

Réparation de l'épithélium bronchique

E. PUCHELLE, J.M. TOURNIER, J.-M. ZAHM, S. DE BENTZMANN, D. GAILLARD

RÉSUMÉ

Les lésions de l'épithélium respiratoire peuvent être liées à un déficit des mécanismes de défense de la muqueuse, secondaire aux modifications physicochimiques de la barrière de mucus qui normalement protège l'épithélium de l'action délétère des irritants inhalés, des bactéries et des virus. Les lésions de l'épithélium respiratoire se traduisent par une augmentation de la perméabilité jonctionnelle, une desquamation partielle des cellules épithéliales, voire même une dénudation totale de la membrane basale. Les modèles *in vivo* et *in vitro* de lésion de l'épithélium respiratoire montrent qu'en réponse à une lésion, l'épithélium de surface est capable de réparer par un certain nombre de mécanismes incluant : l'étalement, la migration des cellules épithéliales basales, la réparation des jonctions serrées, des phénomènes de transdifférenciation et la prolifération des cellules basales et muqueuses. Les cellules de l'épithélium de surface ont la capacité de réparer une lésion et de rétablir l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium après un temps variant de 48 à 72 heures selon la taille de la lésion. Différentes molécules sont directement impliquées dans le processus de réparation (notamment les composants de la matrice extracellulaire et les intégrines correspondantes (fibronectine et $\alpha_5\beta_1$ intégrines), les métalloprotéinases matricielles d'origine épithéliale (gélatinase B et stromélysine)). Au cours de la réparation de l'épithélium, le remodelage de l'épithélium de surface peut entraîner l'apparition de récepteurs apicaux vis-à-vis des adhésines bactériennes et ainsi favoriser la récurrence des infections bronchiques.

MOTS-CLÉS : Épithélium bronchique – Réparation – Remodelage.

SUMMARY

Repair of bronchial epithelium. – Lesions of the respiratory epithelium can be related to a mucosal immune deficiency, secondary to physicochemical alterations of the mucus barrier which normally protects the epithelium from the harmful action of inhaled irritants, bacteria and viruses. Lesions of the respiratory epithelium result in increased junctional permeability, partial desquamation of epithelial cells, or even total exposure of the basement membrane. *In vivo* and *in vitro* models of lesions of the respiratory epithelium show that, in response to a lesion, the surface epithelium can be repaired by a number of mechanisms including: spreading, migration of basal epithelial cells, repair of tight junctions, transdifferentiation phenomena and proliferation of basal and mucus-secreting cell. Cells of the surface epithelium are able to repair a lesion and restore functional integrity of the epithelium after intervals ranging from 48 to 72 hours according to the dimensions of the lesion. Various molecules are directly involved in the repair process (especially constituents of the extracellular matrix and the corresponding integrins (fibronectin and $\alpha_5\beta_1$ integrins), epithelial matricial metalloproteinases (gelatinase B and stromelysin)). During repair of the epithelium, remodelling of the surface epithelium can induce the appearance of apical receptors to bacterial adhesins, thereby facilitating recurrence of bronchial infection.

KEY-WORDS : Bronchial epithelium – Repair – Remodelling.

Communication présentée aux Journées Parisiennes d'Allergologie, 10 janvier 1997.

Unité INSERM 314, IFR n° 53, CHR Maison Blanche, 45, rue Cognacq-Jay, 51092 REIMS Cedex, France.

Tirés à part : Dr E. Puchelle (même adresse).

Reçu le 28 janvier 1997. Accepté le 4 mars 1997.

PUCHELLE E., TOURNIER J.M., ZAHM J.M., de BENTZMANN S., GAILLARD D. – Réparation de l'épithélium bronchique. **Rev. fr. Allergol.**, 1997, 37 (4), 417-422.

