



**HAL**  
open science

# IDENTIFICATION, ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROGENITEURS BRONCHIOLOALVEOLAIRES OVINS

Alain Abi Rizk

► **To cite this version:**

Alain Abi Rizk. IDENTIFICATION, ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROGENITEURS BRONCHIOLOALVEOLAIRES OVINS. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 109- 2012 . tel-00903271

**HAL Id: tel-00903271**

**<https://theses.hal.science/tel-00903271>**

Submitted on 11 Nov 2013

**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.

N° d'ordre : 109- 2012

Année 2012

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

ECOLE DOCTORALE

**EVOLUTION, ECOSYSTEMES, MICROBIOLOGIE, MODELISATION (E2M2)**

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 16/07/2012

Par

**Alain ABI RIZK**

**« IDENTIFICATION, ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROGENITEURS  
BRONCHIOLOALVEOLAIRES OVINS »**

Directeurs de thèse :

Dr Caroline LEROUX, DR2 INRA

Dr Fabienne ARCHER, CR1 INRA

JURY:

Dr Giuseppe BERTONI, Institute of Veterinary Virology, Université de Bern, Suisse Rapporteur

Dr Alice JOUNEAU, CR1, UMR1198 INRA de Jouy-en-Josas Rapporteur

Dr Jean-François VAUTHEROT, DR2, UMR1282 INRA de Tours Rapporteur

Pr Jean-François MORNEX, PU-PH1, Université Lyon1, Hospices Civil de Lyon

Pr Jean-François BERNAUDIN, PU-PH1, Université Pierre et Marie Curie, APHP Hôpital Tenon

Dr Caroline LEROUX, DR2, UMR754 INRA/Université Lyon 1

Dr Fabienne ARCHER, CR1, UMR754 INRA/Université Lyon 1



## REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'unité UMR754 « Rétrovirus et pathologie comparée », dirigée par le Professeur Jean François MORNEX qui je remercie profondément de m'avoir accueilli pendant ces trois ans au sein de son laboratoire.

Je remercie sincèrement les Docteurs Caroline LEROUX et Fabienne ARCHER qui ont encadré mon travail thèse.

J'exprime mes remerciements sincères aux Dr Giuseppe BERTONI, Dr Alice JOUNEAU et Dr Jean-François VAUTHEROT d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs scientifiques et aux Professeurs Jean-François MORNEX et Jean-François BERNAUDIN de participer au jury d'évaluation de mon travail de thèse.

Je remercie grandement le Docteur François GUIGUEN pour son aide inestimable dans le choix des échantillons dédiés à ma thèse, pour sa disponibilité ainsi que sa capacité à répondre à mes très nombreuses questions et surtout de m'avoir appris la cytométrie en flux.

J'exprime ma gratitude au Docteur Frédérique BOYER, à Sophie DESLOIRE, Barbara GINEYS et Christine DOLMAZON pour leurs précieux soutien et conseils.

Je remercie également tous les membres de l'unité UMR754 qui m'ont aidé ou soutenu au cours de la réalisation de ce travail surtout le Professeur Christophe TERZIAN, le Docteur Frédéric ARNAUD et le Docteur Barbara VIGINIER.

Je tiens bien sûr à remercier l'Agence Universitaire de la Francophonie AUF pour leur financement tout au long de mes trois années de thèse.

Un très grand merci à Frank TOURET, Juliano DA CRUZ, Virginie GAY, Takouhie MEGARDITCHIAN, Elsy EL ANDARY, Abdou ACKOUCHE, Barbara GINEYS, Frédéric BOYER, Karthy GALLAY et Marie Pierre CONFORT pour m'avoir supporté, conseillé et pour m'avoir fait beaucoup rire notamment lors de nos petites soirées et sorties.

Fabienne, je suis très content de t'avoir connue, tu étais toujours présente quand j'avais besoin d'un conseil scientifique ou personnel. Tu m'a toujours reboosté quand le moral n'était pas là !! Tout ce travail de thèse je te le dois !

Caroline, je ne trouverais pas les mots pour te dire merci. Travailler sous ton encadrement était l'une des expériences les plus riches que j'ai eu la chance de vivre !!. Comme un vrai «Maestro» tu as su me guider tout le long de cette thèse. Ta rigueur scientifique, ton sérieux et ton organisation me seront pour toujours un modèle à suivre.

Christophe (Grand Père), j'ai passé avec toi de bons et très bons moments, je te remercie profondément pour ce soutien de très très longue date, ces conseils et cette amitié.

J'exprime toute ma reconnaissance à mes Parents et frère, sans qui je n'aurais pas pu être en France pour faire une thèse. Tout ce que j'ai accompli est grâce à vous. Merci infiniment...

Lara, cette thèse je te la dois et je te la dédie. Merci de m'avoir supporté tout ce temps, de m'avoir toujours soutenu dans les moments délicats, de m'avoir conseillé et écouté. Merci de ta patience et de partager ma vie.

## RESUME

Les progéniteurs bronchioalvéolaires situés aux jonctions bronchioalvéolaires peuvent être impliqués dans l'embryogenèse ou la régénération. Ces cellules non décrites chez les gros animaux peuvent participer au développement de nouvelles thérapies contre les maladies pulmonaires aiguës ou chroniques. Dans cette étude, nous avons établi la présence de progéniteurs bronchioalvéolaires dans les poumons des ovins nouveaux nés. Ces cellules ont été identifiées par leur co-expression des protéines CCSP, SP-C et CD34. Une population mineure de cellules CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> (0,33% ± 0,31) était présente *ex vivo*. Le tri magnétique des cellules CD34<sup>pos</sup> a permis l'isolement des progéniteurs SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> (> 80%). Ces cellules étaient maintenues et amplifiées *in vitro* en interface liquide/liquide. De même, ces progéniteurs étaient capables de se différencier soit en cellules de Clara soit en AEC II dans différents milieux de cultures synthétiques et diverses matrices extracellulaires. En outre, les progéniteurs bronchioalvéolaires obtenus *ex vivo* et *in vitro* exprimaient les gènes NANOG, Oct4 et BMI1 spécifiques aux cellules souches. Nous rapportons ainsi, pour la première fois dans un grand animal, l'existence de cellules progénitrices bronchioalvéolaires à fort potentiel de double différenciation et d'expression de certains gènes de cellules souches.

**Mots clés** : cellules souches, poumon, progéniteurs bronchioalvéolaires, CD34, pneumocyte, cellule de Clara, différenciation

**Umr 754 “rétrovirus et Pathologie comparée”. Institut National de Recherche Agronomique,  
Université Claude Bernard Lyon 1. Lyon 1, 50 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon Cedex 07, France**



**ABSTRACT**

Bronchioloalveolar stem cells located at the bronchiolar/alveolar junction may be involved in embryogenesis or regeneration. These cells have not yet been described in large animals, and they may enable the development of new therapeutics to treat acute or chronic lung disease. In this study, we aimed to establish the presence of bronchioloalveolar stem cells in ovine lungs and to characterize their stemness properties. Lung cells were studied using immunohistochemistry on frozen sections of the lung, and immunocytochemistry and flow cytometry were conducted on derived cells. The stem cells were identified by co-expression of CCSP, SP-C and the CD34 hematopoietic stem-cell marker. A minor population of CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells (0.33% ± 0.31) was present *ex vivo* in cell suspensions from dissociated lungs. Using CD34 magnetic positive cell sorting, undifferentiated SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells were purified (>80%) and maintained in culture. Using synthetic media and various extracellular matrixes, SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells differentiated into either Clara cells or alveolar epithelial type-II cells. Furthermore, bronchioloalveolar stem cells obtained *ex vivo* and *in vitro* expressed the stem cell-specific genes NANOG, OCT4 and BMI1. We report for the first time in a large animal the existence of bronchioloalveolar stem cells with dual differentiation potential and the expression of stem cell-specific genes.

**Key words:** lung, stem cell; bronchioloalveolar progenitors, CD34, AEC II, Clara cell, differentiation

**Umr 754 “rétrovirus et Pathologie comparée”. Institut National de Recherche Agronomique,  
Université Claude Bernard Lyon 1. Lyon 1, 50 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon Cedex 07, France**



## LISTE DES ABREVIATIONS

Selon HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) <http://www.genenames.org/>

<b>ABC:</b>	ATP-Binding Cassette
<b>AEC:</b>	Alveolar Epithelial Cell
<b>ALDH:</b>	ALdéhyde DésHydrogénase
<b>AQP:</b>	AQuaPorine
<b>BASC:</b>	BronchioloAlveolar Stem Cells
<b>Bcrp1:</b>	Breast cancer resistance protein 1
<b>BMP4:</b>	Bone Morphogenetic Protein 4
<b>BRF2:</b>	Butyrare Response Factor 2
<b>CC10:</b>	Clara Cell 10 kDa
<b>CCSP:</b>	Clara Cell Secretory Protein
<b>CDKN2A:</b>	Cyclin-Dependent KiNase inhibitor 2A
<b>CFTR:</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<b>CGRP:</b>	Calcitonin Gene-Related Peptide
<b>c-kit:</b>	Cell receptor tyrosine kinase
<b>CSM:</b>	Cellule Souche Mésanchymateuse
<b>EGF:</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR:</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>ENaC:</b>	Epithelial Na Channel
<b>Fgf</b>	Fibroblast growth factors
<b>Fgf10:</b>	Fibroblast growth factor 10
<b>Fgfr2b:</b>	Fibroblast growth factor receptor 2 b
<b>FOX:</b>	Forkhead boX
<b>GATA6:</b>	GATA binding Factor 6
<b>GDF3:</b>	Growth Differentiation Factor-3
<b>Gli1:</b>	Glioma-associated oncogene family zinc finger 1
<b>GRP:</b>	Gastrin Related Peptide
<b>HGF:</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIF-1<math>\alpha</math>:</b>	Hypoxia Inducible Factor 1, alpha subunit
<b>Hip:</b>	Hedgehog interacting protein
<b>IDO:</b>	InDOleamine 2,3-dioxygenase 1
<b>IGF1:</b>	Insulin-like Growth Factor 1
<b>IL10:</b>	InterLeukin 10
<b>iPS:</b>	induced Pluripotent Stem cells
<b>KLF4:</b>	Kruppel-Like Factor 4
<b>KO:</b>	Knock Out
<b>KRAS:</b>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>LEF:</b>	Lymphoid Enhancer binding Factor
<b>LIN28:</b>	LIN-28 homolog
<b>LRC:</b>	Label-Retaining Cells

<b>LRP:</b>	Low density lipoprotein Receptor-related Protein
<b>MAML1:</b>	MAsterMind-Like 1
<b>MHC-1:</b>	Major Histocompatibility Class 1
<b>MYC:</b>	MYeloCytomatosis viral oncogene homolog
<b>NANOG:</b>	Nanog homeobox
<b>CBNPC:</b>	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
<b>OCT4:</b>	OCTamer binding factor 4
<b>CBPC:</b>	Cancer Bronchique à Petites Cellules
<b>piPS:</b>	protein induced Pluripotent Stem cells
<b>Ptc:</b>	Patched
<b>PTEN:</b>	Phosphatase and TENsin homolog
<b>PTGER2:</b>	ProstaGlandin E Receptor 2
<b>PTPRC:</b>	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type, C
<b>RB1:</b>	RetinoBlastoma 1
<b>RBPJK:</b>	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region-lik
<b>RUNX:</b>	Runt-related transcription factors
<b>Sca-1:</b>	Stem cell antigen 1
<b>SCGB1A1:</b>	SéCrétoGloBine 1A1
<b>SHH:</b>	Sonic HedgeHog
<b>SMAD3:</b>	Mothers Against Decapentaplegic homolog 3
<b>Smo:</b>	Smoothened
<b>SOX2:</b>	Sry-related high mObility group boX
<b>SP:</b>	Side Population
<b>SP-A:</b>	Surfactant Protein A
<b>SP-B:</b>	Surfactant Protein B
<b>SP-C:</b>	Surfactant Protein C
<b>SP-D:</b>	Surfactant Protein D
<b>Spry2:</b>	Sprouty homolog 2
<b>SSEA:</b>	Stage-Specific Embryonic Antigens
<b>TCF:</b>	Transcription Factor T-Cell specific
<b>TDGF1:</b>	Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1
<b>TGF-β:</b>	Transforming Growth Factor beta
<b>TITF1:</b>	Thyroid transcription factor 1
<b>TP53:</b>	Tumor Protein p53
<b>TRA:</b>	Tumor-Related Antigen
<b>TRP:</b>	Transformation Related Protein
<b>Wnt:</b>	Wingless type
<b>ZFP42:</b>	Zinc Finger Protein 42

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1: Les stades du développement pulmonaire ovin
- Figure 2: Changement de la proportion des cellules souches alvéolaires et des cellules alvéolaires intermédiaires chez l'ovin durant la période de gestation jusqu'à 2 ans après naissance
- Figure 3: Développement des cellules alvéolaires ovines
- Figure 4: Changement de la proportion des AECI et les AECII chez l'ovin durant la période de gestation jusqu'à 2 ans après naissance
- Figure 5: L'action du complexe Fgf10/SPRY2 sur le développement pulmonaire
- Figure 6 : Action du complexe SHH/Hip sur le développement pulmonaire
- Figure 7 : Action de la voie WNT sur le développement et le branchement pulmonaire
- Figure 8 : Représentation de l'épithélium de surface bordant les voies aériennes
- Figure 9: Obtention des cellules souches pluripotentes induites (iPS)
- Figure 10: Les niches des cellules souches dans l'épithélium pulmonaire
- Figure 11: Les cellules souches bronchioalvéolaires
- Figure 12: L'implication possible des progéniteurs bronchioalvéolaires dans le développement de l'adénocarcinome pulmonaire ovin
- Figure 13: Les conditions de culture des cellules pulmonaire CD34<sup>POS</sup>
- Figure 14 : Localisation *in vivo* des cellules épithéliales SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup>
- Figure 15 : Quantification des cellules SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> *ex vivo* après dissociation des poumons
- Figure 16 : Quantification des cellules SP-C<sup>POS</sup> et CCSP<sup>POS</sup> dans les différents milieux de culture
- Figure 17: Présence de cellules SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> *in vitro*
- Figure 18: Présence de cellules SP-C<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> et CD44v6<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> *in vitro*
- Figure 19: Enrichissement de la population des cellules pulmonaires CD34<sup>POS</sup>
- Figure 20: Expression des protéines SP-C et CCSP dans les cellules CD34<sup>POS</sup>
- Figure 21: Expression des ARNm de SP-C, CCSP, CD34, BMI1, OCT4 et NANOG dans les cellules triées CD34<sup>POS</sup>
- Figure 22: Expression de CD34 dans les cellules triées maintenues *in vitro* en interface liquide/liquide
- Figure 23: Maintien de la population des progéniteurs bronchioalvéolaires par culture en interface liquide/liquide
- Figure 24: Différenciation de la population des progéniteurs bronchioalvéolaires en AEC II
- Figure 25: Différenciation de la population des progéniteurs bronchioalvéolaires en cellules de Clara
- Figure 26: Expression des gènes codant pour BMI1, OCT4 et NANOG dans les progéniteurs bronchioalvéolaires et les cellules différenciées
- Figure 27 : Caractérisation des progéniteurs bronchioalvéolaires ovins
- Figure 28: Intéraction possible des progéniteurs bronchioalvéolaires ovins avec JSRV
- Tableau 1: Origine des prélèvements de poumon de moutons
- Tableau 2: Anticorps utilisés



