



Production of innervated bronchial epithelium from a blood sample

Florent Foisset, Christine Lehalle, Amel Nasri, Carine Bourdais, Lisa Morichon, Aurélie Petit, Isabelle Vachier, Said Assou, Arnaud Bourdin, Nelly Frossard, et al.

► To cite this version:

Florent Foisset, Christine Lehalle, Amel Nasri, Carine Bourdais, Lisa Morichon, et al.. Production of innervated bronchial epithelium from a blood sample. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2023, 23, pp.S0761-8425. <10.1016/j.rmr.2023.01.021>. <hal-03989840>

HAL Id: hal-03989840

<https://hal.science/hal-03989840v1>

Submitted on 15 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

Fabrication d'un épithélium bronchique innervé à partir d'une prise de sang

Production of innervated bronchial epithelium from a blood sample

F. Foisset^{a,b}, C. Lehalle^b, A. Nasria, C. Bourdais^a, L. Morichona, A. Petit^c, I. Vachier^c, S. Assoua^a, A. Bourdinc^d, N. Frossard^b, J. De Vos^{a,e,*}

^a IRMB (institut de médecine régénératrice et de biothérapies), Inserm UMR 1183, université Montpellier, CHU de Montpellier, Montpellier, France

^b LIT (laboratoire d'innovation thérapeutique), UMR7200 CNRS-université de Strasbourg, faculté de pharmacie, Illkirch, France

^c Département de pneumologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France

^d PhyMedExp, université de Montpellier, Inserm U1046, CNRS UMR 9214, Montpellier, France

^e Département d'ingénierie cellulaire et tissulaire, université de Montpellier, CHU de Montpellier, 80, avenue Augustin-Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France

MOTS CLÉS

Asthme ; Inflammation neurogène ; Cellules souches pluripotentes induites ; Épithélium bronchique ; Innervation sensitive

***Auteur correspondant.**

Adresse e-mail :

john.devos@inserm.fr (J. De Vos).

Résumé

L'asthme est une maladie respiratoire fréquente, sévère dans 3 à 5 % des cas. L'inflammation chronique de l'épithélium bronchique joue un rôle clé dans sa physiopathologie. Le système nerveux sensitif périphérique contribue à cette inflammation des voies aériennes via une activation par l'environnement bronchique. Cependant les mécanismes d'action mis en jeu ne sont à ce jour pas bien connus, notamment par manque de modèles fiables. Nous avons mis en place, à partir de cellules souches pluripotentes induites reprogrammées à partir de cellules sanguines, un modèle d'épithélium bronchique innervé par des neurones sensitifs. Ce dernier permettra notamment de mieux comprendre les mécanismes d'action sous-jacents à l'inflammation neurogène.

Introduction

L'épithélium bronchique constitue une barrière physique essentielle dans la protection du poumon contre les agressions extérieures [1]. Cependant, il joue également un rôle central dans la physiopathologie de nombreuses maladies telle que l'asthme, une maladie inflammatoire chronique fréquente des voies aériennes, de sévérité plus ou moins importante, pouvant affecter la qualité de vie des patients et pour lesquels les traitements actuels restent essentiellement symptomatiques [2,3]. Le système nerveux sensitif périphérique participe à l'inflammation en communiquant avec l'environnement bronchique [4]. L'innervation des voies respiratoires comprend des fibres afférentes (sensorielles) et des fibres efférentes parasympathiques et sympathiques. Les fibres afférentes et efférentes sont connectées via le tronc cérébral et sont à l'origine du réflexe de toux, de la régulation du diamètre bronchique, de l'ampliation respiratoire ou encore de la sécrétion de mucus. Les fibres afférentes peuvent également amplifier l'inflammation des voies respiratoires par la libération de neurotransmetteurs directement au niveau bronchique via un réflexe d'axone, processus par lequel les fibres afférentes non myélinisées de type C entraînent la libération locale de neuropeptides, indépendamment de toute implication du système nerveux central (SNC), initiant ainsi une réaction inflammatoire, de la sécrétion de mucus et une bronchoconstriction [4]. Le réflexe d'axone est médié par le relargage de neuropeptides tels que la neurokinine A, la substance P, le CGRP ou la neuromédine U [5,6]. Cette inflammation neurogène a été décrite dans de nombreux organes et a été documentée dans les voies respiratoires de plusieurs espèces, notamment le rat et le cochon d'inde. Cependant, l'importance du réflexe d'axone en physiologie humaine et dans l'asthme en particulier reste débattue en raison de la fréquence dans les tissus humains des fibres nerveuses exprimant les neuropeptides impliqués dans ce réflexe [5] et par manque d'un modèle humain fiable. Un modèle *in vitro* de bronche innervée en 3 dimensions (3D) pourrait permettre l'étude de l'inflammation neurogène et d'établir les réponses inflammatoires aux allergènes, aux infections ou irritants qui pourraient être potentialisées par ces interactions neuro-immunes. Nous avons développé à l'aide de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) un modèle 3D d'épithélium bronchique innervé (Fig. 1).