INTRODUCTION

L'épithélium de surface des voies aériennes est continuellement exposé à l'action délétère des irritants environnementaux, susceptibles d'induire des lésions de cet épithélium. Dans des conditions normales, la surface bronchique est recouverte d'un mucus bronchique qui forme un filtre à l'interface air - cellule et représente une barrière naturelle protégeant les cellules épithéliales des agents toxiques et des agents infectieux et viraux. L'hétérogénéité des chaînes glycaniques des glycoprotéines présentes dans le mucus représente une mosaïque de récepteurs permettant la reconnaissance et l'adhérence des bactéries au mucus [1]. Ces bactéries sont ensuite éliminées par le jeu du transport mucociliaire empêchant ainsi leur accès à la surface des cellules épithéliales. Par contre, dans de très nombreuses pathologies bronchiques, les anomalies du mucus entraînent une diminution de la clairance mucociliaire favorable aux infections virales et microbiennes associées à une réaction inflammatoire locale.

Dans cette brève revue, nous rappellerons les principaux facteurs à l'origine des lésions de l'épithélium respiratoire, la réponse de l'épithélium à ces agents lésionnels et les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la réparation de l'épithélium. Sera enfin évoqué le rôle des modifications des récepteurs épithéliaux dans les mécanismes d'infection bactérienne au cours des phénomènes de réparation de l'épithélium.

PRINCIPALES ORIGINES LÉSIONNELLES DE L'ÉPITHELIUM RESPIRATOIRE

L'intégrité de la barrière épithéliale peut être sévèrement lésée par les agents infectieux et non infectieux. Les bactéries interfèrent avec le transport mucociliaire en diminuant ou en désorganisant l'activité de battement ciliaire. Les microorganismes comme *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les bactéries plus fréquemment responsables de lésions épithéliales [2, 3]. De nombreux agents non infectieux comme les oxydants inhalés (NO_2 , O_2 , O_3), peuvent exercer un effet toxique sur l'épithélium bronchique. La gravité des lésions dépend des caractéristiques physicochimiques des gaz inhalés, de leur concentration, de leur solubilité et de la durée de l'exposition. La réponse de l'épithélium de surface bronchique à une lésion aiguë, quelle qu'en soit la source, entraîne une succession d'événements cellulaires allant d'une perte de l'imperméabilité de la surface épithéliale jusqu'à une dénudation

incomplète (seules les cellules basales restant attachées à la lame basale) ou complète (dénudation de la membrane basale) de l'épithélium de surface. En réponse à une lésion chronique, des phénomènes de transdifférenciation peuvent également intervenir. Les cellules ciliées se transforment en cellules sécrétrices, les cellules sécrétrices peuvent également adopter un phénotype de type malpighien. Ce phénomène de remodelage de l'épithélium de surface est parfaitement représentatif de la « plasticité » de l'épithélium bronchique [4, 5].

RÉPONSE DE L'ÉPITHELIUM RESPIRATOIRE À DES AGENTS LÉSIONNELS

Étude *in vivo*

Plusieurs types de modèles animaux ont été développés afin d'analyser la réponse de l'épithélium bronchique à différentes sources lésionnelles (oxydants, fumée de cigarette, lésions mécaniques, infections virales ou bactériennes). *In vivo*, la régénération de l'épithélium trachéal après une lésion mécanique entraîne une succession de processus incluant l'étalement et la migration des cellules épithéliales proches de la lésion, qui, progressivement, recouvrent les zones dénudées [6]. Il a été montré chez la souris, après infection virale par le virus *influenzae*, une desquamation complète de l'épithélium qui intervient au cours des trois jours qui suivent l'infection. La réparation et la régénération de cet épithélium lésé ne sont complètes qu'après deux semaines. Quels que soient les modèles animaux utilisés, une multitude de facteurs cellulaires sont impliqués dans le stimulus inflammatoire et le phénomène de réparation de l'épithélium qui suit la lésion. Généralement, les séquences décrites suivent chronologiquement cette succession : étalement des cellules bordant la lésion, migration des cellules basales, reformation des jonctions serrées, puis prolifération active incluant une hyperplasie des cellules basales et muqueuses suivie d'une différenciation progressive des cellules muqueuses en cellules préciliées (phénotype cellulaire mixte présentant les caractéristiques de cellules ciliées et de cellules muqueuses) permettant ainsi de réparer et de régénérer l'épithélium cilié dans un délai de quelques jours à quelques semaines, selon l'importance de la lésion.