## Sommaire

REMERCIEMENTS	iii
RESUME	v
ABSTRACT	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES ILLUSTRATIONS	xi
INTRODUCTION GENERALE	5
<b>CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>7</b>
I. CARACTERISTIQUES DEVELOPPEMENTALES ET HISTOLOGIQUES DU POUMON OVIN	9
I.1. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE OVIN.....	9
I.2. INITIATION MOLÉCULAIRE DU DÉVELOPPEMENT PULMONAIRE.....	13
II. HISTOLOGIE DE L'ÉPITHELIUM RESPIRATOIRE	17
II.1. L'ÉPITHÉLIUM TRACHÉO-BRONCHIQUE.....	18
II.2. L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIOLAIRE.....	19
II.3. L'ÉPITHÉLIUM ALVÉOLAIRE.....	19
III. LES CELLULES SOUCHES ET LEUR CLASSIFICATION	20
IV. LES CELLULES SOUCHES ET PROGENITRICES DE L'ÉPITHELIUM PULMONAIRE	28
IV.2. CELLULES PROGÉNITRICES DE L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIOLAIRE.....	30
IV.3. CELLULES SOUCHES DE LA JONCTION BRONCHIOLO-ALVÉOLAIRE.....	31
IV.4. CELLULES PROGÉNITRICES DE L'ÉPITHÉLIUM ALVÉOLAIRE.....	32
IV.5. LES CELLULES C-KIT.....	33
IV.6. LA "SP" (SIDE POPULATION).....	33
IV.7. CONCLUSION SUR LES CELLULES SOUCHES PULMONAIRES.....	34
V. REGULATION MOLECULAIRE DES CELLULES SOUCHES DE L'ÉPITHELIUM RESPIRATOIRE	34
VI. LES CELLULES SOUCHES TUMORALES PULMONAIRES	36
VII. VERS DE NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES	39
VII.1. LES CELLULES SOUCHES ENDOGÈNES.....	39
VII.2. LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	40
VII.3. LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES.....	40
VII.4. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES.....	41
VII.5. LE DÉFI DE LA THÉRAPIE CELLULAIRE DU POUMON.....	42

VIII. CONCLUSION	42
<b>CHAPITRE 2: TRAVAIL EXPERIMENTAL</b>	<b>43</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>46</b>
I. ORIGINE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	46
II. DISSOCIATION ENZYMATIQUE DU POUMON	47
III. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES SP-C ET CCSP SUR DES COUPES DE TISSU PULMONAIRE OVIN	47
IV. CULTURE DES CELLULES PRIMAIRES ISSUES DE LA DISSOCIATION DES POUMONS	48
V. TRI POSITIF DES CELLULES EXPRIMANT LA PROTEINE DE SURFACE CD34	49
VI. CULTURE DES CELLULES TRIÉES CD34 <sup>POS</sup>	49
VI.1. MAINTIEN DES CELLULES CD34 <sup>POS</sup> .....	49
VI.2. DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TRIÉES CD34 <sup>POS</sup> EN AECII.....	50
VI.3. DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TRIÉES CD34 <sup>POS</sup> EN CELLULES DE CLARA.....	50
VII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS SP-C, CCSP, SP-A, CD44V6 ET CD34 PAR IMMUNOMARQUAGES	51
VIII. EXPRESSION DES GENES <i>SP-C</i> , <i>CCSP</i> , <i>CD34</i> , <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> ET <i>BMI1</i> PAR RT-PCR	51
<b>RESULTATS</b>	<b>53</b>
I. MISE EN EVIDENCE DE PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES <i>IN SITU</i> CHEZ LES OVINS NOUVEAUX NES	53
II. QUANTIFICATION ET CARACTERISATION DES CELLULES EPITHELIALES PULMONAIRES ET MISE EN EVIDENCE DES PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES <i>EX VIVO</i>	53
III. CARACTERISATION DES COLONIES EPITHELIALES PULMONAIRES <i>IN VITRO</i>	54
III.1. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE POPULATION DE CELLULES ÉPITHÉLIALES CO -EXPRIMANT SP-C ET CCSP <i>IN VITRO</i> ...	56
III.2. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE POPULATION DE CELLULES ÉPITHÉLIALES EXPRIMANT CD34 <i>IN VITRO</i> .....	57
IV. ISOLEMENT DES CELLULES CD34 <sup>POS</sup> PAR TRI IMMUNOMAGNETIQUE	58
V. EXPRESSION DES GENES CODANT POUR SP-C, CCSP, CD34, BMI1, OCT4 ET NANOG DANS LES PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES	60
VI. MAINTIEN DE L'EXPRESSION DE CD34 <i>IN VITRO</i> PAR LES CELLULES TRIÉES	61

VII. LES CELLULES CD34 <sup>POS</sup> /CCSP <sup>POS</sup> /SP-C <sup>POS</sup> SE DIFFERENCIENT EN AEC II OU EN CELLULES DE CLARA	63
VIII. EXPRESSION DES GENES CODANT POUR CD34, BMI1, OCT4 ET NANOG DANS LES PROGENITEURS BRONCHIOLOALVEOLAIRES	65
<b>DISCUSSION</b>	<b>67</b>
<b>CHAPITRE 3: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>71</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>75</b>
<b>CHAPITRE 4: PUBLICATION</b>	<b>77</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>79</b>



## INTRODUCTION GENERALE

L'épithélium des voies respiratoires est fréquemment lésé au cours des pathologies respiratoires inflammatoires et chroniques et doit régénérer sa structure afin de restaurer son intégrité et ses fonctions de défenses. Des sous-populations de cellules de Clara sont impliquées dans le renouvellement des épithélia bronchique et bronchiolaire, des cellules souches bronchioloalvéolaires assurent le maintien de l'épithélium bronchioloalvéolaire et des AEC II (Alveolar Epithelial Cell type II) se trans-différencient en AEC I (Alveolar Epithelial Cell type I) au sein de l'épithélium alvéolaire. Toutefois, la nature des cellules souches ou des progéniteurs de l'épithélium respiratoire chez les gros animaux et notamment chez les humains reste encore peu connue.

La revue bibliographique présentera les différents types de cellules souches, ainsi que leur potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation. Nous aborderons, le développement de l'appareil respiratoire chez le mouton, ainsi que l'histologie de l'épithélium bordant les voies aériennes et alvéolaires. Nous détaillerons les cellules épithéliales pulmonaires candidates au statut de cellules souches. Nous introduirons les données établies dans la littérature concernant la régulation du comportement des cellules souches épithéliales respiratoires. Enfin, nous discuterons des nouvelles approches thérapeutiques des cellules souches dans le poumon.



# **CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**



Les cavités de l'appareil respiratoire sont tapissées d'un épithélium qui représente une barrière de défense contre les agressions physiques, les polluants et les agents pathogènes. Suite aux altérations, cette ligne de défense doit rapidement se réparer et restaurer ses fonctions. La régénération des tissus lésés est induite par des cellules souches et des cellules progénitrices.

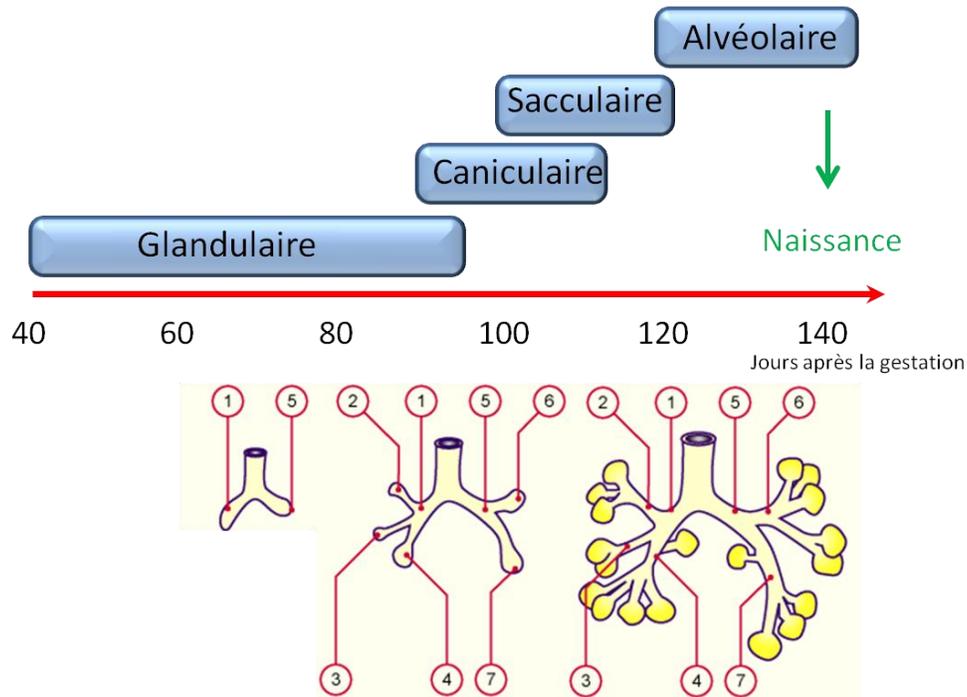
Dans cette revue bibliographique, nous présenterons le développement de l'appareil respiratoire chez le mouton, ainsi que l'histologie de l'épithélium bordant les voies aériennes, puis les caractéristiques générales des cellules souches. Nous détaillerons les cellules épithéliales pulmonaires candidates au statut de cellules souches et les cellules souches pulmonaires tumorales. Finalement, les implications thérapeutiques potentielles des cellules souches au niveau pulmonaire seront abordées.

## **I. CARACTERISTIQUES DEVELOPPEMENTALES ET HISTOLOGIQUES DU POU MON OVIN**

Comme chez tous les mammifères, l'appareil respiratoire ovin est constitué des fosses nasales, du rhino-pharynx, du larynx, de la trachée, de bronches, de bronchioles et d'alvéoles pulmonaires (86).

### **I.1. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE OVIN**

Chez la majorité des mammifères notamment l'homme, la souris et le mouton, le processus de maturation et de différenciation de l'appareil respiratoire commence *in utero* dès les premières semaines de vie fœtale. Contrairement à l'homme où le développement pulmonaire se poursuit jusqu'à l'âge de 8 ans, le développement pulmonaire ovin se termine à la naissance après 140 jours de gestation (3) (Figure 1). La formation de l'appareil respiratoire chez les ovins résulte de l'interaction complexe d'un certain nombre de facteurs: facteurs de croissance, exposition hormonale, facteurs génétiques, nutrition, *stimuli* de nature physique tels que les mouvements fœtaux respiratoires, les forces d'étirement pulmonaire, le volume du liquide intra-pulmonaire, du liquide amniotique et les expositions aux agressions. Le développement pulmonaire ovin s'étend sur 4 stades (Figure 1) (1, 16, 18).



**Figure 1 : Les stades du développement pulmonaire ovin** (adapté de (3)). 1 : bronche principale droite, 2 : lobe pulmonaire supérieur droit, 3 : lobe pulmonaire moyen, 4 : lobe pulmonaire inférieur droit, 5 : bronche principale gauche, 6 : lobe pulmonaire supérieur gauche, 7 : lobe pulmonaire inférieur gauche.

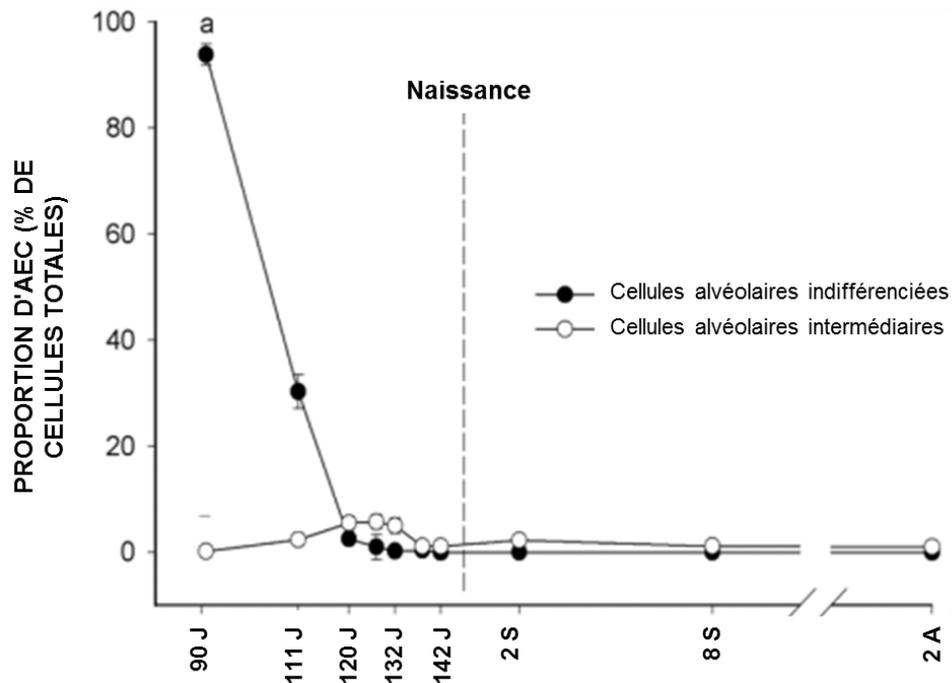
### ***Stade glandulaire (39<sup>ème</sup> – 94<sup>ème</sup> jour de gestation)***

La première ébauche respiratoire apparaît vers le 39<sup>ème</sup> jour de la gestation sous forme d'un bourgeon sur la face ventrale du tube digestif primitif. Très rapidement apparaissent deux bourgeons latéraux qui s'allongent en deux ébauches bronchiques principales pavées d'une seule couche d'épithélium. Cette couche de cellules épithéliales non différenciées subit une différenciation centrifuge de la partie proximale vers la partie distale avec apparition des cellules ciliées, sécrétoires et neuroendocrines. Les ramifications tubulaires continuent jusqu'à la formation des bronchioles terminales. Des cellules épithéliales bronchiolaires différenciées apparaissent telles que les cellules ciliées, non ciliées et caliciformes dans la partie proximale des bronchioles et on détecte les premiers battements ciliaires des cellules ciliées (68).

