10/01/13

Pr : Laurent Plantier

RT : Sophie Lesure

UE5 Cours 20

Inflammation et réparation alvéolaire

D1 : L’épithélium alvéolaire est composé de 2 types cellulaires différents :

* Des pneumocytes de type 1 (P1)
* Des pneumocytes de type 2 (P2)

Des pneumocytes de type 1

Ce sont des cellules aplasiques qui correspondent à 95% de la surface alvéolaire. Au travers de ces cellules se font les échanges de gaz. La fusion des membranes basales permet de réduire au maximum l’épaisseur et la résistance à la diffusion des gaz. Ces cellules ne sont pas capables de se diviser et sont très sensibles aux agressions. Leur morphologie explique cette sensibilité à l’agression. Une petite agression pourrait déchirer leur cytoplasme.

Des pneumocytes de type 2

Ce sont des cellules cuboidales, tres ramassées, situées dans les angles des alvéoles. Elles correspondent à 50% des cellules et à 5% de la surface de l’épithélium. Ces cellules sont spécialisées dans la synthèse du surfactant tensioactif. Elles ont aussi une fonction essentielle de cellules progénitrices.

Une cellule progénitrice est une cellule qui a la capacité de se diviser en 2 cellules filles. 1 des 2 cellules fille se différencie ensuite en un autre type cellulaire et la 2eme cellule fille préserve les capacités de la cellule mère. La cellule fille est encore capable de poursuivre le cycle et de se diviser et de donner naissance à d’autres cellules filles.

D4 : Les phénomènes d'inflammation et de réparation : des phénomènes d’homéostasie et de perturbation de l’homéostasie en condition d’agression.

Le modèle classique d’agression alvéolaire suivie d’une réparation est la pneumopathie à pneumocoque. C’est une maladie extrêmement aigue dont l’agression initiale est extrêmement intense qui va suivre un certain nombre de phases :

* Une phase exsudative précoce avec un afflux massif de polynucléaires neutrophiles (PNN)
* Une phase exsudative plus tardive à partir de la 24eme à la 36eme heure caractérisée par l’affut de monocytes qui vont se différencier en macrophages
* Une phase d’organisation caractérisée par l’activation de la coagulation
* Une phase de résorption

La particularité essentielle de cette réaction inflammatoire est qu’elle va aboutir à la restitution totale de l’’histologie normale. Un sujet normal qui fait une pneumopathie à pneumocoque va guérir totalement, sans séquelle. C’est le modèle prototypique d’une inflammation aigue, totalement résolutive dans le poumon normal.

D5 : Le syndrome de détresse respiratoire aigue

C’est un œdème lésionnel qui commence par une agression aigue du tissu alvéolaire avec une apoptose des pneumocytes de type 1 (que l’on retrouve aussi dans la pneumopathie à pneumocoque), des lésions endothéliales, un œdème massif riche en protéines et un afflux de leucocytes(PNN). A cette étape, on reproduit la phase exsudative précoce de la pneumopathie à pneumocoque.

D6 : Ensuite on a une phase d’organisation comme dans une pneumopathie à pneumocoque standard, c’est à dire que les pneumocytes de type 1 sont tous morts et en réponse à cette agression, on a une prolifération des pneumocytes de type 2 qui exercent leur fonction de cellules progénitrices. On a une hyperplasie pneumocytaire. Puis l’œdème se résorbe.

Dans une pneumopathie à pneumocoque standard (à résolution spontanée), à partir de là, les pneumocytes de type 2 se différencient en pneumocytes de type 1 et certains d’entre eux mourraient par apoptose mais au final les cloisons alvéolaires seraient normales, tapissées par des pneumocytes de type 1 et 2 et on serait revenu à l’histologie normale.

D7 : Ici on est dans le domaine de la pathologie

L’hyperplasie des P2 persiste. Les pneumocytes de type 2, au lieu de se différencier en P1ou de mourir vont rester. On a aussi la formation de bourgeon fibreux. Il y a un afflux de fibroblastes qui vont s’accumuler et synthétiser de la matrice. A ce stade, on a une pneumopathie en voie d’organisation. C’est réversible.

D8 : Si le processus pathologique se poursuit, on arrive à la phase tardive du syndrome de détresse respiratoire aigue caractérisée par un événement essentiel qui est l’évolution vers une phase fibrosante. Au lieu d’arriver à une réparation du tissu et une restauration du tissu normal, on a une destruction de ce tissu par une cicatrisation aberrante. Les fibroblastes qui ont afflué dans ce tissu, au lieu de mourir par apoptose, vont rester et continuer à synthétiser du collagène très rigide qui va entrainer une destruction fibreuse du tissu qui va aboutir à une distension des espaces aériens qui ne sont plus fonctionnels. Tous les petits vaisseaux qui assuraient les échanges gazeux ont été détruits.