Modèles de culture *in vitro*

Afin de mieux identifier les mécanismes impliqués dans la réparation de l'épithélium respiratoire spécifiquement rattachés aux cellules épi-

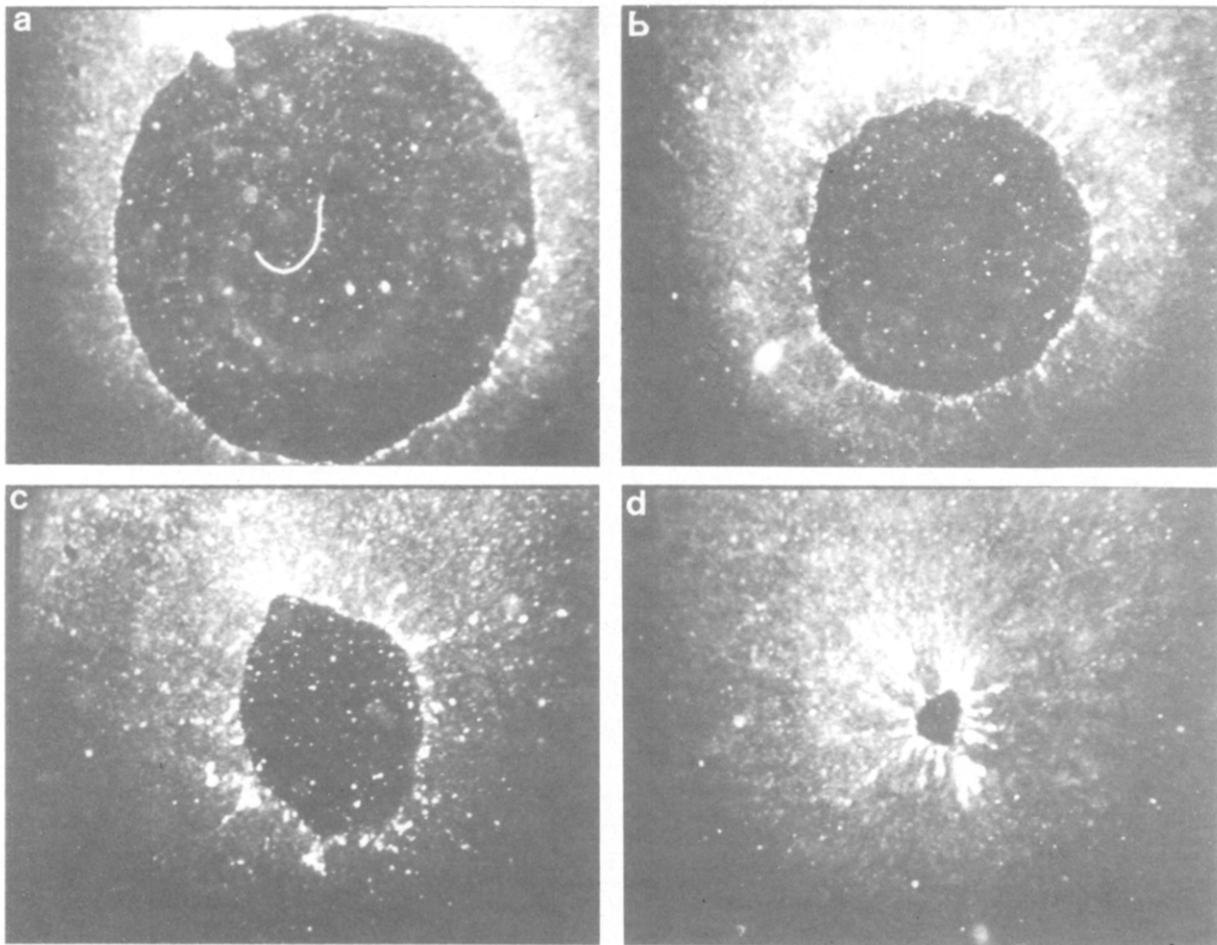


Fig. 1. – Dynamique de la réparation de l'épithélium respiratoire de surface après création d'une lésion par action chimique.

a = T0, b = 30 h, c = 60 h, d = 90 h.

théliales de surface, nous avons mis au point, au laboratoire, un modèle de lésion et de réparation de l'épithélium de surface à partir de cultures de cellules épithéliales de surface nasales [7]. Après dissociation de polypes nasaux et obtention d'une culture à confluence, une lésion chimique est réalisée dans des conditions standards et le processus dynamique de réparation est étudié par vidéo-microscopie. Le premier événement intervenant dans la réparation de la lésion épithéliale correspond à l'étalement et à la migration des cellules sur la matrice extracellulaire dénudée. La vitesse de migration atteint 35 à 45 micromètres par heure, ce qui permet la fermeture progressive de la zone lésée (30 mm²) dans une période de temps de l'ordre de 72 heures (fig. 1). Environ 24 heures après la lésion, la prolifération cellulaire est observée avec un pic d'activité mitotique qui est atteint après 48 heures et concerne environ 25 p. cent des cellules en phase de réparation. Il est intéressant

de constater que, même après recouvrement de la zone lésée par les cellules épithéliales, il faut attendre environ 24 heures supplémentaires pour que l'intégrité de la barrière épithéliale étudiée par la mesure de la résistance transépithéliale et de la perméabilité au [³H]mannitol soit totalement restaurée.