### ***Stade caniculaire (95<sup>ème</sup> – 109<sup>ème</sup> jour de gestation)***

Le nombre total de segments bronchiques étant établi, la croissance en longueur et largeur des bronches débute. Les bronchioles se développent et les cellules épithéliales qui présentent une forme arrondie et contiennent abondamment du glycogène, se différencient en cellules alvéolaires intermédiaires dont le noyau s'aplatit. Du point de vue morphologique, ces

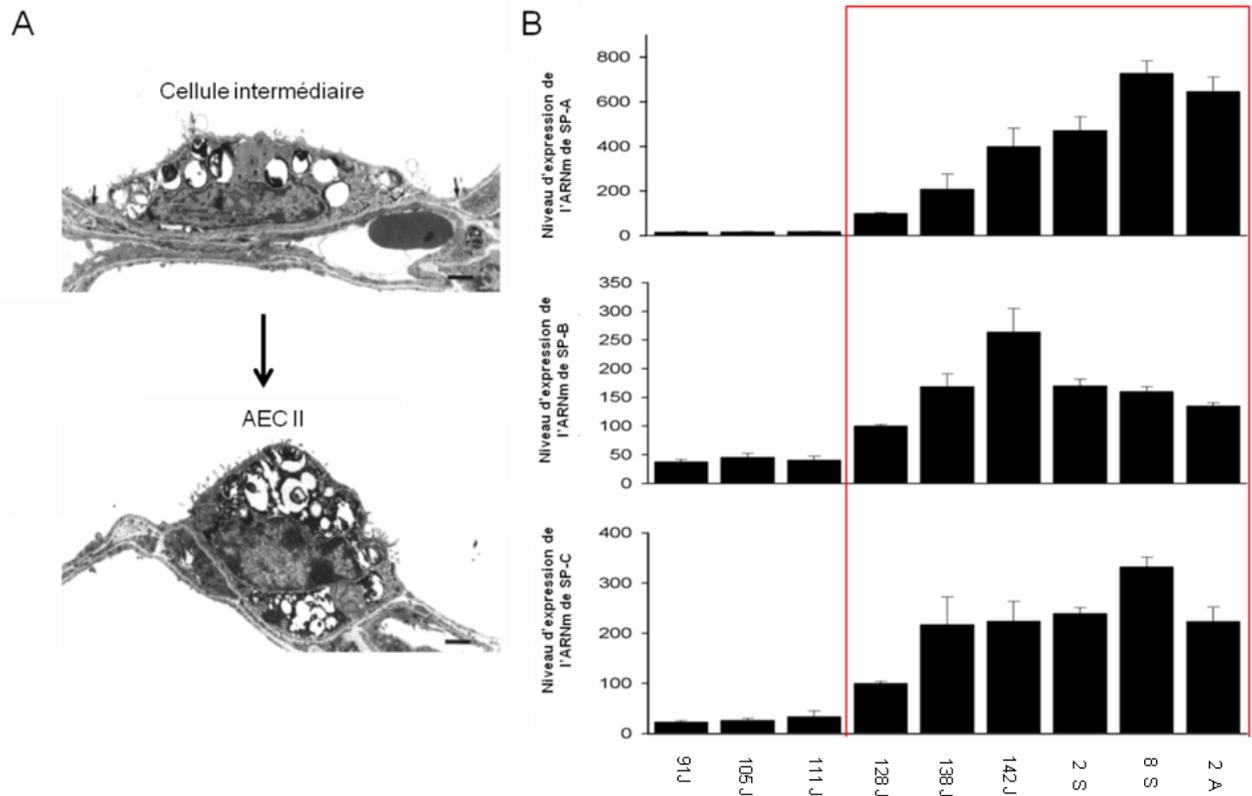
cellules forment de longues extensions cytoplasmiques acquièrent des corps lamellaires et des microvillosités (68). La proportion des cellules épithéliales de formes arrondies et dépourvues de corps lamellaires (cellules immatures souches ou "Stem cells") (figure 2) diminue significativement pour atteindre un taux négligeable à la fin du stade caniculaire. Parallèlement, le nombre de cellules alvéolaires intermédiaires "Intermediate cells" augmente légèrement, signant ainsi la formation des premières ébauches des sacs alvéolaires (Figure 2) (68)



**Figure 2: Changement de la proportion des cellules immatures alvéolaires et des cellules alvéolaires intermédiaires chez l'ovine durant la période de gestation jusqu'à 2 ans après naissance.** Cellules alvéolaires indifférenciées "souches" (Stem cells) (•), cellules alvéolaires intermédiaires (Intermediate cells) (◦) d'après (68). Les cellules alvéolaires immatures, (ou progénitrices ou souches) sont caractérisées histologiquement pour leur forme ronde, un cytoplasme riche en glycogène, l'absence de corps lamellaires. Les cellules intermédiaires sont un groupe hétérogène de cellules qui ont des caractéristiques d'AECI ou d'AECII.

### ***Stade sacculaire (110ème – 121ème jour de gestation)***

Ce stade débute avec la différenciation des cellules alvéolaires intermédiaires en AEC I et AECII (Figure 3 A). La formation des alvéoles se met en place par cloisonnement et la première apparition des protéines du surfactant SP-A, SP-B, SP-C et SP-D résulte de la maturation de des AEC. A la fin du stade sacculaire, le niveau d'expression des ARNm de SP-A, SP-B, SP-C et SP-D commence à augmenter de façon significative et maintient ce niveau d'expression élevé même après la naissance. (Figure 3 B).



**Figure 3: Développement des cellules alvéolaires ovines.** A: Ultrastructure des cellules alvéolaires intermédiaires et des AEC II chez le fœtus ovin. Les cellules intermédiaires présentent des noyaux aplatis, de longues extensions cytoplasmiques, corps lamellaires et microvillosités. Les AEC II de forme arrondie se caractérisent par des noyaux arrondis, des corps lamellaires et des microvillosités leur pôle apical. B: Variation de l'expression relative des ARNm des protéines A (SP-A), B (SP-B) et C (SP-C) du surfactant durant la période de gestation jusqu'à 2 ans après la naissance. Le cadre rouge désigne la période de surexpression des ARNm SP-A, SP-B et SP-C Adapté de (68).

### **Stade alvéolaire (122<sup>ème</sup> – la naissance)**

Contrairement à l'homme, où le développement pulmonaire continue 2 ans après la naissance, au-delà du 130<sup>ème</sup> jour de gestation, il n'y a plus de multiplication alvéolaire chez l'agneau. A la naissance, les cellules intermédiaires alvéolaires disparaissent et les alvéoles maintiennent des taux cellulaires constants de ~ 45% de AECI de forme allongées et ~ 55% de AECII de forme arrondie et riches en corps lamellaires, dès 2 semaines d'âge et jusqu'à la mort de l'animal (68) (Figure 4).

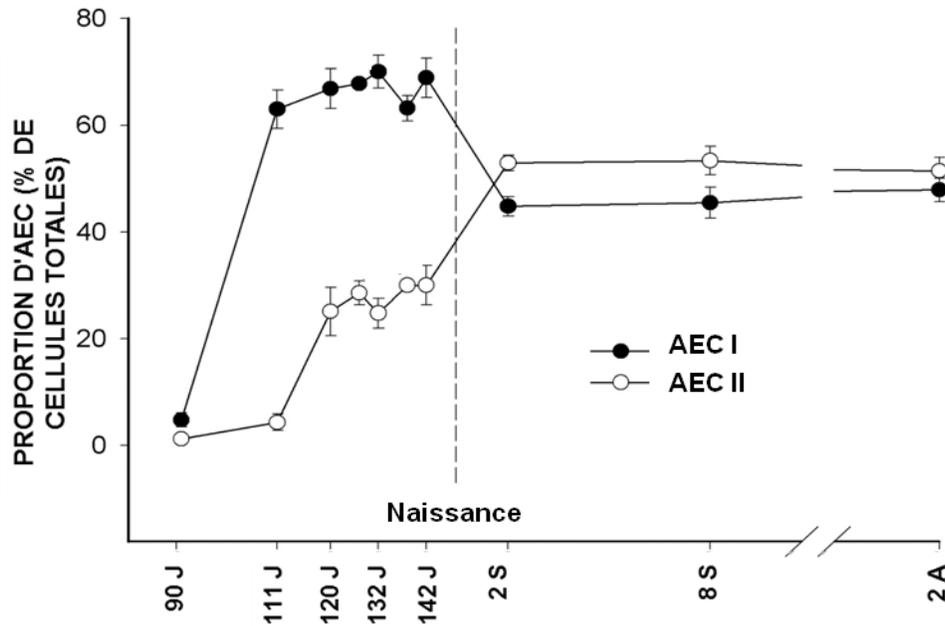


Figure 4: Changement de la proportion des AECI et les AECII chez l'ovine durant la période de gestation jusqu'à 2 ans après naissance. AEC: Alveolar Epithelial Cells, AECI (●), AECII (○) d'après (68).

## I.2. INITIATION MOLECULAIRE DU DEVELOPPEMENT PULMONAIRE

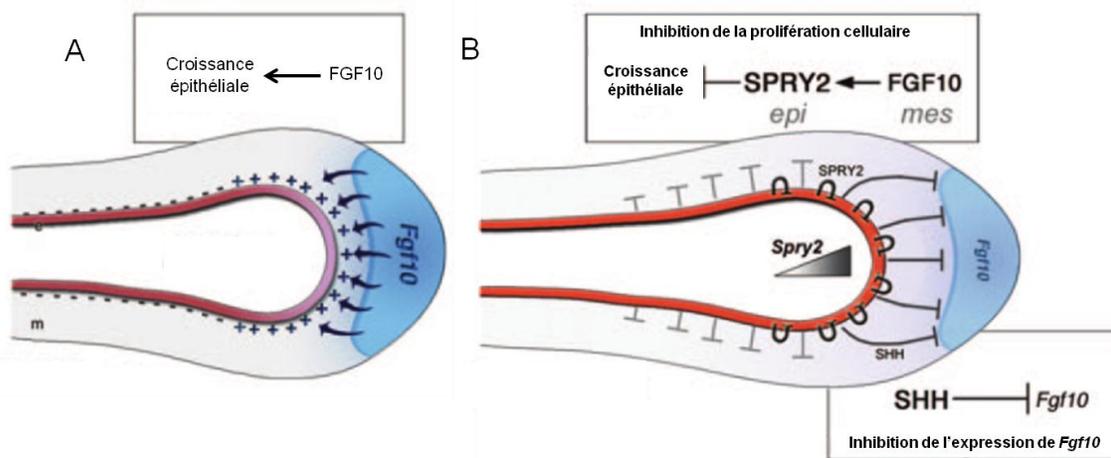
La morphogenèse de l'appareil respiratoire résulte d'une activité cellulaire contrôlée par un mécanisme moléculaire complexe. Le branchement correct, la vascularisation et la différenciation des cellules souches pulmonaires dérivent de l'interaction de multiples facteurs moléculaires tels que les protéines FGF10 (Fibroblast Growth Factor 10), SHH (Sonic Hedgehog), SPRY2 (Sprouty homolog 2 drosophila) et WNT (Wingless type).

### I.2.A. LE COMPLEXE FGF10/ SPRY2

La protéine FGF10 est un membre de la famille des FGF. Elle joue un rôle essentiel dans la formation, l'orientation et la croissance pulmonaire chez les mammifères. Elle est produite par les cellules mésenchymateuses distales du bourgeon pulmonaire au cours du développement. FGF10 agit sur les cellules épithéliales pulmonaires *via* le récepteur membranaire FGFR2B (Fibroblast Growth Factor Receptor 2 b) et induit leur prolifération. Elle induit aussi le branchement du bourgeon et contrôle sa direction de croissance. La délétion des 2 allèles de *FGF10* ou l'inhibition de son récepteur FGFR2B empêchent le développement pulmonaire

murin (174, 201). L'augmentation de la production de FGF10 augmente le branchement et les jonctions anarchiques chez les souris (15).

SPRY2 (Sprouty Homolog 2) est sécrété par les cellules épithéliales et inhibe l'action de FGF10 (85, 139). Chez la souris, l'augmentation de la production de SPRY2 entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et aboutit à la formation de petits poumons; alors que la diminution de sa production est à l'origine d'un nombre plus important de branchements (figure 5) (225).

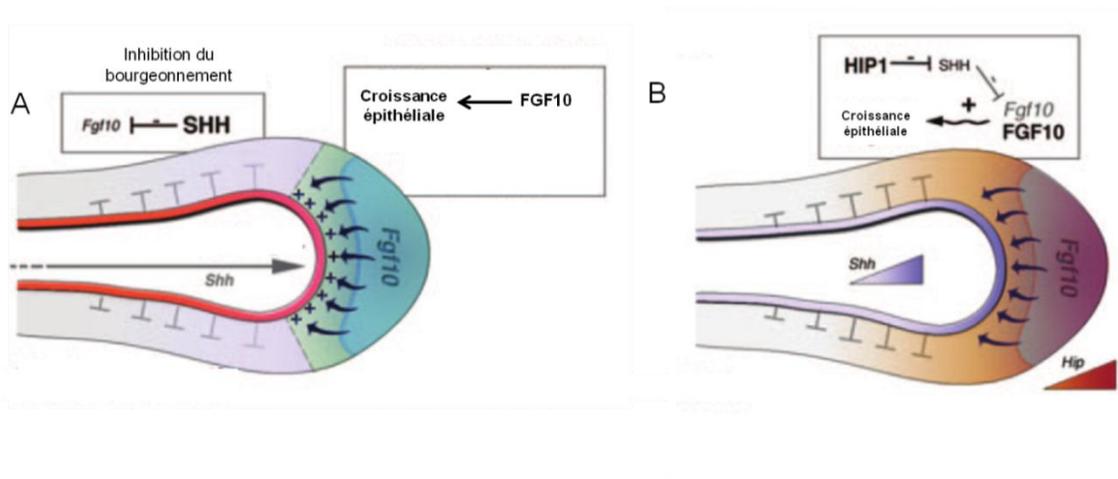


**Figure 5: L'action du complexe Fgf10/SPRY2 sur le développement pulmonaire.** A: *Fgf10* est activé dans les cellules mésenchymateuses et la protéine FGF10 induit la prolifération de l'épithélium pulmonaire (+). B: *Spry2* est activé dans les cellules épithéliales et la protéine SPRY2 inhibe l'action de *Fgf10* (adapté de (243)). Rouge: Epithélium pulmonaire. Bleu: localisation des cellules mésenchymateuses sécrétant Fgf10.