Modèle 3D d'épithélium innervé à partir de cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont obtenues à partir de cellules somatiques par reprogrammation renforçant l'expression transitoire des quatre facteurs de pluripotence (OCT4, SOX2, KLF4 et cMYC) également appelé le cocktail de Yamanaka [7]. Les iPSCs sont caractérisées par une capacité d'auto-renouvellement avec une prolifération intense, ce qui en fait une source illimitée de cellules d'un même donneur. Elles sont également capables de se différencier en tout type cellulaire de l'organisme (pluripotence).

Elles offrent donc la possibilité de produire des types cellulaires tissus-spécifiques, utiles à la modélisation *in vitro* des tissus sains ou pathologiques, y compris pulmonaires et bronchiques. La modélisation de l'épithélium bronchique à partir d'iPSCs offre un nouveau modèle d'étude des pathologies respiratoires en complément des modèles animaux et des modèles cellulaires primaires, et présente des avantages notables, comme la reproductibilité des lots de tissus bronchiques car tous issus de mêmes donneurs, et la possibilité de modifications génétiques des cellules iPSC par la technologie CRISPR/Cas9 [8].

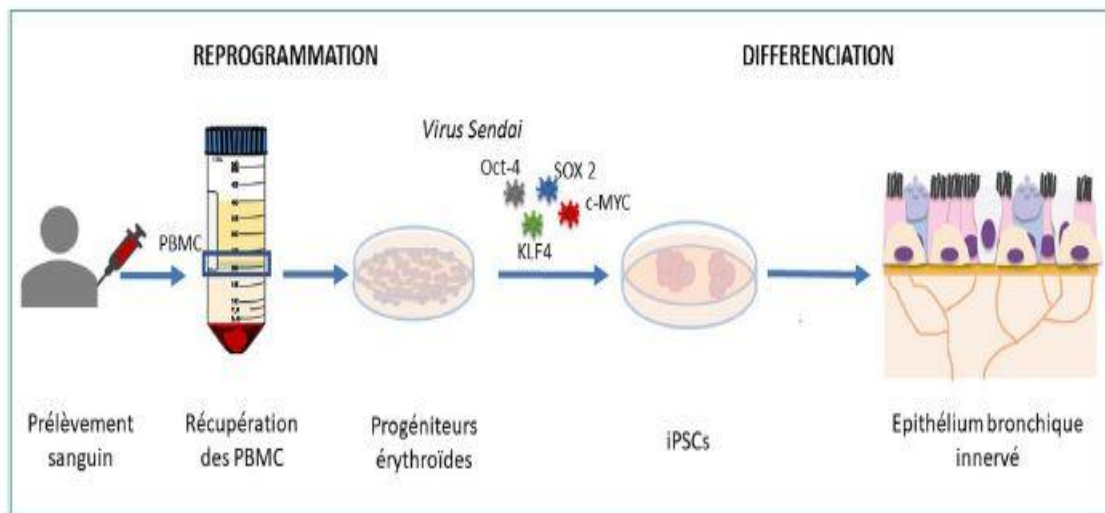


Figure 1. Construction d'un épithélium bronchique présentant une innervation sensitive à partir de cellules sanguines.

Étape 1 : isolation des cellules mononucléées du sang ; Étape 2 : différenciation en progéniteurs érythroïdes ; Étape 3 : transduction des 4 facteurs de pluripotence à l'aide du virus Sendai ; Étape 4 : différenciation des iPSCs en épithélium bronchique et en neurones et construction du modèle.

Nous avons produit des iPSCs à partir de cellules mononucléées obtenues de cinq millilitres de sang de donneurs sains ou de patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive, de bronchopneumonie chronique obstructive (BPCO) ou d'asthme. Ces iPSCs ont ensuite été différenciées en épithélium bronchique sur une matrice collagène-chitosan d'après un protocole de différenciation par bio-mimétisme mis en place au laboratoire et qui mime successivement toutes les étapes du développement pulmonaire [9]. Cet épithélium présente des cellules multi-ciliées, des cellules basales, des cellules à mucus, des cellules clubs et des cellules neuroendocrines (Fig. 2). Il est fonctionnel avec un battement ciliaire physiologique (15 Hz) et une sécrétion de mucus. Cet épithélium repose sur une lame basale sous laquelle se trouve une muqueuse sous-épithéliale composée de cellules de type mésenchymateux exprimant la décorine, et dont certaines sont positives pour l'actine ACTA2, suggérant la présence de myofibroblastes. En parallèle à cette différenciation bronchique, nous avons entrepris de différencier ces mêmes iPSCs en neurones sensitifs, en se basant sur un protocole

de différenciation issu de la littérature [10]. Ces neurones sensitifs ont été ensemencés après dépôt sous la matrice collagène-chitosan support de l'épithélium bronchique. L'étude de la fonctionnalité des circuits neuronaux réalisés par les neurones de l'épithélium est en cours d'évaluation.