D9 : Quelles sont les évolutions possibles après une agression alvéolaire ?

* Normale après une phase exsudative
* Arriver vers une phase proliférative et évoluer normalement
* Evoluer jusqu'à la fibrose qui est un état irréversible

D10 : Comment faire pour ne pas arriver à la fibrose ? Il faut réparer correctement le tissu.

La réparation alvéolaire

Les étapes nécessaires à la réparation alvéolaire :

1ere étape : interrompre la phase initiale du processus pathologique et contrôler la réponse inflammatoire

2eme étape : résorber l’œdème alvéolaire riche en protéines et en facteurs de coagulation

3eme étape : réparer l’épithélium

4eme étape : empêcher les fibroblastes de synthétiser du collagène, limiter leur nombre et limiter leur activation

D12 : Quelle est la forme de la réponse inflammatoire pulmonaire aigue dans un contexte d’agression aigue de type infectieux ?

Ici on a un modèle d’administration de LPS par voie intra-trachéale. C’est un modèle très pur d’activation des voies inflammatoires, très similaire de celui qu’on observe dans les infections par bactérie à gram négatif. Ce graphique montre en fonction du temps l’afflux des différents types cellulaires dans le poumon.

Dès la 4eme heure, on a un afflux considérable de polynucléaires neutrophiles.

Dès la 24eme heure, le taux commence à redescendre. Cette réaction inflammatoire s’est auto-contenue. Cette agression ne s’est pas perpétuée à l’infini.

Il y a une phase tardive de l’inflammation caractérisée au moment où les PNN s’en vont par un afflux de monocytes. Cette modification des populations cellulaires dans le LBA est précédée par l’expression de centaines cytokines qui ont une activité ckémotactique vis-à-vis des populations.

Les 1eres cytokines exprimées dans le poumon agressé par le LPS est l’IL1béta et le TNFalpha qui ont une activité chémotactique très forte pour les neutrophiles. Plus tardivement est sécrété du MIP2 qui a une activité chémotactique plus forte pour les macrophages. Il y a une réponse orchestrée. Cela ne se passe pas au hasard. Lors d’une agression inflammatoire dans un tissu, on a une réponse cytokinique stéréotypée avec initialement l’expression de cytokines qui vont avoir une activité chémotactique pour les neutrophiles et dans un 2eme temps l’expression de cytokines qui vont avoir une activité chémotactique pour les macrophages. Cette réponse orchestrée des cytokines est suivie par un afflux orchestré des cellules cibles.

D13 : La compartimentalisation de la réponse inflammatoire. Le phénomène inflammatoire vu comme un incendie va être circonscrit et limité spatialement et dans le temps. On le démontre grâce à des études. Chez des patient atteints de pneumopathie communautaire aigue unilatérale (probablement à pneumocoque de forme typique), les investigateurs ont fait une fibroscopie bronchique, un lavage broncho-alvéolaire (LBA) qui permet de récupérer du fluide d’œdème alvéolaire. Ils ont fait un lavage du coté atteint et un du coté sain. Ils ont dosé dans ces 2 lavages les concentrations de différentes cytokines. Quelque soit la cytokine (TNF, IL1, IL6), on a une augmentation de la concentration de ces cytokines restreinte au poumon infecté. Dans le LBA du poumon sain, il n'y a pas de réponse inflammatoire. On pourrait croire que c’est logique puisque l’infection n’est que d’un coté. Or en réalité, les bactéries sont entrées par les voies ariennes et donc si on cherche des bactéries dans le poumon controlatéral, généralement on en trouve. Les pneumopathies ne sont pas unilatérales uniquement parce que les bactéries n’ont été que d’un coté. C’est aussi que la réponse inflammatoire a été contenue à ce coté par l’organisme. C’est la **compartimentalisation dans l’espace de la réponse inflammatoire**.

D14 : Il y a aussi une compartimentalisation dans le temps. Quand on est exposé à une bactérie, l’infection ne dure pas éternellement. Cette compartimentalisation n’a pas pour seule origine la clairance des bactéries, il y a aussi la mise en route du phénomène inflammatoire.

Les investigateurs ont récupéré dans le lavage alvéolaire des macrophages chez des sujets sains (barre blanche) et chez des sujets atteints de pneumopathie en prélevant encore une fois du LBA du poumon atteint et du poumon sain et ils regardaient la sécrétion de cytokines par ces macrophages.

En situation spontané on prend des cellules, on les met dans un puits de culture, on regarde quelle cytokine est secrète. Comme attendu, les macrophages prélevés dans le poumon infecté sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires que les macrophages qui venaient des sujets contrôles et encore plus que les macrophages qui viennent du coté sain.