### I.2.B. LE COMPLEXE SHH/HIP

Chez les vertébrés et les invertébrés, la voie de signalisation SHH (Sonic HedgeHog) contrôle la localisation, le moment de la prolifération ainsi que la différenciation cellulaire au cours de l'embryogénèse. La protéine SHH est sécrétée par les cellules épithéliales pulmonaires et agit sur les cellules mésenchymateuses *via* le récepteur PTCH (Patched) (234). La fixation de SHH sur PTCH conduit à la dé-répression de la protéine SMO (Smoothened, frizzled family receptor), normalement inhibée par Ptc (102). L'activation de Smo entraîne une cascade de signalisation intracellulaire et aboutit à l'importation de la protéine Gli1 (Glioma-associated oncogene family zinc finger 1) dans le noyau. Le facteur de transcription Gli1, active l'expression de gènes cibles tels que *FOXF1* (Forkhead box L1) impliqué dans la prolifération des cellules du mésenchyme pulmonaire. La surexpression de *SHH* sous contrôle du promoteur

de SP-C conduit à l'absence d'alvéoles fonctionnelles ainsi qu'à une augmentation du tissu interstitiel mésenchymateux chez la souris (172). La délétion de *SHH* conduit à une trachée qui ne se sépare pas de l'œsophage (172). La protéine SHH augmente la prolifération des cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales. SHH inhibe la transcription du gène *FGF10* impliqué dans la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires. La délétion d'un allèle de *SHH* induit une expression diffuse de FGF10 dans tout le mésenchyme pulmonaire et un développement anarchique de l'épithélium (Figure 6) (172). La protéine HIP (Hedgehog interacting Protein), produite sous l'activation de Gli1, contrôle SHH. Elle inhibe l'action de Gli1 permettant de nouveau à FGF10 d'être reproduite par les cellules mésenchymateuses et d'être reçue par l'épithélium de façon coordonnée (41).

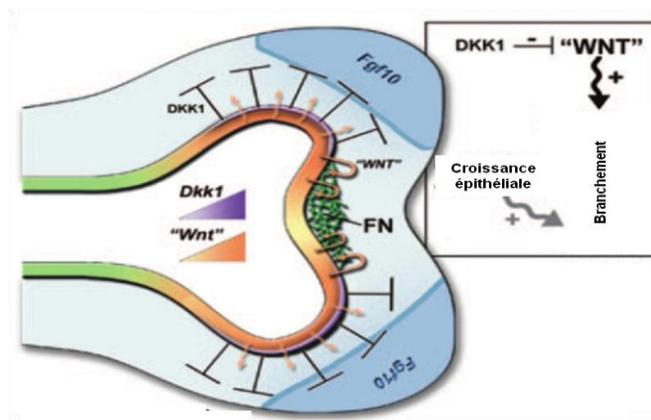


**Figure 6: Action du complexe SHH/HIP1 sur le développement pulmonaire.** A: SHH est sécrétée par les cellules épithéliales et inhibe la transcription de *Fgf10*. B: La protéine HIP inhibe la voie SHH et réactive l'action de la protéine FGF10 (adapté de (243)).

### I.2.C. LA VOIE DE SIGNALISATION WINGLESS TYPE

Les voies WNT (Wingless type) sont impliquées dans l'embryogenèse et la morphogenèse. Elles jouent un rôle majeur dans la programmation cellulaire notamment lors de la formation de l'appareil respiratoire. Ces voies sont complexes et l'ensemble de leur rôle physiologique est encore loin d'être déchiffré. Deux voies ont été décrites : la voie canonique qui joue un rôle important dans le destin des cellules souches des différents organes et la voie non canonique qui intervient dans la polarité et les mouvements cellulaires (114). L'activation de la voie canonique débute par la fixation d'un ligand de la famille WNT sur les récepteurs transmembranaires "Frizzled" et LRP (low density lipoprotein receptor-related protein).

Lorsqu'un ligand Wnt interagit avec ces deux corécepteurs, il y a inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, induisant son accumulation dans le cytoplasme. Celle-ci est transportée dans le noyau pour s'associer avec des protéines de la famille des facteurs de transcription LEF/ TCF (Lymphoid Enhancer binding Factor/ Transcription factor) et permet l'activation des gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation (114). Une mutation induite dans le gène *WNT7b* (Wingless type 7b) de la lignée germinale murine au cours du développement pulmonaire entraîne des troubles respiratoires liés à l'hypoplasie des poumons et est associée à une baisse de la prolifération du mésenchyme ce qui induira la mort des souriceaux après la naissance (206). *WNT5a* empêche l'action de FGF10 et la délétion du gène *WNT5a* induit une prolifération anormale de l'épithélium respiratoire, un rétrécissement du mésenchyme interstitiel ainsi qu'un mauvais embranchement pulmonaire (126). L'inactivation du gène de la  $\beta$ -caténine ou *CTNNB* (catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa) chez des souris KO induit une réduction sévère du nombre d'alvéoles et entraîne leur mort à la naissance (155). La voie canonique WNT, sous le contrôle de DKK1 (Dickkopf-related protein 1) participe donc au développement équilibré du mésenchyme et de l'épithélium et au branchement correct au cours de l'embryogenèse (Figure 7).



**Figure 7: L'action de la voie WNT sur le développement et le branchement pulmonaire.** Un arrêt de la sécrétion de la protéine Dkk1 (Dickkopf-related protein 1) qui est essentiellement un inhibiteur de la voie WNT induit la sécrétion des protéines Wnt par les cellules mésenchymateuses et le branchement du bourgeon pulmonaire suite à la production de fibronectine (FN) au centre de la partie distale (adapté de (243))

#### I.2.4. AUTRES GENES IMPLIQUES DANS LA MORPHOGENESE DU POU MON

De nombreux autres gènes interviennent dans le processus de la morphogénèse du poumon mais leur rôle reste peu connu. La protéine BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) est sécrétée par les cellules épithéliales. Elle est régulée par la protéine FGF10 (101) et agit

rétroactivement en inhibant la sécrétion de Fgf10. BMP4 pourrait donc avoir un rôle d'inhibition de la croissance épithéliale (245). L'EGF (Epidermal Growth Factor) est l'un des facteurs de croissance essentiel dans le branchement du poumon (149). Il est exprimé par l'épithélium et le mésenchyme distal du bourgeon alvéolaire. La délétion de son récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) induit une réduction de 50% du branchement (243).

La famille des TGF- $\beta$  (Transforming Growth factor beta) comprend les trois protéines TGF- $\beta$ 1,2 et 3 toutes exprimées dans le poumon embryonnaire (171). La surexpression de TGF- $\beta$ 1 inhibe le branchement du poumon durant l'embryogenèse (202). L'inhibition du récepteur de type 2 de TGF- $\beta$ , conduit à une augmentation du nombre de branches formées (265). La délétion de *TGF- $\beta$ 3* chez la souris entraîne un retard du développement pulmonaire et la mort précoce à la naissance (110).

## II. HISTOLOGIE DE L'ÉPITHÉLIUM RESPIRATOIRE

Les propriétés morphologiques et physiologiques des cellules formant l'épithélium respiratoire varient selon leur emplacement (27) (Figure 8).

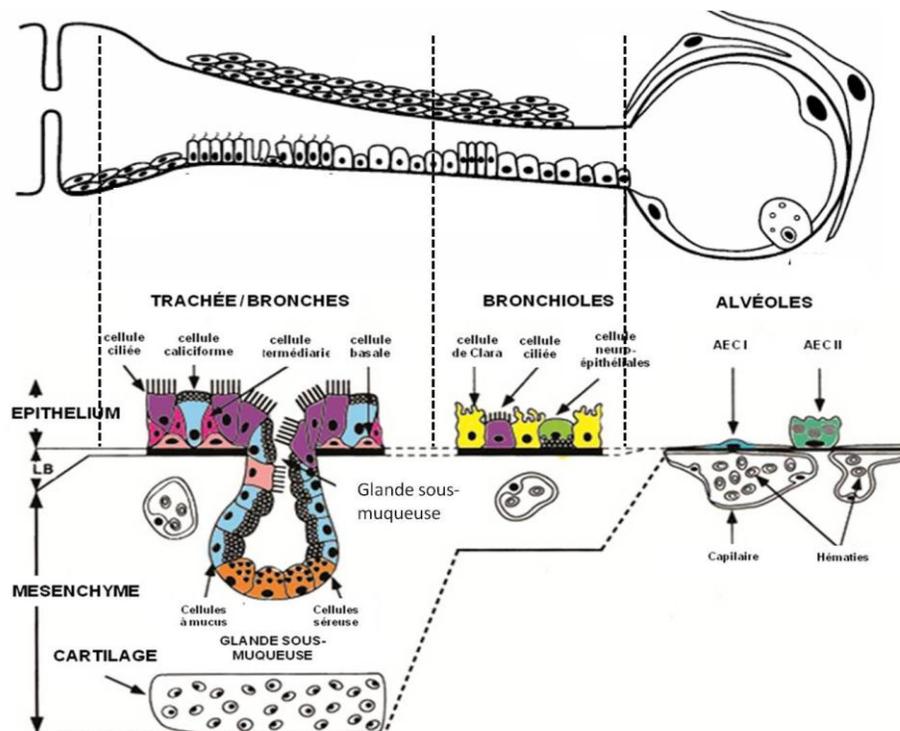


Figure 8 : Représentation de l'épithélium de surface bordant les voies aériennes humaines (adapté de [72]).

## II.1. L'ÉPITHÉLIUM TRACHÉO-BRONCHIQUE

Depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles, l'épithélium respiratoire comprend un épithélium de surface en contact avec l'air inhalé et un épithélium glandulaire situé dans la sous-muqueuse respiratoire et relié à la lumière des voies aériennes par des canaux collecteurs renfermant l'épithélium canalaire. L'épithélium trachéo-bronchique ou pseudo-stratifié présente des cellules à noyaux stratifiés (145). Chez la majorité des mammifères, cet épithélium est composé de plusieurs types cellulaires ancrés à la membrane basale:

- Les **cellules ciliées** sont les plus nombreuses. Leur pôle apical est riche en mitochondries qui apportent l'énergie nécessaire aux battements ciliaires. La synchronisation des battements ciliaires aide au déplacement du mucus respiratoire vers le pharynx (210).
- Les **cellules sécrétoires ou caliciformes** ont comme rôle principal la sécrétion des mucines et la production des protéines à activité antibactérienne telles que les IgA sécrétoires (81).
- Les **cellules intermédiaires** sont des cellules qui se divisent pour donner des cellules ciliées et des cellules sécrétoires (50).
- Les **cellules basales** sont capables de se différencier en cellules intermédiaires et sont impliquées dans la régénération des cellules ciliées et sécrétoires (50) .
- Les **cellules canalaire**s sont les cellules des glandes sous-muqueuses. Elles sont majoritairement ciliées et permettent la propulsion des sécrétions glandulaires vers le liquide de surface (24).
- Les **cellules séreuses** présentent un cytoplasme riche en granules renfermant du lysozyme (90), de la transferrine (26) et de l'anti-leucoprotéase (70). Elles sécrètent des mucines neutres sulfatées (119) et des substances non muqueuses lipidiques (214). Elles jouent un rôle important dans l'immunité innée en sécrétant des facteurs antibactériens et du mucus impliqués dans le maintien du fonctionnement pulmonaire normal au niveau de la lumière des voies aériennes.
- Les **cellules myoépithéliales** entourent les glandes sous-muqueuses. Elles favorisent l'expulsion des sécrétions glandulaires depuis les tubes collecteurs vers la lumière des voies aériennes par la pression qu'elles exercent sur les glandes. Ces cellules sont de forme allongée et sont positionnées à la base de l'épithélium glandulaire en contact avec

la lame basale. Elles expriment la cytokératine 14 caractéristique des cellules épithéliales basales et l' $\alpha$ -actine caractéristique des fibres musculaires lisses (215).

- Les **cellules neuroendocrines** se distinguent par la présence de molécules biologiquement actives comme la sérotonine, la calcitonine, le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), la chromogranine A, la GRP (Gastrin Related Peptide) et la bombésine. Cette dernière est impliquée dans le tonus vasculaire et musculaire bronchique, la sécrétion du mucus et l'activité ciliaire (178, 248). Les peptides et les amines sécrétés par les cellules neuroendocrines jouent un rôle déterminant dans le développement fœtal en modulant la morphogenèse branchée (127, 220).

## II.2. L'EPITHELIUM BRONCHIOLAIRE

L'épithélium qui tapisse les bronchioles est dépourvu de cellules caliciformes mais présente de rares cellules basales, ciliées et neuroendocrines. Cet épithélium est composé essentiellement de cellules en dôme dites **cellules de Clara** (Figure 8). Les cellules de Clara sont non ciliées, de forme ovale chez l'homme et irrégulière chez les autres espèces notamment chez l'ovin (177). Leur noyau est basal et leur pôle apical présente des microvillosités. Ces cellules sont riches en cytochrome P450, une hydroxylase catalysant l'oxydation des composés organiques et participant à la détoxification des xénobiotiques (34, 250). Les cellules de Clara sécrètent une utéroglobine, nommée SCGB1A1 (secretoglobine, family 1A, member 1) chez l'humain et le lapin et CCSP (Clara Cell Secretory Protein) ou CC10 (Clara Cell 10 kDa) chez la souris, le rat ou l'ovin. Cette protéine joue un rôle anti-inflammatoire (150, 207, 244) *via* son potentiel rôle d'inhibiteur de la phospholipase A2 (140). Les cellules de Clara sécrètent également les protéines A, B et D du surfactant alvéolaire (236).

## II.3. L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE

L'épithélium alvéolaire est constitué d'**AEC I** et d'**AEC II** (Figure 8). Les AEC I sont des cellules larges et très aplaties (50 à 100 $\mu$ m de diamètre) couvrant environ 95% de la surface épithéliale alvéolaire (217). Ces cellules ont été initialement décrites comme biologiquement inactives, totalement différenciées et impliquées dans le passage d'air passif vers les capillaires (217). Mais la présence des mitochondries, d'un appareil de Golgi important, de nombreuses vacuoles et des *microvilli* montre que ces cellules sont métaboliquement actives (79). Elles sont impliquées dans le maintien du fluide de surface et dans le transport actif d'eau et d'ions à travers des canaux sodiques ENaC (Epithelial Na Channel) présents à leur membrane (107). Il a été montré que les AEC I isolés des alvéoles de rats présentent une plasticité *in vitro* et sont

capable d'exprimer SP-C, CC10 et OCT4 ce qui suggère leur possible rôle dans la réparation de l'épithélium alvéolaire *in vivo*. (79).

