithéliales dans les canaux de la sous-muqueuse, capables de régénérer un épithélium de surface entier dans un modèle de xénogreffe. (4) Les cellules de Clara remplaçant les cellules ciliées suite à une lésion par un oxydant (Rawlins et Hogan, 2006).

Pour expliquer la potentielle hiérarchie entre les cellules basales et de Clara murines, une hypothèse évoquée par Rock et son équipe, propose que les cellules basales se différencieraient en cellules progénitrices multipotentes, présentant une dérégulation de gènes tels que le *TRP63*, le *NGF-R* ou la cytokératine-5, et commenceraient à exprimer des marqueurs spécifiques des cellules luminales (cytokératine-8). Ces progéniteurs auraient des capacités de prolifération importantes (considérés comme des cellules d'amplification transitoires) et capables de générer des cellules ciliées et sécrétoires (Rock *et al.,* 2010), correspondant potentiellement à un phénotype de cellules intermédiaires décrit dans l'épithélium des voies aériennes humaines (Mercer *et al.,* 1994).

En conclusion des différentes études réalisées, il apparaitrait que les cellules souches (LRC) correspondraient à une sous-population de cellules basales donnant naissance à des cellules progénitrices représentées par d'autres cellules basales et par les cellules sécrétoires de Clara.

#### (ii) Cellules souches/progénitrices de l'épithélium bronchiolaire

Dans la littérature, les travaux menés sur l'identification des cellules souches/progénitrices de l'épithélium bronchiolaire ont été réalisés uniquement à partir de modèles animaux et notamment murins et mettent en évidence les cellules de Clara comme les cellules souches/progénitrices de l'épithélium bronchiolaire, les cellules ciliées, représentant une population cellulaire post-mitotique dérivant des cellules de Clara (Evans *et al.,* 1978 ; Rawlins *et al.,* 2007).

Chez l'homme, l'étude de la nature proliférative des cellules épithéliales bronchiolaires a été évaluée, montrant la participation des cellules de Clara dans la maintenance épithéliale normale des voies de conductions humaines distales (Boers *et al.,* 1999).

En outre, les cellules de Clara, purifiées par élutriation (80 à 85 % de pureté), à partir d'échantillons pulmonaires de lapin adulte, ont montré leur capacité d'autorenouvellement et leur potentiel de différenciation multipotent, en régénérant, *in vivo* dans un modèle de xénogreffe trachéale, un épithélium cuboïde monocouche d'aspect bronchiolaire, bordé de cellules ciliées et de Clara (Hook *et al.,* 1987 ; Brody *et al.,* 1987).

Plus récemment, une étude a développé un modèle murin de traçage génétique maintenu de façon stable au sein de la population des cellules CCSP<sup>+</sup> au sein de l'épithélium bronchiolaire (protéine de fusion CreER exprimée sous le contrôle régulateur du gène CCSP) (Rawlins *et al.,* 2009). Dans cette étude, il a été rapporté qu'au cours de l'homéostasie tissulaire, la proportion des cellules ciliées de l'épithélium bronchiolaire portant le Tag
augmentait, argumentant le fait que les cellules exprimant le CCSP, composées en majorité des cellules de Clara matures, était un pool de cellules progénitrices qui proliféraient et généraient des cellules ciliées.

Cependant, une étude menée en 2006, remet en cause le statut de cellules en différenciation terminale des cellules ciliées. Dans le cadre d'une lésion de l'épithélium bronchiolaire murin induite par le naphtalène, les auteurs ont mis en évidence la capacité des cellules ciliées à s'étaler rapidement avant la phase de prolifération, dans le but de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale, puis de se différencier en cellules de Clara et cellules ciliées et ainsi réparer l'épithélium des voies aériennes. Les cellules ciliées bronchiolaires présenteraient une capacité de changement morphologique et de profil d'expression génique rapide, accompagnant, après déplétion du pool de cellules progénitrices, la transition d'un épithélium squameux en un épithélium cuboïde redevenant pour assurer l'intégrité de la barrière épithéliale, serait associé à la migration et à la prolifération des cellules de Clara variantes associées aux NEB (Park *et al.*, 2006).

La mise en évidence d'une première niche de cellules souches bronchiolaires, a été réalisée en utilisant des modèles de lésions épithéliales. En effet, l'épithélium bronchiolaire murin subissant une ablation des cellules de Clara après un traitement au Naphtalène, était réparé à travers l'activation de cellules résistantes aux polluants, localisées spécifiquement au niveau des NEB dans les zones de bifurcation des voies aériennes (Hong *et al.,* 2001; Reynolds *et al.,* 2000). Ces cellules proliférantes, mises en évidence par l'incorporation de de H<sup>3</sup>-Thymidine, correspondraient à la fois aux cellules de Clara variantes (CCSP<sup>+</sup>, n'exprimant pas le cytochrome P450 2F2, et donc résistantes au naphtalène) et aux cellules neuro-endocrines (CGRP<sup>+</sup>) (Reynolds *et al.,* 2000). Cependant, une ablation complète et totale de l'ensemble des cellules exprimant le CCSP, a montré que les cellules neuro-endocrines, bien qu'à l'origine de l'hypertrophie et de l'hyperplasie des NEB, étaient incapables d'induire la régénération de l'épithélium bronchiolaire après lésion (Reynolds *et al.,* 2000; Peake *et al.,* 2000).

De plus, l'équipe de Giangreco a réalisé une étude en 2009, basée sur des souris chimériques établies à partir de la fusion de deux embryons : l'un de type sauvage (WT) et l'autre présentant une expression ubiquitaire de la GFP (Green Fluorescent Protein). Les souris WT/GFP obtenues ont été analysées en fonction de leur degré de chimérisme tissulaire. Au niveau des voies aériennes bronchiolaires, le génotype des cellules épithéliales est complètement hétérogène, avec la présence de patchs de cellules GFP<sup>+</sup> et GFP<sup>-</sup> de petites tailles, suggérant un renouvellement de l'épithélium (homéostasie) par les nombreuses cellules progénitrices (cellules de Clara), plutôt que par les rares cellules souches épithéliales bronchiolaires situées dans leurs niches. Cependant, suite à la déplétion induite par le Naphtalène du pool des cellules progénitrices au sein des souris chimériques, la régénération épithéliale se traduit par le développement de grands patchs GFP<sup>+</sup> ou GFP<sup>-</sup>. Ces patchs correspondraient au recrutement puis à la prolifération des rares cellules souches activées de l'épithélium bronchiolaire (Giangreco *et al.*, 2009). En effet, la localisation des patchs serait centrée au niveau des zones de bifurcation des voies aériennes bronchiolaires ou au niveau des jonctions bronchiolo-alvéolaires, zones de l'épithélium où ont été préalablement mises en évidence les niches de cellules souches (NEBs et BADJs) (Hong *et al.*, 2001; Giangreco *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2000).

En conclusion, l'épithélium bronchiolaire présenterait donc deux types de cellules contribuant à la maintenance et à la régénération épithéliale murine : les cellules de Clara (cellules d'amplification transitoires) et les rares cellules souches bronchiolaires localisées dans les NEB. La population abondante des cellules d'amplification transitoires facultatives (cellules de Clara), présentes tout au long des voies bronchiolaires, va être capable d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et de générer une descendance de cellules différenciées (Rawlins *et al.,* 2009; Evans *et al.,* 1978; Giangreco *et al.,* 2009).

# (iii) Cellules souches de la jonction bronchiolo-alvéolaire

Au niveau distal des voies aériennes bronchiolaires, peu de NEB ont été identifiés mettant en doute, l'implication des cellules de Clara variantes associées au NEB dans le renouvellement épithélial dans cette zone. Une étude menée en 2002 par Giangreco *et al.,* a identifié une deuxième niche de cellules souches bronchiolaires, après traitement des souris par le naphtalène, au niveau de la jonction bronchiolo-alvéolaire (BADJ). Les cellules dans cette niche expriment le CCSP, résistent aux polluants, correspondent donc à des cellules de Clara variantes, sont des LRC et contribuent à la restauration épithéliale après lésion

(Giangreco *et al.*, 2002). En 2005, une étude menée par Kim *et al.*, a identifié une souspopulation de cellules de Clara CCSP<sup>+</sup> localisées au niveau des BADJ et exprimant à la fois des marqueurs de cellules de Clara (CCSP) et de PN II (pro-SP-C). Cette observation est corrélée avec la description de cellules épithéliales pulmonaires embryonnaires générant des populations de cellules épithéliales bronchiolaires et alvéolaires co-exprimant ces mêmes marqueurs (Wuenschell *et al.*, 1996). Les cellules CCSP<sup>+</sup>/SP-C<sup>+</sup>, quiescentes dans le poumon normal, prolifèrent *in vivo*, en réponse aux lésions épithéliales alvéolaires (Bléomycine) ou bronchiolaires (naphtalène). Isolées par cytométrie en flux grâce à une combinaison de marqueurs (sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>), les cellules CCSP<sup>+</sup>/SP-C<sup>+</sup> montrent une capacité d'autorenouvellement et de différenciation multipotentes *in vitro*, en cellules de Clara CCSP<sup>+</sup>/SP-C<sup>-</sup>), en PN II (CCSP<sup>-</sup>/SP-C<sup>+</sup>) et en PN I (Aquaporine-5<sup>+</sup>/SP-C<sup>-</sup>). Ces cellules ont finalement été nommées BASC (Bronchiolo-alveolar stem cells) (Kim *et al.*, 2005) (Figure 17).



**Figure 17: Modèle schématique d'homéostasie de l'épithélium pulmonaire distal.** Les jonctions bronchiolo-alvéolaires, localisées entre les bronchioles terminales (bordées de cellules de Clara, en rouge) et l'espace alvéolaire (compose de PN I squameux (en bleu), et de PN II cuboïdes (vert)), présentent une niche de cellules souches pulmonaires distales (BASC, en jaune). En réponse aux dommages pulmonaires ou autres stimuli, les BASC peuvent s'autorenouveler et générer des cellules de Clara, des PN II ou des PN I (soit directement, ou via les PN II dérivées des BASC). Les cellules de Clara et les PN II peuvent aussi donner de nouvelles cellules de Clara et des PN I, respectivement, fonctionnant ainsi comme des cellules progénitrices. Les PN I et les cellules de Clara différenciées, sont considérées comme post-mitotiques au sein de l'épithélium pulmonaire distal. Les marqueurs moléculaires des BASC et des PN II sont indiqués. CCSP, Clara cell secretory protein; SP-C, surfactant protein C; Sca-1 (stem cell antigen-1) et CD34, marqueurs de surface cellulaire (Kim, 2007).

Cependant, des travaux récents ont suggéré que les cellules exprimant le CD34 n'appartiendraient pas au lignage épithélial pulmonaire. De plus, le marqueur sca-1 chez la souris, ne distingue pas les cellules souches bronchiolaires des cellules d'amplification transitoires, qui peuvent par contre, être différenciées de par leurs propriétés d'autofluorescence (AF), une autofluorescence faible distinguant les cellules souches bronchiolaires des cellules de Clara (AF importante). Les cellules souches bronchiolaires murines présenteraient donc le profil phénotypique suivant : CCSP<sup>+</sup>/SP-C<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/sca-1 faible/AF faible (CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>) (Teisanu *et al.,* 2009). La sous-population CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> définirait des cellules progénitrices clonogéniques endogènes pulmonaires murines, représentatives du lignage mésenchymateux (McQualter *et al.,* 2009).

La capacité de cellules souches multipotentes des BASC, à l'origine de la régénération d'un épithélium alvéolaire semble remis en cause dans quelques études. En effet, il a été montré que dans un contexte de lésion pulmonaire particulier (pneumectomie unilatérale), les souris présentaient la capacité de croissance pulmonaire post-natale compensatoire (Hsia, 2004), restaurant la taille, le volume ou la composition cellulaire du poumon (Voswinckel *et al.*, 2004). Dans ce cadre, la contribution de la prolifération et de la différenciation des BASC a été évaluée entre 0 et 25 % de la recroissance épithéliale alvéolaire compensatoire (PN I et PN II), démontrant que la régénération épithéliale requerrait la contribution des PN II (pool de cellules progénitrices alvéolaires) (Nolen-Walston *et al.*, 2008). De plus, une étude menée par Rawlins *et al.*, n'a pas pu mettre en évidence, la contribution significative des cellules de Clara variantes ou des BASC (Scgb1a1<sup>+</sup>) dans la maintenance ou la régénération de l'épithélium alvéolaire, bien qu'il soit possible qu'une destruction massive du pool des PN II, révèle une source de cellules bronchiolaires Scgb1a1<sup>+</sup> qui contribuerait à la réparation alvéolaire (Rawlins *et al.*, 2009).

# *(iv) Cellules progénitrices de l'épithélium alvéolaire*

Depuis de nombreuses années, les PN II sont considérés comme les cellules progénitrices de l'épithélium alvéolaire sur la base de leurs capacités d'autorenouvellement et de différenciation en PN I eux-mêmes considérés en différenciation terminale (Brody et Williams, 1992). *In vivo,* l'incorporation de Thymidine tritiée, après une lésion pulmonaire,

montre la progression, en série, des cellules marquées, des PN II se différenciant en PN I (Evans *et al.,* 1973 ; Evans *et al.,* 1975).

L'identification des BASC au niveau des BADJ (Kim et al., 2005), source de cellules souches rares quiescentes, et activables, potentiellement impliquées dans la régénération alvéolaire suite à une lésion, évoque le fait qu'au moins une cellule progénitrice par alvéole soit présente, capable de régénérer rapidement une lésion et ainsi garantir l'homéostasie alvéolaire (Warburton et al., 2008). Fuchs et al. ont montré que les PN II sont capables de proliférer, de migrer et de s'allonger le long de la lame basale dénudée suite à une lésion, puis de se différencier en PN I (Fuchs et al., 2003). De plus, après une lésion pulmonaire induite par une hyperoxie, l'expression de la télomérase est détectée dans les PN II au cours de la régénération (Driscoll et al., 2000). Ces données ont été affinées par les travaux de Reddy et al. montrant que la population des PN II, isolée à partir de poumons de rats traités dans des conditions d'hyperoxie, était hétérogène, composée de deux sous-populations : les PN II exprimant faiblement la Cadhérine-E, non apoptotiques et résistantes aux lésions, présentant une forte capacité de prolifération et une importante activité télomérasique, comparativement aux PN II exprimant fortement la Cadhérine-E. Cette étude indique que la sous-population de PN II exprimant faiblement la Cadhérne-E, induite lors d'un stress pourrait présenter des capacités de cellules souches/progénitrices, et serait principalement responsable de la réparation épithéliale alvéolaire après lésion (Reddy et al., 2004 ; Lee et *al.,* 2006).

Cependant, il semble que la notion selon laquelle les PN I seraient des cellules en différenciation terminale, soit réactualisée. En effet, Gonzalez *et al.*, ont montré que les PN I issus de poumons de rats adultes, isolés par cytométrie en flux en utilisant les 2 marqueurs membranaires spécifiques Aquaporine-5 et RTI-40, étaient capables, *in vitro*, de proliférer, de former des colonies et d'exprimer l'Oct4A, facteur de transcription impliqué dans la maintenance d'un état pluripotent des CSE. De plus, les PN I présentent une plasticité phénotypique *in vitro* : ils sont capables d'exprimer des marqueurs de cellules différenciées : SP-C (PN II) et CC10 (cellules de Clara) (Gonzalez *et al.*, 2009), ce qui pourrait suggérer un rôle potentiel des PN I dans le maintien ou la réparation épithéliale après lésion.

#### (v) Side population pulmonaire

Les difficultés rencontrées dans l'identification précise, ainsi que dans l'isolement des cellules souches épithéliales respiratoires, dues notamment à l'absence de marqueurs de surface définis, ont contribué à la recherche, à l'identification puis à la purification d'une autre source de cellules présentant des capacités de cellules souches. Certains investigateurs se sont basés sur les propriétés d'exclusion du Hoechst 33342, mise en évidence à l'origine, au niveau d'une partie des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse murine (Goodell *et al.,* 1996). Cette population cellulaire à été nommée Side Population (SP), et identifiée par cytométrie en flux sur la base de sa capacité unique à effluer cet intercalant de l'ADN via la protéine transmembranaire Bcrp1 (Breast Cancer Resistance Protein 1) de la famille des ABC transporteurs (ATP-Binding Cassette transporter) (Zhou *et al.,* 2001). La SP ainsi isolée présentait des marqueurs phénotypiques de cellules souches hématopoïétiques.

La propriété d'efflux du Hoechst a ensuite été utilisée comme stratégie commune de purification de cellules souches potentielles dans différents tissus solides. Au niveau des tissus adultes, une SP a ainsi été mise en évidence au niveau de l'épithélium pulmonaire murin (Summer *et al.*, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2007). La SP pulmonaire murine peut être séparée en deux sous-populations en fonction de l'expression du CD45, marqueur spécifique des cellules souches hématopoïétiques : une sous-population hématopoïétique CD45<sup>+</sup>, SP uniformément observée au sein de la moelle osseuse (Challen et Little, 2006), et une sous-population non-hématopoïétique CD45<sup>-</sup>, exprimant majoritairement sca-1, ainsi que des marqueurs spécifiques de populations mésenchymateuses (vimentine<sup>+</sup>) et de voies aériennes (CCSP<sup>+</sup>). Cette dernière population présente des caractéristiques de cellules de Clara variantes des NEB et des BADJ, ce qui suggère que la SP non-hématopoïétique pulmonaire pourrait être enrichie en cellules souches épithéliales (Giangreco *et al.*, 2004).

Finalement, une étude menée en 2008, a mis en évidence, au sein de l'épithélium des voies aériennes trachéo-bronchiques humaines, une SP pulmonaire (CD45<sup>-</sup>) exprimant des marqueurs de cellules épithéliales (Pan-cytokératine), et présentant une stabilité de la longueur des télomères, ainsi que de fortes capacités clonogéniques et prolifératives. Cette SP pulmonaire humaine (0,12 % de l'ensemble des cellules épithéliales) présente le potentiel de régénérer, *in vitro* en culture en interface air-liquide, un épithélium des voies aériennes différencié composé de cellules basales, ciliées ou sécrétoires (Hackett *et al.,* 2008).

# (vi) Notion de niches et régulation des cellules souches de l'épithélium respiratoire

Il est admis que le comportement des cellules souches tissulaires adultes est fortement affecté par leur microenvironnement local appelé « niche » (Watt et Hogan, 2000). Des aspects de l'environnement (signaux extrinsèques) des cellules souches sont connus pour influencer la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement ou la différenciation des cellules souches, tels que les protéines de la matrice extra-cellulaire, le contact direct avec les cellules voisines, une potentielle innervation de la zone ou l'exposition à des facteurs physiques et de sécrétion issus notamment des fibroblastes (Watt et Hogan, 2000 ; Morrison et Spradling, 2008). Ainsi, les niches sont des structures hautement dynamiques et très régulées présentes en nombres limités.

A la différence des cryptes intestinales ou du bulge des follicules pileux, des niches bien définies et identifiées anatomiquement ont été peu décrites au niveau des voies aériennes humaines. Parce que les cellules souches pulmonaires se divisent peu, la mise en évidence et l'identification des cellules souches et de leurs niches potentielles a nécessité la lésion de l'épithélium respiratoire, suivie d'une incorporation de précurseurs nucléotidiques traçables dans toutes les cellules en phase S du cycle cellulaire. En utilisant cette méthode, toutes les cellules en phase S seront marquées très rapidement, alors qu'à long terme, seules les cellules souches à renouvellement très lent resteront marquées, mettant ainsi en évidence les cellules souches (LRC) et leur microenvironnement spécifique et confiné *in vivo*.

Chez la souris, l'observation de cellules basales bordant les canaux glandulaires, de cellules basales situées dans les régions trachéo-bronchiques inter-cartilagineuses ainsi que de cellules CCSP<sup>+</sup> (cellules de Clara variantes et BASC) associées aux NEB et BADJ, retenant le marquage au BrdU à long terme, suggère que ces régions sont enrichies en cellules souches, maintenues à l'état quiescent au sein de leurs niches respectives (Hong *et al.,* 2001; Giangreco *et al.,* 2002; Kim *et al.,* 2005; Reynolds *et al.,* 2000).

La voie de signalisation Notch régule les cellules souches adultes dans de nombreux systèmes, tels que la peau, les glandes mammaires ou le système nerveux (Moriyama *et al.,* 2008 ; Visvader, 2009). Au niveau des cellules basales des voies aériennes, quelques études portant sur le développement et la régénération pulmonaire murine, suggèrent que la voie de signalisation Notch et son niveau d'expression réguleraient la différenciation des cellules progénitrices en cellules ciliées (par un niveau d'expression faible) et sécrétoires (par un niveau d'expression important) (Guseh *et al.,* 2009 ; Morimoto *et al.,* 2010). De plus, le traitement de cultures épithéliales régénérées *in vitro,* en culture en interface air-liquide, avec un agoniste de la voie de signalisation Notch ou l'IL-13 va résulter dans l'augmentation du nombre de cellules caliciformes (Guseh *et al.,* 2009). Cependant, la régulation *in vivo,* des cellules basales trachéo-bronchiques par la voie de signalisation Notch n'est pas encore clairement définie (Figure 18).



Figure 18: Modèle schématique montrant l'influence de signaux paracrines sur le comportement des cellules basales au sein des niches. Ce modèle proposé par Rock *et al.*, en 2009 inclut des signaux environnementaux provenant des cellules épithéliales de proximité, de la circulation sanguine, des nerfs, du stroma et des cellules immunitaires, tout ceci influençant les cellules basales et leurs descendances. Dans des conditions pathologiques (infections bactériennes, inflammation), les cellules épithéliales et le stroma sous-jacent produisent des facteurs qui pourraient moduler le comportement des cellules basales. L'étude d'autres systèmes de cellules souches, suggère que le niveau d'expression des composants de la voie de signalisation Notch (connue pour réguler la balance entre les cellules ciliées et sécrétoires au niveau des voies aériennes embryonnaires humaines) peut être modulé par des signaux paracrines, incluant des cytokines telles que l'IL-6. Cependant, les mécanismes de transduction des signaux qui affectent la biologie cellulaire (polarité, attachement) ou la prolifération, ne sont pas élucidés (Rock *et al.*, 2010).

L'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine influence la capacité d'autorenouvellement et de différenciation de cellules souches, notamment au niveau hématopoïétique (Kirstetter et al., 2006), en induisant un arrêt ou une altération de la différenciation. Un rôle fondamental dans la régulation du développement pulmonaire a été établit pour la voie Wnt/β-caténine (Mucenski *et al.,* 2003). Une étude menée en 2008 par Reynolds et al. a mis en évidence que la stabilisation de la β-caténine au niveau de l'endoderme pulmonaire embryonnaire murin, arrête la maturation épithéliale des voies aériennes, et augmente le pool de cellules souches bronchiolaires adultes. Cette étude suggère, d'une part, qu'une modulation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est nécessaire pour l'établissement de la hiérarchie des cellules souches/progénitrices bronchiolaires, et d'autre part, que la stabilisation de la  $\beta$ -caténine interfere avec l'établissement du pool des cellules d'amplification transitoires (cellules de Clara) et des cellules différenciées matures (cellules ciliées) (Reynolds et al., 2008). Cependant, au sein de souris génétiquement modifiées ( $\beta$ -caténine<sup>-/-</sup>), il n'a pas été rapporté de différences en termes d'expression de marqueurs de différenciation des cellules de Clara ni d'index mitotique au sein de l'épithélium bronchiolaire à l'état normal. En outre, suite à la déplétion des cellules de Clara, l'épithélium bronchiolaire murin s'est régénéré de manière comparable à un épithélium issu de souris sauvages (Zemke et al., 2009).

Les facteurs de transcription SOX (Sry-related high mobility group box) semblent jouer un rôle prépondérant dans la régulation des cellules souches épithéliales respiratoires. Les travaux menés par Tompkins *et al.* ont mis en évidence le rôle du facteur de transcription SOX-2 dans la maintenance et la différenciation de l'épithélium respiratoire post-natal chez la souris. En effet, cette étude a démontré qu'une délétion spécifique de SOX-2 au niveau des cellules de Clara de l'épithélium bronchiolaire, était à l'origine d'une perte progressive des cellules ciliées, de Clara et caliciformes, associée à l'incapacité des cellules progénitrices de produire des cellules sécrétoires en réponse à la mise en contact d'un allergène (Tompkins *et al.,* 2009).

En outre, une induction de l'expression de SOX-17 au sein de cellules épithéliales respiratoires matures entraine la prolifération des cellules progénitrices pulmonaires adultes, tout en modifiant leur capacité de différenciation. En effet, une étude récente réalisée en 2009, a montré que le gène SOX-17, requit dans le cadre du développement de l'endoderme précoce, inhibe la voie de signalisation TGF-β/Smad3 (inhibiteur du cycle

cellulaire), entrainant l'activation du cycle cellulaire et conduit à la respécification des cellules progénitrices alvéolaires en lignages cellulaires épithéliaux bronchiolaires (Lange *et al.*, 2009). D'autres facteurs semblent réguler les cellules souches de l'épithélium respiratoire. Quand l'inactivation de Bmi1 entraine une diminution de la capacité proliférative et d'autorenouvellement des BASC *in vitro* en culture ou *in vivo* après lésion (Dovey *et al.*, 2008), la perte de l'expression post-natale de GATA-6 induit une expansion de ces cellules tout en limitant la capacité de différenciation (Zhang *et al.*, 2008). La délétion conditionnelle de Pten (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), quant à elle, entraine la prolifération et l'hyperplasie des cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires sans perturber la différenciation des cellules ciliées et des cellules de Clara (Davé *et al.*, 2008). Cependant, ce dernier résultat semble controversé. En effet, Tiozzo *et al.* en 2008, ont rapporté que la délétion de Pten, tout en augmentant le pool des cellules progénitrices respiratoires (cellules basales, cellules souches au niveau des NEB et des BADJ) affecte la différenciation des cellules (Tiozzo *et al.*, 2009).

#### (c) Cellules souches exogènes

Une autre source de cellules souches, dites exogènes, pourrait participer *in vivo* à la réparation de l'épithélium respiratoire ou constituer une source cellulaire dans le cadre d'une thérapie cellulaire ou régénératrice pulmonaire. Ces cellules souches exogènes présentent, outre une capacité de prolifération cellulaire, le potentiel de générer des cellules épithéliales respiratoires différenciées. Ainsi, différents types de cellules souches exogènes ont été identifiées : les cellules souches embryonnaires (développé dans la partie II. C. 1) et les iPS (développés dans la partie II. C. 2), les cellules souches du liquide amniotique, les cellules souches dérivées du sang de cordon ombilical, les Side Population (SP) d'origines mésenchymateuses (moelle osseuse), les cellules souches épithéliales présentes dans la moelle osseuse ou dans la circulation, ou les cellules mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux.

# (i) Concept de plasticité des cellules souches adultes

Le mécanisme de plasticité ou de transdifférenciation cellulaire a été décrit dans une étude menée par Bjornson et son équipe, qui montrait que des cellules souches neurales avaient la capacité de générer des cellules sanguines myéloïdes et lymphoïdes fonctionnelles après leur injection systémique dans une souris irradiée (Bjornson *et al.*, 1999). Cette étude a mis en évidence le potentiel des cellules souches adultes, dans des conditions spécifiques et dépendant de signaux micro-environnementaux, à générer des cellules spécialisées appartenant à des tissus différents de leur tissu d'origine, en contradiction avec la définition historique des cellules souches adultes multipotentes engagées dans une ou plusieurs voies de différenciation à l'intérieur d'un tissu donné. Les études initiales mettant en évidence le processus de plasticité des cellules souches, ont utilisé un modèle de transplantation de cellules de la moelle osseuse, dans lequel les cellules murines d'un donneur mâle (portant le chromosome Y), ont été transplantées au sein d'un hôte murin receveur femelle, préalablement irradié. Ainsi, les cellules greffées ont pu être suivies chez l'hôte grâce à la détection du chromosome Y (Herzog *et al.*, 2003).

Au cours des dix dernières années, un très grand nombre d'études ont ainsi rapporté la capacité de transdifférenciation de bon nombre de types cellulaires. On trouvera des exemples de transdifférenciation des cellules souches hématopoïétiques ou cellules de l'épiderme, de l'épithélium respiratoire, intestinales, rénales, dans le parenchyme hépatique, le pancréas, le muscle squelettique, l'endothélium, le tissu cardiaque ou dans le système nerveux central. En outre, il a également été décrit la transdifférenciation de cellules souches musculaires ou du système nerveux central en cellules des lignages sanguins (Wagers et Weissman, 2004). Cependant, le phénomène de transdifférenciation est partiellement remis en cause. En effet, plutôt qu'une transdifférenciation, il s'agirait dans certains cas, d'un phénomène de fusion de la cellule souche exogène avec une cellule différenciée du tissu hôte, lui permettant ainsi d'acquérir des marqueurs phénotypiques des cellulaire pourrait constituer un mécanisme de réparation des tissus lésés (Lagasse *et al.,* 2000), ou que la génération de cellules « épithéliales-like » de peau, du foie ou du poumon par les cellules souches mésenchymateuses ne résulterait pas d'une fusion mais bien d'une

transdifférenciation cellulaire (Harris *et al.,* 2004). Cependant, si le repeuplement d'un organe par des cellules souches d'un autre tissu chez l'animal, semble représenter une potentialité assez générale, il est souvent faible, peu reproductible chez l'homme, limitant ainsi son intérêt thérapeutique.

# (ii) Implication des cellules souches exogènes au niveau pulmonaire

Chez l'Homme, les cellules souches dérivées de la moelle osseuse représentent les populations de cellules souches adultes les mieux caractérisées (Bonnet, 2003), composées des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et mésenchymateuses (CSM). *In vitro*, les CSM humaines, co-cultivées en présence de cellules épithéliales des voies aériennes distales, ont montré une capacité de transdifférenciation en cellules « épithéliales-like » capables de reconstituer un épithélium monocouche. Cependant, la transdifférenciation évoquée est partiellement remise en cause, de par l'identification d'une partie des cellules phénotypiquement épithéliales dérivées des CSM humaines provenant de la fusion d'une CSM et d'une cellule somatique différenciée (fréquence de fusion cellulaire évaluée à 10<sup>-2</sup>) (Spees *et al.,* 2003).

Une étude menée par Krause et son équipe en 2001, a montré *in vivo* la reconstitution de la lignée hématopoïétique à partir de cellules souches dérivées de la moelle osseuse chez des souris hôtes irradiées. Dans cette étude, les cellules souches du donneur pouvaient également générer des cellules différenciées dans de multiples organes incluant l'épithélium respiratoire (Krause *et al.*, 2001). Kotton *et al.* ont également montré que l'introduction de CSM dans la circulation veineuse des animaux, après une lésion épithéliale par la bléomycine, entrainait une transdifférenciation de ces cellules au sein du parenchyme pulmonaire, avec une acquisition des caractéristiques phénotypiques et moléculaires de PN I (Kotton *et al.*, 2001). Depuis, de très nombreuses études sur la transdifférenciation des cellules souches issues de la moelle osseuse en cellules épithéliales respiratoires ont été rapportées dans la littérature, tant dans des modèles animaux que chez l'Homme (Ortiz *et al.*, 2003 ; Suratt *et al.*, 2003 ; Kleeberger *et al.*, 2003 ; Loi *et al.*, 2006).

Cependant, bien que ces études soient prometteuses dans le cadre de thérapies cellulaires régénératives des épithélia respiratoires pathologiques, le pourcentage de cellules

souches exogènes observées au sein des voies respiratoires semble faible, voire inexistant (Bittmann *et al.,* 2001 ; Davies *et al.,* 2002 ; Kotton *et al.,* 2005), dépendamment du diamètre et du type de lésion de l'épithélium respiratoire.

Le rôle des SP exogènes dans la réparation épithéliale pulmonaire a été démontré chez la souris. La Side-Population (SP) dérivée de la moelle osseuse, présente des marqueurs phénotypiques de cellules souches hématopoïétiques. Elle est faiblement représentée dans la moelle osseuse murine (Goodell *et al.*, 1996). Deux études menées par Mac Pherson *et al.* en 2005 et 2006, ont montré que la SP isolée de la moelle osseuse de souris, bien qu'incapable, à elle seule, de reconstituer un épithélium respiratoire lorsque les cellules sont ensemencées en cultures en IAL ou sur une trachée dénudée dans un modèle de xénogreffe, pouvait participer à la réparation de l'épithélium trachéal après lésion et représentait au final, 0,83 % de la totalité des cellules de l'épithélium régénéré (Macpherson *et al.*, 2005). De plus, la caractérisation des cellules du donneur a montré une expression de la cytokératine par ces cellules, de même que le maintien des caractéristiques de cellules hématopoïétiques (CD45<sup>+</sup>) (MacPherson *et al.*, 2006).

Les cellules souches, isolées à partir du liquide amniotique humain (hAFSC), sont des cellules pluripotentes, au même titre que les CSE ou les iPS, capables de générer des cellules différenciées exprimant des marqueurs spécifiques de lignages cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires. Les hAFSC, à l'état pluripotent, sont caractérisées par l'expression du récepteur du stem cell factor (SCF) c-Kit, de Oct4 et SSEA-4, et de différents marqueurs de cellules souches mésenchymateuses et neuronales absents des CSE. Les hAFSC sont donc considérées comme un type de cellules souches intermédiaire entre les CSE et les cellules souches somatiques. Elles sont capables de proliférer à long terme en culture sans perte de leur pluripotence, et ne génèrent pas de tératomes après injection dans des souris immunodéficientes (De Coppi et al., 2007). En 2008, une étude menée par Carraro et al. a montré que des hAFSC sont capables de s'intégrer dans des poumons de souris au cours de leur développement, ainsi qu'au niveau de tissus pulmonaires adultes après une lésion épithéliale. Au niveau des tissus pulmonaires adultes après un traitement hyperoxique, les hAFSC ont été localisées au niveau du poumon distal et expriment le SP-C (marqueur des PN II). De plus, après la déplétion des cellules de Clara, les auteurs ont observé une intégration et une différenciation des hAFSC, au niveau des BADJ ou des bronches, avec une expression spécifique du marqueur des cellules de Clara CC10, montrant l'importante plasticité de ces cellules souches en fonction du type de lésion de l'épithélium des voies aériennes et alvéolaires induite (Carraro *et al.,* 2008).

Sueblinvong *et al.* ont mis en évidence que des cellules souches mésenchymateuses, dérivées du sang de cordon ombilical humain, cultivées *in vitro*, en présence de facteurs de croissance spécialisés, étaient capables d'exprimer le CCSP, le SP-C ainsi que le canal chlorure CFTR. Après leur injection au sein de souris immunodéficientes, ces rares cellules souches ont été localisées au sein de l'épithélium des voies aériennes et exprimaient la cytokératine et le CFTR humain (Sueblinvong *et al.*, 2008).

Deux populations de cellules progénitrices épithéliales ont été identifiées dans la circulation sanguine ainsi qu'au sein de la moelle osseuse murine. La première population a été caractérisée phénotypiquement par l'expression du marqueur épithélial cytokératine-5 et du récepteur CXCR4. Les progéniteurs épithéliaux circulants CK5<sup>+</sup> contribueraient à la réépithélialisation des voies aériennes et à la régénération d'un épithélium pseudostratifié trachéal, via leurs recrutements médiés par le CXCL12 (Gomperts *et al.,* 2006). La seconde population de cellules, dérivée de la moelle osseuse murine et humaine, présente une expression *in vivo* du CCSP, et *in vitro* en culture, une expression de marqueurs spécifiques des PN I, PN II ou des cellules basales, ainsi que du canal sodique ENaC. Il a été démontré que cette population cellulaire délivrée par voie intra-trachéale, s'intègre préférentiellement au niveau de zones lésées par le naphtalène (Wong *et al.,* 2009).

Le tissu adipeux, comme la moelle osseuse, dérive du mésoderme embryonnaire. Facilement isolable et abondant, le tissu adipeux présente également une population de cellules souches adultes. Ces cellules sont capables comme les CSM, de se différencier, en présence des facteurs d'induction spécifiques, en lignées mésodermiques (adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes, myoblastes), ainsi qu'en cellules présentant des caractéristiques morphologiques de cellules neuronales suggérant un potentiel de différenciation ectodermique (Zuk *et al.,* 2001 ; Zuk *et al.,* 2002 ; Rodriguez *et al.,* 2004). Ces cellules présentent une capacité d'autorenouvellement importante *in vitro* (Rodriguez *et al.,* 2004), ainsi qu'un profil d'expression, à la fois commun aux CSM (expression de la CD29, du CD44, du CD71 ..., absence d'expression des marqueurs de la lignée hématopoïétique : CD31, CD34 et CD45) et différent en exprimant le CD49f (intégrine  $\alpha$ 4) (Zuk *et al.,* 2002). Une étude récente menée en 2010, a mis en évidence que les cellules souches adultes dérivées du tissu adipeux humain, présentent la capacité *in vivo*, après injection dans des souris immunodéficientes préalablement irradiées, de se différencier en hépatocytes ainsi qu'en cellules épithéliales du tractus gastrointestinal et des bronches (Fang *et al.,* 2010).

# III. IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES / PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM BRONCHIOLAIRE HUMAIN ADULTE

# A. MATERIELS ET METHODES

## 1. Microdissection des bronchioles humaines

L'utilisation d'échantillons biologiques humains est autorisée par l'article L1245-2 du Code de Santé Publique, modifié par la loi Bioéthique 94-654.

Les tissus pulmonaires humains ont été obtenus à l'occasion de résections pulmonaires dans le cadre d'une chirurgie pour cancer, à distance de tumeurs bronchopulmonaires. Les prélèvements ont été expédiés au laboratoire dans un milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Gibco BRL, Paisley, Royaume Uni) supplémenté de 25 mM d'HEPES (4(2HydroxyEthyl) 1PiperazineEthaneSulfonic acid) (Gibco BRL) et d'antibiotiques (pénicilline 200 U/mL et streptomycine 200 µg/mL) (Gibco BRL).

Les bronchioles humaines, identifiées par l'absence de cartilage et d'un diamètre inférieur ou égal à 1 mm, ont été microdisséquées sous loupe binoculaire. Les bronchioles ainsi isolées ont été ensuite soigneusement lavées, sous agitation à 4 °C, dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) contenant les cations Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> (Gibco BRL), puis nettoyées de tout parenchyme et enfin retournées pour exposer l'épithélium bronchiolaire au milieu.

## 2. Dissociation des cellules épithéliales bronchiolaires

Les cellules épithéliales bronchiolaires ont été dissociées de leurs tissus après une incubation pendant une nuit à 4 °C en présence de collagénase de type XIV de *Streptomyces griseus* (Pronase E) (SigmaAldrich, Saint Quentin Falavier, France) à 1 mg/mL dans du milieu RPMI-HEPES. Après agitation manuelle des bronchioles, les lambeaux de cellules épithéliales détachés ont été récupérés, centrifugés à 1200 rpm pendant 5 minutes, puis resuspendus dans une solution d'acétylcystéine à 2,5 % (P/V) (Bristol-Myers Squibb, Reuil-Malmaison,

France) dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco BRL), pendant 20 minutes à 37 °C, afin de digérer le mucus sécrété. Les lambeaux épithéliaux ont à nouveau été centrifugés puis les cellules épithéliales ont été isolées les unes des autres par une incubation en trypsine/versène (4,2 % de trypsine (P/V) ; 0,33 % d'EDTA (P/V) et 1,42 % de NaCl (P/V) dans du PBS) pendant 45 secondes à T° ambiante. L'activité enzymatique a été stoppée par l'ajout de milieu de culture DMEM contenant 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (GibcoBRL). Après centrifugation et resuspension dans du milieu de culture, les cellules épithéliales bronchiolaires individualisées ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez avant leur ensemencement en culture cellulaire, ou leur utilisation pour une analyse de marqueurs des cellules épithéliales bronchiolaires ou en tri cellulaire par cytométrie en flux.