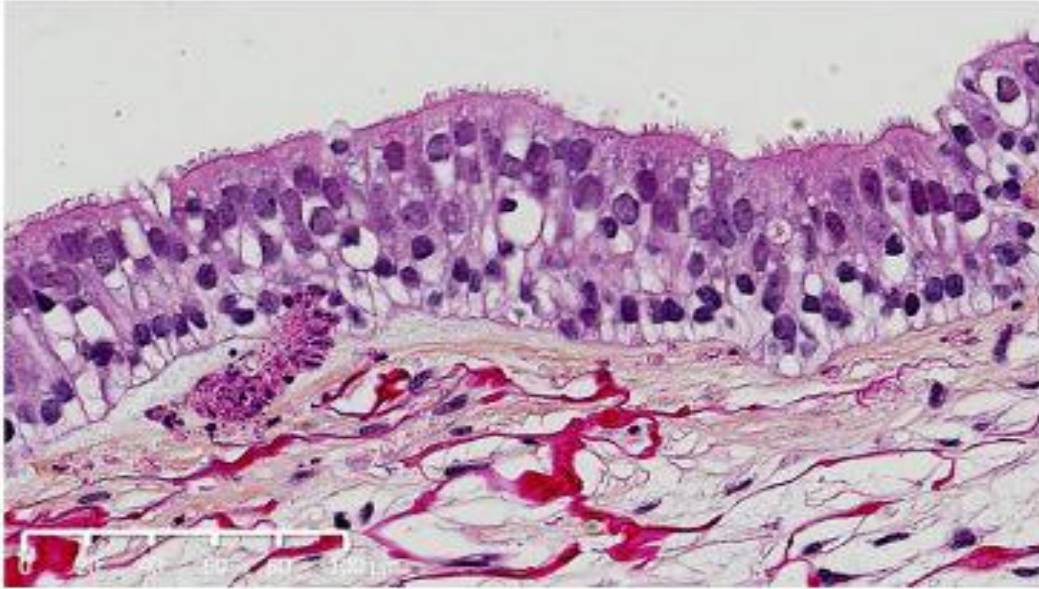


Figure 2. Coloration HES d'une coupe en paraffine présentant un épithélium bronchique obtenu après différenciation à partir de cellules iPS.

Les différents types cellulaires sont présents, notamment les cellules ciliées, reposant sur une lame basale et une muqueuse sous-épithéliale.

Conclusion et perspectives

En partant d'une simple prise de sang, il nous est possible, grâce à la reprogrammation et la différenciation dirigée, dégénérer de façon quasiment illimitée un épithélium bronchique fonctionnel présentant la plupart des types cellulaires attendus et reposant sur une sous-muqueuse innervée. Une fois que l'innervation sera optimisée, en densifiant l'innervation de la matrice par l'ajout de facteurs neuro-trophiques ou par l'ajout de cellules de Schwann dérivées d'iPSCs, il sera possible de stimuler les neurones sensitifs et de voir l'effet de cette stimulation sur l'épithélium, ce qui représenterait un modèle pour l'étude de l'inflammation neurogène. Un tel modèle pourra par la suite servir à des tests pharmacologiques dans un but final de médecine personnalisée des maladies respiratoires telles que l'asthme.

Déclaration des liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, et al. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *ClinMicrobiol Rev* 2011;24:210—29
- [2] Wu TD, Brigham EP, McCormack MC. Asthma in the primary care setting. *Med Clin North Am* 2019;103:435—52.
- [3] Raheison-Semjen C, Guilleminault L, Billiard I, et al. Mise à jour des recommandations pour la prise en charge et le suivi des patients asthmatiques adultes sous l'égide de la Société de pneumologie de langue française (SPLF) et de la Société pédiatrique de pneumologie et allergologie (SP2A). Version courte. *Rev Mal Respir* 2021;38:e1—13.
- [4] Barnes J. Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1986;327:242—5
- [5] Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol* 2001;125:145—54.
- [6] Cardoso V, Chesné J, Ribeiro H, et al. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature* 2017;549:277—81.
- [7] De Vos J, Bouckenheimer J, Sansac C, et al. Human induced pluripotent stem cells: a disruptive innovation. *Curr Res TranslMed* 2016;64:91—6.
- [8] Mianné J, Nasri A, Van CN, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout and interallelic gene conversion in human induced pluripotent stem cells using non-integrative bacteriophage-chimeric retrovirus-like particles. *BMC Biol* 2022;20:8.
- [9] Ahmed E, Fieldes M, Bourguignon C, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells from patients with severe COPD into functional airway epithelium. *Cells* 2022;11:2422
- [10] Muller Q, Beaudet M-J, De Serres-Bérard T, et al. Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensoryneurons and Schwann cells differentiated from iPS cells. *Acta Biomater* 2018;82:93—101.3