Les AEC II sont des cellules de forme cubique ne présentant pas d'extensions cytoplasmiques. Elles occupent 5% de la surface alvéolaire et constituent 63% de la population épithéliale alvéolaire chez l'homme (65) et 55% chez l'ovine (68). Le pôle apical des AEC II présente des microvillosités entourant une zone centrale lisse. Leur cytoplasme est riche en organites et contient un réticulum endoplasmique et un appareil de golgi surdéveloppés, signe d'un métabolisme très actif. Les AEC II se caractérisent par la présence de corps lamellaires situés à proximité des pôles apicaux et occupant 10% du volume de ces cellules. Ce sont des compartiments de stockage intracellulaire du surfactant pulmonaire avant sa sécrétion dans la lumière alvéolaire (252).

L'épithélium bordant les voies respiratoires de la trachée jusqu'aux alvéoles constitue une zone de défense contre les différents polluants et les agressions microbiennes, chimiques et mécaniques. Son homéostasie et le maintien de sa composition cellulaire résultent de la présence de différentes niches de cellules souches adultes et de cellules progénitrices, douées toutes les deux d'une capacité d'auto-renouvellement et de maintien des différents types cellulaires.

### III. LES CELLULES SOUCHES ET LEUR CLASSIFICATION

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de s'auto-renouveler afin de maintenir leur population. Elles produisent des cellules spécialisées qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifique dans le tissu (71, 138). Les cellules souches se divisent soit symétriquement pour donner des cellules souches filles identiques, soit asymétriquement pour donner des cellules souches et des cellules progénitrices plus différenciées. Les cellules progénitrices peuvent s'engager dans une ou plusieurs voies de différenciation. Elles peuvent donner naissance soit directement à des cellules différenciées soit à d'autres cellules progénitrices qui ultérieurement vont se différencier et se spécialiser dans un tissu donné. Les cellules progénitrices ou cellules d'amplification transitoire prolifèrent de façon limitée et participent aux réparations tissulaires après lésions (204). Selon leur capacité de différenciation, on distingue les cellules souches **totipotentes** issues des premières divisions d'un œuf fécondé ou zygote au stade morula 8 cellules. Elles sont nommées blastomères et sont à l'origine des cellules des trois feuilletts embryonnaires: l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme ainsi que

du placenta. Elles sont capables de former un être vivant complet. Les cellules souches **pluripotentes** sont les cellules de l'embryon au stade blastocyste 40 cellules. Elles peuvent s'auto-renouveler et générer tous les tissus d'un organisme mais ne peuvent pas seules être à l'origine de l'être vivant. Les cellules **multipotentes** regroupent les cellules souches tissulaires du fœtus et de l'adulte. Elles sont capables de s'auto-renouveler, présentent un potentiel de différenciation plus limité que celui des cellules souches pluripotentes et s'engagent dans une voie de différenciation tissulaire spécifique. Enfin, les cellules souches **unipotentes** ne donnent naissance qu'à un type unique de cellules différenciées à un stade terminal.

Parmi les cellules souches on distingue les cellules souches embryonnaires, les iPS et les cellules souches adultes.

### III.1. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Les premières cellules souches embryonnaires pluripotentes apparaissent au stade morula, postérieur aux premières divisions du zygote. Au stade blastula, un blastocyste est formé d'un trophoctoderme enveloppant une sphère de cellules souches embryonnaires pluripotentes. Ces cellules génèrent l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Les premières études datent de 1981, avec la dérivation *in vitro* de cellules souches embryonnaires isolées de blastocystes de souris qui injectées aux souris induisaient la formation de tératocarcinomes (141). Des cellules souches embryonnaires humaines ont été isolées en 1998 (227), elles étaient capables de se maintenir jusqu'à deux ans, avec plus de 300 doublements *in vitro* tout en conservant un phénotype indifférencié (161). Les cellules souches embryonnaires humaines sont capables de former une multitude de types cellulaires comme des cellules nerveuses (183), ou des dérivés différenciés des trois feuilletts germinaux (5, 183, 227) comme les cellules osseuses, les cellules musculaires lisses et striées (227).

Les cellules souches embryonnaires expriment des gènes impliqués dans la pluripotentialité tels que les facteurs de transcription *OCT4* (Octamer binding factor 4), *NANOG* (Nanog homeobox), *SOX2* (Sry-related high mobility group box -2), *FOXD3* (Forkhead box D3), *ZFP42* (Zinc Finger Protein 42), le récepteur du *TDGF1* (Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1) ou le facteur de croissance *GDF3* (Growth Differentiation Factor-3) (173). Elles peuvent être également caractérisées par l'activation de la phosphatase alcaline, de la télomérase et par l'expression des gènes *SSEA-3* et *4* (Stage-Specific Embryonic Antigens 3 and 4) ou *MHC-1* (Major Histocompatibility Complex 1) (216). La pluripotence des cellules

souches embryonnaires chez l'homme est d'intérêt pour le développement de la médecine régénérative (54). Cependant, leur utilisation thérapeutique pose des problèmes d'ordre éthique lié à l'utilisation d'embryons humains <sup>1</sup> et d'innocuité lié à leur fort potentiel mitogène et tumorigène, augmentant le risque tumoral après implantation (141).

### III.2. LES IPS

Il est possible de générer des cellules souches pluripotentes semblables aux cellules souches embryonnaires par reprogrammation génétique de cellules somatiques. Ce procédé permet de générer des cellules pluripotentes à partir des cellules d'un individu pour la réparation de ses tissus endommagés. C'est aussi une voie de production *in vitro* d'un répertoire de tissus normaux et pathologiques permettant d'en étudier les caractéristiques physiologiques et biologiques (167).

Les gènes *OCT4* et *SOX2* sont impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (10, 159). Les gènes *MYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) et *KLF4* (Kruppel-Like Factor 4) sont surexprimés dans de nombreuses tumeurs et contribuent à l'auto-renouveaulement et la prolifération des cellules souches embryonnaires (33, 131). L'introduction de ces quatre gènes dans des cellules somatiques murines induit leur reprogrammation en cellules souches pluripotentes induites (33, 131). Les cellules générées à partir de cellules embryonnaires ou fibroblastiques murines ont été nommées iPS (induced Pluripotent Stem cell). Elles présentent des caractéristiques morphologiques et des capacités de prolifération et d'expression de gènes de cellules souches embryonnaires, tels que *OCT 4*, *NANOG*, *SOX2*, *SSEA-1*... (224).

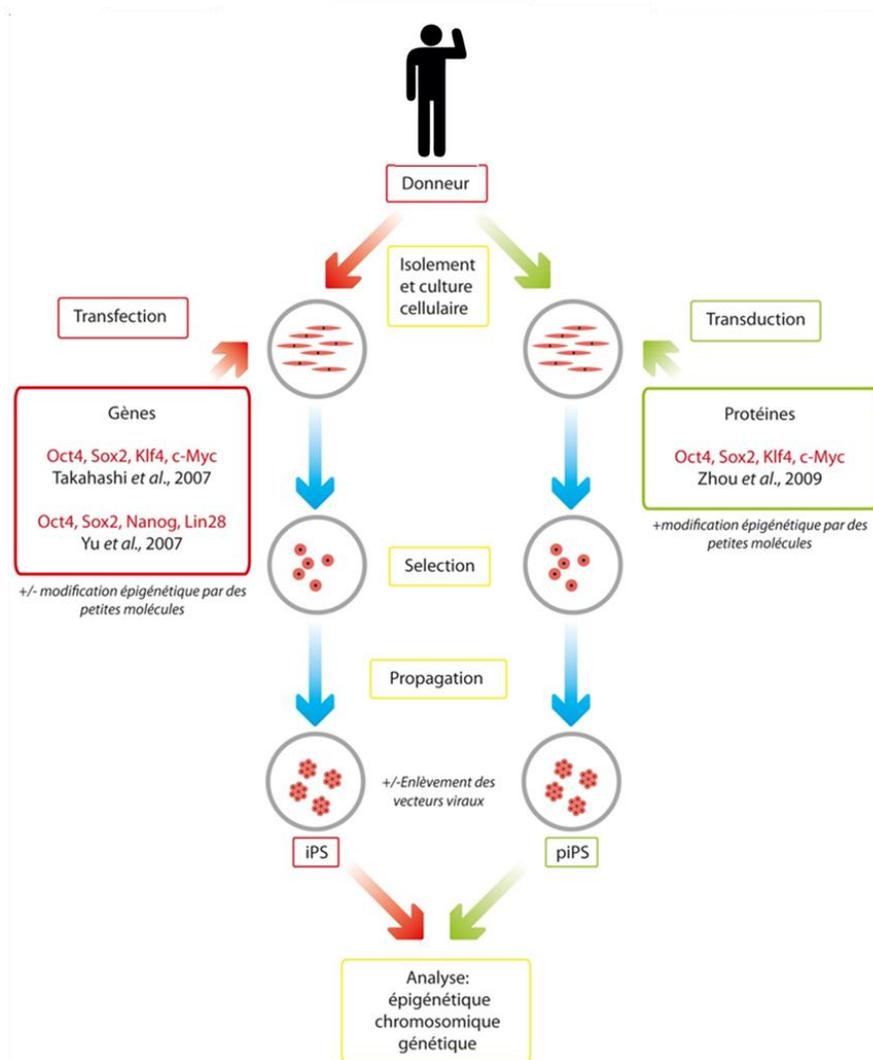
Les premiers clones d'iPS humaines ont été obtenus à partir de fibroblastes humains par l'introduction soit des gènes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *LIN28* (lin-28 homolog) (261) soit des gènes *OCT4*, *Klf4*, *SOX2* et *MYC* (223). Les iPS humaines ainsi obtenues sont analogues aux cellules souches embryonnaires humaines en termes de morphologie, de prolifération, d'activité de la télomérase, d'expression de la phosphatase alcaline et des protéines telles que *SSEA-1*, *SSEA-3*, *SSEA-4*, *TRA -1-60* (Tumor-Related Antigen 1-60), *TRA -1-81* ou *NANOG* (223).

La suppression de transcription du gène *P53* par shRNA (short Hairpin RNA) induit la reprogrammation de 10% de fibroblastes murins en iPS *in vitro* (93). Alors que la

---

<sup>1</sup> Pour information <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics/064000623/index.shtml>

reprogrammation totale *in vitro* des fibroblastes murins et humain ainsi que des lymphocytes T humains en iPS nécessite la surexpression des trois gènes *OCT4*, *SOX2* et *KLF4* par transfection associés à la suppression de l'activité de P53 (93).



**Figure 9: Obtention des cellules souches pluripotentes induites (iPS).** L'introduction dans des cellules humaines des facteurs de reprogrammation a été réalisée par transfection de vecteurs rétroviraux portant les gènes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* et *C-MYC* ou *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *LIN28*. La sélection puis la propagation des cellules reprogrammées sont nécessaires pour générer des iPS. Une autre méthode d'obtention de cellules reprogrammées est l'introduction directe des protéines recombinantes Oct4, Sox2, Klf4 et C-Myc. piPS, protein-induced pluripotent stem cells. (adapté de (194)).

Une autre méthode de transformation de fibroblastes humains en iPS est l'utilisation de facteurs chimiques permettant la modulation du statut épigénétique des cellules tels que l'acide valproïque, un inhibiteur des histones désacétylases. Ainsi la reprogrammation des fibroblastes humains traités à l'acide valproïque serait faisable par transfection seulement des deux gènes de transcription *OCT4* et *SOX2*, éliminant ainsi le risque tumorigène induit par *MYC* et *Klf4* (99) (Figure 9).

De même, les cellules souches pluripotentes peuvent être directement induites par les protéines recombinantes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* et *MYC* qui sont capables de pénétrer le cytoplasme des cellules somatiques. Les cellules ainsi générées sont nommées piPS (protein induced Pluripotent Stem cells). Des piPS obtenues à partir de fibroblastes différenciés d'embryon de souris ont acquis des propriétés d'auto-renouveaulement et de différenciation pluripotent *in vitro* et *in vivo* (266).

### **III.3. LES CELLULES SOUCHES ADULTES**

Les cellules souches adultes assurent l'homéostasie c'est-à-dire le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu en remplaçant les cellules mortes naturellement ou après une lésion et en assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe durant la vie de l'individu. Elles doivent répondre à deux critères biologiques que sont l'auto-renouveaulement et la capacité à se différencier.

#### **III.3.A NOTION DE NICHES DES CELLULES SOUCHES ADULTES**

Le microenvironnement local ou niche affecte directement le comportement des cellules souches tissulaires [161]. Des facteurs environnementaux sont connus pour influencer la survie, la quiescence, l'auto-renouveaulement 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 [161, 162]. Ainsi, les niches sont des structures hautement dynamiques, très régulées et présentes en nombre limité.

Les cellules souches adultes ont été décrites dans l'épiderme (191), le système nerveux central (72), l'intestin (23), les os (20), le foie (257), le pancréas (179), le muscle lisse, le muscle squelettique (182), le muscle cardiaque (122), les glandes mammaires (51), la cornée (146), les glandes salivaires (166), les tendons (197), la membrane synoviale (47), la pulpe dentaire (82),

le thymus (17), le cartilage (190), le tissu adipeux (269), l'épithélium amniotique (164) et l'épithélium pulmonaire (111). Ces cellules sont très rares: de 1 à 1,5 cellules/ 10000 dans la moelle osseuse (246), de 1 à 2 cellules/ 10000 dans le poumon fœtal humain (111), de 1/ 6000 dans les bronchioles et de 1/ 30000 dans les alvéoles d'un individu adulte (111).

### **III.3.B PLASTICITE DES CELLULES SOUCHES ADULTES**

Les cellules souches adultes, définies par leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, ont été initialement considérées comme spécifiques aux organes. Mais, au cours des dix dernières années de nombreuses études ont rapporté la capacité de trans-différenciation de divers types cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent se trans-différencier en cellules épidermiques, épithéliales pulmonaires (56), intestinales (251), rénales (128), hépatiques (247), musculaires (66) ou endothéliales (212)... Les cellules souches musculaires ou du système nerveux central sont capables de se trans-différencier en cellules de la lignée sanguine (239).

Cependant, le concept de trans-différenciation est partiellement remis en cause puisque dans certains cas, il existe un phénomène de fusion d'une cellule souche exogène avec une cellule différenciée (226, 254). Chez la souris, la co-culture des cellules souches embryonnaires et de cellules nerveuses aboutit à la formation de cellules hybrides tétraploïdes exprimant des marqueurs spécifiques aux cellules nerveuses et présentant les caractéristiques d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches embryonnaires (259). Le mécanisme de fusion cellulaire pourrait constituer un moyen de réparation des tissus lésés.