### 3. Etude histologique

#### *a)* Fixation des tissus et des membranes de culture en Interface Air-Liquide (IAL)

#### (1) Tissus pulmonaires humains

Les prélèvements de tissus pulmonaires humains contenant des portions de voies respiratoires bronchiolaires ont été cryofixés en les incluant dans de l'O.C.T (Optimum Cutting Temperature compound, TissueTek, Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, PaysBas), refroidis et durcis par les vapeurs d'azote liquide, puis conservés à -80 °C, avant la réalisation de sections tissulaires à froid.

# (2) Epithelia bronchiolaires régénérés en culture en IAL

Les membranes soutenant les épithélia différenciés après 30 jours de culture en IAL, régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées ou à partir des cellules basales triées, ont été séparées de leur insert à l'aide d'une lame de bistouri puis fixées au Lillie (Formaldéhyde 5 %, pH 7), déshydratées dans un gradient d'Ethanol avant d'être incluses en paraffine. Les blocs ont été conservés à température ambiante avant la réalisation des sections.

#### b) Etudes histologiques des échantillons biologiques

Pour l'analyse histologique des épithélia bronchiolaires natifs ou régénérés *in vitro* en IAL, des sections de 5 à 7 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (cryostat CM3050, Leica, Allemagne) ou d'un microtome (Microtome, Microm HM340E, Microm International GmbH, Walldorf, Allemagne), à partir des blocs cryofixés de tissus pulmonaires et des blocs en paraffine, puis déposées sur des lames de microscopie SuperFrost Plus (O. Kindler GmbH, Germany). Les coupes de tissu pulmonaire ont été, soit colorées avec le kit Rapid Chrome à l'hématoxyline-éosine (Shandon Rapid Chrome<sup>™</sup> Staining kit, Thermoscientific), soit conservées à -20 °C. Les coupes en paraffine des cultures en IAL ont été soit conservées à température ambiante, soit déparaffinées par des bains succéssifs de xylène puis réhydratées dans des bains d'éthanol de 100 % à 50 % puis en PBS, et finalement colorées avec le kit Rapid chrome à l'hématoxyline/éosine. Les images des coupes de tissus respiratoires et d'épithélia bronchiolaires régénérés *in vitro* ont été réalisées à l'aide du microscope Axiolmager (Zeiss, Oberkochen, Germany) et du logiciel AxioVision (Zeiss).

# 4. Etude de l'expression de différents marqueurs des cellules épithéliales bronchiolaires par immunohistochimie et immunocytochimie

#### a) Les anticorps utilisés

Pour réaliser notre étude, les anticorps suivants ont été utilisés : l'anti-cytokératine 13 (CK13) humaine monoclonal murin (IgG1, clone KS-1A3 ; 1/1000, Sigma Aldrich), l'anti-CD151 humain monoclonal murin (IgG1 $\kappa$ , clone 14A2.H1 ; 1/50, BD Biosciences), l'anti- $\Delta$ Np63 humain monoclonal murin (IgG2a, clone 4A4 ; 1/50, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA), l'anti-cavéoline 1 $\alpha$  humaine monoclonal murin (IgG2b, clone 7C8 ; 1/50, Santa Cruz Biotech.)

pour la détection des cellules basales, l'anti-β-tubuline humaine monoclonal murin (IgG2b ; 1/3000, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) exprimée par les cellules ciliées, l'anti-MUC-5AC humaine monoclonal murin (IgG1, clone NCL; 1/100, Novocastra, Newcastle, Royaume Uni) pour la détection des cellules mucosécrétantes caliciformes, l'anti-CK18 humaine monoclonal murin (IgG1, clone CY-90; 1/1000, Sigma Aldrich) exprimée par les cellules cylindriques au sein d'un épithélium mature. La protéine Clara Cell 10 (CC10), exprimée par les cellules de Clara a été détectée grâce à l'anticorps anti-CC10 humain polyclonal caprin (IgG, clone S-20; 1/50, Santa Cruz biotechnology). La polarisation de l'épithélium régénéré a été mise en évidence par l'anticorps anti-Zonula-Occludens-1 (ZO-1) monoclonal murin (IgG1k, clone ZO1-1A12; 1/20, Zymed Laboratories, San Francisco, Etats-Unis). Les témoins négatifs correspondant à chaque marquage ont été réalisés en utilisant des IgG non immunes murines, de rat ou caprines à la place des anticorps primaires, leur dilution étant ajustée à la concentration utilisée pour les anticorps primaires. Les anticorps secondaires anti-souris et anti-rat, ainsi que l'anticorps secondaire anti-chèvre, ont été utilisés directement couplés à une Alexa Fluor 488 ou à une Alexa Fluor 594 (IgG H+L ; 1/200, Molecular Probes, Eugene, OR). Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Sigma-Aldrich) ou l'hématoxyline de Harris (Shandon, Runcorn, Uniteg Kingdom) ont été utilisés pour contrecolorer les noyaux.

#### b) Immunohistochimie

#### (1) Sur cultures entières

La polarisation des épithélia, régénérés à partir des cellules épithéliales bronchiolaires humaines non triées, ou à partir des cellules basales bronchiolaires triées, a été évaluée par la détection immunocytochimique de la protéine ZO-1 sur culture entière. Pour cela, après 30 jours de culture en Interface Air-Liquide, les membranes ont été rincées au PBS puis fixées en Méthanol à -20 °C. Les membranes ont alors été rincées au PBS puis ont été séparées de leur insert à l'aide d'une lame de bistouri. Le protocole utilisé pour la détection immunocytochimique est récapitulé dans le tableau ci-dessous.

ETAPES	SOLUTIONS UTILISEES	TEMPS / TEMPERATURE
Saturation des sites non spécifiques	PBS-BSA 3%	1 heure à T°C ambiante
Anticorps primaire	Dilution en PBS-BSA 3%	1 nuit à 4 °C
Rinçage	PBS	15 minutes à T °C ambiante
Anticorps secondaire couplé Alexa	Dilution en PBS-BSA 3%	45 minutes à T °C ambiante
Rinçage	PBS	15 minutes à T °C ambiante
Contre-coloration des noyaux	DAPI ou Hématoxyline de Harris	10 minutes ou quelques secondes à T °C ambiante
Rinçage (Hématoxyline de Harris)	Eau puis PBS	30 secondes à T °C ambiante
Rinçage (DAPI)	PBS	5 minutes à T °C ambiante

#### Tableau 2 : Protocole de détection protéique par immunohisto/cytochimie.

Les membranes ont alors été montées entre lames et lamelles avec du milieu de montage Aquapolymount (Polysciences, Warrington, PA), et conservées à 4 °C à l'obscurité avant l'acquisition des images en fluorescence à l'aide d'un microscope AxioImager équipé d'une caméra CoolSnap FX (Roper Scientific, Duluth, GA). Les images ont été obtenues à l'aide du logiciel Axiovision 4.8 (Zeiss).

#### (2) Sur cryocoupes de tissus pulmonaires

Les cryocoupes congelées à -20 °C ont été séchées à température ambiante. L'étude de l'expression de la CC10 a nécessité une étape préalable de fixation des coupes tissulaires, au Paraformaldéhyde 4 % en PBS pendant 15 minutes, suivi d'un rinçage au PBS et d'une incubation au Triton X100 (Sigma) à 0,02 % de 5 minutes. Les autres marqueurs étudiés n'ont

pas nécessité d'étapes de fixation. Les lames ont alors subi le protocole décrit dans le tableau (paragraphe III.A.4.b.1). Des lamelles de verre ont été montées sur les lames avec du milieu de montage Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington, PA), et les lames ont été conservées à 4 °C, à l'obscurité, avant l'acquisition des images en immunofluorescence. Pour la réalisation du double marquage CC10/CK13, les coupes ont tout d'abord été marquées avec l'anticorps anti-CC10 en révélant cet anticorps avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les coupes ont été rincées en PBS, puis à nouveau saturées avec du PBS-BSA 3 % pendant 1 heure et incubées avec le second anticorps primaire anti-CK13, révélé avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594. Les témoins négatifs correspondant à chaque marquage ont été réalisés en remplaçant les anticorps primaires par des IgG non immunes, ou en substituant l'anticorps primaire ou secondaire par du PBS-BSA 3 %.

#### (3) Sur cellules cytocentrifugées

Les cellules épithéliales bronchiolaires non triées, ainsi que les cellules basales et cylindriques bronchiolaires triées, ont été cytocentrifugées à la densité de 2x10<sup>4</sup> cellules/lame, à la vitesse de 750 rpm pendant 10 min, sur des lames de microscopie SuperFrost à l'aide du Cytospin 2 (Thermo-Shandon) puis conservées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

L'étude de l'expression de la CC10 a nécessité une étape de fixation des cellules, au Paraformaldéhyde 4 % en PBS, suivi d'une incubation au Triton X100 à 0,02 %. Pour l'étude des autres marqueurs, les cellules épithéliales bronchiolaires cytocentrifugées, ont été fixées au Méthanol à -20°C pendant 10 minutes, puis rincées en PBS pendant 15 minutes. Les cellules ont ensuite subi le protocole décrit dans le tableau (paragraphe III.A.4.b.1). Les témoins négatifs ont été réalisés en remplaçant les anticorps primaires par des IgG non immunes.

Dans le but d'étudier la co-expression de la CK13 et du CD151, les cellules ont été d'abord incubées avec l'anticorps primaire anti-CD151, révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Après une étape de rinçage au PBS suivie d'une période de saturation en PBS-BSA 3 %, les cellules ont été incubées en présence des fragments Fab

(H+L) anti-souris, dans le but de bloquer les sites de liaison libres de l'anticorps primaire anti-CD151. Après une étape de lavage en PBS, les cellules épithéliales ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-CK13 pendant 1 heure, révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594. Les témoins négatifs correspondant à chaque marqueur ont été réalisés en substituant les anticorps primaires par des IgG non immunes. Les noyaux des cellules ont été contre-colorés à l'hématoxyline de Harris et les lames ont été montées pour leur observation en microscopie à fluorescence.

#### (4) Sur cellules en suspension

1 à 2.10<sup>6</sup> cellules épithéliales bronchiolaires humaines dissociées ont été suspendues en présence d'une solution de PBS-BSA 3% pendant 20 à 30 minutes, à 4 °C sous agitation permanente. Les cellules ont ensuite été centrifugées (1200 rpm, pendant 5 minutes) puis incubées avec une solution d'anticorps primaire dilué en PBS-BSA 1 %, pendant 30 minutes à 4 °C sous agitation. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois en PBS, centrifugées, puis incubées dans une solution d'anticorps secondaire couplé à un Alexa dilué en PBS-BSA 1 % pendant 30 minutes à 4 °C sous agitation. Les cellules ont été lavées en PBS et centrifugées avant d'être resuspendues en PBS à une densité de 5x10<sup>5</sup> cellules/mL, cytocentrifugées et finalement fixées et perméabilisées à l'éthanol 70 %. Les noyaux ont été contre-colorés à l'hématoxyline de Harris, puis les lames ont été montées avant leur observation au microscope. Les témoins négatifs correspondant à chaque marqueur ont été réalisés en substituant les anticorps primaires par des IgG non immunes.

### 5. Analyse et tri cellulaires par cytométrie en flux

#### a) Principe

Cette technique permet de caractériser, en termes de taille, de complexité relative et de fluorescence, une cellule isolée à l'intérieur d'un flux liquidien. Les cellules isolées passent dans une chambre d'analyse, traversée par une source excitatrice (Laser), permettant d'obtenir, pour chaque cellule, des caractéristiques de taille relative (Forward Scatter, FSC),

de granulosité relative (Side Scatter, SSC, rendant compte de la complexité cellulaire en termes d'organites), ainsi que l'intensité de la fluorescence émise après l'excitation des fluorochromes couplés aux anticorps d'intérêts fixés à la cellule. Les signaux optiques réémis sont récupérés par différents détecteurs appelés photomultiplicateurs, puis convertis en signaux numériques traités sur un ordinateur à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Biosciences).

#### b) Les anticorps utilisés

Pour réaliser notre étude, les anticorps suivants ont été utilisés : l'anti-CD151 humain monoclonal murin couplé à la PE (Phycoérythrine) (IgG1κ, clone 14A2.H1, 6  $\mu$ L/10<sup>6</sup> cellules) et son isotype contrôle lgG1 non-immun de souris couplé à la PE (clone MOPC-21, 6  $\mu$ L/10<sup>6</sup> cellules) proviennent de BD Biosciences, l'anti-CK13 humaine monoclonal murin (IgG1, clone KS-1A3; 1/1000, Sigma Aldrich), l'anti-β-tubuline humaine monoclonal murin (IgG2b ; 1/3000, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France), l'anti-MUC-5AC humaine monoclonal murin (IgG1, clone NCL ; 1/100, Novocastra, Newcastle, Royaume Uni), l'isotype contrôle IgG1 non-immun murin (clone DAK-GO1, 1/500, DakoCytomation, Trappes, France), l'anti-CC10 humain polyclonal de chèvre (IgG, clone S-20 ; 1/50, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) et son isotype contrôle IgG1 non-immun de chèvre. Les anticorps secondaires antisouris de chèvre, ainsi que l'anticorps secondaire anti-chèvre fabriqué chez l'âne, sont couplés respectivement à l'Alexa Fluor 488 et à l'Alexa Fluor 594 (IgG H+L ; 1/200, Molecular Probes, Eugene, OR).

#### c) Préparation des cellules épithéliales

Les cellules bronchiolaires humaines isolées ont été lavées en PBS contenant 2 mM d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique) (PBS-EDTA) (Sigma). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1200 rpm pendant 5 minutes puis suspendues dans du PBS-EDTA contenant 2 % de BSA (Bovine Serum Albumin) (PBS-EDTA-BSA 2 %) (Sigma) pendant 30 minutes à 4°C et sous agitation permanente, afin de saturer les sites non spécifiques de reconnaissance des anticorps.

#### (1) Etude de l'expression de la CK13 et du CD151

2.10<sup>6</sup> cellules épithéliales ont été perméabilisés (10 minutes à 4 °C) en présence de 0,1 % de Saponine (Sigma Aldrich) diluée en PBS. Après un lavage au PBS-EDTA, les cellules ont été séparées en deux lots (1x10<sup>6</sup> cellules) et incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps anti-CK13, ou l'IgG1 non-immun de souris, rincées en PBS-EDTA puis révélé à l'aide de l'anticorps anti-souris-Alexa 488 (30 minutes, 4 °C). 1.10<sup>6</sup> cellules a été directement incubé, pendant 30 minutes, en présence de l'anticorps anti-CD151-PE ou de son isotype contrôle couplé à la PE. Les échantillons cellulaires ont été rincés deux fois en PBS-EDTA, centrifugés, et finalement suspendus dans 500 µL de PBS-EDTA. L'étude de l'expression de la CK13 et du CD151 a été analysée à partir d'un cytomètre FACSCalibur (BD Biosciences), afin de mettre en évidence la population des cellules basales au sein des cellules épithéliales bronchiolaires humaines.

#### (2) Caractérisation des cellules cylindriques

Les cellules épithéliales ont été perméabilisées avec une solution de 0,1 % de saponine. Après un rinçage au PBS-EDTA, les cellules ont été séparées en différents lots de 1.10<sup>6</sup> cellules, puis incubées pendant 30 minutes, à 4 °C sous agitation, en présence des anticorps anti-MUC-5AC (spécifique des cellules caliciformes), anti-β-tubuline (spécifique des cellules ciliées) et anti-CC10 (spécifique des cellules de Clara). Les IgG1 non-immunes murines ou caprines ont été utilisées comme isotypes contrôles. Les échantillons cellulaires ont été rincés en PBS-EDTA puis incubés en présence des anticorps secondaires anti-souris-Alexa 488 ou anti-chèvre-Alexa 594 pendant 30 minutes. L'ensemble des échantillons cellulaires a été rincé en PBS-EDTA, centrifugé et les cellules finalement suspendues en PBS-EDTA préalablement à leur analyse en cytométrie en flux (FACSCalibur), afin de déterminer la composition en termes de pourcentage, des cellules ciliées, caliciformes ou de Clara au sein des cellules cylindriques bronchiolaires humaines.

# (3) Tri des cellules basales et cylindriques de l'épithélium bronchiolaire humain

Ce tri est réalisé grâce au fractionnement du jet liquide contenant les cellules épithéliales bronchiolaires. Ce jet va se fractionner en un point précis appelé point de rupture, pour donner des gouttes caractérisées par leur position et leur moment d'apparition. Lors de l'analyse, selon les critères définis par l'utilisateur, le programme de tri va décider de l'isolement ou non des cellules contenues dans les gouttes. Ainsi, après la détection d'une cellule d'intérêt, le cytomètre va charger électriquement le jet au moment de la formation de la goutte contenant cette cellule. Les gouttes chargées, contenant une cellule à trier, vont passer entre des plaques de déflection fortement chargées, et vont être déviées du côté de la plaque de polarité opposée, pour finalement être collectées dans un tube. En appliquant différents niveaux de charges, il est possible de trier, dans notre étude, les cellules basales et cylindriques simultanément sur le cytomètre trieur FACSAria (BD Biosciences). Ce trieur cellulaire présente 3 sources d'excitation LASER, rouge (longueur d'onde d'excitation de 633 nm), bleu (longueur d'onde d'excitation de 488 nm) et violet (longueur d'onde d'excitation de 407 nm), et est capable de réaliser une analyse de la fluorescence à très grande vitesse, de manière individualisée et multiparamétrique. 13 paramètres de fluorescence peuvent ainsi être analysés pour chaque cellule en plus des caractéristiques de taille relative (FSC) ou de granulosité relative (SSC).

Les cellules épithéliales bronchiolaires, saturées en présence de PBS-EDTA-BSA 2 %, ont été incubées avec l'anticorps anti-CD151-PE dilué dans le PBS-EDTA-BSA 1 %, pendant 40 minutes à 4 °C sous agitation. Le témoin négatif de cette étude a été réalisé en utilisant l'isotype contrôle IgG1 non-immun murin couplé à la PE. La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; 1/1000, incubation de 10 minutes), marquant les cellules présentant une altération de leur intégrité. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois en PBS-EDTA, centrifugées puis finalement suspendues dans cette même solution préalablement au tri cellulaire par cytométrie en flux.

A partir des caractéristiques déterminées lors des analyses en cytométrie en flux (FACS Calibur), les cellules basales CD151<sup>+</sup> et les cellules cylindriques CD151<sup>-</sup> ont été isolées à partir d'une population de cellules épithéliales bronchiolaires hétérogène.

Les cellules basales CD151<sup>+</sup> et la population des cellules cylindriques CD151<sup>-</sup> ont d'abord été prédéfinies à partir d'un graphique SSC-A vs. FSC-A (A= Area) à partir de la population des cellules épithéliales bronchiolaires totales. Les cellules mortes (DAPI positives) ont été éliminées dans chacune des populations à trier à partir d'un graphique DAPI-A vs. FSC-A et les agrégats et les doublets de cellules ont été exclus à l'aide des graphiques SSC-W vs. SSC-H (granulosité relative) et FSC-W vs. FSC-H (taille relative) (W=Width ; H=Height). Enfin, les populations de cellules basales (CD151<sup>+</sup>) et cylindriques (CD151<sup>-</sup>) ont été validées à partir d'un graphique PE-A vs. FSC-A, en fonction de leur expression ou non du CD151. Les populations cellulaires ont été triées simultanément à une fréquence de 30 MHz, à une vitesse de 3000 à 4000 événements/s et en utilisant une option de tri permettant d'obtenir le meilleur ratio rendement/pureté possible pour les cellules triées.

Pour ces expérimentations, un échantillon des cellules non triées d'épithélium bronchiolaire (contrôle) a subi les mêmes procédures expérimentales de dissociation, d'isolement puis de lavages en PBS-EDTA, mais n'a pas été incubé en présence de l'anticorps d'intérêt, ni passé dans le cytomètre-trieur. Une partie des cellules non triées a également été utilisée pour déterminer la viabilité des cellules épithéliales bronchiolaires totales (marquage au DAPI).

Après chaque tri, la pureté des populations triées CD151<sup>+</sup> et CD151<sup>-</sup> a été évaluée, par une réanalyse en cytométrie en flux et en immunocytochimie (uniquement les cellules basales), en étudiant l'expression de la CK13, à partir d'une fraction de cellules triées puis cytocentrifugées.

# 6. Culture des cellules basales et cylindriques bronchiolaires triées *in vitro*

#### a) Culture cellulaire à l'interface Air-Liquide

Les cellules épithéliales bronchiolaires non triées, ainsi que les cellules basales et les cellules cylindriques, triées par cytométrie en flux, ont été ensemencées, *in vitro*, dans des inserts de culture définissant des compartiments basaux et apicaux, séparés par une membrane poreuse en polyester (Transwell clear, 12 mm de diamètre et pores de 0,4 µm, COSTAR).

Les membranes poreuses ont été préalablement recouvertes, pendant 2h à température ambiante, d'une solution de collagène de type IV à 200 µg/mL (Sigma Aldrich, type VI). Les membranes ont ensuite été rincées au PBS, puis les cellules épithéliales humaines triées ou non ont été ensemencées à raison de 18,3. 10<sup>4</sup> cellules par cm<sup>2</sup> et cultivées à 37 °C en atmosphère humide, et en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été cultivées dans deux types de milieu de prolifération en condition Liquide/Liquide (milieu de prolifération dans les compartiments apicaux et basaux), jusqu'à obtention de la confluence cellulaire: d'une part, un milieu commercial appelé CnT-17 (CELLNTEC Advenced cell systems, milieu spécifique développé pour favoriser la prolifération des cellules progénitrices de l'épithélium des voies aériennes) et d'autre part, un milieu de prolifération préparé au sein de notre laboratoire (d'après les travaux menés par Leichneret al.en 1985 (Lechner et LaVeck, 1985)) composé de DMEM/Ham F-12 (Gibco BRL) (3/1; vol/vol) supplémenté avec 0,87 μM d'insuline bovine, 2,7 μM d'épinéphrine, 35 μg/mL d'extrait pituitaire bovin, 5 µM d'éthanolamine, 65 nM de transferrine humaine, 1,38 µM d'hydrocortisone, 9,7 µM de 3,3',5-triiodo-L-thyronine, 1,6 nM d'EGF recombinant humain, 30 nM d'acétate de rétinyl, 5 µM d'O-phosphoryléthanolamine, 30 nM de sélénite de sodium, 1 nM de chlorure de manganèse tetrahydraté, 1 nM de molybdate d'ammonium tetrahydraté, 0,5 μM de métasilicate de sodium déshydraté, 5 nM de vanadate d'ammonium, 1 nM de sulfate de nickel hexahydraté, 0,5 nM de chlorure d'étain dihydraté (Sigma Aldrich), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

A confluence, le milieu du compartiment apical a été éliminé, le tapis cellulaire confluent a été rincé au PBS, puis le milieu du compartiment basal a été remplacé par un

milieu favorisant la différenciation de l'épithélium respiratoire humain (condition Air/Liquide). Ce milieu de différenciation est composé de DMEM/BEBM (Bronchial Epithelial cell Basal Medium) (LONZA, Vervier, Belgique) (1/1 ; vol/vol) supplémenté en EGF humain recombinant (0,5 mg/l), en épinéphrine (5 mg/l), en BPE (0,13 g/l), en hydrocortisone (0,5 mg/l), en insuline (5 mg/l), en triiodothyronine (6,5 mg/l), en transferrine (0,5 mg/l) (LONZA, Vervier, Belgique), ainsi qu'en pénicilline (200 U/mL), en streptomycine (200 mg/l), en acide rétinoïque (0,1 nM) et en BSA (1,5 mg/l) (Sigma Aldrich). Le milieu de différenciation a été remplacé dans le compartiment basal, toutes les 48 heures, pendant toute la durée de la culture.

L'état de différenciation et la fonctionnalité des épithélia bronchiolaires régénérés à partir de cellules basales triées ou de cellules épithéliales non triées ont été analysés, à 30 jours de culture en IAL.



Figure 19 : Schéma de culture en interface air-liquide

#### b) Recueil des sécrétions apicales de cultures en IAL

A 30 jours de culture en IAL, les sécrétions apicales des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales non triées ou de cellules basales triées ont été collectées. Pour cela, les compartiments apicaux et basaux des cultures ont préalablement été rincés au PBS, puis 100 µl de milieu de différenciation, sans antibiotiques et non complémenté composé de DMEM/BEBM (1/1; vol/vol) ont été ajoutés dans les deux compartiments et incubés pendant 4 heures à 37 °C en atmosphère humide, et en présence de 5 % de CO2. Seules les sécrétions apicales ont été recueillies, centrifugées 5 minutes à 12000 rpm à 4 °C pour éliminer tout résidu cellulaire, puis conservées à -80 °C. Les capacités de défense antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'un dosage de la protéine de sécrétion CC10, par la technique ELISA ont été analysées.

## 7. Fonctionnalité des épithélia régénérés

### a) Etude des propriétés bioélectriques des épithélia régénérés en chambre de Ussing

#### (1) Historique

La technique de mesure des propriétés bioélectriques en Chambre de Ussing a été mise au point au début des années 50 par Hans H. Ussing (Ussing et Zerahn, 1951) dans le but d'évaluer les transports ioniques à travers la peau de grenouille. Cette technique permet d'étudier, *in vitro*, la résistance transépithéliale en appliquant la loi de Ohm (R, en m $\Omega$ /cm<sup>2</sup>), ainsi que les variations du courant de court-circuit ( $\Delta$ lsc en  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>) à travers une membrane biologique, dans notre cas les cultures en IAL. On peut ainsi distinguer les transports actifs des transports passifs des ions à travers ces membranes.

#### (2) Solutions et activateurs pharmacologiques

Le milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (GIBCO, Invitrogen) est une solution saline composée de : CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.493 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, KCl 5.33 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.441 mM, NaCO<sub>3</sub> 4.17 mM, NaCl 137.93 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.338 mM et D-glucose 5.56 mM. La fonctionnalité des épithélia régénérés a été évaluée en utilisant deux modulateurs des transports ioniques. L'amiloride (Sigma) est une substance chimique capable de bloquer les canaux épithéliaux sodiques apicaux (ENaC= epithelial Na<sup>+</sup> channel). La solution stock (10<sup>-3</sup> M) dans du DMSO, est diluée au 1/10 dans du tampon HBSS et ainsi utilisée au 10<sup>-4</sup> M au cours de nos études. La forskoline (Sigma) est un activateur de la sécrétion de chlore AMPc-dépendante par le canal CFTR. La solution stock (25 mM) dans du DMSO, est diluée au 1/100 en présence de la solution d'amiloride précédemment préparée et de tampon HBSS.

#### (3) Montage

Les membranes de culture supportant les épithélia bronchiolaires régénérés à partir de cellules épithéliales totales ou de cellules basales triées, ont été séparées de leurs inserts à l'aide d'une lame de bistouri, puis placées dans une chambre de Ussing sur filtre perméable, dispositif constitué de deux demi-chambres en plexiglas emboitées, reliées chacune à un réservoir et séparées par l'épithélium polarisé. Un compartiment apical et un compartiment basolatéral sont ainsi créés, remplis de tampon HBSS au niveau des réservoirs, et thermostatés à 37 °C à l'aide du support des chambres chauffant. La solution de HBSS circule grâce à un système de bullage (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>), système permettant l'oxygénation des cellules épithéliales sur le filtre, ainsi que l'homogénéisation des solutions biologiques utilisées.

Pour mesurer le voltage, le courant électrique et la résistance, chaque chambre en plexiglas est reliée par des ponts électrolytiques (agar-agar 4% dans du KCl 3M) à différentes électrodes, elles-mêmes reliées à un amplificateur (World Precision Instrument, v1.804, Aston, United Kingdom). Le signal de sortie est enregistré et traité par ordinateur, à l'aide du logiciel d'acquisition Data Trax).

#### (4) Procédure expérimentale

Les membranes de culture en IAL, présentant les épithélia bronchiolaires bien différenciés, ont été placées dans une chambre de Ussing. Les deux faces de la membrane sont baignées dans du tampon HBSS, à 37 °C et homogénéisé à l'aide du système de bullage, et laissé à équilibrer pendant environ 15 minutes. La résistance transépithéliale ( $R=\Delta U/\Delta I$ ) a été mesurée après imposition d'un courant de 30mV. Ensuite, les substances modulatrices des flux ioniques (amiloride et forskoline) ont été ajoutées séquentiellement dans le bain apical baignant l'épithélium bronchiolaire.

Le courant de court-circuit, défini comme étant le courant devant être appliqué à la couche de cellules épithéliales pour amener le potentiel transépithélial à zéro, est le reflet du mouvement global des ions du côté apical vers le côté basolatéral et inversement. Le courant de court-circuit a été mesuré après l'addition d'amiloride à  $10^{-4}$  M et de forskoline à 250  $\mu$ M.

#### b) Fréquence des battements ciliaires

Une mesure de la fréquence des battements ciliaires, reflet de la fonction de clairance mucociliaire, a été réalisée à partir des épithélia régénérés après 30 jours de culture en IAL. Les épithélia régénérés ont été préalablement rincés au PBS dans le but d'éliminer tout débris cellulaire ou toute sécrétion épithéliale muqueuse, puis placés sous un vidéomicroscope, dans une enceinte de culture à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Une caméra CCD (JAI PULNIX T760, San Jose, CA, USA) enregistre plusieurs champs d'observation par cultures. Les battements de cils observés, montés en un film vidéo, vont créer des variations de luminosité traduites en un signal numérique qui sera analysé par Transformée de Fourier, permettant de calculer une fréquence de battements ciliaires (en Hertz). Les mesures de fréquence des battements ciliaires non triées, et de cellules basales triées de quatre patients différents, avec une moyenne de 10 champs d'observation par cultures.

### c) Capacités de défense anti-bactériennes vis-à-vis de Staphylococcus aureus

#### (1) Souches bactériennes de référence

La souche bactérienne Gram positif de *Staphylococcus aureus* (souche 8325-4) a été utilisée au cours de cette étude. La souche bactérienne a été conservée à -20 °C dans le milieu nutritif TSB (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) contenant 20 % (vol/vol) de glycérol.

# (2) Vérification de la pureté de la souche de *Staphylococcus aureus* et préparation de la suspension bactérienne

La pureté de la souche a été vérifiée avant chaque manipulation. La souche bactérienne a d'abord été repiquée sur une gélose Tryptocaséine Soja (TSA) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) pendant une nuit à 37 °C. 2 à 3 colonies ont ensuite été ensemencées dans 10 mL de bouillon Tryptocaséine Soja (TSB) (AES Laboratoire, Bruz, France), pendant une nuit, à 37 °C sous agitation (120 rpm). Après cette période, 2 mL de la suspension bactérienne ont été transférés dans un nouveau bouillon TSB (10 mL), pendant 2 heures à 37 °C sous agitation (120 rpm), permettant d'obtenir une phase exponentielle de croissance bactérienne.

Les bactéries ont ensuite été successivement centrifugées à 3500 rpm, pendant 15 minutes à 4 °C et rincées en PBS puis en eau stérile. Après ces étapes de lavage, les bactéries ont été suspendues dans de l'eau stérile et la Densité Optique (DO) a été mesurée à 630 nm. Le volume de la suspension a été ajusté avec de l'eau stérile dans le but d'obtenir une DO équivalente à 1, correspondant à 10<sup>9</sup> CFU/mL (CFU=Colony-Forming Unit). La suspension bactérienne a été ensuite diluée au 1/4000 soit 2,5.10<sup>5</sup> CFU/mL.

#### (3) Protocole expérimental

 $2 \mu$ L de suspension bactérienne (500 CFU) ont été incubés pendant 2h30, à 37 °C sous agitation permanente, en présence de 30  $\mu$ L de surnageants apicaux (dilués au 1/10),

collectés à partir de cultures épithéliales bronchiolaires régénérées à partir de cellules épithéliales non triées ou de cellules basales triées après 30 jours de culture en IAL. La solution (bactéries + surnageant) a été récupérée puis ensemencée sur une gélose TSA et incubée pendant 24 heures à 37 °C.

Les colonies apparues sur géloses ont été comptées et comparées à la condition contrôle (suspension bactérienne incubée en présence de milieu vide = DMEM/BEBM (1/1 ; vol/vol)). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de survie bactérienne par rapport à la référence obtenue en condition contrôle.

#### 8. Analyse de la sécrétion de la protéine CC10

#### a) Dosage de la concentration en protéines totales

Les surnageants recueillis à 30 jours de culture en IAL ont été décongelés, puis un dosage de la concentration en protéines totales à été réalisé à l'aide du kit BC Uptima Assay (Interchim, Montluçon, France), dosage colorimétrique reposant sur la méthode du Biuret. Une mesure de la DO a été réalisée à 562 nm, à l'aide du lecteur de microplaque Xenius (Safas, Monaco). Les points de gamme ainsi que les échantillons ont été dosés en triplicat. La concentration en protéines totales (µg/mL) de nos surnageants a été déterminée à partir d'une gamme étalon réalisée à partir de BSA.

#### b) Dosage de la protéine CC10 par ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est un test immunoenzymatique qui permet de doser une protéine d'intérêt dans des liquides biologiques. Cette technique permet de visualiser une réaction anticorps/antigène à l'aide d'une réaction colorimétrique produite par l'action d'une enzyme fixée à un anticorps secondaire (de révélation), sur un substrat chromogène. Le dosage de la protéine de sécrétion CC10 a été réalisé à l'aide du kit Human Clara Cell Protein (BioVendor, République Tchèque) dans les surnageants apicaux des cultures régénérées à partir de cellules basales triées ou de cellules épithéliales totales après 30 jours de culture en IAL, selon le protocole du fournisseur. La DO a été mesurée à 450 nm sur le lecteur de microplaque Xenius et la quantité de protéines a été déterminée à partir de la mesure de la DO rapportée à la gamme étalon. Les résultats du dosage ont été exprimés en ng de protéines CC10 dosées/µg de protéines totales.

### 9. Analyses statistiques

Les valeurs obtenues pour les mesures de la résistance transépithéliale, des courants de court-circuit, de la fréquence des battements ciliaires, des capacités de défense antibactériennes et des sécrétions de la protéine CC10, ont été soumises au test non paramétrique de Mann et Whitney. Une différence significative a été définie pour une  $p \le 0,05$ . Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

## **B. RESULTATS**

### 1. Approche expérimentale

Dans le but d'identifier les cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte selon notre hypothèse qu'il pourrait s'agir des cellules basales, il a fallu séparer les différentes populations épithéliales composant l'épithélium bronchiolaire humain, c'est-àdire les cellules basales, ainsi que les cellules ciliées, caliciformes et de Clara, afin d'évaluer leurs capacités progénitrices en réalisant des tests de fonctionnalité.

Tout d'abord, nous avons tenté d'identifier un ou plusieurs marqueurs membranaires spécifiques de l'une des populations cellulaires composant l'épithélium bronchiolaire, en considérant les cellules ciliées comme étant des cellules différenciées de façon terminale, incapables de proliférer et donc de régénérer un épithélium. La première étape a consisté à rechercher ces margueurs membranaires spécifiques sur des sections de tissus bronchiolaires natifs. Ensuite, l'expression du margueur potentiel retenu par les cellules épithéliales dissociées du tissu et isolées les unes des autres par traitement enzymatique a été analysée. Cette seconde étape a permis de vérifier que le marqueur identifié n'était pas altéré par la dissociation enzymatique pratiquée, et pouvait être utilisé pour le tri de la population cellulaire marquée en cytométrie en flux. La détection du marqueur retenu a alors été testée sur cellules épithéliales isolées et mises en suspension, afin de vérifier qu'il était bien spécifique d'une seule population cellulaire (étape 3). Les populations cellulaires ont alors été triées par cytométrie en flux en fonction de leur expression ou non du marqueur retenu et validé (étape 4), puis les populations cellulaires purifiées ont été testées afin de déterminer leur capacité à régénérer un épithélium bronchiolaire in vitro en culture en Interface Air-Liquide (étape 5). Enfin, la structure, le degré de différenciation et de cohésion des épithélia régénérés in vitro, ainsi que leur fonctionnalité (étape 6), ont été analysés (figure 20).



Figure 20 : Schéma de la démarche expérimentale suivie.

# 2. Caractérisation des cellules composant l'épithélium bronchiolaire humain adulte : mise en évidence de la présence de cellules basales

Nous avons tout d'abord caractérisé les populations cellulaires composant l'épithélium bronchiolaire humain adulte, par immunohistochimie sur des sections tissulaires (Figure 21). Nous avons mis en évidence l'expression de la β-tubuline, spécifique des cellules ciliées (A), du MUC-5AC, spécifique des cellules caliciformes (B) et du CC10, marqueur spécifique des cellules de Clara (C). Nous pouvons également observer l'expression d'un marqueur spécifiquement exprimé au niveau des cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte, la Cytokératine-13 (CK13) (C et D), mettant en évidence, au sein de notre matériel d'étude, une couche de cellules basales épithéliales bronchiolaires humaines, absente dans l'épithélium bronchiolaire murin.


# Figure 21 : Caractérisation des cellules composant l'épithélium bronchiolaire humain adulte par immunohistochimie.

Les coupes de tissus bronchiolaire humain ont été marquées avec des anticorps monoclonaux anti-βtubuline (A), anti-MUC-5AC (B), anti-CC10 (C) et anti-CK13 (C et D). Un double immunomarquage avec les anticorps anti-CC10 et anti-CK13 (C) a également été réalisé. Les anticorps anti-β-tubuline, anti-MUC5AC, anti-CC10 sont visualisés à l'aide d'anticorps secondaires polyclonaux couplés à l'Alexa®Fluor 488 et l'anticorps anti-CK13 est visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 594. Objectifs x5 (D) ; x10 (A et B) ; x20 (C).

### 3. Identification de marqueurs membranaires spécifiques des cellules épithéliales bronchiolaires humaines

Dans le but d'identifier les cellules présentant des capacités de cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte, nous avons analysé l'expression potentielle de

différents marqueurs membranaires des cellules épithéliales bronchiolaires, d'après les données établies dans la littérature, notamment concernant les cellules basales de l'épithélium trachéo-bronchique humain (Hajj *et al.*, 2007). En effet, les travaux menés sur les cellules souches ou progénitrices épithéliales bronchiolaires n'ont été réalisées, jusqu'à ce jour, qu'au niveau de modèles animaux, notamment murin, dont l'épithélium bronchiolaire ne présente pas de cellules basales.

#### a) La Cavéoline-1α

La cavéoline-1 est une protéine membranaire des cavéoles. La cavéoline-1 est un marqueur membranaire spécifique des cellules basales épithéliales bronchiques de souris. Cependant, elle a également été mise en évidence au niveau de la membrane des cellules basales et au niveau de la membrane basolatérale des cellules ciliées, dans les voies aériennes proximales chez l'homme et le rat, mais est absente des cellules épithéliales des petites bronches (Krasteva *et al.,* 2006). Nous avons observé que toutes les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain, provenant de 3 patients différents (Figure 22), expriment faiblement mais spécifiquement la cavéoline-1 $\alpha$ , au niveau de leur membrane plasmique (B). Ce marqueur est également résistant à la dissociation et à l'isolement enzymatique des cellules épithéliales bronchiolaires cytocentrifugées et perméabilisées. En effet, les cellules basales positives pour la CK13 expriment également la Cav-1  $\alpha$  (D).