FACTEURS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LES PROCESSUS DE RÉPARATION DE L'ÉPITHÉLIUM

Protéines du cytosquelette

Les filaments d'actine et le réseau de microtubules sont impliqués dans le mouvement cellulaire tandis que les filaments intermédiaires sont essen-

tiellement caractéristiques de l'état de différenciation des phénotypes cellulaires au cours du remodelage tissulaire. Dans les cellules migratoires, au cours du phénomène de réparation, on observe une réorganisation très importante des microtubules. Les cellules aplaties qui migrent vers le site lésé changent leur phénotype et se caractérisent par une faible expression des filaments intermédiaires de cytokeratine 14 qui sont spécifiques des cellules basales dans l'épithélium normal. Ces cellules migratoires très peu différenciées, apparaissent comme des cellules clés dans la réparation de l'épithélium [8].

Facteurs de croissance

Un très grand nombre de facteurs de croissance joue un rôle important dans le phénomène de réparation de l'épithélium. Ces facteurs sont sécrétés non seulement par les cellules du mésenchyme, les macrophages et les plaquettes, mais également de façon spécifique, par les cellules épithéliales de surface [9]. Nous avons pu montrer que l'EGF recombinant accélère la vitesse de réparation des lésions. D'autres facteurs, comme l'IGF, le PDGF et le TGF peuvent également intervenir dans la réparation de l'épithélium, soit en stimulant la croissance des cellules ou en favorisant la synthèse de composants de la matrice extracellulaire [11].