### **III. 4. LES CELLULES SOUCHES TUMORALES**

Actuellement, deux modèles majeurs de propagation des tumeurs qui ne sont pas mutuellement exclusif sont décrits: le modèle d'évolution clonale aléatoire et le modèle des cellules souches tumorales définit comme hiérarchique (31). Le modèle d'évolution clonale propose qu'une seule cellule soit à l'origine de la tumeur. La progression tumorale serait ainsi due à la variabilité génétique acquise au sein du clone original permettant une sélection des cellules les plus agressives (160). Le modèle des cellules souches tumorales définit comme hiérarchique est basé sur l'hypothèse que les cellules tumorales seraient hétérogènes au sein des tumeurs et que seul le sous-ensemble des cellules souches présenterait la capacité de proliférer et à former de nouvelles tumeurs (31, 249). Des données récentes suggèrent qu'une sous-population relativement rare de cellules souches tumorales présente la capacité unique d'initier et d'induire la propagation tumorale (238). Ces cellules ont été identifiées et isolées

dans diverses tumeurs (2, 43, 88, 209) dont les cancers pulmonaires (61) et sont définies comme les cellules cancéreuses possédant la capacité de donner naissance à des tumeurs *in vitro* et *in vivo*. Les cellules souches tumorales présentent des caractéristiques communes aux cellules souches embryonnaires et aux cellules souches adultes dont l'auto-renouveaulement et la capacité de différenciation multipotente (109, 136). L'auto-renouveaulement des cellules souches tumorales entraîne la formation de tumeurs et leur différenciation contribue à l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une tumeur (31, 249).

Les populations de cellules souches tumorales sont établies dans des niches spécifiques qui contrôlent normalement la régénération, l'entretien et la réparation des tissus (199). Ces cellules semblent dériver de cellules souches normales qui ont acquis les mutations leur permettant d'échapper au contrôle de leur niche. Les niches des cellules souches tumorales sont capables de moduler le pouvoir de prolifération de ces cellules en favorisant leur division symétrique et donc l'expansion des tumeurs. La voie EGFR jouerait un rôle dans la prolifération anormale de ces cellules (268). La surexpression d'EGFR dans les cellules souches tumorales corrèle avec l'expansion des tumeurs (268). L'inhibition de l'activité de la tyrosine kinase de l'EGFR entraîne la régression des tumeurs et favorise la division asymétrique des cellules souches tumorales en cellules tumorales ce qui présente un modèle préclinique pour l'élimination des niches de cellules souches (268).

L'expansion tumorale pourrait résulter d'altérations des cellules souches ou de leur niche. L'altération des cellules souches pourrait induire l'arrêt de leur auto-renouveaulement au sein de leurs niches spécifiques et activer des niches alternatives de cellules souches pour induire un cancer. Une niche de cellules vasculaires par exemple, semble contribuer à la formation de certaines tumeurs du cerveau en initiant la génération de cellules souches tumorales et leur prolifération (29, 144). Les cellules vasculaires contrôlent le gradient d'O<sub>2</sub> au sein des niches tumorales (170). Le mécanisme de ce contrôle reste inconnu, mais la disponibilité d'O<sub>2</sub> présente un rôle direct dans la régulation des cellules souches par le biais de la modulation d'*HIF-1α* (Hypoxia Inducible Factor 1, alpha subunit) de la voie Wnt / β-caténine (144). La modulation d'*HIF-1α* entraîne l'activation de cette voie et l'expression de la β-caténine et des effecteurs LEF-1 (Lymphoid Enhancer Factor-1) et TCF-1 (T-Cell Factor-1) (144). Donc, si les cellules souches tumorales dépendent du microenvironnement des niches de cellules souches normales voisines alors ces niches normales pourront être des cibles potentielles pour le traitement des tumeurs.

Les cellules souches tumorales du cancer du sein dans des modèles *in vitro* sont résistantes aux radiations (48) et à la chimiothérapie (130) ce qui pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la récurrence des tumeurs. Ces résultats suggèrent que les différents traitements peuvent ne pas être très adéquats pour l'éradication des cellules souches tumorales *in vivo* (13). Une hypothèse propose que l'ADN de cellules souches tumorales serait plus résistant aux traitements chimiques ou radiologiques que l'ADN de cellules différenciées (142, 264). Ces cellules souches tumorales présentent des capacités préférentielle de réparation de leur ADN après traitement (12). La réparation de l'ADN est activée par un complexe protéique « damaged DNA factor/ preincision complex » qui localise la zone endommagée et active le complexe ERCC1/XPF (Excision Repair Cross-Complementation Group 1/ Xeroderma Pigmentosum complementation group F). Ce complexe est responsable du déroulement de l'hélice de l'ADN et permet à l'ADN polymérase de re-synthétiser le fragment dégradé (142). Les traitements des tumeurs activent préférentiellement les points de contrôles de la réparation de l'ADN des cellules souches tumorales tout en activant les kinases ChK1 et ChK2 responsables de la mitose cellulaire (12).

Le modèle d'évolution clonale aléatoire des tumeurs à partir de plusieurs mutations aléatoires et sélections clonales n'est pas suffisant pour expliquer complètement la biologie des tumeurs. L'hypothèse de l'implication de cellules souches tumorales apporte d'autres éléments de compréhension du mécanisme de formation des tumeurs. La carcinogenèse implique l'acquisition et l'accumulation de mutations génétiques et épigénétiques se développant sur de nombreuses années. Les sous populations de cellules souches au sein des tumeurs semblent être un référentiel de sauvegarde de toutes ces mutations. L'auto renouvellement des cellules souches tumorales entraîne le maintien des mutations génétiques et la différenciation de ces cellules pourrait expliquer l'hétérogénéité des cellules cancéreuses (189).

### ***Marqueurs de cellules souches tumorales***

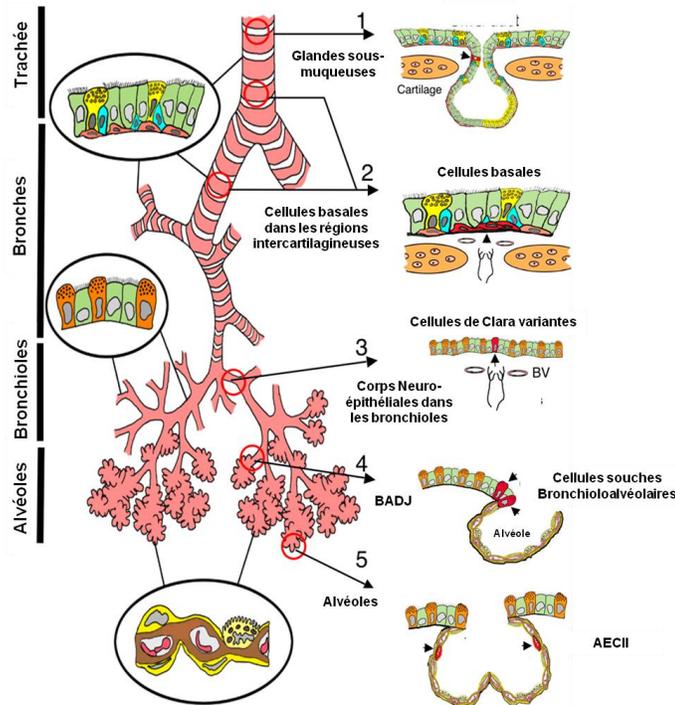
Certaines protéines cellulaires sont des marqueurs spécifiques permettant de caractériser les cellules souches tumorales. Parmi celles-ci, la molécule **CD34** est un antigène de surface exprimé par les cellules endothéliales et hématopoïétiques et est détecté dans plusieurs types de leucémie (195). La protéine CD44 est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire et l'activation de lymphocytes (8). Cette protéine est détecté dans les cancers du sein (2). La protéine **CD133 ou Prominine-1** est détectable dans un large spectre de cancer y compris les cancers pulmonaires (61, 229). CD133 est une protéine de surface jouant un rôle dans

l'activation et le maintien des cellules souches (262), ainsi que dans l'adhésion entre cellules (222). L'ALDH 1 (Aldehyde dehydrogenase 1 family), membre de la famille des ALDH qui métabolise une grande variété d'aldéhydes endogènes et exogènes (260) est fortement exprimée dans divers types de cellules souches et progénitrices tumorales (77, 98, 106, 108). Cette enzyme pourrait être utilisée comme un marqueur de certains types de cellules souches tumorales y compris dans les cancers pulmonaires (106).

#### **IV. LES CELLULES SOUCHES ET PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM PULMONAIRE**

L'épithélium des voies aériennes est soumis à des particules chimiques inhalées et à des agents pathogènes à l'origine de diverses inflammations comme la bronchite chronique, l'asthme et la BPCO (Bronchopneumopathie chronique obstructive)... Ces pathologies sont généralement associées à des changements dans l'organisation cellulaire et le remodelage de la structure épithéliale, voir dans certains cas à une dénudation complète de la membrane basale avec une altération de l'épithélium bordant les voies respiratoires (40).

Pour restaurer ses fonctions, l'épithélium respiratoire doit rapidement se réparer et régénérer sa structure. La régénération est un processus complexe qui se déclenche suite à une lésion. Des cellules épithéliales souches quiescentes et des cellules progénitrices s'activent pour couvrir la zone dénudée (59). Ces cellules migrent vers la zone de réparation et commencent à proliférer. Elles subissent une différenciation progressive afin de restaurer la fonction et les différents types cellulaires de la zone agressée (25, 59). Le mécanisme de régénération de l'épithélium respiratoire a été largement étudié chez la souris et le rat. Après lésion de leur épithélium bronchique, des foyers de cellules en prolifération active ont été observés aux alentours des canaux glandulaires présentant ainsi la première preuve de l'existence de niches de cellules souches au sein du poumon (25). L'observation de cellules dans les canaux glandulaires, les régions trachéo-bronchiques (42), inter-cartilagineuses (42), bronchiolaire (62, 94, 95) et bronchioloalvéolaires (112), retenant à long terme le marquage au bromodésoxyuridine (BrdU), suggère la présence de cellules souches maintenues à l'état quiescent au sein de certaines niches spécifiques dans le poumon (Figure 10).



**Figure 10 : Les niches des cellules souches dans l'épithélium pulmonaire murin.** 1) Cellules basales bordant les canaux des glandes de la sous-muqueuse. 2) Cellules basales de l'épithélium trachéo-bronchique dans les zones cartilage- intercartilage. 3) Cellules de Clara variantes dans les corps neuro- épithéliaux. 4) BASC au niveau des jonctions bronchioalvéolaires. 5) AEC II dans les alvéoles (Adapté de (135)).

## IV.1. LES CELLULES SOUCHES ET LES CELLULES PROGENITRICES DE L'ÉPITHÉLIUM

### TRACHEO-BROCHIQUES

L'étude des cellules souches et progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique révèle la contribution de deux types cellulaires distincts dans le maintien et le renouvellement de cette zone de l'arbre respiratoire. Après divers agressions de l'épithélium trachéo-bronchique par des agents chimiques tels que le polydocanol (24), l'ozone (63), le dioxyde d'azote (62, 63), le dioxyde de soufre (24) ou le naphtalène (218) ou par agression mécanique (205), les cellules basales et les cellules de Clara ont montré un potentiel de prolifération et de réparation de l'épithélium agressé.

#### IV.1.1. LES CELLULES BASALES

Des foyers de cellules basales exprimant les cytokératines 5, 14 et 18 bordent les canaux des glandes de la sous muqueuse au niveau de la trachée proximale et dans les zones cartilage-intercartilage et sont considérées comme niches de cellules souches au sein des voies aériennes trachéo-bronchiques murines (24). Expérimentalement, ces cellules retiennent le

marquage au BrdU pour une centaine de jours après la lésion de l'épithélium trachéo-bronchique et sont caractérisées de LRC (label-retaining cells). Cette capacité à retenir le BrdU est une caractéristique des cellules souches qui se divisent lentement et de façon illimitée (24). Chez des souris transgéniques exprimant la protéine EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur du gène de la cytokératine 5, les cellules basales trachéales exprimant la GFP, sont présentes dans les niches de LRC, et montrent une croissance clonale *in vitro* (200).

De même, après l'ablation des cellules de Clara par l'exposition de souris au naphthalène, les cellules basales s'activent, prolifèrent et sur-expriment la cytokératine 14. Au bout de 6 jours, la réapparition des cellules de Clara suggère la capacité de différenciation des cellules basales en cellules de Clara (95).

#### **IV.1.2. LES CELLULES SECRETRICES OU CELLULES DE CLARA**

Le rôle potentiel des cellules de Clara en tant que cellules progénitrices de l'épithélium trachéo-bronchique a été suggéré dès 1987 (96). Dans la trachée des souris, suite à la lésion des cellules ciliées par exposition au NO<sub>2</sub>, seules les cellules de Clara étaient capables de se diviser (64) et de contribuer à la réparation de l'épithélium trachéal murin en augmentant leur capacité de prolifération (180). Ces observations suggèrent que les cellules de Clara peuvent être des cellules progénitrices (180). Suite à l'induction expérimentale de lésions par le naphthalène, il a été montré que les cellules basales se différencient en cellules de Clara progénitrices multipotentes avec une diminution de l'expression de *TRP63* (Transformation Related Protein 63), *NGFR* (Nerve Growth Factor Receptor), *cytokératine 5* et une surexpression *cytokératine 8*. (192). Les cellules de Clara ainsi générées suite à la différenciation des cellules basales, prolifèrent et génèrent des cellules ciliées (147, 192). Ainsi, les cellules souches trachéo-bronchiques représentent une population de cellules basales qui s'auto-renouvellent et qui se différencient en cellules de Clara progénitrices chez la souris et l'homme (192).

#### **IV.2. CELLULES PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM BRONCHIOLAIRE**

La première mise en évidence d'une niche de cellules souches bronchiolaires a été rapportée chez la souris après induction de lésions bronchiolaires par le naphthalène (186). Une population résistante au naphthalène a été identifiée au niveau des corps neuro-épithéliaux bronchiolaires et était capable de s'activer, de proliférer et de restaurer l'épithélium

bronchiolaire (94, 186). Cette population résistante au naphtalène a été subdivisée en cellules de Clara variantes CCSP<sup>pos</sup> (186).