Figure 22 : Expression de la Cavéoline-1 $\alpha$  (Cav-1 $\alpha$ ) par les cellules basales bronchiolaires humaines.

Les coupes de tissus et les cellules épithéliales bronchiolaires humaines dissociées après digestion enzymatique puis cytocentrifugées ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (A, C). Les coupes tissulaires ont été marquées avec un anticorps monoclonal anti-Cavéoline-1 $\alpha$  (B) et visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa<sup>®</sup>Fluor 488. Les cellules bronchiolaires dissociées ont été incubées avec les anticorps anti-Cavéoline-1 $\alpha$  et anti-CK13 (D) révélés à l'aide des anticorps secondaires couplés à l'Alexa<sup>®</sup>Fluor 488 et à l'Alexa<sup>®</sup>Fluor 594, respectivement (Objectif x20, C, D).

Cependant, un marquage de la Cav-1α réalisé sur des cellules épithéliales bronchiolaires en suspension mais non perméabilisées issues de 3 patients différents, ne montre aucune positivité sur les cellules basales bronchiolaires, ce qui est probablement du à un défaut d'accessibilité de l'épitope pour l'anticorps.

#### b) Le Facteur Tissulaire

Le Facteur Tissulaire (FT), également nommé CD142, est une glycoprotéine transmembranaire constituant le récepteur de surface du facteur de coagulation VII/VIIa. Au niveau des poumons, le FT est spécifiquement exprimé par les PN II et les macrophages

alvéolaires, ainsi que par les cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte, constituant ainsi un marqueur membranaire d'intérêt pour le tri de cette population par cytométrie en flux (Hajj *et al.,* 2007; Imokawa *et al.,* 1997).

Au niveau de l'épithélium bronchiolaire humain adulte, nous avons mis en évidence une faible expression de ce marqueur, au niveau de la membrane plasmique des cellules basales de trois patients différents (Figure 23, B). Cependant, nous avons observé, après la dissociation et l'isolement des cellules épithéliales de quatre patients différents, une absence de ce marqueur au niveau des cellules basales positives pour la CK13, indiquant, en plus de sa faible expression, sa grande sensibilité à l'enzyme de dissociation (D).



#### Figure 23: Expression du Facteur Tissulaire (FT) par les cellules basales bronchiolaires.

Les coupes de tissus, ainsi que les cellules épithéliales bronchiolaires humaines dissociées après digestion enzymatique puis cytocentrifugées ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (A, C). Les sections de tissus ont été marquées par un anticorps monoclonal anti-FT (B) et visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488. Les cellules épithéliales bronchiolaires ont été doublement immunomarquées avec les anticorps anti-FT et anti-CK13 (D) et révélés à l'aide des anticorps secondaires couplés à l'Alexa®Fluor 594 et à l'Alexa®Fluor 488, respectivement (Objectif x20, C, D).

### c) Le CD151

Le CD151 (Cluster of Differentiation 151, aussi appelé PETA-3 (platelet-EC tetra-span antigen 3)) est une protéine de surface cellulaire de la superfamille des tétraspanines, impliqué en tant que composant majeur dans les complexes pré-hémidesmosomes en interagissant avec les intégrines  $\alpha$ 6 et  $\beta$ 4. Le CD151 est exprimé par les cellules basales de l'épithélium bronchique humain (Hajj *et al.,* 2007).

Sur des tissus bronchiolaires adultes de cinq patients différents, nous avons mis en évidence l'expression spécifique du CD151 (Figure 24, B), colocalisé avec la CK13 (cytoplasmique, D), au niveau de la membrane plasmique péricellulaire de toutes les cellules basales (B, D).



#### Figure 24 : Expression du CD151 par les cellules basales.

Les coupes de tissu bronchiolaire humain ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (A) ou incubées avec des anticorps monoclonaux anti-CD151 (B), anti-CK13 (C) ou les deux (D). L'anticorps anti-CK13 est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 594 et l'anticorps anti-CD151 est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488.

De plus, comme le montre la figure 25, le CD151 est résistant à la dissociation enzymatique des cellules épithéliales de leur tissu. En effet, il est toujours exprimé (B) au niveau de la surface des cellules basales bronchiolaires exprimant la CK13 (C). Finalement, après le marquage des cellules épithéliales bronchiolaires non perméabilisées en suspension puis cytocentrifugées, le CD151 (F) est retrouvé exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules basales (G).



# Figure 25 : Validation de l'expression du CD151 par les cellules basales cytocentrifugées (A à D) ou en suspension (E à G).

Les cellules bronchiolaires dissociées ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (A, E) ou incubées avec des anticorps monoclonaux anti-CK13 (C, D, G), anti-CD151 (B, F, G) ou les deux (D, G). L'anticorps anti-CK13 est révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 594 et l'anticorps anti-CD151 est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488. Les flèches indiquent les cellules présentant une colocalisation significative des deux marqueurs (D), et les cellules basales exprimant le CD151 après un marquage des cellules en suspension (F). Barre = 20  $\mu$ m. En conclusion, parmi les trois marqueurs potentiels des cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain, seul le CD151 semble pouvoir être utilisé pour le tri de ces cellules.

# 4. Analyse puis tri des cellules épithéliales bronchiolaires humaines en cytométrie en flux

# a) Analyse de l'expression du CD151, du FT et de la CK13 par cytométrie en flux

Dans le but d'identifier la population des cellules basales parmi l'ensemble des cellules épithéliales bronchiolaires, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps dirigé contre la CK13 (Figure 26). A partir d'un graphique FSC vs. SSC (FSC = taille, SSC = granulosité), l'analyse en cytométrie en flux des cellules épithéliales bronchiolaires humaines adultes totales de trois patients différents, nous suggère que les cellules basales sont confinées au niveau de la population située dans le cadre inférieur gauche, que nous appelons « population analysée » (A), d'après des critères morphologiques (cellules de petites tailles et de faible granulosité). Ce résultat a été confirmé par l'expression spécifique de la CK13. La population des cellules basales représente 22,91 ± 4,2 % de la population analysée.

Sur la base des résultats précédemment obtenus, nous avons, à partir d'échantillons cellulaires totaux de trois patients différents, procédé à l'analyse de l'expression par cytométrie en flux, du CD151 et du FT, afin d'identifier et de valider le CD151 en tant que marqueur d'intérêt pour le tri des cellules basales CD151<sup>+</sup> et non-basales (CD151<sup>-</sup>) par cytométrie en flux, et de confirmer l'absence totale d'expression du FT.

D'une part, l'absence d'expression du FT par les cellules basales dissociées a été mise en évidence (C). De plus, nos analyses ont confirmé l'expression du CD151 (27,44 ± 1,9 % de la population analysée) par les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain, permettant de considérer le CD151 en tant que marqueur d'intérêt pour le tri des cellules basales et non-basales bronchiolaires par cytométrie en flux (D). L'absence des cellules basales doublement marquées par le CD151 et le FT a été confirmée (E).



Figure 26 : Localisation de la population des cellules basales par cytométrie en flux.

Localisation des cellules basales dans le nuage des cellules épithéliales bronchiolaires totales (A) par cytométrie en flux. Analyse de l'expression de la CK13 (B), du FT (C, E) et du CD151 (D, E) par les cellules basales épithéliales bronchiolaires humaines. Les isotypes contrôles, pour chaque marqueurs, ont été réglés sur la population analysée. Les cellules basales sont de petites tailles et peu complexes par rapport aux cellules non-basales (cylindriques). FSC= forward scatter (taille), SSC= side scatter (complexité ou granulosité).

### b) Tri des cellules épithéliales bronchiolaires par cytométrie en flux

### (1) Tri des cellules basales et des cellules nonbasales (cylindriques)

Dans le but de trier les cellules basales parmi les cellules épithéliales bronchiolaires, les cellules ont été marquées avec l'anticorps anti-CD151. Les cellules basales ainsi que les cellules non-basales de l'épithélium bronchiolaire humain ont été purifiées après un traitement des données informatiques, utilisant une série de graphiques de cytométrie en flux permettant de déterminer la population cellulaire à trier (figure 27).

Les cellules basales (P1) et la population des cellules non-basales (P6) ont été déterminées à partir du graphique FSC-A vs. SSC-A (Taille vs. Granulosité) (A = Surface (W+H), donnée regroupant le temps de passage d'une cellule devant le laser (W) et l'intensité de fluorescence émise par la cellule (H)). A partir des populations P1 et P6, les traitements des données informatiques ont été similaires. Tout d'abord, les cellules marquées au DAPI (cellules mortes) ont été éliminées à partir du graphique DAPI-A vs. FSC-A, donnant lieu aux populations P2 et P7 respectivement. Puis, les doublets et agrégats de cellules ont été éliminés de notre sélection (P3, P4 et P8, P9) à partir des populations P2 et P7. Enfin, les populations de cellules basales et non-basales, ont été triées (P5 et P10, respectivement) en fonction de leur expression du CD151.

Les populations de cellules basales  $CD151^+$  et non-basales  $CD151^-$ , ont été triées à partir d'échantillons de cellules épithéliales bronchiolaires totales de  $11,2 \pm 2,6 \times 10^6$  cellules, provenant de 8 patients différents. La viabilité globale (analyse au DAPI) de nos échantillons cellulaires, avant le tri, a été évaluée à 96,4 ± 1,2 %. Les populations cellulaires  $CD151^+$  et  $CD151^-$  triées ont été obtenues à hauteur de 1,019 ± 0,6  $\times 10^6$  et 0,2 ± 0,045  $\times 10^6$  cellules respectivement. Après chaque tri, la viabilité des deux populations a été réanalysée et a montré une viabilité cellulaire de l'ordre de 99,1 ± 0,5 % (cellules  $CD151^+$ ) et 97,1 ± 0,8 % (cellules  $CD151^-$ ).



Figure 27 : Tri des cellules épithéliales bronchiolaires par cytométrie en flux.

Les cellules basales (P1) et la population des cellules non-basales (cylindriques, P6) ont été identifiées au sein des cellules épithéliales totales. A partir des populations identifiées (P1 et P6), les cellules mortes (DAPI positives) ont été éliminées générant les populations P2 et P7, respectivement. Les agrégats et les doublets de cellules ont été exclus dans P3, P4 et P8, P9 (créés à partir de P2 et P7 respectivement). Enfin, les cellules basales (CD151<sup>+</sup>, P5) et la population des cellules non-basales (CD151<sup>-</sup>, P10) ont été triées, en fonction de leur expression ou non du CD151. A=Area ; A= H+W, H= Height, intensité de fluorescence émise par la cellule, W= Width, temps de passage d'une cellule devant le laser.

### (2) Contrôle de la pureté des populations triées

Après chaque expérience de tri cellulaire, les populations CD151<sup>+</sup> et CD151<sup>-</sup> ont été réanalysées par cytométrie en flux, ainsi que par immunocytochimie (uniquement les cellules basales en étudiant l'expression de la CK13, sur des cellules cytocentrifugées, et comptage manuel des cellules positives pour ce marqueur), dans le but d'évaluer la pureté de nos populations d'intérêt (Figure 28).

Les populations triées ont montré une pureté moyenne de 96,9  $\pm$  0,73 % (cellules CD151<sup>+</sup>) et de 96,4  $\pm$  1,31 % (cellules CD151<sup>-</sup>) en cytométrie en flux. Le pourcentage de pureté des cellules basales triées, évalué après une analyse de l'expression de la CK13, réalisée sur un aliquot de la population CD151<sup>+</sup> triée, a montré des résultats similaires aux résultats obtenus en cytométrie en flux (97,2  $\pm$  0,3 % de cellules basales CK13 +).



# Figure 28 : Analyse par cytométrie en flux et immunocytochimie de la pureté des populations cellulaires bronchiolaires épithéliales triées.

Après chaque tri cellulaire, les cellules basales CD151<sup>+</sup> et la population des cellules cylindriques CD151<sup>-</sup> ont été réanalysées dans le but d'évaluer leur pureté, d'une part par cytométrie en flux, et d'autre part, pour les cellules basales, par immunocytochimie en étudiant l'expression de la CK13. Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (Objectif x10).

# (3) Caractérisation de la population des cellules cylindriques bronchiolaires

Nous avons également déterminé la composition de la population hétérogène des cellules non-basales (CD151<sup>-</sup>), à partir de deux méthodes d'études, sur des échantillons cellulaires issus de trois patients différents. D'une part, nous avons analysé en immunocytochimie sur cellules cytocentrifugées l'expression des marqueurs spécifiques des populations composant l'épithélium bronchiolaire humain adulte. D'autre part, nous avons réalisé des analyses en cytométrie en flux, afin de quantifier les différentes sous-populations des cellules cylindriques de l'épithélium bronchiolaire humain adulte.

D'après le profil de cytométrie en flux établi au niveau du graphique FSC-A vs. SSC-A, les cellules non-basales sont composées de cellules présentant une taille ainsi qu'une complexité supérieure aux cellules basales. En immunocytochimie, nos résultats montrent que les cellules cylindriques CD151<sup>-</sup> sont composées de cellules ciliées exprimant la  $\beta$ -tubuline (Figure 29, A), de cellules caliciformes marquées par le MUC-5AC (B) et de quelques cellules de Clara exprimant spécifiquement le CC10 (C).



### Figure 29 : Caractérisation des cellules cylindriques triées par immunocytochimie.

Les cellules bronchiolaires triées ont été incubées avec des anticorps monoclonaux anti-β-tubuline (A), anti-MUC-5AC (B) et anti-CC10 (C). Les anticorps primaires ont été révélés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488. Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (Objectif x10, A, B et C).

Nous avons également quantifié, en cytométrie en flux, le pourcentage des cellules des différentes sous-populations de cellules cylindriques identifiées en immunocytochimie et composant les cellules CD151<sup>-</sup>, à l'aide des anticorps anti-MUC-5AC, anti- $\beta$ -tubuline et anti-CC10 (Figure 30). A partir d'échantillons de cellules épithéliales bronchiolaires provenant de trois patients différents, les cellules cylindriques (population R2) ont été identifiées à partir du graphique ci-dessous FSC-H vs. SSC-H (A). Les photomultiplicateurs du cytomètre ont été réglés sur la position des isotypes contrôles (IgG non immuns révélés à l'aide des anticorps secondaires couplés à l'Alexa®Fluor 488 ou à l'Alexa®Fluor 594) (B), puis l'analyse de l'expression des différents marqueurs précédemment cités a été réalisée. Nos résultats montrent que la population des cellules cylindriques (CD151<sup>-</sup>) de l'épithélium bronchiolaire adulte est composée de 70 ± 4,4 % de cellules ciliées ( $\beta$ -tubuline<sup>+</sup>) (C), de 37 ± 3,1 % de cellules caliciformes (MUC-5AC<sup>+</sup>)(D) et de 1,7 ± 0,6 % de cellules de Clara (CC10<sup>+</sup>)(E).



Figure 30 : Caractérisation des cellules cylindriques par cytométrie en flux : Quantification des différentes sous-populations épithéliales constituant les cellules cylindriques (R2).

Les cellules basales ont été exclues des analyses (R1)(A). Les isotypes contrôles (IgG non immunes) ont été réglées sur la population R2 (B). Les anticorps primaires anti-MUC-5AC et anti-β-tubuline ont été révélés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488 (C, D). L'anticorps primaire anti-CC10 a été révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 594 (E).

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

Les cellules épithéliales bronchiolaires non triées et triées (cellules basales et cellules cylindriques) provenant de 6 patients différents ont été ensemencées sur des membranes, dans un système de culture bi-compartimental.

Comme le montre la figure 31, les cellules basales triées CD151<sup>+</sup> sont capables d'adhérer au support de culture quelques heures après leur ensemencement, et de proliférer jusqu'à l'obtention d'un état de confluence après 7 jours préalable au passage en condition de culture à l'interface air-liquide (B), de manière comparable aux cellules épithéliales bronchiolaires non triées ensemencées à la même densité cellulaire (A). Les cellules cylindriques ne sont pas capables ni d'adhérer au support, ni de proliférer (C).



# Figure 31 : Capacités d'adhérence et de prolifération des cellules épithéliales bronchiolaires non triées et triées.

Analyse de l'adhérence et de la prolifération sur membrane poreuse des cellules épithéliales bronchiolaires non triées (A) et des cellules basales (B) ou cylindriques (C) triées (Objectif x10).

Non seulement les cellules basales bronchiolaires CD151<sup>+</sup> adhèrent au support puis prolifèrent *in vitro*, mais elles sont également capables de se différencier et de régénérer un épithélium bronchiolaire humain adulte différencié après 30 jours de culture en IAL, comme le montre la figure 32. Cet épithélium reconstitué à partir de cellules CD151<sup>+</sup> purifiées (B) est comparable en termes de morphologie, après 30 jours de culture en IAL, à un épithélium régénéré à partir de cellules épithéliales non triées (C) ou à un épithélium bronchiolaire natif (A). Cet épithélium bronchiolaire différencié à partir de cellules CD151<sup>+</sup>, est pseudostratifié. Il semble présenter une assise de cellules basales, ainsi que des cellules ciliées et de Clara, et est comparable à un épithélium issu de cellules épithéliales bronchiolaires non triées.



Epithélium issu de cellules basales

Epithélium issu de cellules non triées

# Figure 32 : Capacité de régénération d'un épithélium bronchiolaire *in vitro* à partir des cellules épithéliales bronchiolaires non triées et triées.

Régénération d'un épithélium bronchiolaire *in vitro* à partir de cellules épithéliales non triées (C) et de cellules basales triées (B). Epithélium natif (A). Les flèches noires mettent en évidence des cellules ciliées, les flèches rouges des cellules basales, et les flèches bleues des cellules non ciliées de Clara.

### 6. Fonctionnalité des épithélia bronchiolaires régénérés.

Afin de vérifier que les épithélia régénérés *in vitro* sont matures, nous avons étudié la fonctionnalité des épithélia bronchiolaires régénérés à partir de cellules basales triées et à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées, après 30 jours de culture en IAL.

Nous avons évalué la polarité et l'intégrité épithéliale, ainsi que les propriétés bioélectriques des épithélia régénérés en termes de résistance transépithéliale ou de mesure des courants de court-circuit. Nous avons également comparé la fréquence des battements ciliaires des épithélia générés à partir de cellules CD151<sup>+</sup> ou de cellules non triées, ainsi que la propriété de défense anti-bactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* de leurs produits de sécrétion. Enfin, nous avons réalisé un dosage de la protéine de sécrétion CC10, spécifique des cellules de Clara.

#### a) Analyse de l'intégrité des épithélia régénérés

Nous avons tout d'abord recherché en immunocytochimie la présence de la protéine ZO-1, marqueur des jonctions serrées épithéliales et donc de l'intégrité épithéliale, sur les cultures entières d'épithélium régénéré à partir des cellules basales bronchiolaires triées ou les cellules épithéliales bronchiolaires non triées, après 30 jours de culture en IAL (Figure 33).

Nous avons pu observer la présence d'un réseau de protéines ZO-1 sous forme de nid d'abeille très caractéristique et homogène, au pôle apical des cellules des épithélia régénérés à partir des cellules bronchiolaires non triées (A) et à partir des cellules basales triées (B), attestant de la présence de jonctions serrées.



Figure 33 : Expression de la protéine ZO-1 par les épithélia bronchiolaires régénérés.

Analyse de l'expression de la protéine des jonctions serrées *zonula occludens-1* (ZO-1) sur des cultures entières, régénérées à partir de cellules épithéliales non triées (A) ou de cellules basales triées (B), après 30 jours de culture en IAL. Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (Objectif x20).

Nous avons également réalisé une mesure de la résistance transépithéliale de ces épithélia régénérés à partir des cellules de quatre patients différents, reflet de l'état des jonctions intercellulaires et donc de l'intégrité épithéliale, après 30 jours de culture en IAL.

Comme le montre la figure 34, les résistances transépithéliales de cultures régénérées à partir de cellules épithéliales bronchiolaires totales ou  $\text{CD151}^+$  triées sont similaires, évaluées respectivement à 156 ± 54  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> et 165 ± 33,6  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>.



#### Figure 34 : Résistance transépithéliale des épithélia bronchiolaires régénérés.

Mesure de la résistance transépithéliale des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées ou de cellules basales CD151<sup>+</sup> triées, après 30 jours de culture en IAL.

### b) Analyse des propriétés électrophysiologiques des épithélia régénérés

Une analyse de la variation des courants de court-circuits ( $\Delta$ Isc) a été effectuée sur des épithélia régénérés à partir des cellules totales ou basales triées issues de 4 patients différents, après une stimulation séquentielle par l'amiloride, puis par la forskoline. Cette mesure transcrit le mouvement global des ions, résultant de l'absorption de Na<sup>+</sup> du compartiment apical vers le compartiment basolatéral et de la sécrétion de Cl<sup>-</sup> du compartiment basolatéral vers le compartiment apical (Figure 35). La comparaison des mesures de  $\Delta$ Isc évaluées pour les épithélia régénérés à partir de cellules basales triées ou de cellules non triées ne montre pas de différence significative. Les valeurs mesurées sont de -5,09 ± -3,8 µA/cm<sup>2</sup> et de -5,41 ± -1,85 µA/cm<sup>2</sup> pour les épithélia issus des cellules bronchiolaires non triées et des cellules basales triées, respectivement, après stimulation par l'amiloride, et de 22,9 ± 7,96 µA/cm<sup>2</sup> et de 32,11 ± 15,5 µA/cm<sup>2</sup> pour les épithélia issus des cellules bronchiolaires non triées et des cellules basales triées, respectivement, après stimulation par l'amiloride, et la 22,9 ± 7,96 µA/cm<sup>2</sup> et des cellules basales triées, respectivement, après stimulation par la forskoline.



#### Figure 35: Propriétés bioélectriques des épithélia bronchiolaires régénérés.

Mesure des variations de courants de court-circuits ( $\Delta$ Isc) après stimulation par l'amiloride et la forskoline à partir des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées, ou de cellules basales CD151<sup>+</sup> triées, après 30 jours de culture en IAL.

### c) Analyse de la fréquence des battements ciliaires

Une mesure de la fréquence des battements ciliaires, reflet de la fonction de clairance mucociliaire, a été réalisée sur des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées et de cellules basales triées de quatre patients différents, après 30 jours de culture en IAL. Cette mesure a été effectuée sur 10 champs d'observation par cultures en moyenne. Comme l'indique la figure 36, la moyenne de la fréquence des battements ciliaires obtenue pour les épithélia régénérés à partir de cellules basales ou de cellules épithéliales non triées est similaire après 30 jours de culture en IAL, évaluée à 11,9  $\pm$  0,23 Hz et 12,4  $\pm$  0,8 Hz respectivement.



#### Figure 36 : Fréquence de battements ciliaires des épithélia bronchiolaires régénérés.

Mesure de la fréquence de battements ciliaires des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées ou de cellules basales CD151<sup>+</sup> triées, après 30 jours de culture en IAL.

# d) Capacités de défense anti-bactériennes vis-à-vis de Staphylococcus aureus.

La fonctionnalité des épithélia régénérés a également été évaluée en termes de capacités de défenses anti-bactériennes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (Figure 37).

Les sécrétions apicales de nos épithélia régénérés à partir de cellules issues de trois patients différents, recueillies à 30 jours de culture en IAL et incubées en présence du pathogène, ont montré un pouvoir bactéricide comparable, qu'elles proviennent d'épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales totales ( $35,9 \pm 2,87$  % de survie bactérienne) ou de cellules basales triées ( $38,25 \pm 1,77$  % de survie bactérienne).



Figure 37 : Capacité bactéricide des épithélia bronchiolaires régénérés.

Evaluation des capacités de défenses anti-bactériennes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* des sécrétions apicales des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées ou de cellules basales triées, collectées à 30 jours de culture en IAL, en comparaison de la condition contrôle (Ctrl).

### e) Analyse de la sécrétion de la protéine CC10

La production de la protéine CC10 a été analysée et quantifiée à l'aide d'un dosage ELISA, dans les sécrétions apicales des épithélia régénérés (figure 38). Nos résultats mettent en évidence, non seulement la production de la protéine CC10, mais aussi un taux de sécrétion comparable dans les sécrétions des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales totales ou de cellules basales purifiées. Ce taux est évalué à 13,29  $\pm$  7,84 et 15,55  $\pm$  10,46 ng de protéines CC10/µg de protéines totales, respectivement.



#### Figure 38 : Sécrétion de la CC10 par les épithélia bronchiolaires régénérés.

Analyse de la sécrétion de la protéine CC10, dans les sécrétions apicales des épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées ou de cellules basales triées, après 30 jours de culture en IAL.

## C. DISCUSSION

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons démontré que les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain adulte, isolées par cytométrie en flux, sur la base de leur expression spécifique du CD151, sont capables de régénérer un épithélium bronchiolaire différencié, cohésif et fonctionnel, *in vitro*, dans un modèle de culture en IAL. L'épithélium régénéré, à partir des seules cellules basales préalablement purifiées, présente des caractéristiques morphologiques, structurales et fonctionnelles similaires à celles d'un épithélium bronchiolaire natif, ou à celles d'un épithélium régénéré à partir de cellules épithéliales bronchiolaires dissociées totales et non triées. Sur la base de ce résultat, nous pouvons conclure que les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain adulte peuvent être considérées, au moins, comme des cellules progénitrices de cet épithélium.

Dans notre étude, trois marqueurs membranaires exprimés spécifiquement par les cellules basales bronchiolaires, ont été identifiés : la Cavéoline-1 isoforme  $\alpha$ , le Facteur Tissulaire et le CD151.

La cavéoline-1 est une protéine membranaire structurale des cavéoles, structures constituant des petites invaginations des membranes plasmiques cellulaires impliquées dans des mécanismes de transduction du signal, d'endocytose, ou dans l'homéostasie du cholestérol (Cohen *et al.*, 2004). Les cavéoles servent également de site potentiel d'entrée pour différents microorganismes (Norkin, 2001). Cette protéine membranaire, exprimée par un large éventail de types cellulaires, des PN I aux cellules endothéliales, adipocytes ou fibroblastes, va présenter une distribution spécifique de ses deux isoformes, Cav-1 $\alpha$  et Cav-1 $\beta$ , en fonction du type cellulaire (Razani *et al.*, 2002 ; Kogo *et al.*, 2004).

Le Facteur Tissulaire, considéré comme le principal activateur de la coagulation, est également impliqué dans différents mécanismes physiopathologiques tels que la migration cellulaire (Müller *et al.*, 1999), l'initiation de l'invasion tumorale, potentiellement par les cellules souches cancéreuses (Milsom *et al.*, 2009; Garnier *et al.*, 2010), le développement de l'angiogénèse (Garnier *et al.*, 2010; Milsom *et al.*, 2009; Förster *et al.*, 2006) ou la médiation de l'inflammation (Chu, 2005).

Le CD151, outre son rôle essentiel dans la formation et dans la stabilité des hémidesmosomes ancrant les cellules basales à la lame basale sous-épithéliale en association étroite avec les intégrines  $\alpha 6\beta 4$  (Sterk *et al.*, 2000), est impliqué dans divers processus biologiques tels que l'adhérence cellulaire ou le transport vésiculaire d'intégrines (Fitter *et al.*, 1999; Sincock *et al.*, 1999). Le CD151 est exprimé au niveau de cellules mésenchymateuses, en particulier les cellules hématopoïétiques, ainsi qu'au niveau de cellules épithéliales diverses, notamment les kératinocytes basaux (Sincock *et al.*, 1997). Le CD151 jouerait le rôle de protéine adaptatrice pour la transduction de voies de signalisation intercellulaire favorisant l'invasion et la croissance tumorale. Il est ainsi impliqué dans la motilité *in vitro* des cellules métastatiques prostatiques ou œsophagiennes (Suzuki *et al.*, 2010; Ang *et al.*, 2010), en interagissant, notamment, avec Met, le récepteur tyrosine kinase de l'HGF (Hepatocyte growth factor) (Franco *et al.*, 2010).

La cavéoline-1, considérée comme un marqueur membranaire spécifique des cellules basales bronchiques de souris, n'avait jusqu'à présent pas été mise en évidence dans l'épithélium bronchiolaire humain, bien qu'elle soit exprimée par les cellules épithéliales basales et ciliées des voies aériennes proximales (Krasteva et al., 2006). Le FT et le CD151 avaient été préalablement identifiés comme marqueurs spécifiques des cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte, et avaient permis de montrer la nature progénitrice de cette population de cellules, après purification en cytométrie en flux et mise en évidence de sa capacité à régénérer, à elle seule, in vitro et in vivo, un épithélium bronchique mature et fonctionnel (Hajj et al., 2007). Bien qu'identifiés sur des coupes de tissus au niveau de la membrane plasmique péricellulaire des cellules basales bronchiolaires, le Facteur Tissulaire et la cavéoline-1 n'ont pu être utilisés pour l'isolement de ces cellules. En effet, ces deux marqueurs membranaires présentent bien une résistance à la pronase E, enzyme permettant de séparer les cellules épithéliales de leur tissu. Cependant, le FT semble être très sensible à la trypsine utilisée pour obtenir l'individualisation parfaite des cellules épithéliales nécessaire au tri cellulaire, et la cavéoline-1, en dehors de toute perméabilisation membranaire, présente un défaut d'accessibilité de l'épitope pour notre anticorps. Ainsi, seul le CD151 a montré l'ensemble des qualités requises pour une utilisation en tri cellulaire afin d'isoler les cellules basales bronchiolaires humaines adultes.

Il est à noter que les analyses que nous avons menées en cytométrie en flux, ont discriminé les cellules basales bronchiolaires de l'ensemble des cellules épithéliales sur la base d'un marquage de la CK13, marqueur intracytoplasmique spécifique des cellules basales respiratoires, et du CD151. Les résultats obtenus ont mis en évidence une expression de ces marqueurs au niveau de notre population d'intérêt à hauteur de 23 % et 27,4 % respectivement. La différence existant entre ces deux pourcentages n'est pas imputable à l'identification éventuelle d'une autre population de cellules épithéliales bronchiolaires, mais semble résider dans le fait que, la CK13 étant un constituant du cytosquelette, sa mise en évidence immunocytochimique nécessite une étape de perméabilisation cellulaire nécessaire au passage de l'anticorps anti-CK13 au travers de la membrane plasmique des cellules épithéliales, ce qui peut générer des disparités quant au nombre de cellules positives qui seront quantifiées.

Jusqu'à présent, les études menées afin de mettre en évidence les cellules souches ou progénitrices candidates naturelles de l'épithélium bronchiolaire, impliquées dans les mécanismes d'homéostasie ou de régénération tissulaires, n'ont été réalisées que sur des modèles murins. Ces travaux ont identifié les cellules de Clara (cellules sécrétoires non ciliées) comme cellules souches et comme cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire chez la souris. En effet, deux sous-types de cellules épithéliales contribueraient à l'homéostasie et à la régénération de l'épithélium bronchiolaire murin : les cellules de Clara (cellules progénitrices facultatives ou cellules d'amplification transitoires), présentes tout au long des voies aériennes bronchiolaires, capables d'entrer rapidement en cycle cellulaire et de générer des cellules différenciées (Rawlins et al., 2009; Evans et al., 1978; Giangreco et al., 2009), et les rares cellules souches bronchiolaires, spécifiquement localisées dans les NEB et les BADJ, et résistantes aux polluants grâce à leur défaut d'expression du cytochrome P450 2F2 (Hong et al., 2001; Giangreco et al., 2002; Reynolds et al., 2000). Cependant, ces données sont difficilement transposables chez l'Homme, du fait des différences histologiques existant entre l'épithélium des voies aériennes humaines et murines (Liu et Engelhardt, 2008), ce qui rend ardue l'identification des cellules souches humaines (Jeffery, 1983). La différence la plus importante existant entre les deux espèces réside dans le fait que les cellules basales murines ne sont observées qu'au niveau de la trachée, avec une proportion très importante de cellules de Clara tout le long des voies aériennes et surtout au niveau bronchiolaire (Pack et al., 1981), alors que les cellules basales sont détectées depuis les voies aériennes proximales jusqu'aux bronchioles chez l'Homme (Boers et al., 1998; Boers et al., 1999). De plus, au sein des tissus bronchiolaires humains ainsi que dans les échantillons de cellules épithéliales bronchiolaires dissociées que nous avons analysés, les cellules de Clara ont été trouvées en faible proportion. Elles représentaient 1,7 % des cellules de la population non-basale (CD151) parmi laquelle nous avons également trouvé 37 % de cellules caliciformes. Au sein des tissus bronchiolaires non pathologiques, les cellules caliciformes sont décrites comme des évènements rares, à la différence des cellules de Clara quantifiées à hauteur de 11 % au niveau des voies aériennes distales (Boers et al., 1999). Les tissus pulmonaires humains utilisés dans le cadre de notre étude, ont été obtenus à l'occasion de résections pulmonaires chirurgicales pour des cas de cancer. Ces tissus, prélevés à distance des tumeurs broncho-pulmonaires, sont toutefois inflammatoires. Or, il a été décrit dans la littérature, que dans un contexte hautement inflammatoire, comme c'est le cas chez les patients souffrant de BPCO, d'asthme ou dans le cas d'une inflammation des voies aériennes d'origine allergique, le nombre de cellules de Clara présentes dans les voies aériennes bronchiolaires diminue (Shijubo et al., 1999; Pilette et al., 2001; Liao et al., 2010), de même que la concentration en protéine CC10 dans le lavage bronchoalvéolaire et le sérum des sujets (Nie et al., 2005; Gioldassi et al., 2004). De façon concomitante, une métaplasie des cellules caliciformes, ainsi qu'une hypersécrétion de mucus ont été rapportées, suggérant que les cellules caliciformes apparues dériveraient, au moins pour une part, des cellules de Clara (Hayashi et al., 2004; Alessandrini et al., 2010). Le contexte inflammatoire des pièces chirurgicales qui ont été utilisées pour notre étude pourrait expliquer la faible proportion de cellules de Clara, ainsi que la forte représentation des cellules caliciformes dans les tissus et les échantillons cellulaires que nous avons analysés.

Après tri cellulaires, les cellules basales bronchiolaires CD151<sup>+</sup> et les cellules non-basales CD151<sup>-</sup> constituées de cellules de Clara, de cellules caliciformes et de cellules ciliées, ont été ensemencées sur des membranes de culture recouvertes de collagène de type IV. Dans ces conditions, seules les cellules basales purifiées ont adhéré, proliféré et finalement régénéré un épithélium bronchiolaire mature, différencié et fonctionnel en IAL. Les cellules non-basales triées n'ont ni adhéré au support ni proliféré, bien que cette population soit

123

constituée, en partie, de cellules de Clara décrites comme cellules progénitrices épithéliales bronchiolaires chez la souris. Afin de déterminer si cette incapacité était liée aux conditions de culture que nous avions utilisées, nous avons tenté de cultiver la population de cellules CD151<sup>-</sup> à plus forte densité d'ensemencement et dans différents milieux de culture développés pour favoriser la prolifération des cellules épithéliales respiratoires humaines : un milieu de culture mis au point au laboratoire d'après les travaux de Leichner *et al.,* (Lechner et LaVeck, 1985), les milieux commerciaux BEGM (Lonza), CnT-17 (CELLNTEC Advanced cell systems) et Quantum 286 (PAA), ainsi que dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF. Quelque soit la densité d'ensemencement et le milieu de culture utilisé, les cellules non-basales CD151<sup>-</sup> n'ont ni adhéré ni proliféré.

Les cellules basales bronchiolaires humaines adultes ont montré leur capacité de prolifération et de différenciation multipotente dans la mesure où elles ont été capables de reconstituer un épithélium différencié similaire à un épithélium bronchiolaire natif ou à un épithélium bronchiolaire régénéré à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées. Bien que l'identité des cellules basales, ciliées et de Clara n'ait pas, pour le moment, été validée en immunohistochimie, ces populations cellulaires sont toutefois identifiables morphologiquement au sein des épithélia différenciés à partir de cellules basales purifiées. En outre, nous avons pu mettre en évidence la présence de la protéine CC10, spécifique des cellules de Clara, dans les produits de sécrétion épithéliaux, avec un taux de production comparable à celui observé pour les cultures d'épithélium bronchiolaire régénéré par les cellules épithéliales humaines non triées. Ce résultat confirme la différenciation des cellules basales bronchiolaires humaines en cellules de Clara fonctionnelles.

La présence de cellules ciliées au sein des épithélia régénérés à partir de cellules basales triées a été aisément détectée en microscopie optique inversée, le battement ciliaire de ces cellules étant observable dès 12 à 15 jours de culture en IAL. Nous avons réalisé des mesures de fréquence des battements ciliaires, reflet de la fonction de clairance mucociliaire. Nos résultats montrent que cette fréquence des battements ciliaires, évaluée à environ 12 Hz, est comparable à celle mesurée au niveau d'épithélia régénérés à partir de cellules épithéliales non triées, mais reste cependant légèrement inférieure à la valeur mesurée pour des feuillets d'épithélia bronchiolaires humains ciliés (15,32 ± 0,09 Hz) obtenus après dissociation enzymatique du tissu, mais avant traitement à la trypsine de ces feuillets. Ces observations confirment la différenciation des cellules basales bronchiolaires humaines en cellules ciliées fonctionnelles.

La fonctionnalité de l'épithélium bronchiolaire régénéré à partir des cellules basales triées a également été évaluée en termes d'intégrité de la barrière épithéliale. Nous avons ainsi montré que la cohésion de l'épithélium est bien établie, d'une part par la mise en évidence de l'expression de la protéine des jonctions serrées ZO-1 qui forme une réseau en nid d'abeille au niveau de la partie apicale des membranes péricellulaires des cellules bronchiolaires cylindriques, et d'autre part par l'analyse de la résistance transépithéliale des cultures régénérées qui a montré des valeurs similaires aux valeurs mesurées au niveau des cultures régénérées à partir de cellules épithéliales bronchiolaires non triées.

L'épithélium bronchiolaire, de par ses transporteurs d'ions transépithéliaux, régule de façon fine la hauteur du liquide périciliaire (Boucher, 1994b) qui est une composante importante du mécanisme de clairance mucociliaire *in vivo* (Tarran, 2004). L'analyse des propriétés électrophysiologiques des épithélia régénérés à partir des cellules basales bronchiolaires ou à partir des cellules épithéliales non triées, en réponse à une stimulation induite par des modulateurs de l'activité de canaux sodiques et chlorures, a pu mettre en évidence la fonctionnalité de ses canaux dans les épithélia en culture.

En outre, la régulation de la composition ionique du liquide périciliaire par les cellules épithéliales est essentielle pour le maintien d'un environnement adéquat à l'efficacité d'action de molécules et peptides antimicrobiens sécrétés par l'épithélium respiratoire (Ganz, 2002; Travis *et al.*, 1999). Ces constituants de l'immunité innée sont impliqués dans les fonctions de défense épithéliales vis-à-vis de pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, agent infectieux retrouvé fréquemment au niveau des muqueuses humaines, notamment au niveau de l'épithélium nasal. L'analyse de la capacité bactéricide des sécrétions épithéliales issues des épithélia régénérés à partir des cellules basales bronchiolaires humaines met en évidence la capacité de défense antibactérienne développée par ces épithélia.

Nos présents travaux ont donc mis en évidence la capacité de prolifération et de différenciation multipotente des cellules basales bronchiolaires humaines adultes, pour régénérer *in vitro* un épithélium constitué de cellules basales, de cellules ciliées et de cellules de Clara. L'épithélium ainsi régénéré a en outre montré des propriétés fonctionnelles d'épithélium bronchiolaire mature. Ces capacités de prolifération et de différenciation leur confèrent donc le statut potentiel de cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte.