Ce qui est intéressant, c’est que quand on prend les mêmes cellules, que l’on leur applique un stimulus pro-inflammatoire (en l’occurrence du LPS) et qu’on regarde leur réponse en terme de réponse inflammatoire, les macrophages alvéolaires des sujets qui avaient une infection, répondaient de façon bien moindre que les macrophages des sujets qui n’avaient pas d’infection. Cela veut dire que **quand on a une infection, les macrophages alvéolaires deviennent hyperactifs** **à un stimulus inflammatoire**. Cela empêche la perpétuation de l’inflammation. Quand on a une infection, les macrophages vont réagir de façon moindre que quand on n’a pas d’infection, ce quoi tend à limiter dans le temps la réaction inflammatoire et donc le dommage des tissus.

D15 : Ces résultats sont-ils vrais in vivo ?

On utilise un modèle de pneumopathie à pneumocoque expérimental chez le lapin. On injecte à ces lapins des PNN radiomarqués : c’est une scintigraphie aux PNN radiomarqués. En utilisant cet examen, on regarde où les neutrophiles injectés à l’animal vont se localiser. Ils vont immédiatement se diriger vers les territoires qui émettent un signal chémotactique. Si un phénomène inflammatoire émet des signaux chémotactiques pour les neutrophiles, on va le détecter par scintigraphie.

Figure de gauche :Si on injecte les PNN 6h après l’injection du pneumocoque chez le lapin, on a une fixation très nette dans le poumon.

Si on fait la même expérience 24h plus tard, le signal chemotactique est émit par le poumon 24h après l’application du pneumocoque. A 24h, le signal s’est complètement éteint.On démontre la compartimentalisation temporale.

D16 : Pourquoi les phénomènes responsables de la compartimentation ont évolué au cours du temps ?

On peut imaginer qu’interrompre la réponse inflammatoire peut être délétère. Si on est face à un germe extrêmement virulent, on n’a pas intérêt à éteindre trop vite la réponse inflammatoire qui a comme finalité initiale d’être anti-infectieuse. D’un autre coté, cette réponse inflammatoire permet de préserver les territoires sains. En compartimentalisant la réponse inflammatoire on empêche les territoires sains d’être atteints.

D17 : Comment se passe la répression de la réponse inflammatoire ?

Il y a une diminution très rapide du nombre des PNN dans le poumon des lapins après une agression de type infectieux. A quoi est-elle due ? A la mort de PNN. Un PNN, une fois qu’il a quitté la circulation a une durée de vie extrêmement courte, en général de l’ordre de 24H. la diminution des PNN suit immédiatement les phénomènes d’apoptose des PNN. Chez les patients qui ont une pneumopathie aigue communautaire qui ne répond pas au traitement, on a une apoptose excessive des PNN. **Certes il faut de l’apoptose des PNN pour compartimentaliser la réponse inflammatoire mais pas trop tôt sinon la maladie va continuer à évoluer et on ne va pas répondre au traitement**.

D18 : Puis ces PNN apoptotiques sont phagocytés par les macrophages alvéolaires. Cette phagocytose va avoir un certain nombre de conséquences et la principale est qu’un macrophage qui a phagocyté un PNN apoptotique va avoir une modification de son phénotype qui va évoluer vers un phénotype de type M2. La modification du phénotype des macrophages qui suit la phagocytose des PNN apoptotiques dépend de l’activation de TNRK.

Un macrophage au départ est une cellule peu différenciée qui n’a pas une activité transcriptionnelle très importante. Par analogie avec la différenciation TH1 et TH2 des lymphocytes, on a défini une différenciation M1 et M2 des macrophages. Il y a une différenciation de type M1 et plusieurs différenciations de type M2.

Un macrophage exposé à des cytokines de type TH1 va suivre une différenciation de type M1 et va développer un phénotype pro-inflammatoire caractérisé notamment par l’expression de la NO synthase inductible qui va lui permettre un killing des pathogènes.

A l’inverse, un macrophage qui va être exposé à un certain nombre de stimulus (cytokines de type TH2 : IL4) va adopter une différenciation de type M2 où il va exprimer l’arginase, le TGF beta, l’IL10 et des propriétés anti-inflammatoires vis-à-vis des autres cellules.