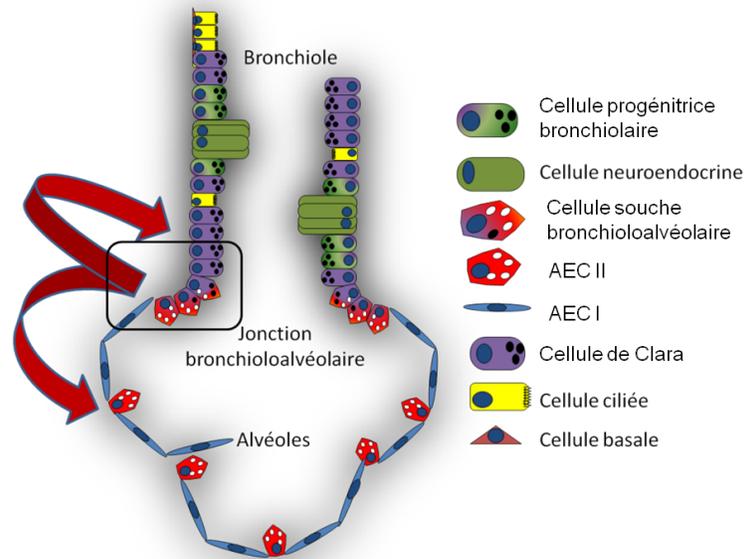
Il existe une population de cellules CCSP<sup>pos</sup> n'exprimant pas le cytochrome P450-2F2 et résistante au naphtalène (186). Le cytochrome P450-2F2 métabolise le naphtalène en produisant un composé hautement toxique induisant la mort des cellules P450-2F2<sup>pos</sup>. Il a été mis en évidence d'autre part, une population de cellules souches neuro-endocrines CCSP<sup>pos</sup>/CGRP<sup>pos</sup> (Calcitonin Gene Related Peptide) (186). D'autre part, certaines cellules ciliées initialement considérées comme différenciées se sont révélées aptes à s'étaler rapidement suite à la l'élimination des cellules de Clara par le naphtalène afin de maintenir l'homéostasie tissulaire (186). Ces cellules ciliées sur-expriment les gènes *β-catenine*, *FOXA2* (Forkhead box A2), *FOXJ1* (Forkhead box J1), *SOX17* (SRY (sex determining region Y)-box 17) et *SOX2* (SRY (sex determining region Y)-box 2), prolifèrent et se différencient en cellules de Clara et cellules ciliées participant ainsi au maintien de la barrière épithéliale (169).

L'épithélium bronchiolaire est donc maintenu par trois types de cellules: les cellules de Clara ou cellules d'amplification transitoire, les rares cellules souches bronchiolaires CCSP<sup>pos</sup>/CGRP<sup>pos</sup> localisées dans les corps neuro-endocrines et certaines cellules ciliées (74, 180).

### IV.3. CELLULES SOUCHES DE LA JONCTION BRONCHIOLO-ALVEOLAIRE

Divers travaux suggèrent une origine commune des cellules de Clara et des AEC II. L'existence de rares cellules de Clara présentant des corps lamellaires a été décrite chez les hamsters au niveau des jonction bronchio-alvéolaires (104). Une population de cellules épithéliales pulmonaires embryonnaires co-exprimant les protéines CCSP et SP-A et capable de générer des populations de cellules épithéliales bronchiolaires et alvéolaire a été mise en évidence chez la souris (253). En 2002, une niche de cellules souches a été observée au niveau de la jonction bronchio-alvéolaire (75). Ces cellules murines expriment la protéine CCSP, résistent aux polluants chimiques et contribuent à la restauration épithéliale après lésion (75). Une sous-population de cellules de Clara CCSP<sup>pos</sup> a été décrite au niveau de la jonction bronchio-alvéolaire (75). Cette population particulière exprime également la protéine SP-C, *Sca-1* (Stem Cell Antigen 1), et CD34 (112). Ces cellules CCSP<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup> sont capables de proliférer *in vivo* en réponse à des lésions de l'alvéole induites par la bléomycine ou de la bronchiole induites par le naphtalène (112). Elles présentent une capacité d'auto-renouveau et de différenciation multipotente en cellules de Clara CCSP<sup>pos</sup>/SP-C<sup>neg</sup> et AEC II

CCSP<sup>neg</sup>/SP-C<sup>pos</sup> *in vivo* (112). Ces cellules souches sont définies chez la souris comme des cellules souches bronchioalvéolaires ou BASC (BronchioloAlveolar Stem Cells) (figure 11).



**Figure 11 : Les cellules souches bronchioalvéolaires.** Les jonctions bronchioalvéolaires localisées entre les bronchioles terminales bordées de cellules de Clara et l'espace alvéolaire composé d'AECI aplatis et d'AECII cuboïdales présentent une niche de cellules souches nommés cellules souches bronchioalvéolaires.

#### IV.4. CELLULES PROGENITRICES DE L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE

Les AECI ont longtemps été considérées comme des cellules en différenciation terminale. Pourtant, ces cellules présentent une plasticité phénotypique *in vitro* et sont capables d'exprimer des protéines spécifiques des AECII comme SP-C et des cellules de Clara comme CCSP (79). Les AEC I issus de poumons de rats adultes sont capables de proliférer *in vitro* et de former des colonies exprimant OCT4, un marqueur de cellules souches embryonnaires. Ceci suggère un rôle possible des AEC I dans le maintien et la réparation épithéliale après lésion (79).

Après des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie, l'activité de télomérase est détectable dans les AEC II au cours de la régénération épithéliale (53). *In vivo*, l'incorporation de thymidine tritiée suite à une lésion alvéolaire par le NO<sub>2</sub> montre la prolifération des AEC II ainsi que leur capacité à migrer et à s'allonger le long de la lame basale dénudée, puis de se différencier en AEC I (63). Deux sous populations d'AECII ont été identifiées dans les alvéoles murines en fonction de la présence ou non d'E-Cadhérine. Les AEC II exprimant fortement l'E-

Cadhérine ne résistent pas aux lésions alvéolaires induites par l'hyperoxie et présentent une faible activité télomérase. A l'inverse, les AEC II n'exprimant pas l'E-Cadhérine sont résistantes aux lésions, et ont une capacité de prolifération *in vitro* et une forte activité télomérase (181). Ces AEC II exprimant l'E-Cadhérine sont responsables de la réparation épithéliale alvéolaire et sont considérées comme des cellules progénitrices d'AEC II et AEC I (181).

#### **IV.5. LES CELLULES C-KIT**

La protéine c-kit est un récepteur tyrosine-kinase localisé à la membrane de différents types de cellules dont les cellules souches. Il joue un rôle important dans la mobilisation des cellules souches et dans la réponse immunitaire lors de lésions tissulaires tout en activant les voies d'inflammation qui activent les cellules souches et les lymphocytes NK (Natural Killer) responsable de l'immunité innée (11). Une étude récente a montré la présence de cellules c-kit<sup>pos</sup> au sein du poumon humain présentant des caractéristiques de cellules souches, d'auto-renouveaulement et de différenciation *in vivo* et *in vitro* (111). Ces cellules expriment les gènes de pluripotence NANOG, OCT4, SOX2 et KLF4 (Krueppel-like factor 4) et sont capables de générer différentes populations de cellules épithéliales pulmonaires *in vitro* exprimant SPC, CC10 et pan cytokératines. Les cellules pulmonaires humaines exprimant c-kit lorsqu'elles sont greffées chez la souris ont le pouvoir de recréer des bronchioles, des alvéoles et des vaisseaux pulmonaires. Cette étude montre pour la première fois l'existence de cellules multipotentes au sein du poumon humain et suggère le rôle crucial des cellules exprimant c-kit dans l'homéostasie et la régénération des différents tissus pulmonaires (111).

#### **IV.6. LA "SP" (SIDE POPULATION)**

Une population particulière de cellules a été identifiée par sa capacité à exclure le Hoeschst 33342, un intercalant de l'ADN, par l'intermédiaire de la protéine transmembranaire Bcrp1 (Breast Cancer Resistance Protein 1) de la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette transporter) (267). Cette population dénommée SP (Side Population) est présente dans divers organes dont la moelle osseuse, le muscle squelettique, la glande mammaire, le testicule, la rétine, la peau, le cœur, le cerveau ou le foie (80). Cette population a aussi été mise en évidence au niveau de l'épithélium pulmonaire murin (187, 219). La SP pulmonaire est séparée en deux groupes en fonction de l'expression de l'antigène de surface CD45 présent sur les leucocytes, lymphocytes, monocytes, granulocytes et thymocytes. On distingue une sous-population CD45<sup>pos</sup> d'origine hématopoïétique (36) capable de se différencier uniquement en cellules hématopoïétiques et une sous-population CD45<sup>neg</sup> non-hématopoïétique (36, 76). Les

cellules CD45<sup>neg</sup> expriment la vimentine (VIM) spécifique des cellules d'origine mésenchymateuse, CCSP et SCA-1. Elles peuvent se différencier en cellules bronchiolaires ou alvéolaires comme les cellules de Clara variantes présentes dans les corps neuro épithéliaux et les jonctions bronchioloalvéolaires. Ceci suggère que la SP pulmonaire non-hématopoïétique CD45<sup>neg</sup>/ VIM<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup>/ SCA1<sup>pos</sup> pourrait être enrichie en cellules souches épithéliales (76).

La SP pulmonaire CD45<sup>neg</sup> représente 0,12% ±0.01 de l'ensemble des cellules épithéliales chez l'homme (84). Ces cellules expriment la pan-cytokératine (84) et surexpriment les protéines ABCG2 (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2), FGF1 (Fibroblast Growth Factor 1), IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1), MYC *define page 16* (v-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog), SOX1 (SRY (sex determining region Y)-box 1), WNT1 (196) et présentent une activité télomérase et une stabilité de la longueur de ses télomères. Cette population est capable de proliférer et montre une forte capacité clonogénique sans se différencier *in vitro*. Elle est aussi capable de régénérer un épithélium différencié composé de cellules basales, de cellules ciliées et de cellules Clara *in vitro* dans des conditions en interface air-liquide (84).

#### IV.7. CONCLUSION SUR LES CELLULES SOUCHES PULMONAIRES

De nombreux travaux ont été réalisés pour essayer de comprendre et d'identifier les cellules souches et progénitrices de l'épithélium respiratoire. Suite à des lésions expérimentales, des foyers de cellules souches ont été observés aux alentours des canaux glandulaires (25), dans les régions trachéo-bronchiques (42), inter-cartilagineuses (42), bronchiolaire (62, 94, 95) et bronchioloalvéolaires (112). Tous ces travaux ont été réalisés chez les petits animaux en particulier chez la souris qui possède un épithélium différent de celui de l'homme, ce qui soulève des questionnements sur l'équivalence de ces différentes cellules souches chez l'homme. Seules des populations de cellules c-kit+ et les SP ont été décrites comme cellules souches au sein du poumon humain jusqu'à ce jour. Ces cellules qui semblent être capable de régénérer l'épithélium pulmonaire humain seront une base de recherche pour définir le lignage de différents cellules souches au sein de l'épithélium humain.

### V. REGULATION MOLECULAIRE DES CELLULES SOUCHES DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE

L'épithélium respiratoire est capable de se réparer et de se régénérer *via* différentes populations de cellules souches localisées le long de l'appareil respiratoire. L'activation de ces cellules est induite par un mécanisme moléculaire complexe.

La voie de signalisation **NOTCH** est impliquée dans la régulation et la différenciation des cellules souches dans les glandes mammaires, la peau ou le système nerveux (154, 237). Cette voie est activée par l'interaction des ligands de la famille Delta et Jagged avec les récepteurs transmembranaires NOTCH. La partie intracellulaire du récepteur NOTCH subit deux clivages protéolytiques et va être transporté dans le noyau pour s'associer au répresseur transcriptionnel RBPJK (Recombination Signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region-like). Ce complexe active la protéine MAML1 (Mastermind-Like 1) qui va convertir RBPJK en activateur transcriptionnel, permettant la transcription de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement ou l'inhibition de la différenciation (55). Au cours du développement pulmonaire, NOTCH s'active dans l'épithélium et le mésenchyme (153). Au niveau épithélial, NOTCH régule le développement et la régénération des cellules de Clara et des cellules ciliées (153). La  $\gamma$  secrétase, un agoniste de la voie de signalisation Notch, augmente le nombre des cellules neuro-endocrines et diminue le nombre des cellules ciliées (83).

La voie **Wnt/  $\beta$ -caténine** joue un rôle essentiel dans la régulation du développement pulmonaire (155). L'activation de cette voie débute par la fixation d'un ligand de la famille Wnt sur les récepteurs transmembranaires Frizzled et LRP (low density Lipoprotein Receptor-related Protein). L'activation de la voie Wnt par la  $\beta$ -caténine permet aux cellules souches hématopoïétiques de se maintenir à un stade immature (114, 184). La  $\beta$ -caténine assure l'augmentation du nombre de cellules souches bronchiolaires chez la souris en freinant leur différenciation (185, 188). La voie WNT/  $\beta$ -caténine ne semble pas nécessaire dans la maintenance et la réparation de l'épithélium bronchiolaire. Aucune différence significative de pouvoir réparateur des cellules de Clara, de leur index mitotique, de leur sensibilité au naphtalène ou de restauration de la population des cellules ciliées n'a été observée entre des souris KO  $\beta$ -caténine et normales (263).

Les facteurs de transcription de la famille **SOX** sont impliqués dans le développement des métazoaires et des mammifères en contrôlant des étapes de prolifération et de différenciation cellulaires dans de nombreux tissus (175). Les protéines SOX sont également impliquées dans la régulation des cellules souches épithéliales respiratoires. Le gène *SOX-17* inhibe la voie de signalisation TGF- $\beta$ / SMAD3 (Mothers Against Decapentaplegic homolog 3) et induit la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices alvéolaires en cellules épithéliales bronchiolaires (120). Une perte progressive des cellules ciliées, des cellules de Clara et des cellules caliciformes est observée dans les souris KO pour *SOX-* (230). Cette perte est associée

à l'incapacité des cellules Clara progénitrices à se multiplier et à assurer l'homéostasie tissulaire en réponse à l'altération (230).

La répression du gène **BMI1** (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) entraîne une diminution de la capacité proliférative et d'auto-renouvellement des BASC suite à l'altération de l'épithélium bronchioloalvéolaire chez la souris (52). La délétion du gène *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) induit la prolifération des cellules progénitrices respiratoires et affecte la différenciation des cellules ciliées (228). La répression du facteur de transcription *GATA-6* (GATA binding Factor 6) qui joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules souches aboutit à une expansion des cellules souches en limitant leur capacité à se différencier (4).