En 2007, des travaux du laboratoire ont affecté le statut progéniteur de l'épithélium bronchique aux cellules basales de ces voies aériennes proximales (Hajj et al., 2007). Nos présents résultats tendent à démontrer que les cellules basales sont les cellules progénitrices, non seulement de l'épithélium bronchique, mais également de l'épithélium bronchiolaire humain adulte. Cependant, il est à noter que, de façon intéressante, les cellules basales bronchiques et bronchiolaires, bien qu'exprimant les mêmes marqueurs, tout au moins ceux que nous avons pu mettre en évidence, ne sont pas identiques. En effet, les cellules basales bronchiques régénèrent un épithélium bronchique constitué de cellules basales, ciliées et caliciformes, alors que les cellules basales bronchiolaires régénèrent un épithélium bronchiolaire constitué de cellules basales, ciliées et de Clara. Contrairement aux données de la littérature démontrant l'effet inducteur majeur de l'environnement sousépithélial sur la spécification des cellules épithéliales au cours du développement pulmonaire (Shannon et al., 1998; Shannon, 1994), la différence observée ici ne peut être imputable à l'environnement cellulaire, les cellules basales bronchiolaires isolées ayant été cultivées sur le même support, avec le même milieu et dans les mêmes conditions que celles utilisées par Hajj et al., en 2007. Nos résultats suggèrent donc que, bien qu'apparemment identiques, les cellules basales bronchiques et les cellules basales bronchiolaires présentent des différences intrinsèques majeures en termes de potentialité de différenciation cellulaire.

## IV. IDENTIFICATION DE SOUS-POPULATION(S) DES CELLULES BASALES DE L'EPITHELIUM DES VOIES AERIENNES PROXIMALES HUMAINES ADULTES

## A. MATERIELS ET METHODES

# 1. Tissus des voies respiratoires humaines : Polypes nasaux

Les prélèvements de polypes nasaux humains ont été obtenus à partir de polypectomies nasales, puis ont été envoyés au laboratoire dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 25 mM d'HEPES et d'antibiotiques (pénicilline à 100 U/mL et streptomycine à 100 µg/mL). Les polypes nasaux ont été, d'abord, lavés plusieurs fois, sous agitation à 4 °C, dans du RPMI-HEPES.

### 2. Dissociation des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales ont été dissociées de leurs tissus après une incubation d'une nuit à 4 °C, en présence de Pronase E (1 mg/mL) dans du milieu RPMI-HEPES. Les tissus respiratoires humains ont été agités manuellement, à l'aide d'une pince, dans une boite de Pétri contenant du milieu RPMI-HEPES, dans le but de décrocher la totalité des cellules épithéliales. Les cellules dissociées ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm puis comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules épithéliales ainsi obtenues ont été, soit cytocentrifugées ou mises en culture en IAL dans le but de régénérer un épithélium respiratoire bien différencié, avant d'étudier l'expression de marqueurs potentiels de sous-populations éventuelles de cellules basales, soit utilisées dans le but de trier les cellules basales et les cellules cylindriques sur la base de l'expression de deux marqueurs membranaires spécifiques des cellules basales: le CD151 et le Facteur Tissulaire (FT) (Hajj *et al.,* 2007), avant l'analyse de l'expression de marqueurs potentiels de sous-populations éventuelles de l'expression de marqueurs potentiels de sous-populations de cellules basales (cellules basales), de la capacité de croissance

clonale de ces cellules ou de la capacité de ces cellules à générer des glandes respiratoires *in vitro*.

### 3. Détection par immunocyto/histochimie de marqueurs potentiels de sous-populations de cellules basales

# a) Fixation des tissus de voies respiratoires humaines et des cultures en IAL

Les prélèvements de polypes nasaux et les membranes de culture en IAL présentant des épithélia respiratoires bien différenciés, ont été cryofixés dans l'O.C.T, puis conservés à - 80 °C, avant la réalisation de sections tissulaires à froid de 5 µm. Les coupes de tissu et d'épithélia régénérés en IAL ont été déposées sur des lames de microscopie SuperFrost conservées à -20 °C.

### b) Etude des marqueurs cellulaires en immunofluorescence

Dans le but de mettre en évidence la présence éventuelle d'une ou de plusieurs souspopulations cellulaires au sein de la population des cellules basales, puis de les isoler par cytométrie en flux afin de déterminer leur statut potentiel de cellules souches, il est apparu nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules basales.

### (1) Les anticorps utilisés

Les anticorps primaires utilisés pour la réalisation de notre étude ont été : l'anticavéoline 1α humaine monoclonal murin (IgG2b, clone 7C8 ; 1/50, Santa Cruz Biotech.), l'anti-ΔNp63 humain monoclonal murin (IgG2a, clone 4A4 ; 1/50, Santa Cruz Biotech.), l'anti-CK13 humaine monoclonal murin (IgG1, clone KS-1A3; 1/1000, Sigma Aldrich) et l'anti-CK14 humaine monoclonal murin (IgG, clone NCL-L-LL002 ; 1/50, Novocastra), l'anti-hABCG2 (Bcrp-1) humain monoclonal murin (IgG2b, clone 5D3 ; 1/200, R&D Systems, Minneapolis, Etats-Unis), l'anti-CD133 humain couplé à la biotine (IgG1, clone AC133-1 ; 1/200, Miltenyi Biotec.) et l'anti-Nestine humaine monoclonal murin (IgG, clone AB5922 ; 1/100, Chemicon International, Chemicon, Temecula, Etat Unis). Les anticorps anti-CD59 humain monoclonal de rat (IgG2b, clone YTH53.1 ; 1/200), anti-CD55 humain monoclonal murin (IgG1, clone 143-30 ; 1/200), anti-CD46 humain monoclonal murin (IgG2a, clone 169-1-E4.3 ; 1/200), anti-CD34 humain monoclonal murin (IgG3, clone TUK3 ; 1/200) proviennent de chez Santa Cruz Biotechnology.

Les IgG non immunes murines et de rat, ainsi que l'IgG1ĸ non-immune biotinylée murine (clone MOPC-21; 1/200, BD Biosciences, San Diego, Etats Unis) ont été utilisées comme témoins négatifs. La révélation de la biotine a été faite grâce au complexe streptavidine-Alexa Fluor 488 (1/100; Molecular Probes; Eugene, Etat Unis). Les anticorps secondaires utilisés dans notre étude sont directement couplés à une Alexa Fluor 488 ou à une Alexa Fluor 594 (IgG H+L; 1/200, Molecular Probes, Eugene, OR). Le DAPI ou l'hématoxyline de Harris ont été utilisés pour contre-colorer les noyaux.

### (2) Marquages immunohistochimiques sur cryocoupes de tissus respiratoires humains et de membranes de culture en IAL

Les cryocoupes congelées à -20 °C, ont subi le protocole expérimental décrit dans le paragraphe III.A.4.b.1. L'étude de l'expression de la  $\Delta$ Np63 a nécessité une étape préalable de fixation des coupes tissulaires, au Méthanol glacial pendant 10 minutes à -20 °C, suivie d'une étape de rinçage au PBS de 5 minutes. Les autres marqueurs étudiés n'ont pas nécessité d'étapes de fixation. Les témoins négatifs correspondant à chaque marqueur ont été réalisés en substituant les anticorps primaires par des IgG non immunes, ainsi qu'en remplaçant l'anticorps primaire ou secondaire par le PBS-BSA 3 %. Les lames ont été conservées à 4 °C, à l'obscurité, avant l'acquisition des images en immunofluorescence à l'aide du microscope AxioImager (Zeiss).

# (3) Marquage immunocytochimique sur cellules cytocentrifugées

Un échantillon des populations de cellules épithéliales de polypes nasaux non triées et de cellules basales CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup> fraichement triées en cytométrie en flux, a été cytocentrifugé à la densité de 5x10<sup>4</sup> cellules/lame, à 750 rpm pendant 10 minutes, sur des lames de microscopie conservées à -20 °C jusqu'à leur utilisation. La procédure expérimentale utilisée pour la réalisation des marquages immunocytochimiques est similaire à celle développée dans le paragraphe III.A.4.b.1. Comme pour les études réalisées en immunhistochimie décrites ci-dessus, les lames ont été montées puis conservées à 4 °C avant leur analyse.

Des doubles marquages (CD151/Cavéoline-1 et  $\Delta$ Np63/CK13) ont été réalisés. Les cellules épithéliales respiratoires triées et non triées ont été d'abord incubées avec l'anticorps primaire anti-cavéoline 1 $\alpha$  ou anti- $\Delta$ Np63, révélés à l'aide d'anticorps secondaires, couplés à l'Alexa 488 (vert). Les cellules ont été saturées en PBS-BSA 3 %, puis incubées en présence des fragments Fab (H+L) anti-souris dans le but de bloquer les sites de liaison libres de l'anticorps primaire. Les cellules épithéliales ont ensuite été incubées en présence du deuxième anticorps primaire anti-CD151 ou anti-CK13 révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594 (rouge). Pour chaque marqueur, les témoins négatifs ont été réalisés en utilisant des IgG non immunes. Finalement, les noyaux des cellules ont été contre-colorés au DAPI et les lames ont été montées pour leur observation en microscopie à fluorescence (AxioImager, Zeiss).

### 4. Cytométrie en flux

Après la dissociation des cellules épithéliales respiratoires humaines, les cellules basales et les cellules cylindriques ont été triées, en cytométrie en flux, à l'aide du cytomètre-trieur FACSAria (BD Biosciences), selon le protocole expérimental établi au sein de notre laboratoire (Hajj *et al.*, 2007). Les deux populations cellulaires ont été séparées physiquement, à l'aide de deux marqueurs membranaires spécifiques des cellules basales : le facteur tissulaire (FT) et le CD151.

### a) Les anticorps utilisés

Pour réaliser nos études, les anticorps suivants ont été utilisés : l'anti-Facteur Tissulaire humain (FT) monoclonal murin couplé à la FITC (Fluorescein isothiocyanate) (IgG1 ;  $3 \mu L/10^6$ cellules, American Diagnostica, Stamford, Etat Unis), l'isotype contrôle non immun murin couplé à la FITC (IgG1 ;  $3 \mu L/10^6$  cells, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), l'anti-CD151 humain monoclonal murin couplé à la PE (IgG1 $\kappa$ , clone 14A2.H1 ;  $6 \mu L/10^6$ cellules, BD Biosciences), ainsi que l'isotype contrôle IgG1 non-immun murin couplé à la PE (clone MOPC-21 ;  $6 \mu L/10^6$  cellules, BD Biosciences).

### b) Tri des cellules épithéliales

Les cellules basales (FT<sup>+</sup>/CD151<sup>+</sup>), et la population des cellules cylindriques (FT<sup>-</sup>/CD151<sup>-</sup>) de l'épithélium respiratoire humain, ont été préparées puis triées selon le protocole précédemment décrit dans la partie III. au paragraphe A.5.c.3. Les deux populations cellulaires définies ont été séparées sur la base de leur expression ou non des deux marqueurs membranaires CD151 et FT, à partir d'un graphique PE-A vs. FITC-A.

Les cellules mortes (DAPI positives, graphique DAPI-A vs. FSC-A, pour les deux populations), ainsi que les agrégats et doublets cellulaires ont été préalablement exclus (SSC-W vs. SSC-H et FSC-W vs. FSC-H, uniquement pour la population des cellules basales) de nos deux populations d'intérêt. Les cellules basales et les cellules cylindriques ont été triées simultanément à une vitesse de 3000 à 4000 événements/s (fréquence de 30 MHz). Les témoins négatifs dans ces études ont été réalisés en utilisant les isotypes contrôles IgG1 non-immun de souris couplé à la PE ou à la FITC.

Enfin, après chaque tri cellulaire, la pureté des populations triées CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup> et CD151<sup>-</sup>/FT<sup>-</sup> a été évaluée par réanalyse en cytométrie en flux, d'un aliquot de 1.10<sup>4</sup> cellules fraichement triées pour chaque population.

### 5. Culture cellulaire à l'interface air/liquide

La procédure de culture en IAL a été précédemment décrite au niveau de la partie III. au paragraphe A.6.a. Les cellules épithéliales de polypes nasaux non triées ont été mises en culture, *in vitro*, sur des membranes poreuses en polyester préalablement recouvertes, de collagène de type IV. Les cellules épithéliales ont été ensemencées à une densité de 4,2. 10<sup>4</sup> cellules par cm<sup>2</sup>, puis cultivées dans le milieu de prolifération préparé au sein de notre laboratoire en condition Liquide / Liquide jusqu'à l'obtention de la confluence cellulaire. Les cellules ont alors été cultivées en interface air-liquide en présence du milieu de différenciation dans le compartiment basal. Le milieu de différenciation a été remplacé dans le compartiment basal, toutes les 48 heures, jusqu'à l'obtention d'un épithélium respiratoire bien différencié au-delà de 30 jours de culture en IAL.

# 6. Etude de la capacité de croissance clonale des cellules basales triées

#### a) Réalisation de tests de clonogénicité

### (1) Principe

Afin d'identifier la présence éventuelle d'une ou de plusieurs sous-populations au sein des cellules basales de l'épithélium respiratoire humain, puis d'évaluer leur potentiel statut de cellules souches, des tests de clonogénicité ont été réalisés (selon le protocole décrit par Kim *et al.,* 2005). Ces tests se basent sur les capacités de prolifération et d'autorenouvellement différentes de ces sous-populations éventuelles, leur affectant le statut de cellules souches ou de cellules progénitrices.

Le principe de ce test est d'ensemencer, à faible densité, des cellules épithéliales respiratoires totalement isolées sur un support cellulaire nutritif confluent en arrêt de prolifération (feeders). Une cellule seule isolée va proliférer lorsqu'elle en a la capacité, et générer un clone de cellules génétiquement identiques.

#### (2) Support cellulaire nourricier : les cellules STO

Les cellules STO (ATCC CRL-1503<sup>™</sup>) sont des cellules embryonnaires fibroblastiques de souris, couramment utilisées en tant que couche cellulaire nutritive. Ces feeders ont servi dans notre étude de substrat pour la réalisation de tests de clonogénicité à partir de cellules basales triées CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup> ou de cellules épithéliales non triées, ensemencées à faible densité.

Les cellules STO ont été cultivées en routine, dans un milieu de culture composé de DMEM contenant 10 % de SVF (Gibco BRL) et 1 % d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine), à 37 °C en atmosphère humide en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. A confluence, les cellules STO ont été rincées deux fois au PBS stérile (Gibco BRL) puis incubées pendant une nuit à 37 °C en atmosphère humide et en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, avec une solution de mitomycine-C (Sigma) à 2,5 µg/mL en DMEM afin d'induire leur arrêt de prolifération. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois au PBS, puis détachées avec une solution de trypsine-EDTA (Gibco BRL). L'action de la trypsine a été stoppée par ajout de milieu de culture contenant 10 % de SVF. Les cellules STO mitomycinées ont été centrifugées à 1200 rpm pendant 5 minutes, comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, puis ensemencées dans nos supports de culture (diamètre 60 mm, plaques 24 puits, plaques 12 puits et plaques 6 puits) (Falcon, Becton Dickinson, Le pont de Claix, France) à la densité de 8,6. 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> dans un milieu de culture composé de DMEM, de 10 % de SVF et d'1 % d'antibiotiques. Les cellules STO sont cultivées pendant 24 heures avant l'ensemencement des cellules épithéliales d'intérêt pour la réalisation des tests de clonogénicité.

#### (3) Réalisation des tests de clonogénicité

Les cellules épithéliales non triées (totalement isolées) ou les cellules triées (cellules basales CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup>) ont été ensemencées sur feeders à une densité de 1000 cellules par boite de Pétri de diamètre 60 mm (Passage 0) et cultivées en milieu CnT-17 contenant 5 % de SVF à 37 °C en atmosphère humide, et en présence de 5 % de CO2. Au bout de 10 jours de culture, les clones PO ont été observés en microscopie optique. Les clones ont ensuite été isolés individuellement à l'aide d'un anneau de clonage, et les cellules issues du clone ont
été récupérées après un traitement à la trypsine-EDTA. Les cellules de chaque clone ont été réensemencées dans un puits d'une plaque 24 puits contenant des feeders (Passage 1). Après cette phase d'isolement, les cellules des clones de départ sont dans une phase d'amplification. A partir de cette étape en plaque 24 puits, tous les 10 à 15 jours de culture, les feeders ont été éliminés puis les cellules issues de chaque clone d'origine ont été récupérées (traitement à la trypsine-EDTA) et réensemencées dans un support de culture contenant des feeders, et de surface toujours plus importante (Passage 2 et au-delà), dans le but d'amplifier au maximum la quantité de cellules issues des clones d'origine (Figure 39).



Figure 39 : Schéma de réalisation de tests de clonogénicité sur supports cellulaires nourriciers.

## (4) Caractérisation des clones en Passage O par un marquage immunocytochimique

#### (a) Les anticorps utilisés :

Les anticorps utilisés pour cette étude ont été : l'anti-CK13 humaine monoclonal murin (IgG1, clone KS-1A3; 1/1000, Sigma Aldrich), l'anti CK14 humaine monoclonal murin (IgG, clone NCL-L-LL002 ; 1/50, Novocastra), l'anti- $\beta$ -tubuline humaine monoclonal murin (IgG2b, 1/3000, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France), l'anti-récepteur  $\alpha$ 7 nicotinique humain polyclonal de lapin (IgG, clone H-302 ; 1/100, Santa Cruz Biotech.), l'anti- $\Delta$ Np63 humaine monoclonal murin (IgG2a, clone 4A4 ; 1/50, Santa Cruz Biotech.), l'anti-CD151 humain monoclonal murin (IgG1 $\kappa$ , clone 14A2.H1 ; 1/50, BD Biosciences), l'anti-facteur tissulaire (FT) humain monoclonal de souris (IgG1, 1/75, American Diagnostica, Stamford, Etat Unis) et l'anti-cavéoline 1 $\alpha$  humaine monoclonal murin (IgG2b, clone 7C8 ; 1/50, Santa Cruz Biotech.). Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin fabriqués chez la chèvre sont utilisés dans notre étude directement couplés à une Alexa Fluor 488 (IgG H+L ; 1/200, Molecular Probes, Eugene, OR). Les témoins négatifs dans ces études ont été réalisés en utilisant les isotypes contrôles IgG1 non-immun de souris. L'hématoxyline de Harris a été utilisée pour contre-colorer les noyaux.

#### (b) Protocole expérimental

Pour réaliser cette étude, les feeders ont été ensemencés sur des lamelles de verre dans une plaque 24 puits. Après 24 heures d'adhérence, les cellules épithéliales respiratoires non triées ou triées (cellules basales CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup>) ont été ensemencées à une densité de 500 cellules par puits. Au bout de 7 jours de culture, les clones en passage O ont été observés, puis les lamelles de verre contenant les clones et les feeders ont été fixées au méthanol pendant 10 minutes à -20 °C. La caractérisation des clones en immunocytochimie a ensuite été réalisée selon le protocole décrit dans la partie III. au paragraphe A.4.b.1.

## b) Etude de la capacité des cellules basales à générer un réseau de glandes respiratoires

La capacité des cellules basales à générer un réseau de glandes respiratoires humain a été évaluée, *in vitro*, en utilisant des gels de Collagène de type I, selon le modèle décrit par Montesano *et al.*, en 1991.

### (1) Préparation des gels de Collagène de type I

Les gels ont été réalisés à partir d'une solution de collagène de type I extrait de tendons de queues de rat (2 mg/mL), en mélangeant 4 volumes de ce collagène avec 1,5 volume de RPMI 5 fois concentré et 0,15 volume d'hydroxyde de Sodium 1 N. Le mélange obtenu a été coulé dans des supports de culture (plaque 24 puits ou supports transwell) puis incubé pendant 15 à 20 minutes à 37 °C, en atmosphère humide, et en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, pour permettre sa gélification.

### (2) Protocole expérimental

Les cellules épithéliales non triées ou les cellules basales fraichement triées ont été ensemencées à une densité de 4,2. 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> sur les gels, puis cultivées à 37 °C en atmosphère humide, et en présence de 5 % de CO2, dans le milieu de culture favorisant la prolifération préparé au sein de notre laboratoire (chapitre III. dans la partie A.6.a.). Le milieu de culture a été remplacé tous les deux jours. L'observation de structures multicellulaires formées, après 15 et 30 jours de culture, a été réalisée à l'aide d'un microscope optique inversé équipé d'une caméra CCD et du logiciel AxioVision 4.8. Les gels ont été récupérés au bout de 30 jours de culture puis cryofixés dans l'OCT et conservés à -80°C. Des sections de 5 à 10 µm ont été réalisées à partir des gels cryofixés puis colorées à l'aide du kit de coloration hématoxyline/éosine. Une étude de l'expression de la Pan-Cytokératine (anticorps anti-Pan-Cytokératine humaine monoclonal murin, clones C-11, PCK-26, CY-90, KS-1A3, M20, A53-B/A2 ; 1/100, Sigma Aldrich) et de MUC-5AC (anticorps anti-

MUC-5AC, clone NCL ; IgG1, 1/100, Novocastra, Newcastle, Royaume Uni) a été réalisée sur ces sections. Les images obtenues ont été réalisées à l'aide du microscope AxioImager et du logiciel AxioVision 4.8.

### 7. Analyses statistiques

Les valeurs résultant de la quantification des clones réalisés aux différents passages successifs, ainsi que les clones caractérisés suivant leur expression de la CK14, sont traduites sous la forme de moyenne ± écart-type.

### **B. RESULTATS**

### 1. Démarche expérimentale

Dans la deuxième partie de notre étude, notre but a été de tenter de mettre en évidence, à partir de deux stratégies d'analyse réalisées en parallèle, la présence d'une ou de plusieurs éventuelles sous-populations au sein des cellules basales de l'épithélium respiratoire humain, qui présenterai(en)t des propriétés de cellules souches tissulaires (équivalentes aux LRC mis en évidence au sein des voies respiratoires trachéo-bronchiques murines). D'une part, nous avons recherché, en immunohistochimie, l'expression de différents marqueurs spécifiques des cellules basales, afin d'en discriminer certains, identifiant d'éventuelles sous-populations au sein de celle-ci. D'autre part, après le tri des cellules basales, ainsi que des cellules « cylindrigues » (cellules ciliées et caliciformes) par cytométrie en flux, d'après le protocole de tri cellulaire précédemment établi par Hajj et al. (Hajj et al., 2007), nous avons évalué la capacité des cellules triées et isolées à générer des clones en culture in vitro, sur des supports cellulaires nutritifs en arrêt de prolifération. Ces tests de clonogénicité permettent d'identifier d'éventuelles sous-populations au sein des cellules basales triées, le statut de cellule souche ou progénitrice étant évalué à partir de leur capacité intrinsèque d'autorenouvellement et de prolifération différentes. Nous avons également déterminé la capacité des cellules épithéliales basales triées à générer un réseau de glandes respiratoires, ce qui est une propriété des cellules souches de l'épithélium trachéo-bronchique (Engelhardt et al., 1995).

# 2. Tri des cellules épithéliales basales respiratoires par cytométrie en flux

Les cellules basales et les cellules cylindriques de l'épithélium respiratoire humain adulte de polypes nasaux ont été triées par cytométrie en flux, sur la base de leur expression de deux marqueurs membranaires spécifiques : le FT et le CD151. Ces deux populations ont été purifiées en suivant le protocole précédemment établi au sein de notre laboratoire (Hajj *et al.*, 2007). Les cellules basales (P1) et cylindriques (P6, composée des cellules ciliées et sécrétoires bronchiques) ont été d'abord déterminées au niveau du graphique FSC-A vs. SSC-A. Les cellules mortes ont été éliminées de notre sélection au niveau du graphique DAPI-A vs. FSC-A, pour la population de cellules basales à trier, aboutissant à la population P2 (dérivant de P1). Ensuite, les doublets et les agrégats de cellules ont été éliminés de la population des cellules basales vivantes (P2) dans les graphiques FSC-H vs. FSC-W (P3) et SSC-H vs. SSC-W (P4). Finalement, les cellules basales FT<sup>+</sup>/CD151<sup>+</sup> (P5) ont été isolées en fonction de leur expression pour ces deux marqueurs.

Les cellules basales  $FT^+/CD151^+$  ont été isolées à partir de cellules épithéliales respiratoires dissociées de polypes nasaux de 12 patients différents (Figure 40, A). En moyenne, 40,9 ± 10,77 x10<sup>6</sup> cellules ont été dissociées et incubées en présence des anticorps anti-FT couplé au FITC et anti-CD151 couplé à la PE. La viabilité globale de nos échantillons cellulaires totaux, analysée à l'aide du DAPI, a été estimée avant le tri à 93,4 ± 2,03 %.

 $2,55 \pm 1,31 \times 10^{6}$  cellules basales ont été isolées à une pureté de 97,3 ± 1,28 % (B). Après chaque expérience de tri cellulaire, la viabilité de nos populations purifiées a été déterminée, et évaluée à 97,8 ± 0,6 %.



Figure 40 : Tri des cellules épithéliales basales de polypes nasaux par cytométrie en flux.

Les cellules basales (P1) et la population des cellules cylindriques (P6) ont été identifiées à partir de l'ensemble des cellules épithéliales totales (A). A partir de la population identifiée (P1), les cellules mortes (DAPI positives) ont été éliminées (P2). Les agrégats et les doublets de cellules ont été exclus au sein des cellules basales dans P3 et P4 (crées à partir de P2). Enfin, les cellules basales (CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup>, P5) ont été triées, en fonction de leur expression ou non du CD151 et du FT. Après chaque tri cellulaire, les cellules basales CD151<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup> ont été réanalysées dans le but d'évaluer leurs puretés (B).

## 3. Discrimination de marqueurs des cellules basales bronchiques humaines adultes : identification de potentielles sous-populations.

Nous avons analysé l'expression de marqueurs cellulaires identifiés dans la littérature au niveau de l'épithélium des voies aériennes, ou de marqueurs classiquement observés pour les cellules souches tissulaires humaines, dans le but d'établir leur éventuelle spécificité visà-vis des cellules basales respiratoires ou d'une sous-population de celles-ci, sous-population candidate au statut de cellules souches, isolable en cytométrie en flux. La capacité souche des cellules de cette sous-population, après tri, serait alors évaluée d'après son potentiel de régénération d'un épithélium respiratoire mature, et son potentiel d'autorenouvellement à long terme.

L'expression de ces différents marqueurs a été évaluée en immunohistochimie à partir de sections de tissus des voies respiratoires humaines et/ou de cultures bien différenciées en IAL, réalisées à partir de cellules épithéliales dissociées de polypes nasaux humains. Si ces marqueurs ont présenté une spécificité vis-à-vis des cellules basales, leur expression a été analysée en immunocytochimie, à partir de cellules épithéliales non triées ou de cellules basales triées cytocentrifugées.

### Analyse de l'expression de marqueurs « génériques » de cellules souches tissulaires humaines

### (1) BCRP-1

L'expression de la protéine transmembranaire Bcrp-1 (Breast Cancer Resistance Protein 1, ABCG2 chez l'homme) a été mise en évidence au niveau des cellules souches appelées Side Population (SP), identifiées au niveau de l'épithélium pulmonaire murin (Summer *et al.*, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2007). L'expression de la Bcrp1 pourrait représenter un marqueur commun à différentes cellules souches tissulaires (Zhou *et al.*, 2001).

La protéine Bcrp-1 n'a été détectée, ni au niveau du tissu épithélial de polypes nasaux, ni au niveau des cellules épithéliales isolées de polypes nasaux issus de 4 patients différents. Aucun marquage n'a en outre été observé au niveau des cellules non épithéliales de la muqueuse respiratoire.

#### (2) CD133

Le CD133 (prominine-1 ou AC133) est une glycoprotéine localisée dans les protrusions de membrane plasmique des cellules. Le CD133 est reconnu comme un marqueur de cellules souches somatiques tissulaires, souvent utilisé en combinaison d'autres marqueurs pour l'isolement des cellules souches.

L'étude de l'expression de ce marqueur en immunohistochimie sur des sections tissulaires d'épithélia de voies respiratoires humaines adultes, n'a pas mis en évidence de cellules positives pour le CD133 au sein de notre matériel d'étude. Aucun marquage n'a en outre été observé au niveau des cellules non épithéliales de la muqueuse respiratoire.

#### (3) CD34

Le CD34 est une glycoprotéine transmembranaire, exprimée spécifiquement par les cellules sanguines primitives et les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse. Au niveau des voies aériennes, les cellules souches épithéliales bronchiolaires murines, situées au niveau des jonctions bronchiolo-alvéolaires (BADJ), ont été purifiées en se basant sur l'expression positive de sca-1 (Stem cell antigen-1), et de CD34 (Kim *et al.*, 2005).

Au cours de nos travaux, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'expression du CD34 par les cellules épithéliales de voies aériennes (Figure 41).



Figure 41 : Analyse de l'expression du CD34 dans les voies aériennes humaines.

Les coupes de tissus de polypes nasaux humains ont été colorées à l'Hématoxyline de Harris (A) ou incubées avec un anticorps monoclonal anti-CD34 visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488 (B). Les flèches mettent en évidence l'expression du CD34 hors de l'épithélium respiratoire humain.

### b) Marqueurs potentiels de l'épithélium de voies aériennes humaines identifiés dans la littérature

Nous avons analysé l'expression de marqueurs, décrits dans la littérature, comme exprimés par les cellules de l'épithélium respiratoire, ou localisés dans d'autres épithélia en association avec des marqueurs exprimés spécifiquement par les cellules basales respiratoires.

La nestine est un filament intermédiaire, initialement identifié en tant que marqueur des cellules souches/progénitrices neuronales (Lendahl *et al.,* 1990). La nestine est coexprimée avec la cytokératine 14 et le facteur de transcription  $\Delta$ Np63, au sein du compartiment régénératif des glandes mammaires humaines (Li *et al.,* 2007).

Le CD46 (également nommé MCP, Membrane Cofactor Protein) est une protéine transmembranaire exprimée dans de nombreux types cellulaires. Une étude a mis en évidence l'expression de ce marqueur au niveau du tractus pulmonaire humain du nez aux alvéoles, associée aux protéines CD55 et CD59 (Varsano *et al.*, 1995), et son association avec le CD151 (Lozahic *et al.*, 2000).

Notre analyse de l'expression de ces différents marqueurs (Figure 42) révèle une absence d'expression du CD55 par les cellules épithéliales des voies aériennes humaines. Concernant le CD59, nous avons mis en évidence l'expression de ce marqueur au niveau des cellules basales, mais aussi au niveau de la bordure apicale des cellules cylindriques (A). Le CD46, semble quant à lui, exprimé par l'ensemble des cellules épithéliales respiratoires humaines dans notre matériel d'étude (B). Enfin, bien que l'expression de la Nestine soit identifiée au niveau des cellules basales de l'épithélium (C), ce marqueur n'est plus identifié au niveau des cellules basales, après l'analyse de son expression au niveau de sections de culture en IAL bien différenciées à partir de cellules épithéliales de polypes nasaux (E), ni au niveau de cellules épithéliales dissociées puis cytocentrifugées (F).



## Figure 42 : Analyse de l'expression du CD59, CD46 et de la nestine au niveau de l'épithélium respiratoire humain.

Les coupes de tissus de voies respiratoires humaines ou de cultures en IAL (stade bien différencié) ont été incubées avec des anticorps monoclonaux anti-CD59 (A), anti-CD46 (B), anti-nestine (C, E) révélés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488. Dans le but de mettre en évidence l'expression de la nestine par les cellules basales, un double marquage des cellules épithéliales de voies respiratoires dissociées a été réalisé, en utilisant les anticorps monoclonaux anti-nestine et anti-CK13, révélés par les anticorps secondaires couplés à l'Alexa®Fluor 594, respectivement (F, Objectif : x20). Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (F). D : coloration par l'hématoxyline de Harris d'une section de culture en IAL bien différenciée.

# c) Marqueurs spécifiques des cellules basales de l'épithélium respiratoire humain

Finalement, nous avons identifié trois marqueurs décrits dans la littérature comme spécifiques des cellules basales.

### (1) La Cavéoline-1α

La cavéoline-1 est considérée comme un marqueur spécifique des cellules basales de l'épithélium respiratoire chez la souris. Chez l'homme, ce marqueur membranaire a été précédemment identifié dans une étude menée par Krasteva *et al.*, au niveau des cellules basales et des cellules ciliées bordant les voies aériennes proximales (Krasteva *et al.*, 2006). Notre étude (Figure 43) sur des tissus de voies respiratoires humains de 4 patients différents (A) montre que ce marqueur est spécifiquement exprimé au niveau de la membrane plasmique de toutes les cellules basales. De plus, ce marqueur membranaire présente une résistance vis-à-vis de l'enzyme de dissociation des cellules épithéliales, puisqu'il est observé au niveau de la membrane plasmique des cellules basales issues des cellules épithéliales respiratoires non triées (C) identifiées par leur expression du CD151 (D), ou triées en cytométrie en flux (F), puis cytocentrifugées (C). Finalement, après marquage en suspension d'échantillons cellulaires issus de 3 patients différents, quelques cellules basales expriment ce marqueur au niveau de leur membrane plasmique (H).



### Figure 43 : Etude de l'expression de la Cavéoline-1α.

Expression de la Cavéoline-1 $\alpha$  par les cellules basales d'épithélia respiratoires (A), par les cellules épithéliales respiratoires dissociées non triées (B, C, D) ou triées (E, F) puis cytocentrifugées et par les cellules dissociées puis marquées en suspension (G et H). Les coupes de tissus de voies respiratoires ont été incubées avec l'anticorps monoclonal anti-Cav-1 $\alpha$  révélé à l'aide de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488 (A). Les cellules épithéliales dissociées ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (B, E, G) ou incubées avec des anticorps monoclonaux anti-Cav-1 $\alpha$  (C, D, F, H) et anti-CD151 (D). Les anticorps anti-Cav-1 $\alpha$  et anti-CD151 ont été révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à l'Alexa®Fluor 488 (C, D, F, G) et à l'Alexa®Fluor 594 (D). Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (D). Barre = 10 µm, Objectif x20 (B, C, G, H) et x400 (D, E, F).

### (2) ΔNp63

La ΔNp63 est une isoforme tronquée dans le domaine de transactivation, en N-Terminal de p63, gène homologue de la p53, suppresseur de tumeur, impliqué dans la régulation des cellules basales de différents épithélia comme l'épiderme ou l'épithélium des voies aériennes bronchiques et bronchiolaires.

L'étude de l'expression de ce facteur de transcription (Figure 44) sur des sections d'épithélia de voies respiratoires humaines adultes, provenant de sept patients différents, montre une expression spécifique de ΔNp63 au niveau des noyaux d'une sous-population de cellules basales respiratoires de surface (B). Cette expression au niveau d'une sous-population de cellules basales identifiées par la CK13, a été également observée sur des lames de cellules épithéliales dissociées de polypes nasaux et cytocentrifugées (D).



## Figure 44 : Expression du ΔNp63 par lescellules épithéliales des voies respiratoires bronchiques humaines.

Les coupes tissulaires et les cellules épithéliales dissociées de polypes nasaux ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (A, C) ou incubées avec des anticorps monoclonaux anti- $\Delta$ Np63 (B, D) et anti-CK13 (D). Les anticorps anti- $\Delta$ Np63 et anti-CK13 ont été révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à l'Alexa®Fluor 488 et à l'Alexa®Fluor 594, respectivement. Les flèches montrent des cellules basales n'exprimant pas le marqueur  $\Delta$ Np63 au sein de leur noyau, les têtes de flèches identifient les cellules basales marquées pour la  $\Delta$ Np63 (Objectif x40, C et D).

### (3) CK14

La Cytokératine-14 est un filament intermédiaire du cytosquelette des cellules épithéliales. Dans la littérature, il a été montré qu'une sous-population de cellules basales, exprimant la cytokératine 14, présentait la capacité de proliférer, de se différencier en cellules de Clara, en cellules ciliées et en cellules basales et de reconstituer un épithélium bronchique murin (Hong *et al.,* 2004a ;Hong *et al.,* 2004b).

L'analyse de l'expression de la CK14, au niveau de l'épithélium respiratoire de polypes nasaux humains adultes de 9 patients différents (Figure 45), montre que seule une rare sous-population de cellules basales, cellules observées de manière isolées ou par groupements de 2 à 3 cellules, expriment la CK14 (B, D).



## Figure 45 : Expression de la CK14 par les cellules épithéliales des voies aériennes humaines.

Les coupes tissulaires ont été colorées par l'Hématoxyline de Harris (A, C) ou incubées avec des anticorps monoclonaux anti-CK14 (B, D). L'anticorps anti-CK14 a été révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488. Les flèches identifient quelques rares cellules basales exprimant ce marqueur cytoplasmique, au sein d'un épithélium respiratoire humain adulte.

En conclusion de cette partie de notre étude, nous avons mis en évidence l'expression de la cavéoline-1 $\alpha$ , marqueur membranaire remplissant tous les critères indispensables à une utilisation pour un tri des cellules basales par cytométrie en flux, mais ne mettant pas en évidence de sous-population particulière. Nous avons également identifié l'expression d'un marqueur nucléaire,  $\Delta$ Np63, et d'un marqueur cytoplasmique, la CK14, exprimés par une sous-population des cellules basales au sein d'un épithélium respiratoire adulte, les autres marqueurs analysés n'ayant pas montré de spécificité vis-à-vis des cellules basales. Bien qu'intéressant,  $\Delta$ Np63 et CK14 ne peuvent toutefois être utilisés pour isoler la ou les souspopulations marquées, car étant des marqueurs nucléaires et cytoplasmiques.

## Détermination de la présence d'éventuelles souspopulations au sein des cellules basales de l'épithélium respiratoire : <u>tests de clonogénicité</u>

Dans le but de mettre en évidence d'éventuelles sous-populations au sein de la population des cellules basales respiratoires, une deuxième approche de notre étude a consisté à réaliser des tests de clonogénicité, selon le protocole décrit par Kim *et al.*, 2005 (Kim *et al.*, 2005). La croissance clonale est une caractéristique des cellules souches/progénitrices. Le principe de ce test est qu'une cellule isolée, déposée sur un tapis de cellules nutritives en arrêt de prolifération, génère après expansion, une population de cellules génétiquement identiques. En fonction du nombre de générations cellulaires réalisées *in vitro* (isolement des clones puis amplification de ceux-ci), il est possible de discriminer des sous-populations au sein de la population basale triée, le statut souche ou progéniteur des cellules clonées étant évalué par leurs capacités de prolifération et d'autorenouvellement potentiellement différentes.

## a) Génération de clones *in vitro* par les cellules basales triées

Nous avons réalisé des tests de clonogénicité à partir de cellules basales respiratoires FT<sup>+</sup>/CD151<sup>+</sup> triées par cytométrie en flux ou de cellules épithéliales non triées dissociées de

polypes nasaux. Ensemencées à très faible densité sur des supports cellulaires nutritifs en arrêt de prolifération, les cellules basales triées, et à un moindre niveau les cellules épithéliales respiratoires non triées, sont capables de générer des clones cellulaires (Figure 46). Les cellules cylindriques FT<sup>-</sup>/CD151<sup>-</sup>, purifiées en cytométrie en flux, puis ensemencées dans ces mêmes conditions et à la même densité de départ que les cellules basales, n'ont pas présenté cette capacité au niveau de notre étude.