Donc on a pu démontrer que des macrophages alvéolaires qui avaient phagocyté des PNN apoptotiques s’orientaient vers une différenciation de type M2, diminuaient leur sécrétion de cytokine pro-inflammatoire telle que l’IL1, le TNF, les facteurs lipidiques, les leucotriènes et le thromboxane. Ces cellules augmentent l’expression de leurs facteurs immunomodulateurs tels que le TGF beta1, L’IL10 qui elle-même exerce un effet autocrine sur les macrophages et sur les autres cellules de type leucocytaire et réduit leur synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

**L’apopotose des PNN qui survient dans les suites immédiates de leur afflux dans le tissu entraine au niveau des macrophages une différenciation de type M2 et joue donc un rôle anti-inflammatoire.**

D19 : Rôle des cellules épithéliales

Durant la préhistoire de la biologie de l’inflammation, on pensait qu’elles étaient de simples passeurs. Aujourd’hui, on sait qu’elles ont un rôle actif dans l’inflammation. Ce rôle actif a été démontré dans des expériences pionnières où on utilisait dans un modèle de pneumopathie aigue chez le lapin par une bactérie à gram négatif différentes souches de pseudo-menaces qui secrétaient ou non une toxine qui avait une activité cytotoxique sur les pneumocytes de type 2.

Quelque soit la souche utilisée, les animaux développaient une pneumopathie infectieuse. Quand on regardait le niveau d’expression des cytokines pro-inflammatoires pour quantifier l’inflammation dans le poumon, on voyait qu’au niveau du LBA, quelque soit la souche de pathogène utilisée, l’intensité de la réaction inflammatoire dans le poumon était la même. La quantité de bactérie isolée dans le sang des animaux était la même donc la translocation bactérienne était la même. Par contre il y avait une différence considérable de réponse inflammatoire systémique. Dans le sérum des animaux qui avaient été infectés par la souche cytotoxique pour les pneumocytes de type 2, on pouvait trouver des marqueurs inflammatoires qui montraient qu’il y avait une réponse inflammatoire systémique considérable chez ces animaux là avec un même niveau de translocation bactérienne dans la circulation, un même niveau d’inflammation locale. Ces animaux qui avaient une réponse inflammatoire systémique développaient secondairement une lésion pulmonaire majorée et mourraient alors qu’à l’inverse, les animaux infectés par les souches non cytotoxiques pour les pneumocytes de type 2 survivaient. Donc cette expérience démontre de façon indirecte que pour contenir la réponse inflammatoire dans le poumon et l’empêcher de déborder au reste de l’organisme, on a besoin d’un épithélium alvéolaire.

**Il faut donc un épithélium alvéolaire intact pour maintenir la réponse inflammatoire au niveau du poumon.**

D20 : Les mécanismes qui préservent et aboutissent à la réparation de l’épithélium.

D 21 : schématiquement, en haut on a l’épithélium caractéristique avec les P2 sur les bords robustes, les pneumocytes de type 1 fragiles au milieu et une agression.

Phase initiale : dénudation de la membrane basale qui va être recouverte d’une matrice extracellulaire (MEC) provisoire

La prolifération des pneumocytes de type 2 qui vont migrer pour recouvrir toute la surface et vont entrainer des remaniements de la MEC et vont se différencier en pneumocytes de type 1 pour restituer l’épithélium initial.

D22 : Qu’est ce qui médie la prolifération des P2 ? C’est le phénomène compensatoire suite à la dépression des P1. Dans un poumon normal, 3% de P2 prolifèrent. En pathologie aussi, on peut observer une hyperplasie du revêtement épithélial alvéolaire et c’est très fréquent par exemple chez les fumeurs ou les patients qui ont une fibrose pulmonaire. L’étude de la prolifération est difficile. En culture, quelque soient les conditions de culture, au mieux on peut les maintenir en vie : il n'y a pas de bon modèle de prolifération des P2 en culture in vitro.

En utilisant les pneumocytes de poumon adulte, on arrive à leur faire synthétiser un peu de thymidine et de l’ADN mais on n’arrive pas à obtenir de mitose. Avec des pneumocytes de poumon fœtal, on n’a que 2 mitoses et des pneumocytes au phénotype immature.

Pour contourner ce problème, il existe des lignées cellulaires obtenues à partir de P2 mais qui ont toutes des inconvénients majeurs. Les lignées obtenues à partir de souries transduites à partir de l’antigène SV40 sont faciles à cultiver mais elles ont perdu beaucoup de traits phénotypes des P2 et notamment l’expression de certaines apoprotéines du surfactant. A549 est une lignée cellulaire très utilisée mais c’est un très mauvais model.

D23 : Contrôle de la prolifération des pneumocytes II

Facteurs solubles stimulants :

KGF, HGF, EGF, TGFa lpha, IGF-1, FGF et bFGF

Facteurs protéiques

–macrophages alvéolaires

–surnageant de LBA

D24 : si on applique un signal mitogénique pour les P2 dans le poumon normal. Si on administre par voie intra-trachéale du KGF, on a un temps très précoce de prolifération en amas de P2, le jour suivant on a migration de ces cellules qui s’étalent sur la membrane capillaire. Et une semaine plus tard on a une différenciation cellulaire en P1 et une apoptose de ces cellules. On observe ceci quelque soit le stimulus.