Protéines de la matrice extracellulaire et leurs récepteurs cellulaires

L'étalement cellulaire et la migration qui interviennent au cours du phénomène de réparation dépendent étroitement des interactions cellules-matrice qui vont réguler la morphologie et les fonctions cellulaires par l'intermédiaire d'une famille de récepteurs cellulaires spécifiques, les intégrines. Parmi les différents composants de la matrice extracellulaire, nous avons pu montrer que la fibronectine est déposée exclusivement à l'interface cellules-matrice au cours du processus de réparation et que l'addition de fibronectine cellulaire favorise la migration de ces cellules. Associée au dépôt de fibronectine dans les cellules épithéliales réparantes, nous avons pu noter que l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, qui est l'un des récepteurs cellulaires de la fibronectine est augmentée dans les cellules migrantes au cours de la réparation [12]. Ces résultats démontrent que les interactions entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire représentent un mécanisme de réparation majeure de l'épithélium des voies aériennes après lésion.

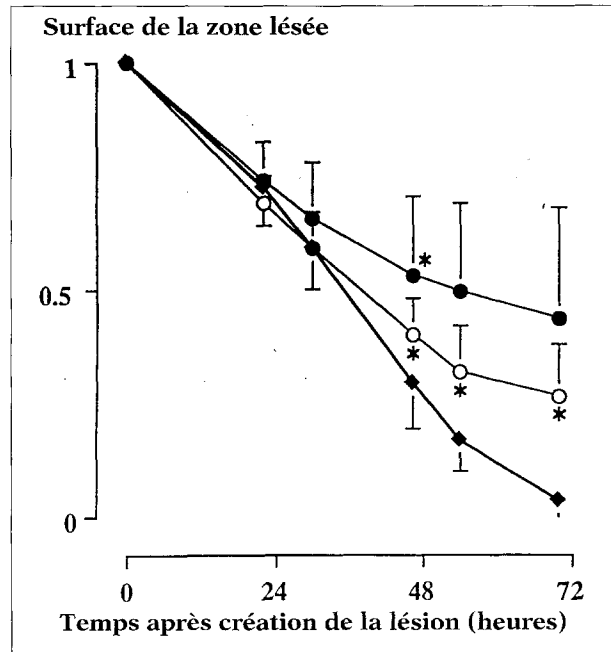


Fig. 2. – Cinétique de réparation d'une lésion créée dans des cellules épithéliales de surface en cultures confluentes. Comparativement aux valeurs contrôles (◆), on observe une augmentation du temps nécessaire à la réparation de la zone lésée après incubation en présence d'anticorps anti-gélatinase B à la concentration de 0.5 µg/ml (○) et 1 µg/ml (●).

Métalloprotéinases et réparation de l'épithélium respiratoire

Lors d'une lésion de l'épithélium respiratoire, les différents composants de la matrice extracellulaire peuvent être dégradés. Ces molécules dégradées doivent être éliminées de la surface lésée pour faciliter la ré-épithélialisation de la lésion. D'autre part, nous avons vu qu'une matrice provisoire riche en fibronectine intervient de façon déterminante dans la réparation des lésions [7]. Cette matrice provisoire doit être remaniée pour permettre la mise en place d'une lame basale définitive sous l'épithélium régénéré.

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) constituent une famille d'enzymes protéolytiques connues pour dégrader spécifiquement la plupart des constituants de la matrice extracellulaire. On peut donc penser que ces enzymes participent à la régénération d'un épithélium lésé en éliminant les molécules partiellement dénaturées ou en remodelant la matrice nouvellement synthétisée. Nous avons étudié deux types de MMPs quant à leur implication possible dans la réparation de lésions de l'épithélium respiratoire: les gélatinases et les stromélysines. La gélatinase A, ou collagénase de type IV de 72 kDa et la gélatinase B, ou

collagénase de type IV de 92 kDa, sont connues pour leur action spécifique sur le collagène de type IV des lames basales. Les stromélysines possèdent une activité protéolytique vis-à-vis de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire: fibronectine, laminine, élastine, protéoglycannes et plusieurs types de collagènes. La stromélysine 1 est également connue pour sa capacité à activer la gélatinase B [13].