Dans notre étude, les populations de cellules basales FT<sup>+</sup>/CD151<sup>+</sup> et de cellules non triées développent des clones (appelés clones P0), observables à partir de 10 jours de culture dans 100 % des expériences. Les clones obtenus en Passage 0 ont été isolés les uns des autres puis cultivés individuellement, sur des supports cellulaires nourriciers, en analysant leur capacité d'expansion. Chaque passage successif a ensuite été réalisé entre 10 et 15 jours après récupération des cellules du clone. Les clones issus à l'origine de cellules épithéliales non triées ont été passés 3 fois, avant de dégénérer alors que les clones issus de cellules basales triées n'ont pu être passés que deux fois, avant leur dégénérescence.



## Figure 46 : Capacité des cellules basales triées et des cellules épithéliales non triées, à générer des clones.

Evaluation de la capacité des cellules basales triées et des cellules épithéliales non triées, ensemencées à faible densité, à générer des clones sur des supports cellulaires nourriciers en arrêt de prolifération. Chaque clone observé en Passage 0, va être isolé de l'ensemble à l'aide d'un anneau de clonage et d'un traitement enzymatique, puis ensemencé sur un support de culture de diamètre toujours supérieur pour favoriser l'expansion de ce clone (Objectif x10).

Nous avons évalué le pourcentage d'obtention de clones issus de cellules épithéliales non triées ou de cellules basales triées, aux différents passages (Tableau 3). Pour réaliser cette étude, 12 échantillons de cellules épithéliales non triées provenant de patients différents (120000 cellules au total), et trois échantillons de cellules basales triées issus des cellules épithéliales de patients différents (15000 cellules triées au total) ont été utilisés. Chacune des populations, présentant un pourcentage de viabilité similaire, a été ensemencée à la même densité cellulaire. La pureté des cellules basales triées était toujours supérieure à 99 %.

Nos résultats indiquent que seule une faible proportion de cellules issues des populations triées et non triées présente une croissance clonale (Passage 0), évaluée à 3,5 % et 1,6 % respectivement. Cependant, à partir de l'obtention des clones PO issus de cellules non triées ou de cellules basales triées, nous avons observé des résultats comparables en termes de pourcentages d'obtention de clones P1, évalués à 31 % (cellules triées) et 35 % (cellules non triées), et de clones P2, évalués à 7,6 % (cellules triées) et 6,8 % (cellules non triées) à partir de l'isolement des clones P0.

Nombre de	Cellules épithéliales non triées	Cellules basales FT <sup>+</sup> /CD151 <sup>+</sup>
passage des clones	(120000 cellules)	(15000 cellules)
Passage 0	1,6 % des cellules de départ	3,5 % des cellules de départ
	1920 clones isolés en PO	525 clones isolés en P0
Passage 1	35 % de clones obtenus issus de clones P0	31 % de clones obtenus issus de clones P0
	Soit 0,56 % des cellules totales	Soit 1,08 % des cellules totales
Passage 2	19,4 % de clones P2 (issus de clones P1)	24,6 % de clones P2 (issus de clones P1)
	Soit 0,108 % des cellules totales	Soit 0,27 % des cellules totales
	= 1 cellule/926 cellules totales	= 1 cellule/371 cellules triées
	6,79 % des clones	7,6 % des clones
	obtenus en PO	obtenus en PO
Passage 3	Rares évènements	
	12,09 % de clones P3 (issus de	
	clones P2)	
	Soit 0,013 % des cellules totales	Absence de clones P3
	= 1 cellule/7692 cellules totales	
	0,82 % des clones	
	obtenus en PO	

 Tableau 3 : Pourcentage d'obtention des clones aux différents passages, rapporté au nombre de cellules ensemencées au départ, ou au nombre de clones PO isolés.

# b) Caractérisation en immunocytochimie des clones générés à partir de cellules épithéliales non triées

Nous avons caractérisé, en immunocytochimie, le phénotype des cellules composant les clones obtenus en Passage 0, générés à partir de cellules épithéliales respiratoires dissociées de polypes nasaux de quatre patients différents. Nous avons analysé l'expression de différents marqueurs spécifiques des populations cellulaires composant l'épithélium bronchique chez l'Homme (Figure 47). Notre étude indique que les clones générés à partir de cellules épithéliales dissociées non triées, expriment les différents marqueurs des cellules basales de l'épithélium bronchique tels que la cavéoline-1 $\alpha$  (A), le CD151 (B), le FT (C), la CK13 (D), ainsi que le récepteur nicotinique  $\alpha$ 7 (E). En outre, nous pouvons noter l'expression de  $\Delta$ Np63 au niveau des cellules en cours de division (F, G). En dehors de  $\Delta$ Np63, les différents marqueurs étudiés sont exprimés de manière uniforme par tous les clones PO, ainsi que par chaque cellule composant le clone. D'autre part, l'étude de l'expression de la  $\beta$ -tubuline (spécifique des cellules ciliées) et de MUC-5AC (spécifique des cellules sécrétoires, *non montré*) montre que ces marqueurs ne sont pas exprimés par les cellules des clones (H).



## Figure 47 : Caractérisation en immunocytochimie des clones P0, obtenus à partir de cellules épithéliales non triées.

Les clones ont été incubés avec des anticorps primaires anti-Cav-1 $\alpha$  (A), anti-CD151 (B), anti-FT (C), anti-CK13 (D), anti- $\alpha$ 7 (E), anti- $\Delta$ Np63 (G) et anti- $\beta$ -tubuline (H) révélés à l'aide de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488. Les clones ont été également colorés à l'hématoxyline de Harris (F, Objectif x10, C, E, H ; x20, A, F et x40, D).

L'analyse de l'expression par les clones P0 de la CK14, seul marqueur clairement identifié discriminant une sous-population de cellules basales bronchiques humaines (Figure 48), montre la présence de deux types de clones P0 : les clones exprimant la CK14<sup>+</sup> (43,2 % de la totalité des clones analysés) et les clones n'exprimant pas la CK14 (56,8 % de la totalité

des clones analysés). Ces résultats suggèrent que les clones se sont développés à partir de deux sous-populations de cellules basales, exprimant ou n'exprimant pas la CK14.



Figure 48 : Etude de l'expression de la CK14, par les clones P0 obtenus à partir de cellules épithéliales non triées.

Les clones ont été incubés avec l'anticorps primaire anti-CK14 révélé à l'aide de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa<sup>®</sup>Fluor 488. Les clones ont également été colorés à l'hématoxyline de Harris (Objectif x10).

# 5. Etude de la capacité des cellules basales à générer un réseau de glandes respiratoires

En 1995, Engelhardt *et al.* ont montré la présence de cellules souches à capacité de différenciation multipotente au sein des cellules épithéliales bronchiques humaines et aptes à générer un réseau de glandes respiratoires au sein de la sous-muqueuse dans un modèle de xénogreffe (Engelhardt *et al.*, 1995). Sur la base de ces travaux, nous avons tenté de déterminer la capacité des cellules épithéliales totales ou des cellules basales humaines adultes triées à partir de polypes nasaux, à générer un réseau de glandes dans un modèle de

culture *in vitro* en 3 Dimensions développé par Montesano *et al.,* en 1991 à partir de cellules épithéliales rénales (Montesano *et al.,* 1991).

Nous avons donc étudié la capacité des cellules épithéliales respiratoires, dissociées de polypes nasaux provenant de cinq patients différents, ou de cellules basales issues de trois expériences de tri, à générer un réseau de glandes respiratoires *in vitro*. Les cellules ont été ensemencées sur des gels de collagène. La confluence du tapis cellulaire a été obtenue après 5 à 7 jours de culture. Dès 15 jours de culture, nous avons pu observer que certains foyers de cellules épithéliales non triées (Figure 49) aussi bien que des cellules basales triées (Figure 50) ont formé des massifs cellulaires qui se sont invaginés et ont envahi les gels de collagène pour former des structures multicellulaires, observables en microscopie optique inversée (Figure 49) ou après sections de gels cryofixés (Figure 50). En outre, certaines structures multicellulaires développées à l'intérieur des gels présentent une lumière (Figure 50, D). Cependant, les cellules, dont l'origine épithéliale a été vérifiée par leur expression de cytokératine (Figure 50, E), formant ces structures restent immatures. En effet, elles n'expriment pas de marqueur classique de cellules glandulaires bronchiques comme la mucine MUC-5AC.



Figure 49 : Structures multicellulaires obtenues à partir de cellules épithéliales non triées ensemencées sur des gels de collagène de type I, observées en microscopie optique après 15 et 35 jours de culture. Observation de foyers de cellules épithéliales envahissant les gels à partir d'un tapis de cellules confluentes (A, B, C). Observation de structures multicellulaires à l'intérieur des gels de collagène I (D, E, F). (Objectif x20).



Figure 50 : Structures multicellulaires obtenues après 15 à 35 jours de culture à partir de cellules épithéliales basales triées ensemencées sur des gels de collagène de type I, observés après sections des gels cryofixés. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline de Harris (A), à l'hématoxyline/éosine (B, C, D) ou incubées avec un anticorps anti-Pan-cytokératine (E) révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa®Fluor 488 (E). Les sections révèlent la présence de structures épithéliales multicellulaires (E) bordant parfois une lumière (D) (Objectif x20).

## C. DISCUSSION

Sur la base des travaux menés par Hajj *et al.*, en 2007, démontrant la capacité progénitrice des cellules basales de l'épithélium de surface bronchique humain adulte (Hajj *et al.*, 2007), nous avons tenté d'identifier, dans cette seconde partie de notre étude, la présence éventuelle d'une ou de plusieurs sous-populations au sein des cellules basales, sous-population(s) candidate(s) au statut de cellules souches tissulaires. Dans la première partie de nos travaux, nous avons démontré que les cellules basales sont progénitrices, non seulement de l'épithélium bronchique, mais également de l'épithélium bronchiolaire humain adulte. Les cellules basales, identifiées le long de l'épithélium respiratoire depuis les voies aériennes proximales jusqu'aux bronchioles, constitueraient un pool progéniteur régénératif, latent dans des conditions normales et activable suite à une lésion produite par les pathogènes ou aérocontaminants contenus dans l'air. Cependant, bien que des résultats quant à l'identité des cellules souches, au sein de leurs niches respectives, n'ont pas encore été identifiées chez l'Homme.

Sur l'hypothèse que les cellules souches de l'épithélium des voies aériennes humaines correspondraient à une sous-population de cellules basales nous avons tenté d'identifier cette sous-population, à partir de cellules issues de polypes nasaux humains, tissus bordés d'un épithélium respiratoire présentant des propriétés morphologiques et fonctionnelles comparables à celles d'un épithélium bordant les bronches humaines (Knowles *et al.,* 1981). Pour ce faire, deux approches, menées en parallèle, ont été utilisées : d'une part, la recherche de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules basales et plus particulièrement d'une ou plusieurs éventuelles sous-populations de celles-ci, et d'autre part, l'étude de la capacité d'expansion clonale des cellules basales triées et purifiées.

L'expression de différents marqueurs cellulaires a été étudiée, marqueurs identifiés dans la littérature au niveau de l'épithélium des voies aériennes, ou classiquement exprimés par différents types de cellules souches tissulaires adultes humaines.

De nombreux marqueurs membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires des cellules basales ont été décrits dans la littérature : le facteur de transcription p63, les cytokératines-5, -13, -

17 (Daniely *et al.*, 2004 ; Nakajima *et al.*, 1998 ; Dupuit *et al.*, 1995), le CD44 (Mackay *et al.*, 1994), les intégrines de types α6, β4 et β1 (Coraux *et al.*, 1998 ; Rock *et al.*, 2009), la GSI-B4 (groupe sanguin B) (Bals et Welsch, 1997), le canal à eau AQP-3 (Kreda *et al.*, 2001; Avril-Delplanque *et al.*, 2005), les sous-unités α7 et β2 composant les récepteurs nicotiniques (Maouche *et al.*, 2009 ; Tournier *et al.*, 2006), le TNF receptor-associated factor 4 (TRAF-4) (Krajewska *et al.*, 1998), le CDw137 (Boussaud *et al.*, 1998), le Discoidin domain receptor family member 1 (DDR1) (Sakamoto *et al.*, 2001), le Nerve growth Factor Receptor (NGF-R) et l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) (Rock *et al.*, 2009 ; Voynow *et al.*, 2005). Cependant, ces marqueurs sont exprimés par l'ensemble des cellules basales, de manière uniforme, et n'identifient donc pas de sous-population.

Nous avons alors choisi d'analyser l'expression de marqueurs dits « génériques » de cellules souches tissulaires humaines, tels que la glycoprotéine de la famille des transporteurs ABC appelée ABCG2 (ou Bcrp-1). L'expression de ce marqueur a été, à l'origine, mis en évidence au niveau des cellules de certains types de cancers mammaires ou du colon, caractérisés par une résistance à différents agents chimiothérapeutiques dûe à un efflux de ces substances cytotoxiques hors des cellules pathologiques via cette glycoprotéine (Doyle *et al.*, 1998). Cette protéine transmembranaire a, par la suite, été observée au niveau de différents épithélia normaux, tels que l'épithélium intestinal et du colon, et surtout identifié en temps que marqueur caractéristique d'un type particulier de cellules souches appelé Side Population (SP). Ces cellules souches d'origine hématopoïétique ou non-hématopoïétique, capables d'effluer le Hoechst 33342 via Bcrp-1, ont été identifiées au niveau de la moelle osseuse murine (Goodell *et al.*, 1996), puis au sein de certains tissus solides (Challen et Little, 2006), notamment l'épithélium pulmonaire murin (Summer *et al.*, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2007).

Le CD133 est, quant à lui, reconnu comme un marqueur de cellules souches somatiques tissulaires, souvent utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs pour l'isolement des cellules souches dans de nombreux tissus tels que la moelle osseuse (Yin *et al.*, 1997), le cerveau (Uchida *et al.*, 2000) ou le foie (Kordes *et al.*, 2007). De plus en plus d'études mettent en évidence l'expression du CD133 au niveau de cellules souches cancéreuses de différentes origines comme la prostate, le colon ou le poumon (Eramo *et al.*, 2008; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2005). Ce marqueur, identifié au niveau de certaines

cellules épithéliales adultes (Corbeil *et al.,* 2000) et embryonnaires (Weigmann *et al.,* 1997), est décrit comme étant un antigène de surface spécifique des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines (Yin *et al.,* 1997) et des cellules progénitrices endothéliales.

Le CD34 est un marqueur des cellules souches hématopoïétiques, endothéliales et épidermiques humaines (Ivanova *et al.,* 2002; Blanpain *et al.,* 2004). Une étude, réalisée en 2005, a montré que les cellules souches épithéliales bronchiolaires murines (BASC, CCSP<sup>+</sup>/SP-C<sup>+</sup>), situées au niveau des jonctions bronchiolo-alvéolaires (BADJ), pouvaient être isolées sur la base de leur expression de Sca-1 (Stem cell antigen-1), et de CD34 (Kim *et al.,* 2005).

Exprimée de manière précoce au cours du développement embryonnaire, la nestine est, quant à elle, également mise en évidence, au niveau d'une sous-population de cellules souches de l'épithélium limbique de la cornée humaine (Seigel *et al.*, 2003), ou au niveau du compartiment régénératif du système nerveux central et de nombreux autres tissus comme le foie, le pancréas, ou le tractus gastro-intestinal (Wiese *et al.*, 2004).

Bien qu'étant identifiés au niveau de différents types de cellules épithéliales ou de cellules souches bien caractérisées chez l'adulte, parmi ces différents marqueurs, seule la nestine a été mise en évidence au niveau de toutes les cellules basales de l'épithélium respiratoire humain. La nestine a été précédemment identifiée co-exprimée avec la CK14 et le facteur de transcription  $\Delta$ Np63, au sein du compartiment régénératif des glandes mammaires humaines (Li *et al.*, 2007). Cependant, ce marqueur, qui n'identifie pas de sous-population de cellules basales, est en outre sensible au traitement enzymatique nécessaire à la dissociation épithéliale des tissus respiratoires et est totalement absent des cellules épithéliales isolées.

Notre étude nous a toutefois permis d'identifier trois marqueurs présentant une spécificité d'expression par les cellules basales de l'épithélium de polypes nasaux humains: la cavéoline-1 isoforme  $\alpha$ , la  $\Delta$ Np63 $\alpha$  et la CK14.

La cavéoline-1 isoforme  $\alpha$ , que nous avions préalablement identifiée au niveau de l'ensemble des cellules basales bronchiolaires humaines, est exprimée également par les cellules basales de l'épithélium des voies aériennes proximales, et présente toute les

caractéristiques de résistance aux traitements enzymatiques nécessaires pour une utilisation dans le cadre du tri des cellules basales. Cependant, ce marqueur n'identifie pas, tout comme la nestine, de sous-population de cellules basales.

A l'inverse, l'analyse de l'expression de l'isoforme  $\Delta Np63\alpha$  et de la CK14 a montré des profils d'expression non homogènes au sein de l'ensemble des cellules basales d'intérêt.

p63, gène homologue de la p53 (suppresseur de tumeur), est décrit comme étant impliqué dans la régulation des cellules basales de différents épithélia pluristratifiés (épiderme ou épithélium des voies aériennes bronchiques et bronchiolaires), en régulant le devenir, la différenciation et l'homéostasie épithéliale au cours du développement embryonnaire et dans les tissus adultes. En effet, les souris p63<sup>-/-</sup> ne présentent ni épiderme, ni autres épithélia stratifiés (Yang et al., 1999). Le profil de transcription de p63 est complexe, présentant différentes isoformes par épissage alternatif à activités opposées : l'isoforme ΔN-p63, oncogénique, tronquée en NH2-Terminal dans son domaine de transactivation, est considérée comme dominant négatif, et l'isoforme TAp63, présenterait une activité similaire à la protéine suppresseur de tumeur p53 (Little et Jochemsen, 2002). ΔNp63 présente un rôle de répresseur de transcription, en se liant soit directement à l'ADN, soit en inhibant les isoformes TAp63. Ce marqueur serait également requis pour le maintient d'un état de cellules « souches-like », favorisant la prolifération continue et la croissance tumorale (Deyoung et Ellisen, 2007), en inhibant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose induits par TAp63 et p53. Chez l'adulte, l'isoforme  $\Delta Np63\alpha$  est exprimée de manière prédominante dans les couches cellulaires basales d'épithélia stratifiés, suggérant sa contribution au maintien du potentiel prolifératif des cellules basales nécessaires à la stratification épithéliale (Truong et al., 2006). Il a été établi en 2009, le rôle de médiateur de la ΔNp63 au cours de la stratification des kératinocytes en régulant directement les gènes codant des kératines exprimées par les cellules basales, notamment la CK14 (Romano et al., 2009). Cependant, bien qu'étant identifié au niveau d'une sous-population de cellules basales de l'épithélium de polypes nasaux, probablement des cellules entrées dans un état prolifératif, ΔNp63 étant un marqueur nucléaire, il ne peut être utilisé pour isoler cette souspopulation par cytométrie en flux.

La Cytokératine-14, filament intermédiaire du cytosquelette épithélial, est exprimée au niveau de tous les kératinocytes, ainsi que dans les cellules basales de nombreux épithélia tels que les épithélia trachéaux, œsophagiens ou prostatiques (Porter et al., 2000), en association avec la CK5 pour former des complexes hétérotétramériques qui s'étendent de la surface du noyau à la membrane plasmique épithéliale. Il a été démontré que l'expression de la CK14 augmente au niveau des cellules épithéliales embryonnaires qui donneront, à termes, les cellules basales des épithélia stratifiés. De plus, l'expression de la CK14 serait corrélée avec l'activité mitotique et le degré de multipotence des cellules basales de ces épithélia (Coulombe et al., 1989). Ce marqueur a été largement étudié au niveau de l'épithélium trachéal murin, dans le cadre de l'identification des éventuelles cellules souches tissulaires, ainsi que dans l'établissement d'une hiérarchie des cellules souches/progénitrices et leur descendance en cellules différenciées. En effet, il a été rapporté qu'une souspopulation de cellules basales, localisée au sein des canaux glandulaires et de l'épithélium de surface trachéal dans les zones intercartilagineuses, exprime fortement la CK14, retient le BrdU, et est capable de régénérer un épithélium trachéal pseudo-stratifié différencié après une lésion importante de l'épithélium (Borthwick et al., 2001). De plus, des travaux ont montré la présence, au sein des cellules basales trachéales, de sous-populations hétérogènes de cellules souches à capacité de différenciation unipotentes ou multipotentes, ainsi qu'une induction rapide de l'expression de la CK14 au sein des cellules basales, précédant l'apparition d'une hyperplasie de celles-ci et d'une redifférenciation en cellules ciliées et en cellules sécrétoires (Hong et al., 2004b). La CK14 (marqueur de cellules souches), au sein de l'épithélium trachéal murin, permet donc la mise en évidence de l'hétérogénéité des cellules basales et la discrimination de sous-populations, où les cellules CK14<sup>+</sup> (20 % des cellules basales totales) présenteraient des capacités de cellules souches, et les cellules CK14<sup>-</sup> (80 %) présenteraient des capacités de cellules progénitrices. Cependant, une étude récente a suggéré que l'induction de l'expression de la CK14 serait synonyme d'une activation générant une induction de la différenciation cellulaire en réponse à des signaux environnementaux (Cole et al., 2010). Dans notre étude, nous avons identifié l'expression de la CK14 par de rares cellules basales au sein d'un épithélium non lésé. Ces cellules pourraient donc bien correspondre aux cellules souches tissulaires adultes humaines, ou au moins à des cellules quiescentes capables d'être réactivées en fonction des conditions environnementales. Cette population marquée pourrait ainsi constituer la population des cellules basales maintenues en état prolifératif, donc pourrait potentiellement constituer le réservoir des cellules souches de l'épithélium bronchique humain. Cependant, comme pour  $\Delta$ Np63, ce marqueur étant cytoplasmique, il ne peut être utilisé pour isoler les cellules d'intérêt en cytométrie en flux.

Notre deuxième approche a consisté à étudier la capacité d'expansion clonale des cellules basales afin d'identifier, parmi celles-ci, des cellules présentant des capacités de prolifération et d'autorenouvellement différentes, discriminant ainsi les cellules souches des cellules progénitrices. Pour cela, nous avons réalisé des tests de clonogénicité, à partir de cellules basales triées en cytométrie en flux, ou à partir de cellules épithéliales de polypes nasaux non triées. Par cette méthode, nous avons mis en évidence la capacité d'une faible proportion de cellules basales triées et de cellules épithéliales non triées à générer des clones en passage 0, évaluée à 3,5 % et 1,6 % respectivement de la quantité de cellules ensemencées. Nous pouvons donc tout d'abord constater l'hétérogénéité de la population des cellules basales, tant sur le plan phénotypique que fonctionnel.

En comparant les données chiffrées établies en passage 0, nous pouvons observer que les cellules basales génèrent environ 2,2 fois plus de clones que les cellules épithéliales non triées. Or, il a été rapporté que les cellules basales représentent environ 30 % de la totalité des cellules épithéliales de l'épithélium bronchique humain (Boers *et al.*, 1998). Nos résultats suggèrent donc que, dans les tests réalisés à partir de cellules épithéliales non triées, les cellules basales pourraient représenter le pool de cellules doué de capacité d'expansion clonale. De plus, afin de déterminer la capacité des cellules cylindriques (cellules ciliées et sécrétoires), à générer des clones *in vitro*, cette population, triée en cytométrie en flux, a été ensemencée à la même densité que les cellules basales. Comme il avait été précédemment établi par Hajj *et al.* en 2007, nos résultats montrent que les cellules cylindriques de l'épithélium bronchique humain adulte, même sur une couche de cellules nourricières, sont incapables de proliférer et de générer des clones cellulaires. Cette observation renforce l'hypothèse du développement de clones par les seules cellules basales au sein des cellules épithéliales non triées. Les clones obtenus en passage 0 ont ensuite été isolés puis cultivés individuellement. Bien que le pourcentage de clones obtenus en passage 1 et en passage 2 soit similaire pour les cellules basales triées et pour les cellules épithéliales non triées (passage 1 : 31 % et 35 %, pour les cellules basales et les cellules non triées, respectivement ; passage 2 : 7,6 % et 6,8 %, pour les cellules basales et les cellules non triées, respectivement), il est à noter que les clones dérivant à l'origine de cellules épithéliales non triées ont pu être passés 3 fois alors que les clones issus de cellules basales triées n'ont pu être passés que deux fois. Cette observation suggère que les cellules triées, ayant subi un protocole de marquage lourd avant le tri cellulaire, ainsi qu'un passage dans un flux liquidien à haute pression, seraient fragilisées.

Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence l'hétérogénéité de la population des cellules basales, qui serait constituée majoritairement des cellules incapables de réaliser des clones, et de plus rares cellules montrant des capacités d'expansion *in vitro,* à plus ou moins long terme. Cependant, le faible nombre de passages ayant pu être réalisés indique, soit une absence de cellules souches au sein des cellules que nous avons ensemencées, soit la présence unique de cellules progénitrices, soit des conditions de culture impropres à l'expansion des cellules souches d'intérêt.

Nous avons également caractérisé du point de vue phénotypique, les clones obtenus en passage 0 générés à partir de cellules épithéliales non triées. Nous avons ainsi pu montrer que tous les clones obtenus *in vitro*, expriment les différents marqueurs spécifiques des cellules basales bronchiques humaines tels que la cavéoline-1, le CD151, le FT, la CK13, ainsi que le récepteur nicotinique  $\alpha$ 7 et la  $\Delta$ Np63, avec une expression de ce dernier facteur de transcription au niveau des cellules en cours de division. A l'exception de  $\Delta$ Np63, l'ensemble des cellules composant les clones et l'ensemble des clones expriment ces marqueurs uniformément. De plus, nous avons montré l'absence d'expression de marqueurs des cellules différenciées ciliées et sécrétoires ce qui indique que 1) les clones se sont développés à partir des seules cellules basales, et 2) les cellules des clones ne se sont pas différenciées dans nos conditions de culture. De façon intéressante, nos résultats montrent que l'expression de la CK14, seul marqueur clairement identifié discriminant une souspopulation de cellules basales bronchiques humaines, par les clones en passage 0 est restreinte à une proportion des clones développés, de l'ordre de 43,2 % de la totalité des clones analysés. Cette observation suggère que les clones obtenus dérivent, à l'origine, d'au moins deux sous-populations de cellules basales : les cellules basales CK14<sup>+</sup> et les cellules basales CK14<sup>-</sup>, confirmant ainsi l'hétérogénéité de la population des cellules basales de départ.

Enfin, nous avons analysé la capacité des cellules basales triées et des cellules épithéliales non triées, après leurs ensemencements sur des gels de collagène, à générer des structures glandulaires après invasion des gels. Nous avons tout d'abord montré que les cellules basales triées ainsi que les cellules épithéliales non triées sont capables de former une monocouche cellulaire confluente sur les gels de collagène de type I. Sur la base des résultats que nous avons présentés précédemment, nous pouvons conclure que le tapis cellulaire obtenu à partir des cellules épithéliales non triées s'est développé à partir des seules cellules basales présentes au sein de la population ensemencée. Nous avons ensuite pu observer que, dans les deux cas de culture, certaines cellules, au sein de tapis, sont capables de former des îlots cellulaires qui envahissent les gels et reconstituent des structures multicellulaires non différenciées, bordant parfois une lumière. Nous pouvons donc conclure qu'il existe, au sein des cellules basales bronchiques humaines, une souspopulation, non identifiée sur des critères morphologiques ou immunocytochimiques, douée de la capacité de générer des structures pseudo-glandulaires tridimensionnelles. Ce résultat est à rapprocher de l'observation faite par Engelhardt et al. en 1995, qui rapportaient que des cellules épithéliales bronchiques humaines, génétiquement tracées, régénéraient un épithélium bronchique différencié dans un modèle de xénogreffe, et que de plus, une souspopulation cellulaire présentait le potentiel de générer un réseau de glandes respiratoires au sein de la sous-muqueuse, démontrant la présence de cellules souches à capacité de différenciation multipotente, au sein des cellules bronchiques humaines (Engelhardt et al., 1995).

### V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le travail de cette thèse a été mené autour de deux axes étroitement liés, d'une part, en identifiant la nature des cellules progénitrices endogènes responsables de la régénération de l'épithélium bronchiolaire humain, et d'autre part, en s'appuyant sur des précédents travaux identifiant les cellules basales en tant que cellules progénitrices de l'épithélium bronchique humain adulte, en tentant d'identifier la présence potentielle de souspopulations au sein des cellules basales, candidates au statut de cellules souches épithéliales respiratoires humaines.

Dans la première partie de notre travail, nous avons démontré, pour la première fois chez l'Homme, que les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire adulte, isolées par cytométrie en flux sur la base de leur expression spécifique d'un marqueur membranaire, le CD151, et cultivées *in vitro* en interface air-liquide, sont capables de régénérer un épithélium bronchiolaire différencié et fonctionnel. L'épithélium ainsi régénéré, à partir des seules cellules basales purifiées, présente des caractéristiques morphologiques, structurales et fonctionnelles similaires à celles d'un épithélium bronchiolaire natif, ou à celles d'un épithélium régénéré à partir de cellules épithéliales bronchiolaires dissociées totales et non triées. Les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire présentent donc une capacité de différenciation multipotente, pour donner l'ensemble des populations cellulaires composant un épithélium bronchiolaire. Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain adulte peuvent être considérées, au moins, comme les cellules progénitrices de cet épithélium.

L'épithélium reconstitué par les seules cellules basales bronchiolaires n'est cependant pas totalement caractérisé pour le moment. Il serait important d'identifier et de quantifier, sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques des différentes populations basales, ciliées et de Clara constituant l'épithélium bronchiolaire, les populations cellulaires présentes au sein des épithélia régénérés à partir de cellules basales triées et de comparer les résultats obtenus aux données présentées dans la littérature au niveau d'un épithélium bronchiolaire natif. De plus dans le but de valider les cellules basales en tant que cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain, déterminer l'activité enzymatique de la télomérase par ces cellules est primordial. En effet, cette activité enzymatique est faiblement détectée dans les cellules souches quiescentes, mais hautement présente dans les cellules à activité proliférative importante, notamment les cellules progénitrices (Umemoto *et al.,* 2006), alors qu'elle semble absente de la plupart des cellules somatiques (Forsyth et al., 2002). Enfin, il serait intéressant de réaliser des tests de reconstitution itérative de l'épithélium bronchiolaire. Ces tests consistent à régénérer un épithélium bronchiolaire mature à partir de cellules basales hautement purifiées, d'en isoler ensuite les cellules basales sur la base de leur expression du CD151 et de tenter de reconstituer à nouveau un épithélium différencié à partir de ces cellules, et celà, plusieurs fois à la suite. Ces tests pourraient mettre en évidence la présence de cellules souches épithéliales bronchiolaires au sein des cellules basales CD151<sup>+</sup> triées.

Nos résultats montrent que les cellules basales de l'épithélium bronchiolaire humain adultes peuvent être considérées comme les cellules progénitrices de cet épithélium. Dans la mesure où les cellules basales constituent également les cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire des voies aériennes proximales (Hajj et al., 2007; Rock et al., 2009), cette population de cellules basales pourrait constituer un pool cellulaire prolifératif et régénératif global au sein des voies aériennes. Cependant, bien qu'exprimant des marqueurs spécifiques similaires et cultivées dans des conditions identiques, les cellules basales triées et purifiées bronchiques et bronchiolaires présentent des capacités de différenciation multipotentes différentes, à l'origine de la régénération d'un épithélium morphologiquement (hauteur de l'épithélium) et structuralement (composition cellulaire de l'épithélium) différent. Ces deux types de cellules basales (bronchiques et bronchiolaires) semblent être donc des cellules différentes. Il serait donc extrêmement intéressant d'étudier et de comparer leur profil d'expression, par des études de transcriptomique et de protéomique, afin d'identifier des marqueurs caractéristiques communs ou différents permettant leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons tenté d'identifier une ou plusieurs sous-population(s) de cellules basales de l'épithélium bronchique humain adulte,

potentiellement candidate(s) au statut de cellules souches épithéliales tissulaires. Nous avons établi l'expression spécifique, par une ou plusieurs sous-populations de cellules basales, de deux marqueurs que sont la CK14 et ΔNp63. Alors que ΔNp63 serait impliqué dans le maintien d'un état prolifératif des cellules basales épithéliales, l'expression de la CK14 identifie, au sein d'un épithélium bronchique humain adulte, une rare sous-population de cellules basales, isolées ou en groupement de deux à trois cellules. Cependant, bien qu'identifiant une sous-population d'intérêt, aucun des marqueurs identifiés ne peut être utilisé pour l'isolement de celle-ci. Nous avons, en outre, mis en évidence la capacité d'une faible sous-population de cellules basales bronchiques à réaliser in vitro une expansion clonale limitée. Les clones générés expriment de manière homogène l'ensemble des marqueurs spécifiquement identifiés au niveau des cellules basales bronchiques. L'expression de la CK14 est, quand à elle, plus restreinte, et a identifié deux sous-populations de clones, qui se sont donc développés à partir de deux sous-populations de cellules basales. Dans la mesure où les cellules basales épithéliales bronchiques humaines CK14<sup>+</sup> sont des évènements rares au sein des tissus, les clones dérivant de ces cellules et exprimant ce marqueur pourraient constituer la sous-population d'intérêt recherchée, candidate au statut de cellules souches bronchique. Ces clones nous paraissent donc être d'un intérêt majeur. Il semble important de définir les conditions optimales favorisant leur expansion, puis de les étudier en termes de transcriptome et de protéome afin de mettre potentiellement en évidence un profil d'expression de certains gènes spécifiquement exprimés par des cellules souches adultes tissulaires déjà identifiées, ainsi que des marqueurs spécifiques permettant de les isoler par la comparaison de leur profil d'expression avec celui des cellules basales CK14<sup>-</sup>.

Une troisième méthode pourrait être envisagée afin de mettre en évidence une ou des sous-populations de cellules basales épithéliales respiratoires. En effet, des études ont mis en évidence l'activation de certains marqueurs suite à un stress, marqueurs permettant d'identifier une sous population cellulaire présentant une résistance à l'apoptose, une forte capacité de prolifération et une importante activité de la télomérase. Cette étude indique qu'une sous-population en dormance, présentant des capacités de cellules souches, pourrait potentiellement être réinduite lors d'un stress (Reddy *et al.,* 2004 ; Lee *et al.,* 2006). Dans ce cadre, il pourrait être envisagé la possibilité de réinduire l'expression, par une sous-

population préalablement quiescente, de marqueurs discriminant la population de cellules souches parmi les cellules basales.

Notre étude a également mis en évidence la présence d'une sous-population de cellules basales à l'origine de la formation de foyers d'invasion cellulaires afin de générer *in vitro* des structures cellulaires tridimensionnelles de type glandulaire, capacité identifiée comme spécifique des cellules souches épithéliales bronchiques humaines (Engelhardt *et al.*, 1995). Cependant, les études permettant d'identifier la sous-population basale à capacité de cellules souches ne sont qu'à leur commencement. Il apparait impératif d'identifier de nouveaux marqueurs de discrimination membranaires d'éventuelles sous-populations en association avec l'expression de la CK14, seul marqueur jusqu'à présent mis en évidence, afin d'isoler ces cellules, et de les caractériser phénotypiquement et fonctionnellement. Il sera également fondamental d'établir les conditions optimales de maintien de l'état multipotent des cellules d'intérêt et de définir l'environnement propice à leur expansion en culture *in vitro*.

## BIBLIOGRAPHIE

### AGERBERTH B, CHARO J, WERR J, OLSSON B, IDALI F, LINDBOM L, et al.

The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):3086-93.

#### AGNEL M, VERMAT T, CULOUSCOU JM.

Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS Lett.* 1999 Jul 23;455(3):295-301.

## ALESSANDRINI F, WEICHENMEIER I, VAN MIERT E, TAKENAKA S, KARG E, BLUME C, et al.

Effects of ultrafine particles-induced oxidative stress on Clara cells in allergic lung inflammation.

Part Fibre Toxicol. 2010 Apr 26;7:11.

#### ANG J, FANG BL, ASHMAN LK, FRAUMAN AG.

The migration and invasion of human prostate cancer cell lines involves CD151 expression. *Oncol Rep.* 2010 Dec;24(6):1593-7.

#### ARMSTRONG RJ, SVENDSEN CN.

Neural stem cells: from cell biology to cell replacement. *Cell Transplant.* 2000 Mar-Apr;9(2):139-52.

#### AVILION AA, NICOLIS SK, PEVNY LH, PEREZ L, VIVIAN N, LOVELL-BADGE R.

Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126-40.

## 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 Aug;23(7):992-1001.

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

Preliminary evaluation of neuroendocrine cells in the respiratory tract in rats with experimental uremia.

Folia Histochem Cytobiol. 2001;39(2):205-6.

#### BACH SP, RENEHAN AG, POTTEN CS.

Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):469-76.

#### BALDWIN F.

Basal cells in human bronchial epithelium. *Anat Rec.* 1994 Mar;238(3):360-7.
# 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, WELSCH U.

Lectins and antibodies to blood group antigens as markers for the basal cells of the human respiratory epithelium.

Microsc Res Tech. 1997 Sep 1;38(5):505-11.

# BASBAUM CB, JANY B, FINKBEINER WE.

The serous cell. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:97-113.

# BITTMANN I, DOSE T, BARETTON GB, MÜLLER C, SCHWAIBLMAIR M, KUR F, et al.

Cellular chimerism of the lung after transplantation. An interphase cytogenetic study. *Am J Clin Pathol.* 2001 Apr;115(4):525-33.

### BJORNSON CR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI MC, VESCOVI AL.

Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999 Jan 22;283(5401):534-7.

### BLANPAIN C, LOWRY WE, GEOGHEGAN A, POLAK L, FUCHS E.

Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 2004 Sep 3;118(5):635-48.

### **BLENKINSOPP WK.**

Proliferation of respiratory tract epithelium in the rat. *Exp Cell Res.* 1967 Apr;46(1):144-54.

### 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.

### BOERS JE, AMBERGEN AW, THUNNISSEN FB.

Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1585-91.

### BOERS JE, DEN BROK JL, KOUDSTAAL J, ARENDS JW, THUNNISSEN FB.

Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Sep;154(3 Pt 1):758-63.

### BONNET D.

Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med.* 2003 Nov;3(3):140-9.

### BORTHWICK DW, SHAHBAZIAN M, KRANTZ QT, DORIN JR, RANDELL SH.

Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Jun;24(6):662-70.

### **BOUCHER RC.**

Human airway ion transport. Part one. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Jul;150(1):271-81.

# **BOUCHER RC.**

Human airway ion transport. Part two. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Aug;150(2):581-93.

# BOUSSAUD V, SOLER P, MOREAU J, GOODWIN RG, HANCE AJ.

Expression of three members of the TNF-R family of receptors (4-1BB, lymphotoxin-beta receptor, and Fas) in human lung. *Eur Respir J.* 1998 Oct;12(4):926-31.

# BOWES D, CLARK AE, CORRIN B.

Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax.* 1981 Feb;36(2):108-15.

# **BOWES D, CORRIN B.**

Ultrastructural immunocytochemical localisation of lysozyme in human bronchial glands. *Thorax.* 1977 Apr;32(2):163-70.

# **BRANDTZAEG P.**

Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components. Immunohistochemistry with a cold ethanol-fixation technique. *Immunology*. 1974 Jun;26(6):1101-14.

# **BREEZE RG, WHEELDON EB.**

The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis.* 1977 Oct;116(4):705-77.

# BREUER R, ZAJICEK G, CHRISTENSEN TG, LUCEY EC, SNIDER GL.

Cell kinetics of normal adult hamster bronchial epithelium in the steady state. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990 Jan;2(1):51-8.

# BRIEL M, GREGER R, KUNZELMANN K.

Cl- transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na+ channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC.