D25 : Inhibiteur :

PTHrP

Angiotensine 2 (apoptose)

D26 : Migration des pneumocytes 2

On étudie les P2 en culture primaire ou lignées grâce à 3 modèles :

–Plaie calibrée (on peut gratter la couche de cellules avec une pipette, faire un trou dedans avec un aérographe, faire pousser les cellules en cercle pour former un trou)

•Physique: strie

•Chimique: soude (pour faire un trou)

•Apparenté : Inserts

–Bille d’agarose

–Migration à travers un filtre

Diapo 27 : on gratte des cellules confluentes à l’aide d’une pipette et on obtient un tunnel de destruction le long de la plaque. En présence d’un stimulus pro-migratoire (ici le sérum de vœu fœtal qui est un additif classique des cultures cellulaires), on assiste à la fermeture progressive de la plaie. C’est le modèle d’étude de la migration par plaie calibrée.

D28 : On expose la plaie à différents agents et on observe si elle se referme. TGF alpha augmente la migration des cellules. Quand on rajoute dans le milieu des collagénases, on modifie la MEC, on diminue le temps de fermeture. Quand on ajoute de la fibronectine, on enrichie le milieu en MEC, on accélère la migration.

Diapo 29 : Modèle de sortie dune bille d’agarose

On prend une bille d’agarose. Va se former un gel bidimensionnel dans lequel on met des cellules au départ. On dépose ces billes sur une couche de plastique et on expose les cellules à un stimulus migratoire et on les regarde sortir de la bille et se rependre sur le substrat de culture. On a ainsi montré le rôle des collagénases dans l’acquisition d’un phénotype migratoire par les cellules.

D30 : Modèle moderne d’étude de la migration au travers d’une membrane poreuse.

Cette technique est indépendante de la prolifération cellulaire. Dans les modèles précédents, si on prend des cellules qui se divisent à toute vitesse, on va avoir une fermeture beaucoup plus rapide de la plaie qu’avec des cellules qui ne se divisent pas, indépendamment de leur migration. C’est l'inconvenant majeur des modèles de pré-calibré et de billes d’agarose.

On prend une membrane percée de trous calibrés (de 6microns) et on ensemence des cellules d’un seul coté de la membrane. On les expose à un stimulus chémotactique et on regarde les cellules qui sont passées de l’autre coté. On ne quantifie que des cellules qui ont migré. Cette expérience est indépendante de la prolifération.

D31 : cette expérience montre le rôle des intégrines

D32 : les remaniements matriciels et de leur rôle lors de la réparation épithéliale

On a en haut un épithélium normal avec une membrane basale normale composée de collagène IV et de laminine. Quand la membrane basale est dénudée, du sérum s’exsude et on a une MEC provisoire qui contient du fibrinogène, de la fibronectine et des collagènes fibrillaires. Comme le fibrinogène et la fibroncetine ont une activité pro-migratoire, l'association de la prolifération de ces cellules et de l’effet chemotactique exercé par les fibronectines est responsable de la migration des cellules sur la plaie et du recouvrement de la matrice provisoire. Ensuite on a la synthèse de protéase : de collagenase et de gélatinases par les P2 qui vont digérer la MEC provisoire et quoi vont permettre l’établissement d’une MEC définitive composée de collagène IV et de laminine et la différenciation des P2 en P1.

D33 : In vivo, on utilise du liquide de LBA comme additif au milieu de culture des cellules soumises à une plaie calibrée pour calculer la vitesse de fermeture. Dans le fluide des sujets ayant un OAP d’origine cardiaque on n’aucune activité pro-migratoire. Dans le fluide des sujets ayant une agression aigue du poumon, on a une activité pro-migratoire très intense.

Quand on a une inflammation aigue du poumon, de façon contemporaine, on a une activation de systèmes qui vont favoriser la réparation de l’épithélium. La réaction inflammatoire s’accompagne immédiatement de la mise en route de systèmes de réparation.

D35 : Le fluide prélevé à un moment plus tardif à une activité pro-migratoire inferieure à celle du fluide prélevée initialement. Il y a un parallélisme entre l’intensité de la réponse inflammatoire et le degré d’activation des systèmes de réparation.

Les facteurs pro-inflammatoires eux-mêmes exercent une activité de réparation. Une cytokine pro-inflammatoire prototypique, exprimée dès la 2eme heure dans le modèle l’injection de LPS chez le lapin a un rôle dans la migration. Quand on prend le LBA des malades atteints de pneumopathie et que l’on inactive l’IL1 avec un anticorps neutralisant ou un antagoniste du récepteur, on obtient une diminution d'activité pro-migratoire et donc une diminution de réparation alvéolaire. L’intensité de la réparation alvéolaire est corrélée de façon directe avec la concentration d’IL1 dans le LBA de départ. **C’est la cytokine pro-inflammatoire elle-même qui va induire la réparation de l’épithélium.**

D36 : Un autre facteur soluble qui va jouer un rôle dans la réparation est HGF. Il est exprimé par les neutrophiles. Sur la photo, l’HGF est exprimé en rouge. Les macrophages n’expriment pas l’HGF.