Au cours de la réparation de lésions créées *in vitro* sur des cultures de cellules isolées de l'épithélium des voies aériennes, nous avons déterminé, par différentes techniques zymographiques, les concentrations des gélatinases et des stromélysines présentes d'une part dans les cellules migratoires impliquées dans la réparation des lésions et d'autre part dans les cellules stationnaires situées à distance des lésions. La gélatinase A est faiblement exprimée par les cellules épithéliales et son niveau d'expression ne varie pas au cours de la réparation. A l'inverse, la gélatinase B et les stromélysines sont plus abondantes dans les cellules migratoires. La proportion de gélatinase B et de stromélysines présentes sous forme active est plus importante dans les cellules qui réparent la lésion comparativement aux cellules stationnaires. De plus on observe un ralentissement du processus de réparation (fig. 2) en présence de l'anticorps 6-6B, spécifique de la gélatinase B et connu pour bloquer l'activation de cette enzyme [14]. Pendant la réparation, les variations d'activité de la gélatinase B et des stromélysines suivent des évolutions similaires. Ce dernier résultat suggère que la réparation d'une lésion dépend d'une cascade de MMPs et que ces MMPs peuvent être elles-mêmes impliquées dans l'activation d'autres MMPs.

Nous avons par ailleurs noté que les stromélysines 1 et 3 sont exprimées essentiellement au cours de la réparation de lésions par des cellules migratoires caractérisées par un phénotype mésenchymateux. En effet, ces cellules expriment la cytokératine 14, spécifique des cellules basales de l'épithélium respiratoire, mais aussi la vimentine, marqueur des cellules mésenchymateuses. La présence de MMPs dans les cellules basales qui migrent laisse supposer un rôle spécifique pour ces enzymes à l'interface entre l'épithélium qui répare une lésion et l'environnement matriciel des cellules. D'autre part, les stromélysines et en particulier la stromélysine 3 sont essentiellement produites *in vivo* par les cellules mésenchymateuses aussi bien dans un foyer inflammatoire qu'autour d'un groupe de cellules cancéreuses [15]. La présence de stromélysine 3 et de vimentine dans les cellules migratoires réparant une lésion peut donc être considérée comme le reflet d'une transition épithélio-mésenchymateuse dans ces cellules épithéliales [16]. En résumé, nos résultats suggèrent

que la réparation de lésions de l'épithélium des voies aériennes dépend de l'activité de plusieurs MMPs et que l'expression de ces enzymes coïncide avec l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux de la part des cellules migratoires.

RÔLE DE LA RÉPARATION DE L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIQUE DANS LA COLONISATION BACTÉRIENNE

Au cours des différents événements qui caractérisent les mécanismes de lésion et de réparation de l'épithélium respiratoire, les microorganismes rencontrent des conditions optimales pour leur adhérence, persistance et multiplication sur les surfaces cellulaires. Nous avons pu montrer que *Pseudomonas aeruginosa* qui est un germe opportuniste de l'épithélium ne présente aucune virulence lorsque l'épithélium respiratoire est normal et pseudostratifié. Par contre, dans un épithélium lésé, la dénudation de la membrane basale et l'exposition de composants de la matrice extracellulaire créent des conditions optimales pour la colonisation par cette bactérie [17]. Parmi ces composants de la matrice extracellulaire, la laminine et la fibronectine se révèlent des composants cibles pour *Pseudomonas aeruginosa*. Au cours de la réparation de l'épithélium de surface, en particulier dans la mucoviscidose, les cellules en phase de réparation présentent des récepteurs apicaux tels que les gangliosides asialylés (Asialo GM₁) qui ont une affinité particulière pour *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres récepteurs épithéliaux, notamment des intégrines β_1 redistribuées à la partie apicale des cellules au cours des mécanismes de différenciation liés à la migration cellulaire apparaissent comme de très bons candidats pour l'adhérence bactérienne.