J Physiol. 1998 May 1;508 (Pt 3):825-36.

# BRODY AR, HOOK GE, CAMERON GS, JETTEN AM, BUTTERICK CJ, NETTESHEIM P.

The differentiation capacity of Clara cells isolated from the lungs of rabbits. *Lab Invest.* 1987 Aug;57(2):219-29.

### **BRODY JS, WILLIAMS MC.**

Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu Rev Physiol.* 1992;54:351-71.

# BUISINE MP, DEVISME L, COPIN MC, DURAND-REVILLE M, GOSSELIN B, AUBERT JP, et al.

Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Feb;20(2):20.

# CADIEUX A, SPRINGALL DR, MULDERRY PK, RODRIGO J, GHATEI MA, TERENGHI G, et al.

Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. *Neuroscience*. 1986 Oct;19(2):605-27.

### CAPLAN AI.

The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994 Jul;21(3):429-35.

### CARRARO G, PERIN L, SEDRAKYAN S, GIULIANI S, TIOZZO C, LEE J, et al.

Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. Stem Cells. 2008 Nov;26(11):2902-11. Epub 2008 Aug 21.

# CARTWRIGHT P, MCLEAN C, SHEPPARD A, RIVETT D, JONES K, DALTON S.

LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005 Mar;132(5):885-96. Epub 2005 Jan 26.

### 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.

# CHALLEN GA, LITTLE MH.

A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells.* 2006 Jan;24(1):3-12.

### CHILVERS MA, O'CALLAGHAN C.

Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax.* 2000 Apr;55(4):314-7.

# CHU AJ.

Tissue factor mediates inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Aug 15;440(2):123-32.

### COHEN AW, HNASKO R, SCHUBERT W, LISANTI MP.

Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1341-79.

# COLE BB, SMITH RW, JENKINS KM, GRAHAM BB, REYNOLDS PR, REYNOLDS SD.

Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. *Am J Pathol.* 2010 Jul;177(1):362-76. Epub 2010 Jun 3.

### COLLINS AT, BERRY PA, HYDE C, STOWER MJ, MAITLAND NJ.

Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10946-51.

# CORAUX C, DELPLANQUE A, HINNRASKY J, PEAULT B, PUCHELLE E, GAILLARD D.

Distribution of integrins during human fetal lung development. *J Histochem Cytochem.* 1998 Jul;46(7):803-10.

# CORAUX C, NAWROCKI-RABY B, HINNRASKY J, KILEZTKY C, GAILLARD D, DANI C, et al.

Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Feb;32(2):87-92. Epub 2004 Dec 2.

# CORBEIL D, RÖPER K, HELLWIG A, TAVIAN M, MIRAGLIA S, WATT SM, et al.

The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25:275(8):5512-20.

# COULOMBE PA, KOPAN R, FUCHS E.

Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation.

J Cell Biol. 1989 Nov;109(5):2295-312.

# DANIELY Y, LIAO G, DIXON D, LINNOILA RI, LORI A, RANDELL SH, et al.

Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium.

Am J Physiol Cell Physiol. 2004 Jul;287(1):C171-81.

# DAVÉ V, WERT SE, TANNER T, THITOFF AR, LOUDY DE, WHITSETT JA.

Conditional deletion of Pten causes bronchiolar hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Mar;38(3):337-45. Epub 2007 Oct 5.

### DAVIES JC, POTTER M, BUSH A, ROSENTHAL M, GEDDES DM, ALTON EW.

Bone marrow stem cells do not repopulate the healthy upper respiratory tract. *Pediatr Pulmonol.* 2002 Oct;34(4):251-6.

### DE COPPI P, BARTSCH G JR, SIDDIQUI MM, XU T, SANTOS CC, PERIN L, et al.

Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007 Jan;25(1):100-6. Epub 2007 Jan 7.

# DE MAIO A, VEGA VL, CONTRERAS JE.

Gap junctions, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol*. 2002 Jun;191(3):269-82.

# DENHAM M, COLE TJ, MOLLARD R.

Embryonic stem cells form glandular structures and express surfactant protein C following culture with dissociated fetal respiratory tissue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jun;290(6):L1210-5. Epub 2006 Jan 6.

### **DEYOUNG MP, ELLISEN LW.**

p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 2007 Aug 9;26(36):5169-83. Epub 2007 Mar 5.

# DIERYNCK I, BERNARD A, ROELS H, DE LEY M.

The human Clara cell protein: biochemical and biological characterisation of a natural immunosuppressor. *Mult Scler.* 1996 Jul;1(6):385-7.

# DONNELLY GM, HAACK DG, HEIRD CS.

Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. *Cell Tissue Kinet*. 1982 Mar;15(2):119-30.

# DONTU G, AL-HAJJ M, ABDALLAH WM, CLARKE MF, WICHA MS.

Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003 Oct;36 Suppl 1:59-72.

# VAN DORP AG, VERHOEVEN MC, NAT-VAN DER MEIJ TH, KOERTEN HK, PONEC M.

A modified culture system for epidermal cells for grafting purposes: an in vitro and in vivo study.

Wound Repair Regen. 1999 Jul-Aug;7(4):214-25.

### DOVEY JS, ZACHAREK SJ, KIM CF, LEES JA.

Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11857-62. Epub 2008 Aug 12.

# DOYLE LA, YANG W, ABRUZZO LV, KROGMANN T, GAO Y, RISHI AK, ROSS DD.

A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15665-70. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Mar 2;96(5):2569.

### DRISCOLL B, BUCKLEY S, BUI KC, ANDERSON KD, WARBURTON D.

Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;279(6):L1191-8.

# DUPUIT F, KÄLIN N, BRÉZILLON S, HINNRASKY J, TÜMMLER B, PUCHELLE E.

CFTR and differentiation markers expression in non-CF and delta F 508 homozygous CF nasal epithelium.

J Clin Invest. 1995 Sep;96(3):1601-11.

# EGAN M, FLOTTE T, AFIONE S, SOLOW R, ZEITLIN PL, CARTER BJ, et al.

Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR.

Nature. 1992 Aug 13;358(6387):581-4.

### ELLEFSEN P, TOS M.

Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae. *Anat Anz.* 1972;130(5):501-20.

### ENGELHARDT JF, SCHLOSSBERG H, YANKASKAS JR, DUDUS L.

Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development*. 1995 Jul;121(7):2031-46.

### ENGELHARDT JF.

Stem cell niches in the mouse airway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Jun;24(6):649-52.

# ERAMO A, LOTTI F, SETTE G, PILOZZI E, BIFFONI M, DI VIRGILIO A, et al.

Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008 Mar;15(3):504-14. Epub 2007 Nov 30.

# EVANS MJ, CABRAL LJ, STEPHENS RJ, FREEMAN G.

Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO2. *Am J Pathol.* 1973 Feb;70(2):175-98.

### EVANS MJ, CABRAL LJ, STEPHENS RJ, FREEMAN G.

Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO2. *Exp Mol Pathol.* 1975 Feb;22(1):142-50.

### EVANS MJ, CABRAL-ANDERSON LJ, FREEMAN G.

Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Lab Invest.* 1978 Jun;38(6):648-53.

### EVANS MJ, COX RA, SHAMI SG, WILSON B, PLOPPER CG.

The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1989 Dec;1(6):463-9.

# EVANS MJ, KAUFMAN MH.

Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

# EVANS MJ, MOLLER PC.

Biology of airway basal cells. *Exp Lung Res.* 1991 May-Jun;17(3):513-31.

### EVANS MJ, PLOPPER CG.

The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Aug;138(2):481-3.

### EVANS MJ, SHAMI SG, CABRAL-ANDERSON LJ, DEKKER NP.

Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO2. *Am J Pathol.* 1986 Apr;123(1):126-33.

### FALK MM.

Cell-free synthesis for analyzing the membrane integration, oligomerization, and assembly characteristics of gap junction connexins. *Methods.* 2000 Feb;20(2):165-79.

# FALK MM.

Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol.* 2000 Aug;79(8):564-74.

# FANG B, LI Y, SONG Y, LI N, CAO Y, WEI X, et al.

Human adipose tissue-derived adult stem cells can lead to multiorgan engraftment. *Transplant Proc.* 2010 Jun;42(5):1849-56.

# FITTER S, SINCOCK PM, JOLLIFFE CN, ASHMAN LK.

Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochem J.* 1999 Feb 15;338 (Pt 1):61-70.

# VAN DER FLIER LG, CLEVERS H.

Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:241-60.

### FORD JR, TERZAGHI-HOWE M.

Basal cells are the progenitors of primary tracheal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res.* 1992 Jan;198(1):69-77.

# FÖRSTER Y, MEYE A, ALBRECHT S, SCHWENZER B.

Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. *Clin Chim Acta*. 2006 Feb;364(1-2):12-21. Epub 2005 Sep 2.

### FORSYTH NR, WRIGHT WE, SHAY JW.

Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again.

Differentiation. 2002 Jan;69(4-5):188-97.

# FRANCO M, MURATORI C, CORSO S, TENAGLIA E, BERTOTTI A, CAPPARUCCIA L, et al.

The tetraspanin CD151 is required for met-dependent signaling and tumor cell growth. *J Biol Chem.* 2010 Oct 11. [Epub ahead of print]

# FRANKE WW, GOLDSCHMIDT MD, ZIMBELMANN R, MUELLER HM, SCHILLER DL, COWIN P.

Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jun;86(11):4027-31.

### FRANKEN C, KRAMPS JA, MEYER CJ, DIJKMAN JH.

Localization of a low molecular weight protease inhibitor in the respiratory tract. Bull Eur Physiopathol Respir. 1980;16 Suppl:231-6.

#### FUCHS E, TUMBAR T, GUASCH G.

Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell. 2004 Mar 19;116(6):769-78.

#### FUCHS S, HOLLINS AJ, LAUE M, SCHAEFER UF, ROEMER K, GUMBLETON M, et al.

Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. Cell Tissue Res. 2003 Jan;311(1):31-45. Epub 2002 Nov 12.

### FUKUSHIMA N, OHKAWA H.

Hematopoietic stem cells and microenvironment: the proliferation and differentiation of stromal cells.

Crit Rev Oncol Hematol. 1995 Oct;20(3):255-70.

#### GANZ T.

Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. J Clin Invest. 2002 Mar;109(6):693-7.

### GARNIER D, MILSOM C, MAGNUS N, MEEHAN B, WEITZ J, YU J, et al.

Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. Thromb Res. 2010 Apr;125 Suppl 2:S44-50.

#### GARROD D, CHIDGEY M, NORTH A.

Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. Curr Opin Cell Biol. 1996 Oct;8(5):670-8.

### GARROD DR.

Desmosomes and hemidesmosomes. Curr Opin Cell Biol. 1993 Feb;5(1):30-40.

### GARTY H, PALMER LG.

Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. Physiol Rev. 1997 Apr;77(2):359-96.

#### GIANGRECO A, ARWERT EN, ROSEWELL IR, SNYDER J, WATT FM, STRIPP BR.

Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 9;106(23):9286-91. Epub 2009 May 28.

### 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 Jul;161(1):173-82.

### GIANGRECO A, SHEN H, REYNOLDS SD, STRIPP BR.

Molecular phenotype of airway side population cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Apr;286(4):L624-30. Epub 2003 Aug 8.

# GIOLDASSI XM, PAPADIMITRIOU H, MIKRAKI V, KARAMANOS NK.

Clara cell secretory protein: determination of serum levels by an enzyme immunoassay and its importance as an indicator of bronchial asthma in children. *J Pharm Biomed Anal.* 2004 Mar 1;34(4):823-6.

# **GODFREY RW.**

Human airway epithelial tight junctions. *Microsc Res Tech.* 1997 Sep 1;38(5):488-99.

# GODFREY RW, SEVERS NJ, JEFFERY PK.

Freeze-fracture morphology and quantification of human bronchial epithelial tight junctions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Apr;6(4):453-8.

# GOMPERTS BN, BELPERIO JA, RAO PN, RANDELL SH, FISHBEIN MC, BURDICK MD, et al.

Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury.

J Immunol. 2006 Feb 1;176(3):1916-27.

# GONZALEZ RF, ALLEN L, DOBBS LG.

Rat alveolar type I cells proliferate, express OCT-4, and exhibit phenotypic plasticity in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Dec;297(6):L1045-55. Epub 2009 Aug

# GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G, CONNER AS, MULLIGAN RC.

Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.

*J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1797-806.

### GOSNEY JR, SISSONS MC, ALLIBONE RO.

Neuroendocrine cell populations in normal human lungs: a quantitative study. *Thorax.* 1988 Nov;43(11):878-82.

### GREEN KJ, JONES JC.

Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* 1996 Jun;10(8):871-81.

### GRONEBERG DA, EYNOTT PR, OATES T, LIM S, WU R, CARLSTEDT I, et al.

Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med.* 2002 Feb;96(2):81-6.

# GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S.

Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

# GUM JR JR.

Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Dec;7(6):557-64.

# GUSEH JS, BORES SA, STANGER BZ, ZHOU Q, ANDERSON WJ, MELTON DA, et al.

Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development*. 2009 May;136(10):1751-9. Epub 2009 Apr 15.

# GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF, et al.

Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999 Sep 23;401(6751):390-4.

### HAAS M, FORBUSH B 3RD.

The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:515-34.

# HACKETT TL, SHAHEEN F, JOHNSON A, WADSWORTH S, PECHKOVSKY DV, JACOBY DB, et al.

Characterization of side population cells from human airway epithelium. *Stem Cells.* 2008 Oct;26(10):2576-85. Epub 2008 Jul 24.

# 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. Epub 2006 Sep 28.

### HANRAHAN JW, WIOLAND MA.

Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(1):17-21.

# HARRIS RG, HERZOG EL, BRUSCIA EM, GROVE JE, VAN ARNAM JS, KRAUSE DS.

Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*. 2004 Jul 2;305(5680):90-3

### HARVEY BJ, EHRENFELD J.

Epithelial pH and ion transport regulation by proton pumps and exchangers. *Ciba Found Symp.* 1988;139:139-64.

# HAYASHI T, ISHII A, NAKAI S, HASEGAWA K.

Ultrastructure of goblet-cell metaplasia from Clara cell in the allergic asthmatic airway inflammation in a mouse model of asthma in vivo. *Virchows Arch.* 2004 Jan;444(1):66-73. Epub 2003 Nov 25.

# HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS.

Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3483-93. Epub 2003 Jul 31.

# HICKS W JR, HALL L 3RD, SIGURDSON L, STEWART C, HARD R, WINSTON J, et al.

Isolation and characterization of basal cells from human upper respiratory epithelium. *Exp Cell Res.* 1997 Dec 15;237(2):357-63.

### HIEMSTRA PS.

Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation. *Paediatr Respir Rev.* 2001 Dec;2(4):306-10.

# HOFFMAN RM, CLAYPOOL WD, KATYAL SL, SINGH G, ROGERS RM, DAUBER JH.

Augmentation of rat alveolar macrophage migration by surfactant protein. *Am Rev Respir Dis.* 1987 Jun;135(6):1358-62.

# HONG H, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, AOI T, KANAGAWA O, NAKAGAWA M, et al.

Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1132-5. Epub 2009 Aug 9.

# 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 Jun;24(6):671-81.

### HONG KU, REYNOLDS SD, WATKINS S, FUCHS E, STRIPP BR.

Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):577-88.

### 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 Apr;286(4):L643-9. Epub 2003 Jul 18.

# HOOK GE, BRODY AR, CAMERON GS, JETTEN AM, GILMORE LB, NETTESHEIM P.

Repopulation of denuded tracheas by Clara cells isolated from the lungs of rabbits. *Exp Lung Res.* 1987;12(4):311-29.

### HSIA CC.

Signals and mechanisms of compensatory lung growth. *J Appl Physiol.* 2004 Nov;97(5):1992-8.

# HUANGFU D, OSAFUNE K, MAEHR R, GUO W, EIJKELENBOOM A, CHEN S, et al.

Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* 2008 Nov;26(11):1269-75. Epub 2008 Oct 12.

# IMOKAWA S, SATO A, HAYAKAWA H, KOTANI M, URANO T, TAKADA A.

Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Aug;156(2 Pt 1):631-6.

# INAYAMA Y, HOOK GE, BRODY AR, CAMERON GS, JETTEN AM, GILMORE LB, et al.

The differentiation potential of tracheal basal cells. *Lab Invest.* 1988 Jun;58(6):706-17.

# IVANOV DB, PHILIPPOVA MP, TKACHUK VA.

Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc).* 2001 Oct;66(10):1174-86.

# IVANOVA NB, DIMOS JT, SCHANIEL C, HACKNEY JA, MOORE KA, LEMISCHKA IR.

A stem cell molecular signature. *Science*. 2002 Oct 18;298(5593):601-4. Epub 2002 Sep 12.

# JAHNSEN FL, STRICKLAND DH, THOMAS JA, TOBAGUS IT, NAPOLI S, ZOSKY GR, et al.

Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus.

J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):5861-7.

# JARAMILLO MA, GUTIERREZ JA, MARGRAF LR.

Pulmonary gastrin-releasing peptide expression in anencephaly. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1995 May-Jun;15(3):377-87.

### JEFFERY PK.

Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis.* 1983 Aug;128(2 Pt 2):S14-20.

### JEFFERY PK, REID LM.

The effect of tobacco smoke, with or without phenylmethyloxadiazole (PMO), on rat bronchial epithelium: a light and electron microscopic study. *J Pathol.* 1981 Apr;133(4):341-59

### JEFFERY PK, LI D.

Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J.* 1997 Jul;10(7):1655-62.

### JOHNSON MD, WIDDICOMBE JH, ALLEN L, BARBRY P, DOBBS LG.

Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):1966-71. Epub 2002 Feb 12.

### JOHNSON NF, HUBBS AF.

Epithelial progenitor cells in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990 Dec;3(6):579-85.

### KALINER MA.

Human nasal respiratory secretions and host defense. Am Rev Respir Dis. 1991 Sep;144(3 Pt 2):S52-6.

### KIM CF.

Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Nov;293(5):L1092-8. Epub 2007 Aug 10.

#### KIM CF, JACKSON EL, WOOLFENDEN AE, LAWRENCE S, BABAR I, VOGEL S, et al.

Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell. 2005 Jun 17;121(6):823-35.

# KING M.

Rôle of mucus viscoelasticity in clearance by cough. Eur J Respir Dis Suppl. 1987;153:165-72.

# KING M, RUBIN BK.

Mucus-controlling agents: past and present. Respir Care Clin N Am. 1999 Dec;5(4):575-94.

# KING RJ, CLEMENTS JA.

Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. Am J Physiol. 1972 Sep;223(3):715-26.

### KIRSTETTER P, ANDERSON K, PORSE BT, JACOBSEN SE, NERLOV C.

Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block.

Nat Immunol. 2006 Oct;7(10):1048-56. Epub 2006 Sep 3.

# KLEEBERGER W, VERSMOLD A, ROTHÄMEL T, GLÖCKNER S, BREDT M, HAVERICH A, et al.

Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury. Am J Pathol. 2003 May;162(5):1487-94.

### **KNOWLES M, GATZY J, BOUCHER R.**

Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. N Engl J Med. 1981 Dec 17;305(25):1489-95.

# **KNOWLES MR, BOUCHER RC.**

Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J Clin Invest. 2002 Mar;109(5):571-7.

### KOCZULLA AR, BALS R.

Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. Drugs. 2003;63(4):389-406.

# KOGO H, AIBA T, FUJIMOTO T.

Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25574-81. Epub 2004 Apr 2.

# 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.

# KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG.

Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 14;96(19):10711-6.

# KORDES C, SAWITZA I, MÜLLER-MARBACH A, ALE-AGHA N, KEITEL V, KLONOWSKI-STUMPE H, et al.

CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 12;352(2):410-7. Epub 2006 Nov 15.

# KOTTKE MD, DELVA E, KOWALCZYK AP.

The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci.* 2006 Mar 1;119(Pt 5):797-806.

# KOTTON DN, MA BY, CARDOSO WV, SANDERSON EA, SUMMER RS, WILLIAMS MC, et al.

Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001 Dec;128(24):5181-8.

### KOTTON DN, FABIAN AJ, MULLIGAN RC.

Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Oct;33(4):328-34. Epub 2005 Jun 16.

# KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, ZAPATA JM, VAN ARSDALE T, GASCOYNE RD, BERERN K, et al.

TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues.

Am J Pathol. 1998 Jun;152(6):1549-61.

### KRAMPS JA, FRANKEN C, MEIJER CJ, DIJKMAN JH.

Localization of low molecular weight protease inhibitor in serous secretory cells of the respiratory tract.

J Histochem Cytochem. 1981 Jun;29(6):712-9.

### KRASTEVA G, PFEIL U, DRAB M, KUMMER W, KÖNIG P.

Caveolin-1 and -2 in airway epithelium: expression and in situ association as detected by FRET-CLSM. *Respir Res.* 2006 Aug 11;7:108.

# KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, et al.

Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001 May 4;105(3):369-77.

#### KREDA SM, GYNN MC, FENSTERMACHER DA, BOUCHER RC, GABRIEL SE.

Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Mar;24(3):224-34.

### KUNZELMANN K, SCHREIBER R.

CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol.* 1999 Mar 1;168(1):1-8.

# KUZNETSOV SA, FRIEDENSTEIN AJ, ROBEY PG.

Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol.* 1997 Jun;97(3):561-70.

# LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, et al.

Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000 Nov;6(11):1229-34.

# LAJTHA LG.

Stem cell concepts. Nouv Rev Fr Hematol. 1979;21(1):59-65.

# LAMBLIN G, LHERMITTE M, KLEIN A, HOUDRET N, SCHARFMAN A, RAMPHAL R, et al.

The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa?

Am Rev Respir Dis. 1991 Sep;144(3 Pt 2):S19-24.

### LANGE AW, KEISER AR, WELLS JM, ZORN AM, WHITSETT JA.

Sox17 promotes cell cycle progression and inhibits TGF-beta/Smad3 signaling to initiate progenitor cell behavior in the respiratory epithelium. *PLoS One.* 2009 May 27;4(5):e5711.

### LANSDORP PM.

Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 1995 Mar;23(3):187-91.

### LAUBE DM, YIM S, RYAN LK, KISICH KO, DIAMOND G.

Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;306:153-82.

### LECHNER JF, LAVECK MA.

A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J Tissue Culture Methods*. 1985; 9:43-48.

### LEE CH, IGARASHI Y, HOHMAN RJ, KAULBACH H, WHITE MV, KALINER MA.

Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Mar;147(3):710-6.

#### LEE J, REDDY R, BARSKY L, WEINBERG K, DRISCOLL B.

Contribution of proliferation and DNA damage repair to alveolar epithelial type 2 cell recovery from hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Apr;290(4):L685-L694. Epub 2005 Nov 18.

### LEHRER RI, GANZ T.

Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):96-102.

### LENDAHL U, ZIMMERMAN LB, MCKAY RD.

CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990 Feb 23;60(4):585-95.

### LI H, CHERUKURI P, LI N, COWLING V, SPINELLA M, COLE M, et al.

Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res.* 2007 Jan 15;67(2):501-10.

### LI Y, MCCLINTICK J, ZHONG L, EDENBERG HJ, YODER MC, CHAN RJ.

Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):635-7. Epub 2004 Sep 9.

### LIAO JP, CHI CH, LI HC, TANG XY.

Effects of N-acetylcysteine on Clara cells in rats with cigarette smoke exposure. *Chin Med J (Engl).* 2010 Feb 20;123(4):412-7.

### LITTLE NA, JOCHEMSEN AG.

p63. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Jan;34(1):6-9.

### LIU JY, NETTESHEIM P, RANDELL SH.

Growth and differentiation of tracheal epithelial progenitor cells. *Am J Physiol.* 1994 Mar;266(3 Pt 1):L296-307.

### LIU X, ENGELHARDT JF.

The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Aug 15;5(6):682-8.

### LOI R, BECKETT T, GONCZ KK, SURATT BT, WEISS DJ.

Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells.

Am J Respir Crit Care Med. 2006 Jan 15;173(2):171-9. Epub 2005 Sep 22.

# LOWELL S, JONES P, LE ROUX I, DUNNE J, WATT FM.

Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters.

*Curr Biol.* 2000 May 4;10(9):491-500.

# LOZAHIC S, CHRISTIANSEN D, MANIÉ S, GERLIER D, BILLARD M, BOUCHEIX C, et al.

CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):900-7.

# MACKAY CR, TERPE HJ, STAUDER R, MARSTON WL, STARK H, GÜNTHERT U.

Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol.* 1994 Jan;124(1-2):71-82.

# MACPHERSON H, KEIR PA, EDWARDS CJ, WEBB S, DORIN JR.

Following damage, the majority of bone marrow-derived airway cells express an epithelial marker.

Respir Res. 2006 Dec 19;7:145.

# MACPHERSON H, KEIR P, WEBB S, SAMUEL K, BOYLE S, BICKMORE W, et al.

Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo. *J Cell Sci.* 2005 Jun 1;118(Pt 11):2441-50.

# MANTILE G, MIELE L, CORDELLA-MIELE E, SINGH G, KATYAL SL, MUKHERJEE AB.

Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem.* 1993 Sep 25;268(27):20343-51.

# 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. Epub 2009 Oct 1.

# MARSHMAN E, BOOTH C, POTTEN CS.

The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays.* 2002 Jan;24(1):91-8.

# MARTIN GR.

Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. 1980 Aug 15;209(4458):768-76.

### MARTIN GR.

Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634-8.

# MCKAY R.

Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):66-71.

# MCQUALTER JL, BROUARD N, WILLIAMS B, BAIRD BN, SIMS-LUCAS S, YUEN K, et al.

Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the sca-1 positive cell fraction. *Stem Cells* 2009 Mar:27(3):623-33

Stem Cells. 2009 Mar;27(3):623-33.

# 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.

### **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.

# MILSOM C, MAGNUS N, MEEHAN B, AL-NEDAWI K, GARNIER D, RAK J.

Tissue factor and cancer stem cells: is there a linkage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):2005-14. Epub 2009 Jul 23.

### MINGUELL JJ, ERICES A, CONGET P.

Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001 Jun;226(6):507-20.

### MONTESANO R, SCHALLER G, ORCI L.

Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell.* 1991 Aug 23;66(4):697-711.

### MORIMOTO M, LIU Z, CHENG HT, WINTERS N, BADER D, KOPAN R.

Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *J Cell Sci.* 2010 Jan 15;123(Pt 2):213-24.

# MORIYAMA M, DURHAM AD, MORIYAMA H, HASEGAWA K, NISHIKAWA S, RADTKE F, et al.

Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell.* 2008 Apr;14(4):594-604.

### MORRISON SJ, UCHIDA N, WEISSMAN IL.

The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.

# MORRISON SJ, SPRADLING AC.

Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):598-611.

# MUCENSKI ML, WERT SE, NATION JM, LOUDY DE, HUELSKEN J, BIRCHMEIER W, et al.

beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis.

J Biol Chem. 2003 Oct 10;278(41):40231-8. Epub 2003 Jul 28.

# MÜLLER M, ALBRECHT S, GÖLFERT F, HOFER A, FUNK RH, MAGDOLEN V, et al.

Localization of tissue factor in actin-filament-rich membrane areas of epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1999 Apr 10;248(1):136-47.

# MURPHY M, REID K, DUTTON R, BROOKER G, BARTLETT PF.

Neural stem cells. J Investig Dermatol Symp Proc. 1997 Aug;2(1):8-13.

# NAKAJIMA M, KAWANAMI O, JIN E, GHAZIZADEH M, HONDA M, ASANO G, et al.

Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathol Int.* 1998 Dec;48(12):944-53.

# NELSON S, MASON CM, KOLLS J, SUMMER WR.

Pathophysiology of pneumonia. *Clin Chest Med.* 1995 Mar;16(1):1-12.

# NETTESHEIM P, JETTEN AM, INAYAMA Y, BRODY AR, GEORGE MA, GILMORE LB, et al.

Pathways of differentiation of airway epithelial cells. *Environ Health Perspect.* 1990 Apr;85:317-29.

# NICHOLS J, ZEVNIK B, ANASTASSIADIS K, NIWA H, KLEWE-NEBENIUS D, CHAMBERS I, et al.

Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.  $Call_{1008}$  Oct 30:05(3):370.01

*Cell.* 1998 Oct 30;95(3):379-91.

# NIE X, LI Q, CAI G, DAI Y, ZHANG J.

The effect of N-acetylcysteine on Clara cells and Clara cell 16 kDa protein in a murine model of allergen-induced airway inflammation. *Respirology.* 2005 Mar;10(2):157-63.

### NOGEE LM.

Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:601-23.

# NOLEN-WALSTON RD, KIM CF, MAZAN MR, INGENITO EP, GRUNTMAN AM, TSAI L, et al.

Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Jun;294(6):L1158-65. Epub 2008 Mar 2

# NORKIN LC.

Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Jul 28;49(3):301-15.

# O'GRADY SM, PALFREY HC, FIELD M.

Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. *Am J Physiol.* 1987 Aug;253(2 Pt 1):C177-92.

# ORTIZ LA, GAMBELLI F, MCBRIDE C, GAUPP D, BADDOO M, KAMINSKI N, et al.

Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8407-11. Epub 2003 Jun 18.

# PACK RJ, AL-UGAILY LH, MORRIS G.

The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study.

J Anat. 1981 Jan;132(Pt 1):71-84.

### 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.

# PARIS S, POUYSSÉGUR J.

Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na+/H+ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts.

J Biol Chem. 1983 Mar 25;258(6):3503-8.

### PARK IH, ARORA N, HUO H, MAHERALI N, AHFELDT T, SHIMAMURA A, et al.

Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2008 Sep 5;134(5):877-86. Epub 2008 Aug 7.

# PARK KS, WELLS JM, ZORN AM, WERT SE, LAUBACH VE, FERNANDEZ LG, WHITSETT JA.

Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Feb;34(2):151-7. Epub 2005 Oct 20.

### PASTVA AM, WRIGHT JR, WILLIAMS KL.

Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2007 Jul;4(3):252-7.

### PEAKE JL, REYNOLDS SD, STRIPP BR, STEPHENS KE, PINKERTON KE.

Alteration of pulmonary neuroendocrine cells during epithelial repair of naphthalene-induced airway injury.

Am J Pathol. 2000 Jan;156(1):279-86.

# PERA MF, REUBINOFF B, TROUNSON A.

Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2000 Jan;113 (Pt 1):5-10.

# PERA MF, TROUNSON AO.

Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development*. 2004 Nov;131(22):5515-25.

# PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, et al.

Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999 May 14;284(5417):1168-70.

# PILETTE C, GODDING V, KISS R, DELOS M, VERBEKEN E, DECAESTECKER C, et al.

Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):185-94.

# PLOPPER CG, MANGO GW, HATCH GE, WONG VJ, TOSKALA E, REYNOLDS SD, et al.

Elevation of susceptibility to ozone-induced acute tracheobronchial injury in transgenic mice deficient in Clara cell secretory protein.

Toxicol Appl Pharmacol. 2006 May 15;213(1):74-85. Epub 2005 Oct 14.

# PORTER RM, LUNNY DP, OGDEN PH, MORLEY SM, MCLEAN WH, EVANS A, et al.

K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Lab Invest.* 2000 Nov;80(11):1701-10.

# PROCKOP DJ.

Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.

# PUCHELLE E, GAILLARD D, PLOTON D, HINNRASKY J, FUCHEY C, BOUTTERIN MC, et al.

Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1992 Nov;7(5):485-91.

# PUCHELLE E, ZAHM JM, QUEMADA D.

Rheological properties controlling mucociliary frequency and respiratory mucus transport. *Biorheology*. 1987;24(6):557-63.

#### RAMIYA VK, MARAIST M, ARFORS KE, SCHATZ DA, PECK AB, CORNELIUS JG.

Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells.

Nat Med. 2000 Mar;6(3):278-82.

### RANDELL SH, COMMENT CE, RAMAEKERS FC, NETTESHEIM P.

Properties of rat tracheal epithelial cells separated based on expression of cell surface alphagalactosyl end groups.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1991 Jun;4(6):544-54.

### **RANDELL SH, BOUCHER RC; UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA VIRTUAL** LUNG GROUP.

Effective mucus clearance is essential for respiratory health. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Jul;35(1):20-8. Epub 2006 Mar 9.

### RAWLINS EL, OKUBO T, XUE Y, BRASS DM, AUTEN RL, HASEGAWA H, WANG F, HOGAN BL.

The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium.

Cell Stem Cell. 2009 Jun 5;4(6):525-34.

# RAWLINS EL, OSTROWSKI LE, RANDELL SH, HOGAN BL.

Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 9;104(2):410-7. Epub 2006 Dec 28.

### **RAWLINS EL, HOGAN BL.**

Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? Development. 2006 Jul;133(13):2455-65. Epub 2006 May 30.

# **RAZANI B, WOODMAN SE, LISANTI MP.**

Caveolae: from cell biology to animal physiology. Pharmacol Rev. 2002 Sep;54(3):431-67.

### **REDDY R, BUCKLEY S, DOERKEN M, BARSKY L, WEINBERG K, ANDERSON** KD, et al.

Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Apr;286(4):L658-67. Epub 2003 Aug 15.

### **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.

# REYNOLDS SD, HONG KU, GIANGRECO A, MANGO GW, GURON C, **MORIMOTO Y, et al.**

Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Jun;278(6):L1256-63.

# **REYNOLDS SD, MALKINSON AM.**

Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jan;42(1):1-4. Epub 2009 Sep 9.

# **REYNOLDS SD, SHEN H, REYNOLDS PR, BETSUYAKU T, PILEWSKI JM, GAMBELLI F, et al.**

Molecular and functional properties of lung SP cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Apr;292(4):L972-83. Epub 2006 Dec

# REYNOLDS SD, ZEMKE AC, GIANGRECO A, BROCKWAY BL, TEISANU RM, DRAKE JA, et al.

Conditional stabilization of beta-catenin expands the pool of lung stem cells. *Stem Cells.* 2008 May;26(5):1337-46. Epub 2008 Mar 20

# RICCI-VITIANI L, LOMBARDI DG, PILOZZI E, BIFFONI M, TODARO M, PESCHLE C, et al.

Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5. Epub 2006 Nov 19.

# 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. Epub 2009 Jul 2

### 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. Epub 2010 Aug 10.

# RODRIGUEZ AM, ELABD C, DELTEIL F, ASTIER J, VERNOCHET C, SAINT-MARC P, et al.

Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 5;315(2):255-63.

### ROGERS AV, DEWAR A, CORRIN B, JEFFERY PK.

Identification of serous-like cells in the surface epithelium of human bronchioles. *Eur Respir J.* 1993 Apr;6(4):498-504.

### **ROGERS DF, JEFFERY PK.**

Inhibition by oral N-acetylcysteine of cigarette smoke-induced "bronchitis" in the rat. *Exp Lung Res.* 1986;10(3):267-83.

### **ROGERS DF.**

The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Jan;35(1):1-6.

### SOLOZOBOVA V, ROLLETSCHEK A, BLATTNER C.

Nuclear accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. BMC Cell Biol. 2009 Jun 17;10:46.

### ROMANO RA, ORTT K, BIRKAYA B, SMALLEY K, SINHA S.

An active role of the DeltaN isoform of p63 in regulating basal keratin genes K5 and K14 and directing epidermal cell fate. *PLoS One.* 2009 May 20;4(5):e5623.

### SAKAMOTO O, SUGA M, SUDA T, ANDO M.

Expression of discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase on the human bronchial epithelium. *Eur Respir J.* 2001 May;17(5):969-74.

# SAMADIKUCHAKSARAEI A, COHEN S, ISAAC K, RIPPON HJ, POLAK JM, BIELBY RC, et al.

Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng.* 2006 Apr;12(4):867-75.

### SATO N, MEIJER L, SKALTSOUNIS L, GREENGARD P, BRIVANLOU AH.

Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):55-63. Epub 2003 Dec 21.

### 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 Apr;286(4):L631-42. Epub 2003 Sep 5.

### SCHULTZ BD, TAKAHASHI A, LIU C, FRIZZELL RA, HOWARD M.

FLAG epitope positioned in an external loop preserves normal biophysical properties of CFTR.

Am J Physiol. 1997 Dec;273(6 Pt 1):C2080-9.

### SCHUTTE BC, MCCRAY PB JR.

[beta]-defensins in lung host defense. Annu Rev Physiol. 2002;64:709-48.

### SCHWIEBERT EM, BENOS DJ, EGAN ME, STUTTS MJ, GUGGINO WB.

CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1 Suppl):S145-66.

# 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.

### SEIGEL GM, SUN W, SALVI R, CAMPBELL LM, SULLIVAN S, REIDY JJ.

Human corneal stem cells display functional neuronal properties. *Mol Vis.* 2003 Apr 30;9:159-63.

### SHANNON JM.

Induction of alveolar type II cell differentiation in fetal tracheal epithelium by grafted distal lung mesenchyme.  $Dev Biol_{1994} Dec: 166(2):600-14$ 

*Dev Biol.* 1994 Dec;166(2):600-14.

### SHANNON JM, NIELSEN LD, GEBB SA, RANDELL SH.

Mesenchyme specifies epithelial differentiation in reciprocal recombinants of embryonic lung and trachea.

Dev Dyn. 1998 Aug;212(4):482-94.

# SHARMA P, DUDUS L, NIELSEN PA, CLAUSEN H, YANKASKAS JR, HOLLINGSWORTH MA, et al.

MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Jul;19(1):30-7.

# SHEBANI E, SHAHANA S, JANSON C, ROOMANS GM.

Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue Cell.* 2005 Apr;37(2):145-52.

# SHIJUBO N, ITOH Y, YAMAGUCHI T, IMADA A, HIRASAWA M, YAMADA T, et al.

Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Sep;160(3):930-3.

# SHORT DB, TROTTER KW, RECZEK D, KREDA SM, BRETSCHER A, BOUCHER RC, et al.

An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton.

J Biol Chem. 1998 Jul 31;273(31):19797-80.

# SIBILLE Y, REYNOLDS HY.

Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Feb;141(2):471-501.

# SINCOCK PM, FITTER S, PARTON RG, BERNDT MC, GAMBLE JR, ASHMAN LK.

PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function.

J Cell Sci. 1999 Mar;112 (Pt 6):833-44.

# SINCOCK PM, MAYRHOFER G, ASHMAN LK.

Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem.* 1997 Apr;45(4):515-25.

# SINGH G, KATYAL SL.

Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Aug;17(2):141-3.

# SINGH G, KATYAL SL, BROWN WE, PHILLIPS S, KENNEDY AL, ANTHONY J, et al.

Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Sep 7;950(3):329-37

# SLEIGH MA, BLAKE JR, LIRON N.

The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Mar;137(3):726-41.

### SMITH A.

A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006 Jun;441(7097):1060

### SMITH JJ, WELSH MJ.

Fluid and electrolyte transport by cultured human airway epithelia. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1590-7.

# SNYDER JC, TEISANU RM, STRIPP BR.

Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):254-64.

# SNYDER JC, REYNOLDS SD, HOLLINGSWORTH JW, LI Z, KAMINSKI N, STRIPP BR.

Clara cells attenuate the inflammatory response through regulation of macrophage behavior. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Feb;42(2):161-71. Epub 2009 May 7.

# SPEES JL, OLSON SD, YLOSTALO J, LYNCH PJ, SMITH J, PERRY A, PEISTER A, WANG MY, PROCKOP DJ.

Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4;100(5):2397-402. Epub 2003 Feb 26.

### SPRINGER J, GRONEBERG DA, PREGLA R, FISCHER A.

Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regul Pept.* 2005 Jan 15;124(1-3):195-201.

# STERK LM, GEUIJEN CA, OOMEN LC, CALAFAT J, JANSSEN H, SONNENBERG A.

The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol.* 2000 May 15;149(4):969-82.