D37 : rôle de l’HGF

En situation d’inflammation aigue on a un afflux massif de PNN bourrés d’HGF. Quand ils meurent, ils relarguent l’HGF dans le milieu, est activé par les serines protéases du milieu. L’HGF a une action réparatrice dans le milieu : il a une activité mitogène sur les P2 et une activité pro-migratoire qui va favoriser la réparation épithéliale. Les phénomènes pro-inflammatoires contiennent la réparation tissulaire.

D38 : l-HGF est apporté par les PNN et est aussi secrété localement. Le LBA des patients atteints de pathologie inflammatoire aigue du poumon induit la sécrétion par les cellules résidentes du poumon de l’HGF. Il ya un apport direct par les PNN et un effet indirect : le LBA en condition inflammatoire contient des facteurs solubles qui vont induire la sécrétion de facteurs de réparation par les cellules résidantes.

D39 : Les facteurs solubles impliqués

On teste le rôle de l’IL1. Quand on inactive la voie, on diminue la synthèse de l’HGF par les fibroblastes. **Les signaux inflammatoires et les signaux de réparation sont étroitement liés et synchrones**. Ce n’est pas un phénomène séquentiel. Il n’y a pas inflammation puis réparation mais inflammation et réparation en même temps. L’IL1beta agit de façon directe sur l’épithélium et de façon indirecte en activant les fibroblastes en leur faisant synthétiser de l’HGF.

D40 : la fibrose

Si l’inflammation n’est pas contrôlée, si l'épithélium n’est pas réparé correctement. La fibrose est un échec de la réparation ou une dysfonction de l’épithélium. L’agent qui contrôle le devenir du tissu est l’épithélium. Suite à une agression, on peut avoir une réparation épithéliale complète ou une absence de réparation et une évolution vers la fibrose.

D41 : dans les années 80, on utilise des modèles toxiques pour démontrer le rôle de l’épithélium : le modèle d’exposition au toluène hydroxybutilé administré par voie systémique qui entraine l’apoptose de l’épithélium. Dans ce modèle on entraine une apoptose complète des P1 et s’il n’y a pas d’agression supplémentaire, on a une prolifération des P2 qui vont se différencier et ramener le tissu à son état antérieur. Si à l’agression des P1 on rajoute une agression qui vise les P2, on va avoir une prolifération des fibroblastes qui vont synthétiser une quantité exagérée de collagène qui donne une fibrose. Il ne suffit pas d’agresser les P1, il faut aussi agresser les P2 pour aboutir à des lésions de fibrose. Dans ce modèle, l’agression est limitée à épithélium.

D43 : dans les années 90, on a utilisé l’immunologie : des anticorps qui activent Fas, récepteur membranaire qui induit l’apoptose des cellules. L’apoptose de l'épithélium est suivie par une réaction inflammatoire très rapide. L'épithélium joue un rôle anti-inflammatoire : quand on l’enlève, on a une inflammation suivie par l'expression de médiateurs pro-fibrosants par activation des fibroblastes et synthèse de collagène. On reproduit le phénomène selon lequel on induit de l’inflammation et de la fibrose après une agression.

D44 : dans les années 2000, en détruisant l’épithélium on induit de la fibrose. Dans une souris transgénique on introduit une construction qui associe SFTPC et DTR : le promoteur de l’apoprotéine C du surfactant avec le récepteur de la toxine diphtérique. Dans ces cellules le promoteur est activé et induit l’expression par la membrane du récepteur de la toxine diphtérique. La liaison à la toxine diphtérique entraine l’apoptose des cellules. Quand on élimine l'épithélium alvéolaire on a une réaction inflammatoire et une activation des fibroblastes qui vont proliférer, se différencier et induire de la matrice.

D45 : La **fibrose est un échec de la réparation épithéliale**. L’homéostasie de l’alvéole repose sur des intéractions entre les différents types cellulaires qui la constitue. On connait l’interaction entre l’épithélium et les fibroblastes mais on connait mal l’interaction entre les cellules endothéliales et les fibroblastes car leur culture est très compliquée.