CONCLUSION

Les remodelages de l'épithélium des voies aériennes au cours des mécanismes lésionnels et au cours de la réparation de l'épithélium représentent des événements critiques qui peuvent favoriser la récurrence des infections et par conséquent, accélérer les lésions pulmonaires et initier la pathologie obstructive pulmonaire. Le développement de nouvelles thérapeutiques antibactériennes ayant pour but de prévenir l'adhérence bactérienne à l'épithélium lésé ou en phase de réparation représentent donc une stratégie potentielle à développer afin d'éviter la colonisation bactérienne.

RÉFÉRENCES

1. Girod S., Zahm J.M., Plotkowski C., Beck G., Puchelle E. – Role of the physicochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.*, 1992, 5, 477-487.
2. Wilson R., Pitt T., Taylor G., Watson D. – Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine products by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1987, 79, 221-229.
3. Johnson A.P., Inzana T.J. – Loss of ciliary activity in organ cultures of rat trachea with lipooligosaccharide isolated from *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.*, 1986, 22, 265-268.
4. Basbaum C., Jany B. – Plasticity in the airway epithelium. *Am. J. Physiol.*, 1990, 259, L38-46.
5. Puchelle E., Zahm J.M. Repair processes of the airway epithelium. In : Ed. Cl. Lenfant, M. Dekker. Airways and Environments : from injury to repair. Series : Lung Biology in Health and Disease, 1996, Chap. 7, 1576-182.
6. McDowell E.M., Beccu P.J., Schurch W., Trump B.F. – The respiratory epithelium. VI Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1979, 63, 995-1008.
7. Zahm J.M., Chevillard M., Puchelle. – Wound repair of human surface respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991, 5, 242-248.
8. Shimizu T., Nishihara M., Kawaguchi S., Sakakura Y. – Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1994, 11, 85-94.
9. Shoji S., Ertl R.F., Linder J., Koizumi S., Duckworth W.C., Rennard S.I. – Bronchial epithelial cells respond to insulin and insulin-like growth factor I as a chemoattractant. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1990, 2, 553-557.
10. Barrow R.E., Wang C., Evan M.J. – Growth factors accelerate epithelial repair in sheep trachea. *Lung*, 1993, 171, 335-344.
11. Romberger D.J., Beckmann J.D., Claasen L., Ertl R.F., Rennard S.I. – Modulation of fibronectin production of bovine bronchial epithelial cells by transforming growth factor beta. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1992, 7, 149-155.
12. Hérard A.L., Pierrot D., Hinnrasky J., Kaplan H., Sheppard D., Puchelle E., Zahm J.M. – Fibronectin and its $\alpha_5\beta_1$ integrin receptor are involved in the wound repair process of the airway epithelium. *Am. J. Physiol. (Lung)*, 1996, 271, L726-733.
13. Goldberg G.I., Strongin A., Collier I.E., Genrich L.T., Marner B.L. – Interaction of 92kDA type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 4583-4591.
14. Buisson A.C., Zahm J.M., Polette M., Pierrot D., Bellon G., Puchelle E., Birembaut P., Tournier J.M. – Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. *J. Cell. Physiol.*, 1996, 166, 413-426.
15. Basset P., Wolf C., Chambon P. – Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues : a review. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1993, 24, 185-193.
16. Buisson A.C., Gilles C., Polette M., Zahm J.M., Birembaut P., Tournier J.M. – Wound repair-induced expression of stromelysin is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. *Lab. Invest.*, 1996, 74, 658-669.
17. de Bentzmann S., Plotkowski C., Puchelle. – Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, 154, S155-162.



UNIVERSITÉ DE PARIS - ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS

ENTRETIENS DE BICHAT 1997

Du 15 septembre
au 20 septembre
1997

Faculté de Médecine
Pitié-Salpêtrière
91, boulevard de l'Hôpital, 75013 PARIS

N° de Formation : 11.75.22007.75

Programme et renseignements à :

L'EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANÇAISE

Tél. : 01 45 48 42 60

- 15, rue Saint-Benoît, 75278 PARIS Cedex 06

Fax : 01 45 44 81 55