# STEVENS TP, MCBRIDE JT, PEAKE JL, PINKERTON KE, STRIPP BR.

Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 1):L486-93.

# STOJKOVIC M, LAKO M, STOJKOVIC P, STEWART R, PRZYBORSKI S, ARMSTRONG L, et al.

Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture.

Stem Cells. 2004;22(5):790-7.

### STONE KC, MERCER RR, FREEMAN BA, CHANG LY, CRAPO JD.

Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Aug;146(2):454-6.

#### STRIPP BR.

Hierarchical organization of lung progenitor cells: is there an adult lung tissue stem cell? *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Aug 15;5(6):695-8.

#### STRIPP BR, REYNOLDS SD.

Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Apr 15;5(3):328-33.

# STUTTS MJ, CANESSA CM, OLSEN JC, HAMRICK M, COHN JA, ROSSIER BC, et al.

CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995 Aug 11;269(5225):847-50.

# SUEBLINVONG V, LOI R, EISENHAUER PL, BERNSTEIN IM, SURATT BT, SPEES JL, et al.

Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Apr 1;177(7):701-11. Epub 2007 Dec 6.

### SUMMER R, KOTTON DN, SUN X, MA B, FITZSIMMONS K, FINE A.

Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jul;285(1):L97-104. Epub 2003 Mar 7.

### 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.

# SURATT BT, COOL CD, SERLS AE, CHEN L, VARELLA-GARCIA M, SHPALL EJ, et al.

Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Aug 1;168(3):318-22. Epub 2003 Apr 30.

### SUZUKI S, MIYAZAKI T, TANAKA N, SAKAI M, SANO A, INOSE T, et al.

Prognostic Significance of CD151 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma with Aggressive Cell Proliferation and Invasiveness. *Ann Surg Oncol.* 2010 Oct 27.

### SZKOTAK AJ, MAN SF, DUSZYK M.

The role of the basolateral outwardly rectifying chloride channel in human airway epithelial anion secretion.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Dec;29(6):710-20.

### TAKABAYSHI K, CORR M, HAYASHI T, REDECKE V, BECK L, GUINEY D, et al.

Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*. 2006 Apr;24(4):475-87.

# TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, et al.

Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

# TAKAHASHI K, YAMANAKA S.

Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.

Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.

# 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.

# TARRAN R.

Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(1):42-6.

# TARRAN R, LOEWEN ME, PARADISO AM, OLSEN JC, GRAY MA, ARGENT BE, et al.

Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca2+-activated Cl-conductances.

J Gen Physiol. 2002 Sep;120(3):407-18.

### TEISANU RM, LAGASSE E, WHITESIDES JF, STRIPP BR.

Prospective isolation of bronchiolar stem cells based upon immunophenotypic and autofluorescence characteristics. *Stem Cells.* 2009 Mar;27(3):612-22.

# THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, et al.

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

# THORNTON DJ, CARLSTEDT I, HOWARD M, DEVINE PL, PRICE MR, SHEEHAN JK.

Respiratory mucins: identification of core proteins and glycoforms. *Biochem J.* 1996 Jun 15;316 ( Pt 3):967-75.

# TIOZZO C, DE LANGHE S, YU M, LONDHE VA, CARRARO G, LI M, et al.

Deletion of Pten expands lung epithelial progenitor pools and confers resistance to airway injury.

Am J Respir Crit Care Med. 2009 Oct 15;180(8):701-12. Epub 2009 Jul 2.

#### TOMPKINS DH, BESNARD V, LANGE AW, WERT SE, KEISER AR, SMITH AN, et al.

Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells.

PLoS One. 2009 Dec 14;4(12):e8248.

# TOURNIER JM, MAOUCHE K, CORAUX C, ZAHM JM, CLOËZ-TAYARANI I, NAWROCKI-RABY B, et al.

alpha3alpha5beta2-Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells. Am J Pathol. 2006 Jan;168(1):55-68.

### TRAVIS SM, CONWAY BA, ZABNER J, SMITH JJ, ANDERSON NN, SINGH PK, et al.

Activity of abundant antimicrobials of the human airway. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 May;20(5):872-9.

# TRINH NT. PRIVÉ 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. Epub 2007 Jul 13.

### TROPEPE V, COLES BL, CHIASSON BJ, HORSFORD DJ, ELIA AJ, MCINNES RR, et al.

Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science. 2000 Mar 17;287(5460):2032-6.

# **TROUNSON AO.**

The derivation and potential use of human embryonic stem cells. Reprod Fertil Dev. 2001;13(7-8):523-32.

# TRUONG AB, KRETZ M, RIDKY TW, KIMMEL R, KHAVARI PA.

p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. Genes Dev. 2006 Nov 15:20(22):3185-97.

### TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M.

Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Apr;2(4):285-93.

# TURNER J, ROGER J, FITAU J, COMBE D, GIDDINGS J, VAN HEEKE G, et al.

Goblet Cells are Derived from a FOXJ1-Expressing Progenitor in a Human Airway Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Jun 10.

### TYLER NK, HYDE DM, HENDRICKX AG, PLOPPER CG.

Cytodifferentiation of two epithelial populations of the respiratory bronchiole during fetal lung development in the rhesus monkey.

Anat Rec. 1989 Dec;225(4):297-309.

# UCHIDA N, BUCK DW, HE D, REITSMA MJ, MASEK M, PHAN TV, et al.

Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14720-5.

#### ULICH TR, YI ES, LONGMUIR K, YIN S, BILTZ R, MORRIS CF, et al.

Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest.* 1994 Mar;93(3):1298-306.

### UMEMOTO T, YAMATO M, NISHIDA K, YANG J, TANO Y, OKANO T.

Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state.

Stem Cells. 2006 Jan;24(1):86-94. Epub 2005 Sep 8.

### URBACH V, VAN KERKHOVE E, MAGUIRE D, HARVEY BJ.

Cross-talk between ATP-regulated K+ channels and Na+ transport via cellular metabolism in frog skin principal cells.

J Physiol. 1996 Feb 15;491 (Pt 1):99-109.

### USSING HH, 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 HAUTE L, DE BLOCK G, LIEBAERS I, SERMON K, DE RYCKE M.

Generation of lung epithelial-like tissue from human embryonic stem cells. *Respir Res.* 2009 Nov 5;10:105.

# VARSANO S, FROLKIS I, OPHIR D.

Expression and distribution of cell-membrane complement regulatory glycoproteins along the human respiratory tract.

Am J Respir Crit Care Med. 1995 Sep;152(3):1087-93.

# VINALL LE, FOWLER JC, JONES AL, KIRKBRIDE HJ, DE BOLÓS C, LAINE A, et al.

Polymorphism of human mucin genes in chest disease: possible significance of MUC2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Nov;23(5):678-86.

### VISVADER JE.

Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 2009 Nov 15;23(22):2563-77.

# VOSWINCKEL R, MOTEJL V, FEHRENBACH A, WEGMANN M, MEHLING T, FEHRENBACH H, et al.

Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. *Eur Respir J.* 2004 Oct;24(4):524-32.

### 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. Epub 2005 Jul 14.

# WAGERS AJ, WEISSMAN IL.

Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004 Mar 5;116(5):639-48.

#### WANNER A, SALATHÉ M, O'RIORDAN TG.

Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Dec;154(6 Pt 1):1868-902.

#### WARBURTON D, PERIN L, DEFILIPPO R, BELLUSCI S, SHI W, DRISCOLL B.

Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Aug 15;5(6):703-6.

#### WATT FM, HOGAN BL.

Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427-30.

# WEICHSELBAUM M, SPARROW MP, HAMILTON EJ, THOMPSON PJ, KNIGHT DA.

A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium.

Respir Res. 2005 Oct 10;6:115.

#### WEIGMANN A, CORBEIL D, HELLWIG A, HUTTNER WB.

Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 11;94(23):12425-30.

#### WHIKEHART DR, PARIKH CH, VAUGHN AV, MISHLER K, EDELHAUSER HF.

Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis.* 2005 Sep 26;11:816-24.

### WIDDICOMBE JG, PACK RJ.

The Clara cell. *Eur J Respir Dis.* 1982 May;63(3):202-20.

# WIESE C, ROLLETSCHEK A, KANIA G, BLYSZCZUK P, TARASOV KV, TARASOVA Y, et al.

Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 2004 Oct;61(19-20):2510-22.

#### WILLEMS LN, KRAMPS JA, STIJNEN T, STERK PJ, WEENING JJ, DIJKMAN JH.

Antileukoprotease-containing bronchiolar cells. Relationship with morphologic disease of small airways and parenchyma.

Am Rev Respir Dis. 1989 May;139(5):1244-50.

# WISZNIEWSKI L, SANZ J, SCERRI I, GASPAROTTO E, DUDEZ T, LACROIX JS, et al.

Functional expression of connexin30 and connexin31 in the polarized human airway epithelium.

Differentiation. 2007 Jun;75(5):382-92. Epub 2007 Apr 11.

# WONG AP, KEATING A, WADDELL TK.

Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytotherapy*. 2009;11(6):676-87.

### WRIGHT NA.

Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer.

Int J Exp Pathol. 2000 Apr;81(2):117-43.

# WUENSCHELL CW, SUNDAY ME, SINGH G, MINOO P, SLAVKIN HC, WARBURTON D.

Embryonic mouse lung epithelial progenitor cells co-express immunohistochemical markers of diverse mature cell lineages.

J Histochem Cytochem. 1996 Feb;44(2):113-23.

# XIA Y, HAWS CM, WINE JJ.

Disruption of monolayer integrity enables activation of a cystic fibrosis "bypass" channel in human airway epithelia. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):802-5.

# YAMADA KM, GEIGER B.

Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Feb;9(1):76-85.

# YAMADA S, NELSON WJ.

Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion.

J Cell Biol. 2007 Jul 30;178(3):517-27. Epub 2007 Jul 23.

# YANG A, SCHWEITZER R, SUN D, KAGHAD M, WALKER N, BRONSON RT, et al.

p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):714-8.

# YIN AH, MIRAGLIA S, ZANJANI ED, ALMEIDA-PORADA G, OGAWA M, LEARY AG, et al.

AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997 Dec 15;90(12):5002-12.

# YOSHIDA S, SHIMMURA S, NAGOSHI N, FUKUDA K, MATSUZAKI Y, OKANO H, et al.

Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2714-22. Epub 2006 Aug 3.

# YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S, et al.

Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20. Epub 2007 Nov 20.

# ZAHM JM, PIERROT D, HINNRASKY J, FUCHEY C, CHEVILLARD M, GAILLARD D, et al.

Functional activity of ciliated outgrowths from cultured human nasal and tracheal epithelia. *Biorheology*. 1990;27(3-4):559-65.

# ZAHM JM, PIERROT D, VAQUEZ-GIROD S, DUVIVIER C, KING M, PUCHELLE E.

The role of mucus sol phase in clearance by simulated cough. *Biorheology*. 1989;26(4):747-52.

# ZEMKE AC, TEISANU RM, GIANGRECO A, DRAKE JA, BROCKWAY BL, REYNOLDS SD, et al.

beta-Catenin is not necessary for maintenance or repair of the bronchiolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Nov;41(5):535-43. Epub 2009 Feb 12.

# ZEPEDA ML, CHINOY MR, WILSON JM.

Characterization of stem cells in human airway capable of reconstituting a fully differentiated bronchial epithelium.

Somat Cell Mol Genet. 1995 Jan;21(1):61-73.

# ZHANG Y, GOSS AM, COHEN ED, KADZIK R, LEPORE JJ, MUTHUKUMARASWAMY K, et al.

A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):862-70. Epub 2008 Jun 8.

# ZHOU H, WU S, JOO JY, ZHU S, HAN DW, LIN T, et al.

Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009 May 8;4(5):381-4. Epub 2009 Apr 23.

# ZHOU S, SCHUETZ JD, BUNTING KD, COLAPIETRO AM, SAMPATH J, MORRIS JJ, et al.

The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1028-34.

# ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, et al.

Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28.

# ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, et al.

Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.

The American Journal of Pathology, Vol. 175, No. 5, November 2009 Copyright © American Society for Investigative Pathology DOI: 10.2353/ajpath.2009.090212

#### Cardiovascular, Pulmonary and Renal Pathology

# α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulates Airway Epithelium Differentiation by Controlling Basal Cell Proliferation

Kamel Maouche,\*<sup>†‡</sup> Myriam Polette,\*<sup>†§</sup> Thomas Jolly,\*<sup>†</sup> Kahina Medjber,\*<sup>†</sup> Isabelle Cloëz-Tayarani,<sup>‡</sup> Jean-Pierre Changeux,<sup>‡</sup> Henriette Burlet,\*<sup>†</sup> Christine Terryn,<sup>†</sup> Christelle Coraux,\*<sup>†</sup> Jean-Marie Zahm,\*<sup>†</sup> Philippe Birembaut,\*<sup>†§</sup> and Jean-Marie Tournier\*<sup>†</sup>

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U903,\* Reims; IFR53, UMR-S903,<sup>†</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, Reims; the Département de Neuroscience,<sup>†</sup> Institut pasteur, Paris; and the Centre Hospitalier Universitiare Reims,<sup>§</sup> Hôpital Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin, Reims, France

Airway epithelial basal cells are known to be critical for regenerating injured epithelium and maintaining tissue homeostasis. Recent evidence suggests that the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), which is highly permeable to Ca2+, is involved in lung morphogenesis. Here, we have investigated the potential role of the  $\alpha$ 7 nAChR in the regulation of airway epithelial basal cell proliferation and the differentiation of the human airway epithelium. In vivo during fetal development and in vitro during the regeneration of the human airway epithelium, a7 nAChR expression coincides with epithelium differentiation. Inactivating a7 nAChR function in vitro increases cell proliferation during the initial steps of the epithelium regeneration, leading to epithelial alterations such as basal cell hyperplasia and squamous metaplasia, remodeling observed in many bronchopulmonary diseases. The regeneration of the airway epithelium after injury in  $\alpha 7^{-/-}$  mice is delayed and characterized by a transient hyperplasia of basal cells. Moreover, 1-year-old  $\alpha 7^{-/-}$  mice more frequently present basal cells hyperplasia. Modulating nAChR function or expression shows that only  $\alpha$ 7 nAChR, as opposed to heteropentameric  $\alpha_x \beta_v$  nAChRs, controls the proliferation of human airway epithelial basal cells. These findings suggest that  $\alpha$ 7 nAChR is a key regulator of the plasticity of the human airway epithelium by controlling basal cell proliferation and differentiation pathway

and is involved in airway remodeling during bronchopulmonary diseases. (Am J Pathol 2009, 175:1868–1882; DOI: 10.2353/ajpatb.2009.090212)

The respiratory epithelium, which is constantly exposed to airborne pollutants, is frequently injured, which results in altered epithelial functions. To restore these functions, the respiratory epithelium must undergo rapid repair via epithelial cell spreading and migration and regenerate its structure via basal cell proliferation and differentiation.1 These processes are tightly controlled to restore the pseudostratified architecture of the normal mucociliary epithelium. However, in most respiratory diseases, alterations of the regeneration processes induce epithelial remodeling such as hyperplasia, metaplasia, and fibrosis. Understanding the sequence of processes involved in cell proliferation and differentiation is therefore of crucial importance. Both in vivo and in vitro, human airway basal cells are able to proliferate and reconstitute a fully differentiated and functional epithelium.<sup>2</sup> These cells are such considered as progenitors of the human airway epithelium and important actors of the airway epithelium regeneration.

The nonneuronal cholinergic system is thought to be involved in the regulation of cell functions such as cellcell interaction, apoptosis, and proliferation.<sup>3</sup> It is now established that human bronchial epithelial cells contain all of the machinery for the production, storage, secretion, and degradation of acetylcholine, which acts as an autocrine or paracrine hormone.<sup>4,5</sup> Acetylcholine exerts its effects through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs)

Accepted for publication July 22, 2009.

Address reprint requests to Jean-Marie Tournier, Ph.D., INSERM UMRS 903, 45 rue Cognacq-Jay, F-51092 Reims, France. E-mail: jm.tournier@ univ-reims.fr.

Supported by grants from the French Associations: Association pour la Recherche sur les Nicotianées and Ligue contre le Cancer (Comité de la Marne) (to J.M.T.), Vaincre la Mucoviscidose (to C.C.), the Fond National pour la Santé ACI-2004-2010 INCa (Cancéropôle Grand-Est project), the Lions Club of Soissons and 1 Euro Contre le Cancer (to P.B.), and by the Région Champagne-Ardenne (to T.J., K.M., and K.M.).

α7 nAChR is characterized by an elevated Ca2+ permeability<sup>10</sup> and has been involved in several important biological processes such as cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis in cancer.11,12 Prenatal nicotine exposure significantly increases pulmonary α7 nAChR expression and alters fetal lung development<sup>13</sup> and subsequently pulmonary function in newborn.14 In particular, alteration of lung branching morphogenesis induced by nicotine is mediated by a7 nAChR.15 Altogether, these observations led us to investigate whether the a7 nAChR could be involved in the differentiation of the respiratory epithelium. In the human airway epithelium, we observed α7 nAChR expression in basal cells, which play a critical role in the epithelial regeneration. Both in vivo and in vitro, the α7 nAChR expression is associated with the airway epithelium differentiation. Moreover, in vitro inactivating a7 nAChR or in vivo disrupting genetic a7 nAChR expression induces airway epithelium remodeling by modulating basal cell proliferation. This study thus provides several lines of evidence that α7 nAChR is significant for airway epithelial differentiation and suggests that α7 nAChR is a key regulator of the plasticity of the airway epithelium.

#### Materials and Methods

#### Reagents

Unless otherwise stated, all reagents were from Sigma-Aldrich Chimie (L'Isle d'Abeau Chesnes, France): mouse anti-cytokeratin (CK)-13 (clone KS-1A3; 1/1000), mouse anti-CK14 (clone LL02; 0.7 µg/ml), mouse anti-Ki-67 (5 μg/ml) (Dako, Trappes, France), mouse anti-β-tubulin (clone KMX-1; 0.1 µg/ml) and mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MAB374; 1 µg/ml) (Millipore, St. Quentin en Yvelines, France), mouse antihuman cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (clone 24-1; 2 µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN), mouse anti-zonula occludens (ZO)-1 (clone ZO1-1A12; 1/20) (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), mouse anti-desmoplakin 1-2 (clone DP1 and 2-2.15; 20  $\mu$ g/ml) (Harlan Sera-Lab, Loughburough, UK), rabbit polyclonal antibodies anti-nAChR α7 (H-302, lot A2203; 1 μg/ml), anti-caveolin-1 (N-20; 2 μg/ml) and anti-α-ENaC (H-95; 1 µg/ml) and mouse anti-Foxj1 (clone 3-19; 2 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-transglutaminase-1 (0.2 µg/ml) (Covalab, Cambridge, UK), 4',6'-diamino-2-phenylindole (200 ng/ml), Griffonia simplicifolia isolectin B<sub>4</sub>-FITC (GSI-B4; 4 µg/ml), Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse or anti-rabbit (IgG H+L; 1/200) secondary antibodies, αBTX-Alexa Fluor 488 conjugate, rabbit anti-Alexa Fluor 488 (5 µg/ml) and donkey anti-rabbit IgG-Alexa Fluor conjugate (10 µg/ml) (Molecular Probes, Eugene, OR), and a-conotoxin MII was synthesized by Geneprep (Montpelier, France) according to Ref.<sup>16</sup>

#### Human Airway Tissues and Ex Vivo Wound Repair Model

The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94-654 of the Public Health Code of France, with a written consent from the patients or their families. Tracheas from normal human fetuses ranging from 10 to 25 weeks of development were obtained after medically induced abortions. Human airway tissues were collected after nasal polypectomy of patients who did not suffer from any other disease. Human bronchial tissues from patients undergoing surgery for bronchial carcinoma were obtained from microscopically normal areas distant from the tumor.

Human bronchial tissue samples were locally injured and the repair process was followed for 4 days as described previously.<sup>17,18</sup>

#### Epithelial Cell Isolation and Culture

Human airway epithelial cells (HAECs) were isolated from polyps and bronchial tissues and cultured in an air-liquid interface culture condition as described previously.<sup>2,19,20</sup> After 5, 7, 9, 11, 16, 23, 30, and 33 days, cells were detached with trypsin and counted with the ADAM-MC apparatus (Labtech, France).

Human airway basal epithelial cells were sorted and separated from secretory and ciliated cells by FACS as described previously.<sup>2</sup> The sorted cells were composed of 98.4% basal cells as demonstrated by the reanalysis of the sorted cells.

#### Immunocyto/histochemistry

An indirect immunofluorescence labeling technique was performed on frozen sections of bronchial tissues or cell cultures as described previously.<sup>19</sup> All fluorescence-labeled preparations were examined with an AxioImager microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a Coolsnap FX camera (Roper Scientific, Lisses, France). Images were processed with the AxioVision (Zeiss) and Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) software.

#### Localization of Binding Sites for *α*-Bungarotoxin

Binding sites for  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ BTX) were studied in bronchial tissue samples according to Ref.<sup>21</sup> with some modifications, including the following steps: 1) overnight incubation at 4°C with 1  $\mu$ mol/L  $\alpha$ BTX-Alexa Fluor 488 conjugate, 2) fixation with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature, 3) overnight incubation at 4°C with 5  $\mu$ g/ml rabbit anti-Alexa Fluor 488, 4) incubation for 1 hour at room temperature with 10  $\mu$ g/ml donkey anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488 conjugate, and 5) counterstaining with hematoxylin. Controls were performed by omitting  $\alpha$ BTX-Alexa Fluor 488 conjugate in the first incubation.

#### Cell Proliferation Assay

Freshly isolated HAECs or FACS sorted basal epithelial cells were seeded on 96-well microplates in a proliferation medium, adapted from Refs.<sup>19</sup> and <sup>22</sup> at a density of  $20 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>, and cultured in the presence of 0–10  $\mu$ mol/L  $\alpha$ BTX, methyllycaconitine,  $\alpha$ -connotoxin MII, or mecamylamine. Cells were then incubated for 1 hour in 1 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide. The dye was extracted with propanol-2 and the OD at 560 nm was read in a Xenius spectrophotometer (Safas, Monaco).

# Transfection of Small Interfering RNA and nAChR α7 Expression Vector and RT-PCR Analyses

Two  $\alpha$ 7 subunit-specific 19-nt sequences were selected in the coding sequence of nAChR  $\alpha$ 7 subunit (GenBank accession no. NM000746) to generate 21-nt sense and 21-nt antisense strands of the type (19N) TT (N, any nucleotide). The selected 19-nt sequences were as follows:  $\alpha$ 7si1, 5'-CAUCCGAUUCGGUACCAUU-3'; and  $\alpha$ 7si2, 5'-GGACAGAUCACUAUUUACA-3' (Eurogentec, Seraing, Belgium). Two duplexes, which do not recognize any sequence of human genome, were used as control. A total of 20,000 16HBE14o-cells were transiently transfected with 20 nmol/L siRNA duplexes by using the calcium phosphate-precipitation method. Twenty-four hours after transfection, cells were counted and collected for RT-PCR analysis.

Using FuGENE 6 reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France), 20,000 16HBE14o-cells were transiently transfected with 1  $\mu$ g/ml pCMV6 empty vector or 1  $\mu$ g/ml pCMV6-cDNA  $\alpha$ 7 (OriGene, Rockville, MD), according to the manufacturer's procedure. The cells were counted and collected for RT-PCR analysis at 1, 3, and 6 days after transfection.

RT-PCR analyses were performed as previously described,<sup>23</sup> using primers for human  $\alpha$ 7 nAChR (5'-CAGTCTTACTCTCTCTTACCGTCT-3' and 5'-GCAC-CAGTTCAGAAGGATGACTC-3'; Eurogentec).

#### Western Blotting

Quantification of  $\alpha$ 7 nAChR by Western blotting was performed as previously described,<sup>23</sup> using the H-302 anti- $\alpha$ 7 nAChR antibody. Subsequent detection of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was performed on the same filters as a control.

#### Transgenic Mice

All experiments and procedures were performed in compliance with the French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation. Mice lacking the  $\alpha$ 7 subunit of the nicotinic receptor (C57BL/6 background) and wildtype littermates were generated as previously reported,<sup>24</sup> shipped from Institut Pasteur (Paris, France) and housed in a sterile animal care facility. Mice, used for the study of the tracheal epithelium regeneration process, were ~8 weeks of age. The phenotype of tracheal epithelium was also investigated in 1-year-old mice.

#### Induction of Tracheal Epithelial Damage in Mice

Epithelial desquamation was induced in mouse trachea after instillation of polidocanol.<sup>25</sup> Thirty-five microliters of 2% polidocanol in PBS was slowly instilled into the nostrils. Animals were sacrificed on days 0 (before polydocanol treatment), 2, 4, 6, 7, and 8, and trachea was removed. The morphology of the tracheal epithelium was studied in 10 hematoxylin-stained sections covering the entire proximal region of the trachea extending 1–3 mm beneath the larynx. The epithelial height was measured in three different areas of the tracheal epithelium.

#### Characterization of the Tracheal Epithelium Histology in $\alpha 7^{+/+}$ and $\alpha 7^{-/-}$ 1-Year-Old Mice

The morphology of the tracheal epithelium was studied in  $\alpha 7^{+/+}$  and  $\alpha 7^{-/-}$  1-year-old mice, in ~10–15 hematoxylin-stained sections covering the entire proximal region of the trachea extending 1–3 mm beneath the larynx. In all sections derived from  $\alpha 7^{+/+}$  and  $\alpha 7^{-/-}$  mice, three different phenotypes of the surface epithelium were observed. In each section, we assessed the percentage of each phenotype along the total length of the tracheal epithelium covering cartilage

#### Results

# $\alpha$ 7 nAChR Expression Is Associated with the Differentiation of the Airway Epithelium

When using the H-302 polyclonal antibody or  $\alpha$ BTX, a competitive antagonist with a high affinity for the  $\alpha$ 7 nAChR,<sup>10,26,27</sup> we localized the  $\alpha$ 7 nAChR in the normal human airway epithelium, both at the apical plasma membrane of columnar ciliated cells and in the pericellular plasma membrane of basal cells (Figure 1, A and B).

To study the relationship between a7 nAChR expression and the differentiation of the airway epithelium, we studied the expression of a7 nAChR both in vivo in human tracheal tissue samples during fetal development and in vitro during the regeneration of human airway epithelium. The human fetal airway epithelium acquires its morphological differentiation at ~12 to 15 weeks of development.28 We observed that, during the fetal development of human airways, α7 nAChR expression starts at 13 weeks of development, simultaneously with the expression of ZO-1, a marker of epithelial cohesion, of β-tubulin, a marker of the ciliary differentiation and of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, a marker of epithelium functionality for CI- ion secretion at the apical membrane (Figure 2). The human airway epithelium can be fully regenerated in vitro from isolated HAECs maintained in culture in an air-liquid interface condition.<sup>20</sup> In
#### α7 nAChR in Airway Epithelium Plasticity 1871 AJP November 2009, Vol. 175, No. 5



Figure 1. Localization of nAChR  $\alpha$ 7 in the airway epithelium. nAChR  $\alpha$ 7 was localized with the H-302 antibody at 1 µg/ml (A) or with AlexaFluor488- $\alpha$ BTX at 1µmol/L (B) in human bronchial tissue samples, both at the apical side of the epithelium (arrows) and in basal epithelial cells (arrowheads).

this model, we observed a progressive regeneration of pseudostratified epithelium after 4 to 6 weeks (Figure 3A). By using immunofluorescence and RT-PCR techniques, we observed that the expression of a7 nAChR in the basal layers of the epithelium was maximal in steps II and III (appearance of the first ciliated cells) and paralleled the expression of CK14, a marker of airway basal cells.<sup>29</sup> suggesting that  $\alpha$ 7 nAChR expression in basal cells is essential during the initial step of epithelial differentiation and the establishment of the basal cell layer. Thereafter, the expression became progressively restricted to one single layer of basal cells for α7 nAChR or isolated basal cells for CK14 at a time where the epithelium was pseudostratified and continuously expressed β-tubulin at the apical membrane (steps IV and V). Quantification of RT-PCR showed that the amount of α7 nAChR mRNA progressively increased during steps I to III (P = 0.0183) and then decreased during steps III to V (P = 0.0388; Friedman test) (Figure 3B).

Altogether, these observations indicate that the  $\alpha$ 7 nAChR expression is related to the differentiation of the airway epithelium and provide a rationale for investigating the implication of  $\alpha$ 7 nAChR in the differentiation of the airway epithelium.

# $\alpha$ 7 nAChR Expression/Activity Is Associated in Vivo with the Remodeling of the Airway Epithelium

The knockout mice model gives a good opportunity to investigate the effect of the  $\alpha$ 7 nAChR absence on the

airway epithelium morphology and differentiation. In all tracheal sections from 1-year-old control and  $\alpha 7^{-/-}$  mice, three different phenotypes of the surface epithelium were observed. Phenotype 1 corresponds to a normal epithelium with two layers of nuclei and an epithelium height in the range of 25 to 35  $\mu$ m. Phenotype 2 corresponds to a normal epithelium with three to four layers of nuclei and an epithelium height in the range of 40 to 55  $\mu$ m. Phenotype 3 corresponds to a disorganized epithelium, with four to six layers of nuclei, an absence of the superficial columnar cell layer and an epithelium height in the range of 30 to 55 µm (Figure 4A). By using the Griffonia simplicifolia isolectin B4 (GSI-B4), which binds specifically to basal cells in the mouse tracheal epithelium,30 we confirmed that phenotype 1 is characterized by one monolayer of basal cells, phenotype 2 contains one/two layers of basal cells, whereas GSI-B4 recognizes three/four layers of basal cells in phenotype 3 (Figure 4B). The percentage of phenotype 2 in the tracheal epithelium was decreased in  $\alpha 7^{-/-}$  mice as compared with control mice (P = 0.0373), whereas phenotype 3 was 3.8 times more expressed in  $\alpha 7^{-/-}$  mice (P = 0.0174) (Figure 4C), suggesting that the absence of the a7 nAChR in mice is associated with a more frequently observed hyperplasia of basal cells in the tracheal epithelium.

The allosteric model for nAChRs implies the equilibrium between channel resting, opening and desensitization.<sup>31</sup> Chronic exposure to nicotine results in both peaks of activation and long-term desensitization of nAChRs, but it is now believed that the overall effect of sustained smoking may result in nAChR desensitization and that chronic smoking maintains this desensitization, even if chronic nicotine exposure is also known to up-regulate nAChRs.32 The a7 nAChR has been shown to be particularly susceptible to desensitization33-35 and to up-regulation on nicotine exposure.7,13,36 We thus postulated that in heavy smokers the potential nicotine-induced inactivation of the α7 nAChR may result in alterations in the airway epithelium differentiation. Indeed, in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and with a significant smoking history, the airway epithelium is characterized by secretory cell or basal cell hyperplasia and squamous metaplasia (Figure 5). Hyperplasia of basal cells (area B and D) and squamous metaplasia (area C) are characterized by an overexpression of CK13 and CK14, desmoplakins 1 and 2, and by the absence of β-tubulin at the apex of the epithelium, confirming the absence of ciliated and polarized cells at the luminal surface. Whereas a7 nAChR expression is restricted to one basal cell layer at the margin of the pseudostratified epithelium (Figure 5 D, arrow), α7 nAChR is present up through most basal layers in areas of basal cell hyperplasia or squamous metaplasia (Figure 5, D and C, arrowheads). Similarly to what we observed during the in vitro epithelium differentiation (Figure 3 A), a7 nAChR expression in remodeled areas of the airway epithelium is mainly restricted to CK14-expressing basal cells.

These results suggest that the airway epithelium differentiation-associated  $\alpha$ 7 nAChR expression implicates the differentiation pathway of airway basal cells.



Figure 2. Expression of nAChR α7 during the fetal development of the human airway epithelium. nAChR α7, the protein ZO-1, β-tubulin, and CFTR were localized with Alexa 488 conjugates in human tracheal tissue samples at 11, 13, and 24 weeks of development and in samples from adult patients.

# The $\alpha$ 7 nAChR Is Involved in the Differentiation Pathway of the Airway Epithelium

To investigate the function of the a7 nAChR in the differentiation of the airway epithelium, we first studied the effect of  $\alpha$ BTX, a toxin with a high affinity for the  $\alpha$ 7 nAChR, on human bronchial tissues undergoing repair. After inducing a local wound in fresh human bronchial tissues (ex vivo wound repair model), we observed that basal cells, characterized by the expression of CK13, are able to spread and migrate to progressively cover the wounded area. Similarly, we observed that the α7 nAChR is continuously expressed in basal cells in the unwounded pseudostratified epithelium at the lesion edge and in the repairing area (Figure 6A). Exposure of cultures to aBTX induced a progressive thickening of the epithelium in the repairing areas, with two to three and then four to six cell layers after 3 and 4 days, respectively, as compared with one to three cell layers observed in the control cultures. In both control- and aBTX-exposed cultures, all repairing cells contained CK13, but more cells expressed Ki-67, a proliferation marker, in their nuclei when exposed to αBTX, especially after 4 days in culture (Figure 6B). These observations suggest that the pharmacological inactivation of a7 nAChR up-regulates basal cell proliferation and modulates the early events of epithelium regeneration. To analyze in more details and to quantify these effects, we used an *in vitro* air-liquid interface culture model of airway epithelium regeneration.

When analyzing the effect of the chronic exposure to  $\alpha$ BTX on the regeneration of the human airway epithelium (in vitro air-liquid interface culture model), we first observed that aBTX induced a dramatic increase in cell proliferation in the early phases of epithelial regeneration. Indeed, in the presence of 5  $\mu$ mol/L  $\alpha$ BTX, we observed a significant increase of the cell number (P < 0.05) at day 5 (+626%), day 7 (+206%), day 9 (+123%), day 11 (+23%), day 16 (+11%), and day 23 (+10%) (Figure 7A). After 2 days in culture, we identified more Ki-67-positive nuclei in aBTX-exposed cells than in control cells (Figure 7B), suggesting that αBTX was likely to favor cell cycle progression rather than inhibiting apoptosis. Moreover, we observed that all cells expressing Ki-67 in the nucleus, were those expressing CK13, a marker of airway basal cells (Figure 7B), suggesting that aBTX induced basal cell proliferation during the initial step of epithelial regeneration. Figure 7C (control) depicts the evolution of the epithelium morphology during the regeneration process in the absence of aBTX. On day 16, the control cultures exhibit three to four layers of cuboidal undifferentiated cells. On day 23, columnar cells and some ciliated cells (arrowheads) are observed in the upper part of the epithelium. Finally on day 33, the epithelium is pseudostratified, ciliated cells are present all along the

#### α7 nAChR in Airway Epithelium Plasticity 1873 AJP November 2009, Vol. 175, No. 5



epithelium, CK13 and CK14 and desmoplakins 1 and 2 are essentially expressed in the basal layer of basal cells while  $\beta$ -tubulin and  $\alpha$  subunit of the epithelial sodium channel (a-ENaC) are expressed all along the apical membrane of columnar cells, suggesting that the regenerated epithelium is now fully differentiated (Figure 7D, control). When epithelial regeneration was performed in the presence of aBTX, added from day 1, the epithelium was pluristratified and composed of five to six and seven to eight layers of cuboidal cells at days 16 and 23, respectively, with some very flat cells observed at the top of the epithelium on day 23. After 33 days of aBTX exposure, the epithelium still consisted in 8 to 10 layers of cuboidal and polyhedral cells, most of them overexpressing CK13 and CK14 and desmoplakins 1 and 2 in the basal layers whereas the apical expression of β-tubulin and α-ENaC was greatly reduced (Figure 7, C and D, aBTX d1), a situation similar to that observed in vivo in

squamous metaplasia of the airway epithelium from smoking patients with COPD (Figure 5C). Moreover, p63, present in airway basal cells and whose expression is decreased during squamous cell differentiation,37 was expressed in the control basal cells but absent in aBTXexposed cultures. Transglutaminase-1, a well-known marker of squamous differentiation of the respiratory tract,38 is expressed at low level in the control cultures, but overexpressed in the presence of  $\alpha$ BTX (Figure 7D). The forkhead transcription factor Foxj1 is required for ciliogenesis and also involved in the organization of the apical membrane.39 In the differentiated pseudostratified epithelium, Foxj1 is present and expressed at the same level in most cell nuclei of the epithelium. In aBTX-exposed cultures, Foxi1 is still present in the basal progenitor cells of the epithelium, but its expression is much lower in the intermediate cells and finally absent in the upper part of the epithelium (Figure 7D). In summary,



**Figure 4.** Morphological characterization of the tracheal epithelium in  $\alpha 7^{+/+}$ and  $\alpha 7^{-/-}$  mice. As Histological hematoxylin-stained sections of the upper tracheal illustrating the three different epithelial phenotypes observed in 1-year-old mice. B Binding of the FITC-conjugated GSI-B4 lectin to cryosections of mouse trachea. Each panel is matched with the corresponding hematoxylin-stained sections presented at the same level in A. Ci Quantification (mean  $\pm$  SD) of each phenotype 1, 2, and 3, expressed as percentage of the total length of the tracheal epithelium in cross-sections of trachea from control  $\alpha 7^{+/+}$  mice (white bars, n = 9) and from  $\alpha 7^{-/-}$  mice (black bars, n = 6). The significance of the differences between control  $\alpha 7^{+/+}$  mice and  $\alpha 7^{-/-}$  mice was determined using the Mann-Whitney test.

adding aBTX from day 1-stimulated cell proliferation during the initial steps of the regeneration and prevented the differentiation of the normal pseudostratified airway epithelium. To investigate in more details the relationship between the initial stimulation of cell proliferation and the subsequent alteration of epithelium differentiation, we tested the effect of adding chronically αBTX from day 11, ie, after ~50% of cell proliferation has already occurred in the control culture (Figure 7A). When adding αBTX from day 11, we did not observed any subsequent modification of cell proliferation and the evolution of epithelium morphology and the distribution of differentiation markers were similar to those observed in the control culture, even after a 22-day exposure to aBTX (Figure 7 A, C, and D, αBTX d11), suggesting that cell proliferation needs to be altered by aBTX, during the first steps of the epithelium regeneration, to induce an alteration in epithelium differentiation.