D46 : quelle est la nature de ces interactions ? Dans ces expériences, on cherche si les P2 contrôlent le phénotype des fibroblastes. Si on prend un poumon fœtal au stade pseudo-glandulaire, le poumon est constitué de 2 types cellulaires : d’un épithélium qui recouvre les canaux pseudo-glandulaires et du mésenchyme totalement indifférencié. Ce mésenchyme va donner naissance aux fibroblastes alvéolaires, au muscle lisse bronchique et à l’endothélium. Quand on met ces poumons en culture, les cellules continuent à se diviser un certain temps. Les chercheurs ont pris de l’épithélium distal, de l'épithélium proximal trachéal et du mésenchyme et ont fait des expériences de co-culture. En mettant en présence l’épithélium distal avec le mésenchyme proximal, le mésenchyme va se différencier en mésenchyme distal. L’épithélium contrôle la différenciation d’un tissu par rapport à l’autre. Les P2 en temps normal contrôlent-ils le phénotype des fibroblastes ? Ils ont mis en culture des P2, ont récupéré le surnageant de culture contenant tous les facteurs solubles qui sont secrétés et on traite des fibroblastes avec. On utilise le surnageant des P2 de rats normaux sur des fibroblastes et on observe que ce surnageant inhibe la prolifération des fibroblastes. L’épithélium réprime les cellules normales. Si on prend des P2 de rats exposés à la bléomycine (modèle classique de fibrose pulmonaire), le surnageant des P2 a perdu son effet anti-prolifératif vis-à-vis des pneumocytes. **En condition pathologique, un épithélium dysfonctionnel perd sa capacité à réprimer l’activation des fibroblastes. Un épithélium normal réprime la différenciation des fibroblastes.**

D47 : en faisant pousser des cellules épithéliales en fond de puits et en faisant des radeaux de fibroblastes dans des blocs de collagène, on montre que l’inhibition de la prolifération des fibroblastes par les P2 est médiée par la prostaglandine, que l’on peut reproduire avec de la PGE2 exogène. On peut l’inhiber avec des agents pharmacologiques qui inhibent le PGE2.

D48 : A l’inverse, un certain nombre de facteurs favorisent la prolifération des fibroblastes comme l’endothéline1, la fibronectine.

D49 : on a des cellules épithéliales en fond de puits et des fibroblastes en radeaux dans des blocs de collagène. Quand on co-cultive des pneumocytes avec des fibroblastes, on maintient la différenciation épithéliale induite par l’expression des protéines du surfactant, la synthèse des phopholipides du surfactant. Dans ce modèle, l’épithélium réprime les fibroblastes et les fibroblastes secrètent des facteurs solubles qui favorisent la différenciation des P2. L'interaction va dans les 2 sens. Les facteurs impliqués les mieux décrits sont les facteurs de croissance FGF7, FGF10 et HGF.

En situation normale, les fibroblastes normaux ont la capacité de favoriser la différenciation des P2 et de favoriser leur survie.

D50 : En situation pathologique, les choses s’inversent : si on utilise des fibroblastes cultivés à partir de poumon de rat dans le cadre d’un modèle de fibrose, et qu’on les co-cultive avec des P2, au lieu de favoriser leur survie et leur différenciation, on induit leur apoptose. On introduit le concept d’interaction entre les P2 et les fibroblastes, interaction qui en situation normale favorise à la fois la survie et la différenciation des P2 et réprime la prolfération des fibroblastes. En condition pathologique (dans les fibroses), l’épithélium perd sa capacité à réprimer la prolifération des fibroblastes et où les fibroblastes vont perdre leur rôle trophique vis-à-vis de l’épithélium et à l’inverse, vont acquérir une activité pro-apoptotique.

D51 : de nombreux facteurs solubles jouent un rôle dans l’interaction du mésenchyme et de l’épithélium, ex : TGF beta, VEGF, PDGF, SHH, notch, endothéline, WNT… On sait peu de choses du rôle des contacts cytoplasmiques directs.

D52 : l’origine des fibroblastes lors des fibroses pulmonaires

Au niveau embryologique, les fibroblastes résidents du poumon dérivent du mésenchyme pulmonaire fœtal.

Il y a différentes sources de fibroblastes pulmonaires chez l’adulte :

* Les précurseurs mésenchymateux locaux :
  + De la différenciation de fibroblastes
  + A partir de cellules souches mésenchymateuses
  + A partir du muscle lisse
  + A partir de cellules non mésenchymateuses (=à partir de l’endothélium)
* A partir d’autres types cellulaires
* A partir de précurseurs monocytaires sanguins dérivés de la moelle osseuse : les fibrocytes

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est la dédifférenciation d’une cellule épithéliale qui va perdre ses caractères des cellules épithéliales et qui va acquérir des caractères mésenchymateux.

La transition endothéliaux-mésenchymateuse apparait pour les cellules endothéliales.

Une cellule qui tire son origine de la TEM ne sera jamais une cellule totalement mésenchymateuse car elle garde des facteurs épithéliaux.

**Les cellules mésenchymateuses ont la capacité à se différencier en différents types cellulaires.** Les critères retenus pour reconnaitre la nature de MSC est leur capacité à se différencier en cellules ostéogéniques, en adipocyte ou en chondrocyte. Ces cellules occupent une niche.

D54 : Les fibrocytes sont des cellules qui tirent leur origine de la moelle osseuse, qui expriment des marqueurs de surface comme CXCR4 qui est un récepteur de surface et qui exprime des collagènes. Ces cellules sont émises par la moelle osseuse en réponse à un facteur systémique circulant et vont rejoindre via la circulation les territoires d’agression pour participer à la réparation. On sait que parmi les facteurs chimiotactiques il y a CXCL12. Chez l’homme, les fibrocytes sont une population très minoritaire mais au cours des phénomènes de réparation et de fibrose, le nombre de ces cellules augmente.

D55 : rôle en pathologie humaine

Dans le LBA des malades atteints d’agression alvéolaire aigue, il y a une augmentation très significative du nombre e fibrocytes témoignant d’un afflux de ces cellules dans le poumon des malades. La présence de grande proportion de fibrocytes dans le LBA est un marquer pronostic plus fort que les score utilisés de façon courante. Il y a donc une corrélation entre l’afflux de ces cellules dans le poumon des malades et l’évolution vers la fibrose.

D56 : la transition épithélio-mésenchymateuse

Ce sont des cellules épithéliales évoluant vers un phénotype fibroblastique. Cela joue un rôle au cours du développement, de la réparation des épithéliums car l’acquisition d’un phénotype migratoire par les cellules épithéliales peut être considéré comme de la transition épithélio-mésenchymateuse car ces cellules vont perdre l’expression des jonctions serrés, vont exprimer des molécules du cytosquelette qui sont d’ordinaire observées dans les cellules mésenchymateuses et qui vont migrer comme des cellules mésenchymateuses. L’acquisition de traits métastatiques dans la cellule tumorale correspond à un équivalent de transition épithélio-mésenchymateuse. Ce phénomène est inductible in vitro mais on ne connait pas son rôle dans la fibrogénèse. On l’étudie grâce à des expériences où on étudie des cellules qui sont passées par un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, on leur impose un marqueur fluorescent et on suit ce que deviennent ces cellules dans des modèles de fibrogénèse. Par exemple chez des souris qui sont modifiées pour exprimer l’AGFP sous la dépendance du promoteur de l’apoprotéine C du surfactant, tout le liquide alvéolaire a été marqué par l’AGFP. Quand on expose ces cellules à la bléomycine, on observe un déplacement de ces cellules vers l’intérieur des zones de fibrose. On a des cellules qui expriment des gènes spécifiquement épithéliaux que l’on retrouve complètement enfoui au milieu des zones de fibrose en association avec l’expression de traits fibroblastiques. Ce modèle est vrai chez l’animal, chez l’home c’est moins clair.

D57 : on part d’un épithélium normal marqué pour l’alphaSMA (marqueur myofibroblastique non exprimé par l’épithélium normal). Quand on traite par du TGFbeta, toutes les cellules l’expriment. Les cellules expriment AQP5 (marqueur de P1) ne l’expriment plus quand on traite avec du TGFbeta.

D58 : conclusion

L’agression est suivie d’une lésion épithéliale alvéolaire. En condition normale on a une compartimentalisation spatiale et temporale de la réponse inflammatoire, une réparation de l’épithélium qui participe à la compartimentalisation de la réponse inflammatoire, l’ensemble aboutissant à une guérison complète.

Si la réponse inflammatoire n’est pas contrôlée, si la réparation épithéliale n’est pas complète, on aboutit à une perturbation des interactions entre l’épithélium et le mésenchyme qui contrôle en situation normale l’homéostasie de la cloison alvéolaire. La perturbation des interactions entre l’épithélium bronchique et le mésenchyme aboutit à l’augmentation du nombre de fibroblastes qui vont se différencier en myofibroblastes qui vont synthétiser du collagène, de la fibronectine et on va aboutir à des lésions fibreuses irréversibles. A chaque étape, le phénomène est auto-renforcé : si on ne répare pas correctement l’épithélium, on ne va pas pouvoir contrôler la réponse inflammatoire car quand on tue l’épithélium alvéolaire on induit de façon autonome une réponse inflammatoire et si on perturbe les interactions entre l’épithélium et le mésenchyme, les fibroblastes vont perdre leur capacité à favoriser la différenciation de l’épithélium et sa survie et à l’inverse induire l’apoptose. Si on a une augmentation du nombre de myofibroblastes, on renforce les altérations des interactions et on aboutit à la fibrogénèse.