Finally, we investigated the effect of a7 nAChR absence on the regeneration of the tracheal epithelium in  $\alpha$ 7<sup>+/+</sup> and  $\alpha$ 7<sup>-/-</sup> mice. Desquamation of the mouse tracheal epithelium was induced after instillation of a polydocanol solution.25 Figure 8A depicts the morphology of regenerating tracheal epithelium in  $\alpha 7^{+/+}$  and  $\alpha 7^{--}$ mice from days 0 to 8 after polydocanol instillation. Before injury, both  $\alpha^{7+\prime+}$  and  $\alpha^{7-\prime-}$  8-week-old mice presented the same pseudostratified morphology of the tracheal epithelium with one to two layers of nuclei. On day 2, only flat cells spreading over the denuded basement membrane are observed. On day 4, 3 to 4 and 8 to 10 cell layers are present in the control  $\alpha^{7+\prime+}$  mice and in  $\alpha^{7-\prime-}$  mice, respectively, suggesting that an active cell proliferation has occurred with a more significant effect observed in  $\alpha 7^{-/-}$  mice. The first columnar cells are observed in  $\alpha 7^{+/+}$  mice, whereas the epithelium in  $\alpha 7^{-/-}$  mice is still undifferentiated. On day 6, the first basal cells are observed only in  $\alpha 7^{+/+}$  mice. On day 7, the epithelium in α7+/+ mice is almost fully differentiated whereas that of  $\alpha 7^{-/-}$  mice begins to pseudostratify with the appearance of the first basal cells. On day 8, the epithelium in  $\alpha 7^{+/+}$ mice and in  $\alpha 7^{-/-}$  mice has a similar pseudostratified structure. We measured the epithelium height during the whole process of regeneration (Figure 8B). On day 4, the epithelium is thicker both in  $\alpha 7^{+/+}$  and  $\alpha 7^{-/-}$  mice (P = 0.0339) as compared with day 0. Then, we observed a progressive and significant decrease of the epithelium height between day 4 and day 8 both in  $\alpha 7^{+/+}$  mice (P = 0.0315) and in  $\alpha 7^{-/-}$  mice (P = 0.0067), with a thicker epithelium in  $\alpha 7^{-/-}$  mice on day 4 and day 6 (P = 0.0209). Finally on day 8, the epithelium height in  $\alpha 7^{-/-}$ mice (33.9  $\pm$  3.4  $\mu$ m) is still higher as compared with day 0 (27.5 ± 1.3; P = 0.0339), whereas the epithelium height in  $\alpha 7^{+/+}$  mice (30.0 ± 4  $\mu$ m) is similar to that observed on day 0 (28.8 ± 0.8; P > 0.99). Immunostaining for caveolin-1, a marker of basal cells in the mouse tracheal epithelium,40 confirmed a basal cell hyperplasia more pronounced in  $\alpha 7^{-/-}$  mice than in  $\alpha 7^{+/+}$  mice both on days 4 and 6, whereas a single basal cell layer is observed on day 8 (Figure 8C). These results suggest that the regeneration of the airway epithelium in  $\alpha 7^{-/-}$  mice is altered and characterized by a transient hyperplasia of basal cells.

# $\alpha$ 7 nAChR Regulates the Proliferation of Airway Epithelial Basal Cells

We have observed that  $\alpha$ 7 nAChR regulates the proliferation of HAECs in air-liquid interface culture and that the proliferating cells are mainly composed of basal epithelial cells (Figure 7, A and B). Because  $\alpha$ 3 $\alpha$ 5 $\beta$ 2 nAChR is also expressed in basal epithelial cells and involved in the wound repair process of the injured airway epithelium,<sup>19</sup> we investigated the respective and potential role of  $\alpha$ 7 nAChR and  $\alpha$ 3 $\alpha$ 5 $\beta$ 2 nAChR in basal cell proliferation by studying the effect of different nAChR antagonists,  $\alpha$ BTX<sup>10,28,27</sup> and methyllycaconitine<sup>41</sup> for the  $\alpha$ 7 nAChR,  $\alpha$ -connotoxin MII for the  $\alpha$ 3 $\beta$ 2 nAChR,<sup>16</sup> and mecamylamine for all  $\alpha_x \beta_y$  heteropentameric nAChRs,<sup>42</sup> on the *in vitro* 



**Figure 5.** nAChR  $\alpha$ 7 in a smoker-derived remodeled human airway epithelium. The localization of nAChR  $\alpha$ 7, CK13 and CK14, desmoplakins 1 and 2 (Desmo), and  $\beta$ -tubulin was studied by immunofluorescence with Alexa 488 conjugates (green color in dark panels) in a human bronchial tissue sample derived from a patient with a significant smoking history and presenting different types of remodeling: normal pseudostatified epithelium with hyperplasia of secretory cells (A), hyperplasia of basal cells and squamous metaplasia (B), and squamous metaplasia (C). D reports  $\alpha$ 7 nAChR distribution in the area of basal cell hyperplasia.  $\alpha$ 7 nAChR is expressed in the basal cell layer in the pseudostatified epithelium (D, arrow) and present in most basal layers in areas of basal cell hyperplasia or squamous metaplasia (D and C, arrowheads).

proliferation of isolated HAECs (Figure 9A) and of sorted human airway basal epithelial cells (Figure 9B). We did not observe any significant effect of both  $\alpha$ -connotoxin MII and mecamylamine on cell proliferation when tested from 0.1 to 10  $\mu$ mol/L. On the contrary,  $\alpha$ BTX exposure dose-dependently increased cell proliferation both in isolated HAECs (Figure 9A) and in sorted human airway basal epithelial cells (Figure 9B), with a maximal effect observed for a 10  $\mu$ mol/L concentration. Both  $\alpha$ BTX and methyllycaconitine, two competitive antagonists of  $\alpha$ 7 nAChRs, stimulated basal cell proliferation (Figure 9B). Similarly, exposure of 16HBE14o-cells, a normal human airway cell line<sup>43</sup> expressing the basal airway cell markers CK13 and CK14 (Figure 10 A), to 0.1–10  $\mu$ mol/L  $\alpha$ BTX significantly increased (P = 0.0074, Friedman test) cell proliferation in a dose-dependent way (Figure 10B). Transfection of the 16HBE14o-cell line with two different small interfering RNAs (siRNAs), Si1 and Si2, targeted to



**Figure 6.** Effect of *a*BTX on the *ex vivo* wound repair of the human respiratory epithelium. Normal human bronchial tissue samples were locally wounded (*ex vivo* wound repair model) and maintained in culture. Ar After 2 days in culture, the localization of CK13 and nAChR *a*7 was studied by immunofluorescence with Alexa 488 conjugates (**green color** in **dark panels**) in stationary cells in the unwounded pseudostratified normal epithelium (**ft column**), in the transition area between the normal unwounded epithelium and the migrating cells (**middle column**) and in migrating cells in the wounded area (**right column**). **Arrowheads** denote expression of nAChR *a*7 in basal cells present in the unwounded pseudostratified epithelium and at the lesion edge. **B**: After 3 and 4 days in culture in the presence (**right panels**) or absence (control, **left panels**) of 5 µmol/L *a*BTX, the localization of CK13 (Alexa 594, **red color**) and of the Ki-67 protein (Alexa 488, **green color**) was studied by immunofluorescence in the regenerating epithelium, i.e., in cells located in the initially wounded area of the injurce epithelium (**right panels**) or 5 µmol/L *a*BTX, the localization of CK13 (Maxa 594, **red color**) and of the Ki-67 protein (Alexa 488, **green color**) was studied by immunofluorescence in the regenerating epithelium, i.e., in cells located in the initially wounded area of the injurce epithelium.

mRNA encoding the  $\alpha$ 7 nAChR subunit, significantly inhibited protein level for  $\alpha$ 7 nAChR by 56 and 41%, respectively (Figure 10C) and stimulated cell proliferation over a 1- to 6-day period (Figure 10D), as compared with scramble siRNA controls. On the contrary, transfection of the 16HBE14o-cell line with the  $\alpha$ 7 nAChR cDNA significantly increased by 157%  $\alpha$ 7 nAChR protein level (Figure 10E) and decreased cell proliferation by 49 and 25%, 3 and 6 days after transfection, respectively, as compared with transfection with the pCMV6 empty vector (Figure 10F).

# Discussion

The remodeling of the airway epithelium, described as abnormal plasticity, includes basal cell and goblet cell hyperplasia, and squamous cell metaplasia.<sup>44</sup> These changes involve that any delay in the repair of the injured epithelium, or disruption in proliferation and differentiation, may affect the dynamic process of regeneration. In this study, we demonstrate that the  $\alpha$ 7 nAChR, expressed in human airway basal cells, is essential for the regeneration of a normal pseudostratified epithelium by regulating basal cells proliferation *in vivo* and *in vitro*. Our findings also suggest that alteration of  $\alpha$ 7 nAChR expression or activity in airway basal cells is involved in the airway epithelium remodeling, namely basal cell hyperplasia and squamous metaplasia.

In animal models, it has been shown that airway basal cells have the potential to proliferate and to differentiate into most cell types of the mucociliary epithelium to re-



**Figure** 7. Effect of  $\alpha$ BTX on the *in vitro* regeneration of the human respiratory epithelium. HAECs were isolated and cultured in air-liquid interface in the absence (control) or in the presence of 5  $\mu$ mol/L  $\alpha$ BTX added from day 1 ( $\alpha$ BTX d1) or from day 11 ( $\alpha$ BTX d11). Ai Cells in each condition were counted over a 30-day period in culture. The results are expressed as mean cell number  $\pm$  SD for five different experiments conducted on primary cultures of HRECs derived from five different patients. The significance of the differences between  $\alpha$ BTX-exposed cultures and control cultures was determined using Wilcoxon rank test (\*P < 0.05). Bi CK13 (red color Alexa 594 conjugate), Ki-67 (green color: Alexa 488 conjugate), and cell nuclei (blue color 4',6'-diamino-2-phenylindole) immunostaining of HRECs after 2 days in control and  $\alpha$ BTX-exposed cultures; arrowheads point to Ki-67 immunoreactivity in CK13-positive cells. Ci Morphology of the regenerated epithelium after 16, 23, and 33 days in culture in the different conditions (control,  $\alpha$ BTX d1 and  $\alpha$ BTX d11). Arrowheads point to CK13, CK14, desmoplakins 1 and 2 (Desm), PG3, *B*-tubulin (*B*-Tub),  $\alpha$ -ENaC, Foxj1, and transglutaminase-1 (TG-1) immunostaining with Alexa 488 conjugates of HRECs after 33 days in culture in air-liquid interface condition.

generate its structure.<sup>45–48</sup> More recently, *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that human adult airway basal cells, as opposed to ciliated and secretory cells, are able to proliferate and to reconstitute a fully differentiated and functional mucociliary airway epithelium and may be considered as progenitors of the human airway epithelium.<sup>2</sup> We have observed that airway epithelial cells, migrating to repair a wound (*ex vivo* wound repair model) or adhering and proliferating to further regenerate the epithelium (air-liquid interface culture model), present basal cell characteristics and continuously express  $\alpha$ 7 nAChR. Al-

though  $\alpha$ 7 nAChR has been shown to be expressed at the apex of the rat tracheal epithelium<sup>49</sup> or of nicotinetreated monkey airway epithelium,<sup>13</sup> the expression of  $\alpha$ 7 nAChR in airway basal cells has never been reported before. Although  $\alpha$ 7 nAChR is expressed in migrating basal cells repairing a wound, we previously observed that  $\alpha$ 7 nAChR is not involved in the first step of epithelium regeneration, ie, cell spreading and migration, which implies the  $\alpha$ 3 $\alpha$ 5 $\beta$ 2 nAChR.<sup>19</sup> Here, we show that  $\alpha$ 7 nAChR expressed in airway basal cells is involved in the epithelium differentiation. 1878 Maouche et al AJP November 2009, Vol. 175, No. 5



**Figure 8.** Regeneration of the tracheal epithelium after exposure to polydocanol in  $\alpha 7^{+/+}$  and  $\alpha 7^{-/-}$  mice. At Histological hematoxylin-stained sections of upper trachea from day 0 (just before polydocanol treatment) to day 8 in 8-week-old mice. Arrows in day 2 denote only flat cells spreading over the denuded basement membrane are observed both in  $\alpha 7^{+/+}$  mice and in  $\alpha 7^{-/-}$  mice. Arrows in day 6 denote the first basal cells observed in  $\alpha 7^{+/+}$  mice. Arrows in day 7 denote the appearance of the first basal cells in  $\alpha 7^{-/-}$  mice. B<sub>1</sub> Variation of epithelium height during the epithelium regeneration. Results are expressed as mean epithelium to five mice for each time. The significance of the differences between control  $\alpha 7^{+/+}$  mice and  $\alpha 7^{-/-}$  mice was determined at each time using the Mann-Whitney test. C<sub>1</sub> Identification of caveolin-1 in cryosections by immunofluorescence with an Alexa 594 conjugate.

The expression of  $\alpha$ 7 nAChR is definitely associated with the differentiation state of the airway epithelium. The highest detectable  $\alpha$ 7 nAChR expression, both during the human airway fetal development and during the *in vitro* regeneration of the human pseudostratified epithelium, is observed when airway epithelial differentiation takes place. Otherwise,  $\alpha 7^{-/-}$  mice are viable and the airway epithelium morphology is similar in  $\alpha 7^{-/-}$  mice and in control mice, at least during the first weeks of life, suggesting that  $\alpha 7$  nAChR expression is not essential for





Figure 9. Effect of nicotinic antagonists on the *in vitro* proliferation of HAECs. The proliferation of HAECs, isolated from normal human bronchial tissues (A) or of basal cells, sorted by FACS (tetraspanin CD151<sup>+</sup> and tissue factor<sup>+</sup>) from a normal human bronchial tissue sample (B) was studied with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide (MTT) technique on multiwell plates in the presence of increasing concentrations of  $\alpha$ BTX, methyllycaconitine,  $\alpha$ -connotoxin MII, and mecamylamine (A and B). The results are expressed as mean OD at 560 nm ± SD for 10 different experiments conducted on primary cultures of HRECs derived from 10 different patients (A) or for one experiment with sorted basal epithelial cells, run in sextuplicates (B). The significance of the differences between control and antagonist exposed-cells was determined using the Wilcoxon rank test (A) and the Mann-Whitney test (B).

normal airway development or that the missing function of  $\alpha$ 7 nAChR in  $\alpha$ 7<sup>-/-</sup> mice is compensated by up-regulated expression of other nAChR subunits as described in keratinocytes.50 Nevertheless, chronic prenatal nicotine exposure increases pulmonary a7 nAChR expression and alters fetal lung development in monkeys.13 Chronic exposure to submicromolar concentration of nicotine is also known to irreversibly inactivate many nAChRs, including a7 nAChR,35 and inactivation of a7 nAChR alters pulmonary morphogenesis.15 Similarly, we have observed that the chronic inactivation of a7 nAChR by aBTX prevents the in vitro differentiation of the normal human pseudostratified epithelium and that the absence of  $\alpha 7$ nAChR in mice induces modifications of the epithelium phenotype and an altered epithelial regeneration after wounding. We can therefore infer that a7 nAChR plays a potential role in the airway epithelium differentiation. Surprisingly, in all these in vivo and in vitro approaches, we observed that the absence or the inactivation of  $\alpha 7$ nAChR is characterized by either a transient or an established hyperplasia of basal epithelial cells, which led us to investigate the potential role of the a7 nAChR in the regulation of airway epithelial basal cell proliferation.



**Figure 10.** Effect of *α*BTX, of siRNA, and of cDNA specific for nAChR *α*7 on the proliferation of the normal airway cell line 16HBE140-. At CK13 and CK14 immunostaining of 16HBE140-cells in culture. B: 16HBE140-cells were cultured for 6 days in multivell plates in the presence of increasing concentrations of *α*BTX, and the cell number was determined using the 3-(4,5-dimethyltetrazolium bronide (MTT) method. Results are expressed as mean OD at 560 nm ± SD for four different *α*BTX-treated cultures. C-F: 16HBE140-cells were transiently transfected either with two different siRNA sequences against nAChR *α*7 subunit (Si 1 and Si 2), or with two scrambled control siRVAs (Ctrl 1 and Ctrl 2) (C and D), or with the *α*7 cDNA expression vectors, or the empty control vector (pCMV6) (E and F). C and E<sub>1</sub> Immunoblots (**top panels**) and quantification of nAChR *α*7 subunit, normalized for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) values (**bottom panels**) 6 days after transfectant relative to the control (Ctrl), Ctrl2, or pCMV6) transfectants. The significance of the differences between transfected cells and the corresponding controls was determined using the one simple t +test (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01). D and F<sub>1</sub> transfected cells were counted on days 1, 3, and 6 after transfection. The results are expressed as mean cell number ± SD for four different transfected cultures. The significance of the differences between α7 siRNA or α7 cDNA-transfected cells and their corresponding controls was determined using the (\*P = 0.0339; \*\*P = 0.0209).

 $\alpha$ 7 nAChR appears to be a key negative regulator of airway epithelial basal cell proliferation: 1) inactivating  $\alpha$ 7 nAChR *in vitro* with  $\alpha$ BTX stimulates cell proliferation in the early phases of the epithelial regeneration and the corresponding proliferating cells have phenotypic characteristics of basal epithelial cells, 2) regeneration of the airway epithelium in mice lacking  $\alpha$ 7 nAChR is characterized by a transient hyperplasia of basal cells, 3) airway epithelium in aged  $\alpha$ 7<sup>-/-</sup> mice more frequently presents areas of basal cell hyperplasia, and 4) *in vitro*, the proliferation of sorted human airway basal cells is stimulated by aBTX and methyllycaconitine but not by a-Conotoxin MII nor mecamylamine, suggesting that only a7 nAChR regulates the proliferation of basal cells in the normal human airway epithelium. Similarly, inhibition of the α7 nAChR pathway favored cell cycle progression in epidermal keratinocytes. 50 On the contrary, many authors have noticed that a7 is the main nAChR subunit that mediates the proliferative effects of nicotine in cancer cell lines.12 This a7 nAChR-mediated stimulatory effect of nicotine was also observed in commercialized normal bronchial epithelial cells, after these cells have been amplified after isolation.51 At the opposite, we always observed a stimulatory proliferative action of aBTX on primary cultures of freshly isolated HAECs and on purified human airway basal cells. We also observed the same proliferation stimulatory effect of both aBTX and a7 nAChR-specific siRNAs on the 16HBE14o-cell line, a normal human airway cell line expressing the basal airway cell markers CK13 and CK14, whereas transfection with the a7 nAChR cDNA inhibited cell proliferation. We observed a stimulatory proliferative effect of nicotine both on HAECs and isolated human airway basal cells only when cells were incubated for 7 to 15 days with high nicotine concentrations (10 to 100 µmol/L), conditions which may have favored α7 nAChR inactivation (data not shown). This antagonist-like effect of nicotine, on over exposure of HAECs to nicotine, has been already described by Zia et al.7 These results suggest that the regulation of cell proliferation by a7 nAChR may be quite different in the normal airway epithelium and in primary cultures of normal HAECs, on the one hand, and in lung cancer and cell lines derived from lung cancers, on the other hand.

Our results raise the concept of coupling between cell growth and differentiation. In the normal pseudostratified tracheobronchial epithelium, a strict balance exists between cellular proliferation and differentiation.44,52 This balance is likely maintained via equilibrium between positive and negative growth regulatory factors and factors controlling differentiation.53 It is generally accepted that an inverse relationship exists between growth and differentiation in the airway epithelium.52,54 For example, after mechanical or toxic injury, the balance between proliferation and differentiation is disturbed, and the epithelium undergoes hyperplasia followed by transient squamous metaplasia,55-60 a situation similar to our observation after aBTX exposure: that is, after an increased cell proliferation, the regenerated airway epithelium ends up with squamous metaplasia. Interestingly, we have observed that, although the airway epithelium undergoes squamous metaplasia in vitro, Foxj1, a transcription factor involved in ciliated cells differentiation,61.62 is down-regulated. Regulation of Foxi1 expression may thus be a key element in the αBTX-induced epithelium squamous metaplasia. We have observed that aBTX-induced squamous metaplasia takes place only when adding the a7 nAChR antagonist during the proliferation step of the airway epithelium regeneration. It has been proposed that the induction of squamous metaplasia after injury of the tracheobronchial epithelium involves enhanced proliferation of a p63+/ CK14+/CK5+/BS-I-B4+ subpopulation of basal cells.37

Indeed, we have observed that a7 nAChR blockade induces expression of squamous metaplasia phenotype in cultured HAECs, which was preceded by CK14+ basal cell hyperplasia. Interestingly, constitutive expression of the human CK14 gene in the mouse airway epithelium induced tracheal basal cell hyperplasia and squamous metaplasia.63 Of note, the lack of p63 expression in αBTX-induced squamous metaplasia is in agreement with the hypothesis that down-regulation of p63 might be necessary for basal cells to differentiate into squamous cells.37 Among the many factors that have been identified and regulate positively or negatively the growth and differentiation of airway epithelial cells by autocrine or paracrine mechanisms, transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a major cytokine involved in driving squamous metaplasia, is of particular interest. Jetten et al.38 and Masui et al.64 have indeed shown that TGF-β exposure or overexpression in airway epithelial cells induces terminal cell division and favors the expression of a squamous phenotype. Similarly in the present study, aBTX-induced hyperproliferation is followed by a period in which cells stop proliferating and undergo squamous differentiation, suggesting that these changes in the differentiation pathway, when  $\alpha$ 7 nAChR is absent or inactivated, may be related to TGF-B overexpression. In addition, we have observed that the α7 nAChR blockade enhances the expression of transglutaminase, a marker of squamous differentiation known to be up-regulated by TGF-β.38 Moreover, upregulation of TGF- $\beta$  by nicotine is mediated by  $\alpha$ 7 nAChR during atrial remodeling,65 TGF-β up-regulates CK14 expression and promotes the expression of basal cell phenotype<sup>66</sup> and inhibits p63 function.<sup>67</sup> Taken together, our results suggest that a7 nAChRs inactivation can initiate an alternative program of the basal cell differentiation process leading to squamous differentiation and that this process may be associated to down-regulation of Foxi1 and/or up-regulation of TGF-β.

Our data suggest that a7 nAChR is critical for the renewal of the normal respiratory epithelium by repressing basal cell proliferation and stimulating their differentiation. After an acute injury, the regeneration of the airway epithelium in  $\alpha 7^{-/-}$  mice is delayed, transiently abnormal, and characterized by a basal cell hyperplasia. On the long term and after many epithelium renewals, absence or inactivation of the a7 nAChR may progressively induce the frequent remodeling of the airway epithelium observed in old  $\alpha 7^{-/-}$  mice: hyperplasia of basal cells and squamous metaplasia. α7 nAChR inactivation, during the in vitro regeneration of the human airway epithelium, also induces dramatic morphological changes leading to squamous metaplasia. Many inflammatory bronchopulmonary diseases are characterized by a bronchial epithelium remodeling<sup>68</sup> and by a progressive and altered ability of the airway epithelium to regenerate a normal and functional epithelium.69 Chronic obstructive pulmonary diseases are also characterized by a permanent inflammatory context. The a7 nAChR is also now known as an essential regulator of inflammation.21,70 Its inactivation or down-expression may contribute to the excessive proinflammatory pathway, the increased fragility of the airway epithelium and the altered epithelium regeneration observed in COPD. Most patients with COPD have a history of chronic smoking. In these patients,  $\alpha$ 7 nAChR inactivation may results from chronic exposure to nicotine. Indeed, the  $\alpha$ 7 nAChR has been shown to be particularly susceptible to inactivation<sup>33–35</sup> and over exposure of bronchial epithelium cells to nicotine *in vitro* produced an antagonist-like effect (7). Interestingly,  $\alpha$ 7<sup>-/-</sup> mice and  $\alpha$ BTX-exposed HAEC cultures present the same airway epithelium remodelings, basal cell hyperplasia, and squamous metaplasia, as those observed in these smoking COPD patients.

In summary,  $\alpha$ 7 nAChR appears to be a key regulator of the plasticity of the human airway epithelium in controlling basal cell proliferation. Our results also suggest that  $\alpha$ 7 nAChR may be involved in the basal cell differentiation process. These effects may be determinant in the airway epithelium remodeling associated to cigarette smoke as well as in the development of COPD and lung cancers.

## Acknowledgments

We thank Edith Puchelle and Marina Pretolani (INSERM U700, Paris, France) for helpful discussions and Anne L. Leblond (INSERM U533, Nantes, France) for her help in developing the mouse model of tracheal desquamation. We thank all of the surgeons and doctors who provided us with human airway tissues: Dr. Pascal Corlieu (Hôpital Tenon, Paris, France), Prof. Jean-Michel Klossek (Hôpital Jean Bernard, Poitiers, France), Dr. Christophe. Ruaux (Clinique Mutualiste de la Sagesse, Rennes, France), Drs. Michel Monteau and Talal Nasser (Clinique Courlancy, Reims, France), and Drs. Elisabeth Alanio, Matthieu Capovilla, Anne Durlach, Dominique Gaillard, Karine Joseph, and Dominique Zachar (Hôpital Maison Blanche, Reims, France).

# References

- Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E: [Repair and regeneration of the airway epithelium]. French. Med Sci 2005, 21:1063–1069
- Hajj R, Baranek T, Le NR, Lesimple P, Puchelle E, Coraux C: Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transitamplifying cell properties. Stem Cells 2007, 25:139–148
- Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I: Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. Life Sci 2007, 90:2181–2185
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K: Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. Pharmacol Ther 1998, 77:59–79
- Kummer W, Lips KS, Pfeil U: The epithelial cholinergic system of the airways. Histochem Cell Biol 2008, 130:219–234
- Steinbach JH: Mechanism of action of the nicotinic acetylcholine receptor. Ciba Found Symp 1990, 152:53–61
- Zia S, Ndoye A, Nguyen VT, and Grando SA: Nicotine enhances expression of the α3, α4, α5, and α7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1997, 97:243–262
- Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM: Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol 1998, 54:779–788
- Cartisle DL, Hopkins TM, Gaither-Davis A, Silhanek MJ, Luketich JD, Christie NA, Siegfried JM: Nicotine signals through muscle-type and

neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibroblasts. Respir Res 2004, 5:27

- Seguela P, Wadiche J, neley-Miller K, Dani JA, Patrick JW: Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain α7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. J Neurosci 1993, 13:596-604
- Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P: Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. Mutat Res 2008, 659:221–231
- Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P: Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. Trends Pharmacol Sci 2008, 29:151–158
- Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER: Prenatal nicotine increases pulmonary α7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. J Clin Invest 1999, 103:637–647
- Sekhon HS, Keller JA, Benowitz NL, Spindel ER: Prenatal nicotine exposure alters pulmonary function in newborn rhesus monkeys. Am J Respir Crit Care Med 2001, 164:989–994
- Wongtrakool C, Roser-Page S, Rivera HN, Roman J: Nicotine alters lung branching morphogenesis through the α7 nicotinic acetylcholine receptor. Am J Physiol 2007, 293:L611–L618
- Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM, McIntosh JM: A new α-conotoxin which targets α3β2 nicotinic acetylcholine receptors. J Biol Chem 1996, 271:7522–7528
- Buisson AC, Gilles C, Polette M, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM: Wound repair-induced expression of a stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. Lab Invest 1996, 74:658–669
- 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
- Tournier JM, Maouche K, Coraux C, Zahm JM, Cloez-Tayarani I, Nawrocki-Raby B, Bonnomet A, Burlet H, Lebargy F, Polette M, Birembaut P: α3α5β2-Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells. Am J Pathol 2006, 168:55–68
- 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
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ: Nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature 2003, 421:384–389
- Lechner JF, LaVeck MA: A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. J Tissue Cult Meth 1985, 9:43–48
- Bonnomet A, Polette M, Strumane K, Gilles C, Dalstein V, Kileztky C, Berx G, van RF, Birembaut P, Nawrocki-Raby B: The E-cadherinrepressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by up-regulating MT1-MMP expression. Oncogene 2008, 27:3692–3699
- Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De BM, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL: Mice deficient in the α7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack α-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. J Neurosci 1997, 17:9165–9171
- Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH: Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2001, 24:662–670
- Rangwala F, Drisdel RC, Rakhilin S, Ko E, Atluri P, Harkins AB, Fox AP, Salman SS, Green WN: Neuronal α-bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors. J Neurosci 1997, 17:8201–8212
- Drisdel RC, Green WN: Neuronal α-bungarotoxin receptors are α7 subunit homomers. J Neurosci 2000, 20:133–139
- Jeffery PK, Gaillard D, Moret S: Human airway secretory cells during development and in mature airway epithelium. Eur Respir J 1992, 5:93–104
- Dupuit F, Kalin N, Brezillon S, Hinnrasky J, Tummler B, Puchelle E: CFTR and differentiation markers expression in non-CF and &F 508 homozygous CF nasal epithelium. J Clin Invest 1995, 96:1601–1611
- Flint FF, Schulte BA, Spicer SS: Glycoconjugate with terminal α-galactose: a property common to basal cells and a subpopulation

of columnar cells of numerous epithelia in mouse and rat. Histochemistry 1986, 84:387-395

- Changeux JP, villers-Thiery A, Chemouilli P: Acetylcholine receptor: an allosteric protein. Science 1984, 225:1335–1345
- Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH: It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. Prog Neurobiol 2008, 84:329–342
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M: A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (α7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α-BTX. Neuron 1990, 5:847–856
  Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL: Desensitization of nicotinic ACh
- Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL: Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. Trends Neurosci 2005, 29:371–378
- Olale F, Gerzanich V, Kuryatov A, Wang F, Lindstrom J: Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human α3, α4, and α7 neuronal nicotinic receptor subtypes. J Pharmacol Exp Ther 1997, 283:675–683
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA: Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of α5 and α7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. FASEB J 2008, 22:1356–1368
- Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell SH, Oren M, Jetten AM: Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. Am J Physiol 2004, 287:C171–C181
- Jetten AM, Shirley JE, Stoner G: Regulation of proliferation and differentiation of respiratory tract epithelial cells by TGF-β. Exp Cell Res 1986, 167:539–549
- Pan J, You Y, Huang T, Brody SL: RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. J Cell Sci 2007, 120:1968–1876
- Krasteva G, Pfeil U, Drab M, Kummer W, Konig P: Caveolin-1 and -2 in airway epithelium: expression and in situ association as detected by FRET-CLSM. Respir Res 2006, 7:108
- Davies AR, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Wonnacott S: Characterisation of the binding of [<sup>3</sup>H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling α7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology 1999, 38:679–690
- 42. Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC: Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h α2β2, h α2β4, hα3β2, h α3β4, h α4β2, h α4β4 and h α7 expressed in Xenopus occytes. J Pharmacol Exp Ther 1997, 280:346–356
- Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC: CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1994, 10:38–47
- Basbaum C, Jany B: Plasticity in the airway epithelium. Am J Physiol 1990, 259:L38–L46
- Inayama Y, Hook GE, Brody AR, Cameron GS, Jetten AM, Gilmore LB, Gray T, Nettesheim P: The differentiation potential of tracheal basal cells. Lab Invest 1988, 58:706–717
- Liu JY, Nettesheim P, Randell SH: Growth and differentiation of tracheal epithelial progenitor cells. Am J Physiol 1994, 266:L296–L307
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR: Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. Am J Pathol 2004, 164:577–588
- Ford JR, Terzaghi-Howe M: Basal cells are the progenitors of primary tracheal epithelial cell cultures. Exp Cell Res 1992, 198:69–77
- Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostile NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Conti-Fine BM: Human bronchial epithelial and endothelial cells express α7 nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol 2001, 60:1201–1209
- Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky Al, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Kummer W, Lips K, Vetter DE, Grando SA: Central role of α7

nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. J Cell Biol 2002, 159:325-336

- Dasgupta P, Chellappan SP: Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story. Cell Cycle 2006, 5:2324–2328
- Ayers MM, Jeffery PK: Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. Eur Respir J 1988, 1:58–80
- Jetten AM: Growth and differentiation factors in tracheobronchial epithelium. Am J Physiol 1991, 260:L361–L373
- Jetten AM, Rearick JI, Smits HL: Regulation of differentiation of airway epithelial cells by retinoids. Biochem Soc Trans 1986, 14:930–933
- Harris CC, Silverman T, Smith JM, Jackson F, Boren HG: Proliferation of tracheal epithelial cells in normal and vitamin A-deficient Syrian golden hamsters. J Natl Cancer Inst 1973, 51:1059–1062
- Mossman BT, Ley BW, Craighead JE: Squamous metaplasia of the tracheal epithelium in organ culture. I. Effects of hydrocortisone and β-retinyl acetate. Exp Mol Pathol 1976, 24:405–414
- Lane BP, Gordon RE: Regeneration of vitamin A deficient rat tracheal epithelium after mild mechanical injury: growth kinetics and cellular differentiation Differentiation 1979, 14:87–93
- Keenan KP, Combs JW, McDowell EM: Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. III. Large and small lesions: comparative stathmokinetic and single pulse and continuous thymidine labeling autoradiographic studies. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1982, 41:231–252
- Keenan KP, Wilson TS, McDowell EM: Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. IV. Histochemical, immunocytochemical and ultrastructural studies. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1983, 43:213–240
- Woodworth CD, Mossman BT, Craighead JE: Squamous metaplasia of the respiratory tract: possible pathogenic role in asbestos-associated bronchogenic carcinoma. Lab Invest 1983, 48:578–584
- Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP: Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. J Clin Invest 1998, 102:1077–1082
- Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD: Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. Am J Respir Cell Mol Biol 2000, 23:45–51
- Dakir EL, Feigenbaum L, Linnoila RI: Constitutive expression of human keratin 14 gene in mouse lung induces premalignant lesions and squamous differentiation. Carcinogenesis 2008, 29:2377–2384
- Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB, Harris CC: Type β transforming growth factor is the primary differentiationinducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:2438–2442
- Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, Wang N, Li X, Feng T, Hong Y, Yang B: Down-regulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. Cardiovasc Res 2009, 83:465–472
- 66. Maki M, Saitoh K, Kaneko Y, Fukayama M, Morohoshi T: Expression of cytokeratin 1, 5, 14, 19 and transforming growth factors β1, β2, [bet]a3 in osteofibrous dysplasia and adamantinoma: a possible association of transforming growth factor-beta with basal cell phenotype promotion. Pathol Int 2000, 50:801–807
- Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, Solari A, Bobisse S, Rondina MB, Guzzardo V, Parenti AR, Rosato A, Bicciato S, Balmain A, Piccolo S: A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFβ-induced metastasis. Cell 2009, 137:87–98
- Jeffery PK: Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2001, 164:S29–S39
- 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, 3:726–733
- Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Grando SA, Kawashima K: Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit gene knockout mice. J Neuroimmunol 2007, 189:69–74

# Epithelial Cell–Extracellular Matrix Interactions and Stem Cells in Airway Epithelial Regeneration

Christelle Coraux<sup>1</sup>, Jacqueline Roux<sup>1</sup>, Thomas Jolly<sup>1</sup>, and Philippe Birembaut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, 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 m<sup>2</sup>. 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

Proc Am Thorac Soc Vol 5. pp 689–694, 2008 DOI: 10.1513/pats.200801-010AW Internet address: www.atsjournals.org 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 reepithelialization 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

<sup>(</sup>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



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)- $\beta$ , WNT/ $\beta$ -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 inneuroepithelial bodies. (4) Pollutantresistant 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 a and a ß 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 B1-integrins are necessary to the rapid migration of airway epithelial cells on type IV collagen and laminin-1 and -2, and that a2-, and a6-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 as b1-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 cellcell 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 α1.6-fucose (18) or sialyl LewisX (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 reepithelialization 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 Ecadherin 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-B due to the enhancement of cell adhesion via integrins (31) and  $\alpha_{\nu}\beta_8$  integrinactivated TGF-B1 delays the degree of wound closure (32). On the other hand, an inducing role for TGF-B1 on airway epithelial wound repair has also been demonstrated by addition of TGF-B1 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  $\alpha_3$ - and  $\beta_1$ -integrin subunit as well as of the hyaluronic acid nonintegrin receptor CD44, and a decreased production of MMP-1 leading to increased cell-ECM deadhesion 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,

#### PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY VOL 5 2008

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

#### Coraux, Roux, Jolly, et al.: Airway Epithelial Regeneration

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
- 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, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P,
- Zahm JM, Kaplan H, Hérard 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.
- Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E. Epithelial barrier integrity during *in vitro* wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 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, Dorsheid 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.

- Hérard 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* 1997273: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 α-dystroglycan. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;24:179–186.
- Adam EC, Holgate S, Lackie PM. Epithelial repair is inhibited by an α<sub>1,6</sub>-fucose binding lectin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 292:L462–L468.
- Allahverdian S, Wojcik KR, Dorscheid DR. Airway epithelial wpund repair: role of carbohydrate sialyl Lewis<sup>x</sup>. 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, Rubenfeld A, Hard R, Gardella J, Bright
- Sigurdson L, Sen T, Hall L III, Rubenfeld 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-β by the integrin α<sub>v</sub>β<sub>8</sub> delays epithelial wound closure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:252–259.
   Lechapt-Zalcman E, Pruliere-Escabasse V, Advenier D, Galiacy S,
- 33. 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.

#### PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY VOL 5 2008

- 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.
- 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 overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab Invest* 2000; 80:209-219.
- 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.
- 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.
- 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.
- Emura M. Stem cells of the respiratory epithelium and their in vitro cultivation. In Vitro Cell Dev Biol 1977;33–14.
- Liu JY, Nettesheim P, Randell SH. Growth and differentiation of tracheal progenitor cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1994; 266:L296–L307.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
   Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM. Number and proliferation
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- stem cells in normal lung and lung cancer. Cell 2005;121:823–835.
  Sandell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 20063:718–725.

694

L'épithélium qui couvre les voies aériennes, et plus particulièrement les voies aériennes distales bronchiolaires, est fréquemment lésé et remodelé, et doit régénérer sa structure afin de restaurer ses fonctions. Cette reconstitution épithéliale va mettre en jeu l'activation des cellules souches et progénitrices tissulaires qui, chez l'Homme, ne sont actuellement pas encore clairement identifiées. Dans la première partie de notre travail, nous avons identifié les cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte, en étudiant le potentiel des cellules épithéliales basales. Isolées par cytométrie en flux sur la base de leur expression du CD151, les cellules basales CD151<sup>+</sup> et les cellules non-basales CD151<sup>-</sup> constituées des cellules ciliées, caliciformes et de Clara, ont été cultivées en interface air-liquide. Nos résultats montrent que seules les cellules basales bronchiolaires CD151<sup>+</sup> prolifèrent pour former une monocouche cellulaire confluente qui va régénérer un épithélium pseudostratifié différencié constitué de cellules basales, ciliées et de Clara, et qui présente des propriétés fonctionnelles éléctrophysiologiques, d'intégrité épithéliale, de battement ciliaire et de défense antibactériennes. Ces résultats démontrent que les cellules basales peuvent être considérées comme, au moins, les cellules progénitrices de l'épithélium bronchiolaire humain adulte. Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons tenté de mettre en évidence une ou plusieurs sous-populations de cellules basales candidate(s) au statut de cellules souches par des stratégies de recherche de marqueurs spécifiques, de tests de clonogénicité et de formation de structures glandulaires in vitro. Nos résultats ont montré la présence d'une rare sous-population de cellules basales exprimant la CK14, capables de générer des clones cellulaires. Une sous-population de cellules basales, non identifiée, s'est également avérée capable de générer des structures multicellulaires envahissant les gels de collagène. Ces sous-populations pourraient représenter la population des cellules souches de l'épithélium des voies aériennes humaines.

# Mots clés : Cellules souches/progénitrices; épithélium des voies aériennes; cellules basales

The airway epithelium, and particularly the bronchiolar airway epithelium, are frequently injured and remodelled, and have to rapidly regenerate their structure in order to restore their functions. The regeneration process involves stem and progenitor cells that have not been clearly identified as yet in Human. We have isolated human bronchiolar epithelial basal cells, specifically expressing the CD151, by flow cytometry, and cultured CD151<sup>+</sup> basal cells and CD151<sup>-</sup> non basal cells (ciliated, goblet and Clara cells) at the air-liquid interface. Our results demonstrate that the only bronchiolar basal cells are able to proliferate to give rise to a confluent cell monolayer, and then to reconstitute a differentiated pseudostratified bronchiolar epithelium constituted by basal ciliated and Clara cells. Moreover, the regenerated bronchiolar epithelium exhibits functional properties such as ion transport, epithelial integrity, ciliary beating and antibacterial defence. These data support that the bronchiolar basal cells can be considered, at least, as progenitor cells of the human adult bronchiolar epithelium. We have also tried to isolate one or more basal cell sub-populations that could act as airway epithelium stem cells, by strategies of identification of sub-population markers, clonogenicity assays and in vitro glandular structures formation assays. We have shown that a rare population of basal cells expresses the CK14 marker and is able to give rise to cellular clones. An unidentified basal cell sub-population is also able to generate multicellular structures invading the collagen gel. These sub-populations could represent the stem cells of the human airway epithelium.

Key words: Stem/progenitor cells; airway epithelium; basal cells