## VI. LES CELLULES SOUCHES TUMORALES PULMONAIRES

Selon l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), l'ATS (American Thoracic Society) et l'ERS (European Respiratory Society), les cancers du poumons se divisent en deux groupes<sup>2</sup>: Les **CBPC** (cancer bronchique à petites cellules) et les **CBNPN** (cancer bronchique non à petites cellules) (67, 231). Environ 15% des tumeurs pulmonaires sont des CBPC et apparaissent dans les bronches. Les CBNPC se divisent en trois types histologiques: les adénocarcinomes, le carcinome squameux et les carcinomes à grandes cellules. Les adénocarcinomes représentent environ 40% des CBNPC et apparaissent habituellement dans les tissus pulmonaires périphériques (44). Les carcinomes squameux représentent 25% des cancers pulmonaires et sont généralement situés dans la bronche centrale. Les carcinomes à grandes cellules semblent dériver des cellules neuroendocrines et peuvent être observés en combinaison avec d'autres types de CBNPC (189). Il est estimé que le tabagisme cause 90% des cancers du poumon (44, 189). Différents types de modifications génétiques ont été décrites dans les tumeurs pulmonaires comme les anomalies chromosomiques (256), l'activation du complexe télomérase (91) et les mutations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur comme *P53* (Tumor Protein p53) *RB1* (RetinoBlastoma 1), *CDKN2A* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), *KRAS* et *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) (189). Certains de ces gènes peuvent être utilisés comme marqueurs de progression de la maladie, d'autres peuvent avoir un rôle direct dans la genèse des cancers pulmonaires (6) L'altération des composants de l'épithélium de l'appareil respiratoire associé à des lésions pulmonaires aiguës ou chroniques

<sup>2</sup> pour information <http://www.pathologyoutlines.com/lungtumor.html>

augmentent de manière significative le risque de développer un cancer pulmonaire (157, 189). Les cellules de Clara variantes et les cellules neuroendocrines ont été proposées comme les cellules à l'origine des cancers broncho-pulmonaires (186). Des cellules souches tumorales pulmonaires pourraient émerger de progéniteurs tels des cellules de Clara variantes ou des cellules différenciées ayant acquis une capacité d'auto-renouveaulement comme des cellules neuroendocrines (238). Ces phénomènes sont soutenus par les hypothèses de la plasticité des cellules souches, qui est définie comme la capacité à franchir la barrière des lignées cellulaires différenciées et à adopter les phénotypes d'autres types cellulaires (57), ainsi que par l'hypothèse de la trans-différenciation (69).

L'hétérogénéité phénotypique observée entre les différents types de tumeurs pulmonaires suggère que l'environnement histologique de la tumeur affecte profondément le destin des cellules cancéreuses (148) et le programme de développement des cellules d'une lignée spécifique peut être modifié en changeant les signaux dans l'environnement local (163).

Les cellules pulmonaires tumorales humaines ont été mises en évidence en utilisant différentes approches. L'isolement des cellules souches tumorales est basé sur le phénotype ou sur les caractéristiques fonctionnelles de ces cellules. La SP ayant une capacité de restauration de l'épithélium s'est avérée résistante à la chimiothérapie dans les cancers pulmonaires (92, 196, 219, 221). La surexpression de la télomérase, suggère que la SP pulmonaire pourrait représenter une source de cellules souches tumorales avec un potentiel prolifératif illimité (92, 196, 219, 221). Des cellules souches tumorales peuvent être aussi identifiées et isolées par tri cellulaire utilisant le marqueur de surface cellulaire CD133 ou prominine-1 (115). CD133 est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques, endothéliales, neurales et dans de nombreuses tumeurs telles que les tumeurs cérébrales et pulmonaires (208). Le manque de marqueurs des progéniteurs pulmonaires représente le problème majeur d'isolement des cellules souches tumorales pulmonaires. Les marqueurs connus comme CD133, ABCG2 (ATP-Binding Cassette sub-family G member 2) et IL-6R (Interleukin 6 Receptor) (258), ne sont pas toujours efficaces pour trier pour la population de cellules souches tumorales (60). Une autre méthode d'isolement des cellules souches pulmonaires tumorales repose sur l'activité accrue de l'ALDH (Aldéhyde déshydrogénase). Cette enzyme est responsable de l'oxydation intracellulaire des aldéhydes et est surexprimée dans les cellules souches et les cellules souches tumorales (77). Des cellules souches tumorales résistantes à la chimiothérapie ont été isolées après traitement *in vitro*. Ces cellules expriment CD133, CD117, SSEA-3, TRA1-81, OCT-4 et la  $\beta$ -caténine (124). L'expression de ces marqueurs a permis la sélection de cellules

souches tumorales ont permis l'élaboration de lignées cellulaires tumorales amplifiables *in vitro* et formant des sphères tumorales. Ces cellules souches tumorales présentent un potentiel clonogénique, des capacités d'auto-renouveaulement, de génération d'une descendance différenciée et une tumorigénicité élevée *in vivo chez les souris* (61). Les cellules CD133<sup>POS</sup> isolées des tumeurs présentent aussi les caractéristiques d'autorenouveaulement et de différenciation des cellules souches *in vitro* et *in vivo* (19, 38).

Des dérégulations transcriptionnelles peuvent activer des oncogènes et/ou désactiver les gènes suppresseurs de tumeur (21). Les gènes *RUNX* (Runt-related transcription factors) par exemple, présentent des caractéristiques oncogéniques et suppresseurs de tumeurs. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement tissulaire normal. Beaucoup de translocations chromosomiques impliquant les gènes *RUNX* mènent à la formation de protéines de fusion oncogéniques (30). *RUNX3* est un facteur de transcription essentiel dans la phase tardive du développement pulmonaire. Il est nécessaire pour le contrôle de la différenciation et de la prolifération de l'épithélium bronchiolaire (121). Sa sous-régulation par hyper-méthylation a été observée dans les adénocarcinomes pulmonaires (129, 132) et a même été proposée comme un événement précoce dans le développement des carcinomes pulmonaires en inhibant la différenciation des cellules progénitrices (121). *TTF1* (Thyroid transcription factor-1) pourrait être un oncogène spécifique des adénocarcinomes pulmonaires (118) et *BRF2* un oncogène spécifique des cancers squameux (137). *OCT4* est un facteur transcriptionnel des cellules souches embryonnaires. L'inhibition d'*OCT4* induirait l'apoptose des cellules souches tumorales (97). *SOX2* contrôle l'auto-renouveaulement et la différenciation des cellules souches (105) et est impliqué dans le branchement et la morphogénèse correcte du poumon (78, 103). *SOX2* a été proposé comme un oncogène dont l'expression est essentielle dans les cellules souches tumorales pulmonaires pour induire la cancérogenèse (100, 224).

Chez l'homme *c-kit* s'est avéré être un promoteur de la croissance tumorale (89, 117). Les patients ayant une surexpression de *c-Kit* dans les cellules souches tumorales présentent des taux de survie inférieurs à ceux qui ne l'ont pas et montrent des phénomènes de résistance à la chimiothérapie (87). Le blocage de la voie *c-Kit* inhibe la prolifération et la survie des cellules souches tumorales après chimiothérapie (123).

La connaissance des voies de signalisation des cellules souches tumorales pulmonaires pourrait mener au développement de nouvelles thérapies capables d'éliminer ces cellules. Les méthodes développées pour l'isolement des cellules souches tumorales décrits précédemment

et la cohérence des données précliniques des facteurs de transcription tels que RUNX3, OCT4, SOX2, et c-Kit représentent un développement scientifique majeur pour la survie et la guérison des patients.

## **VII. VERS DE NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES**

Les pathologies pulmonaires ont un impact majeur en santé humaine. À ce jour, aucun traitement ne s'est avéré efficace pour restaurer les dégâts et les fonctions normales du poumon suite à certaines pathologies. Mais récemment, dans des modèles d'animaux, les cellules souches ont montré un pouvoir thérapeutique prometteur contre plusieurs pathologies pulmonaires comme la bronchite chronique obstructive (162), les pneumonies (116), la mucoviscidose (28) et l'asthme (22, 158). Basés sur des données préliminaires, des essais précliniques et cliniques sont actuellement en cours pour examiner le potentiel thérapeutique des cellules souches contre des maladies pulmonaires humaines. Actuellement, les cellules progénitrices endogènes du poumon, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses, les iPS et les cellules souches embryonnaires sont sélectionnées soit pour leur effet immunomodulateur stimulant le système immunitaire soit pour leur potentiel de différenciation en cellules pulmonaires. Les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques montrent des effets immunomodulateurs (151). En outre, les cellules souches endogènes et les cellules souches embryonnaires présentent une certaine capacité de différenciation en cellules pulmonaires (198).

### **VII.1. LES CELLULES SOUCHES ENDOGENES**

Les cellules souches endogènes pulmonaires sont les cellules souches présentes au sein de l'épithélium bronchiolaire, bronchioloalvéolaire et alvéolaire. La majorité de nos connaissances repose sur l'implication de ces cellules au cours du développement pulmonaire, dans des modèles animaux de cancers pulmonaires ou suite à des lésions épithéliales provoquées expérimentalement chez la souris. Des études précliniques montrent que la transplantation intra trachéale d'AECII réduit significativement les lésions alvéolaires induite par la bléomicine chez la souris (203). Les cellules progénitrices alvéolaires CD133<sup>POS</sup> injectées atténuent elles aussi les lésions alvéolaires murines (73, 151). Donc l'utilisation des progéniteurs endogènes pourrait être une alternative thérapeutique efficace dans le traitement des lésions pulmonaires. Toutefois, le défi majeur pour l'utilisation thérapeutique des cellules

pulmonaires endogènes repose sur la difficulté d'isoler des cellules souches saines du poumon des individus malades vu leur nombre limité dans les tissus endommagés (151).

## **VII.2. LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES**

De nombreuses études proposent l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques et circulantes pour le traitement des pathologies pulmonaires. L'utilisation de cellules souches de la moelle osseuse, en particulier de cellules souches hématopoïétiques déjà utilisées dans la thérapie de leucémies, lymphomes, anémies héréditaires semble une approche prometteuse dans le traitement de certaines pathologies pulmonaires (58, 211). Ces cellules ont montré un certain degré de plasticité et sont capables de se différencier en d'autres types cellulaires dans le cerveau, le foie, le cœur (14) ou les poumons(162). Certaines études remettent en question l'efficacité de ces cellules à repeupler les organes avec un pourcentage significativement acceptable et un ciblage adéquat. Les données cliniques disponibles à l'heure actuelle sur ce sujet sont très rares et la majorité des travaux est effectuée chez les animaux (14, 46, 162).

## **VII.3. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES**

Les cellules souches mésenchymateuses sont probablement les plus étudiées parmi les cellules souches adultes. Ces cellules d'origine stromale s'auto-renouvèlent et se différencient en plusieurs lignées cellulaires. Elles peuvent être dérivées de la moelle osseuse, du sang du cordon ombilical, de la gelée de Wharton du cordon ombilical, du placenta ou du tissu adipeux (32, 49). Elles se caractérisent par l'expression de CD44, CD74, CD166, CD73, CD90, et CD105 (49). Elles se sont avérées efficaces dans le traitement des pathologies pulmonaires dans plusieurs modèles animaux. L'administration intratrachéale de cellules souches mésenchymateuses diminue l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline (255). Ces cellules sont capables de réduire l'inflammation et d'augmenter la survie des cellules épithéliales alvéolaires dans des modèles de pathologies pulmonaires chroniques induites chez des souris nouveaux nés comme la dysplasie bronchopulmonaire (9, 235). Les cellules souches mésenchymateuses possèdent plusieurs caractéristiques qui leur permettent d'être utilisables dans les pathologies pulmonaires. Ces cellules injectables dans l'arbre bronchique par administration intra-trachéale sont capables de migrer vers les sites de lésion. Ce mécanisme inconnu pourrait être lié à l'expression spécifique d'une grande gamme de récepteurs de chimiokines et de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), IL-2 (Interleukin 2), IL-1 $\beta$ , et IL-4 (193).

Les cellules souches mésenchymateuses humaines sont capable d'acquérir une morphologie de cellules épithéliales lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* avec des cellules épithéliales pulmonaires et d'exprimer des marqueurs de cellules épithéliales pulmonaires comme la protéine CC26 (Clara Cell 26 kDa) spécifique des cellules de Clara et cellules ciliées, les cytokératines 17, 18 et 19, l' E-cadhérine, la  $\beta$ -caténine et le CD24, une protéine d'adhésion cellulaire. ce changement morphologique pourrait être lié au pouvoir de différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules épithéliales et le pouvoir de 1% de ces cellules souches à fusionner avec les cellules épithéliales pulmonaires pour créer des cellules binucléées (213). Les cellules souches mésenchymateuses humaines sont capables d'exprimer le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) lorsqu'elles sont cultivées avec des AEC. L'expression du gène *CFTR* peut être corrigée dans les cellules souches mésenchymateuses issues de patients atteints de la mucoviscidose. Cela suggère le possible traitement des patient atteints de mucoviscidose avec de cellules souches mésenchymateuses endogènes corrigées *in vitro* pour l'expression de CFTR puis ré-inoculées dans le poumon (242).

Une étude récente montre que le traitement des souriceaux exposés à l'hyperoxie par injection de cellules souches mésenchymateuses induit l'augmentation significative des BASC dans le poumon par rapport aux témoins non traités (232). *In vitro*, les cellules souches mésenchymateuses murines ont un effet direct sur la prolifération des BASC. Chez des souris adultes exposées à la bléomycine et traitées avec des cellules souches mésenchymateuses, les cellules exprimant la protéine CCSP dont les BASC sont capables de restaurer les zones alvéolaires agressées plus rapidement que chez les témoins. Ce travail met en évidence le rôle potentiel des cellules souches exogènes dans l'activation des cellules souches endogènes et la réparation des lésions pulmonaires (232).

#### **VII.4. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES**

Peu d'études décrivent la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules pulmonaires. *In vitro*, des cellules souches embryonnaires humaines maintenues dans des conditions de culture de cellules épithéliales pulmonaires développent des corps lamellaires et expriment SP-C (198, 240), suggérant leur différenciation en AEC II (240). Chez la souris, les AEC II dérivées de cellules souches mésenchymateuse humaines *in vitro* sont capables de restaurer les alvéoles des souris "nude" et de se différencier en AEC I *in vivo* (241).

### **VII.5. LE DEFI DE LA THERAPIE CELLULAIRE DU POUMON**

Les modèles animaux expérimentaux comme la souris restent souvent très éloignés de la réalité humaine. De même, les modèles expérimentaux d'altérations du poumon par des produits chimiques ou par des procédés physiques ne ressemblent souvent pas aux lésions liées aux pathologies pulmonaires humaines (152).

L'utilisation d'embryons humains surnuméraires pour des approches thérapeutiques est un sujet de débat et les considérations éthiques sont un frein au développement de ce type d'approches. Alternativement, les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse, du placenta ou du cordon ombilical sont plus facilement accessibles avec des enjeux éthiques moindres (45, 151).

Les manipulations génétiques des cellules souches peuvent induire des instabilités chromosomiques pouvant présenter un risque à long terme chez les malades traités. Pourtant, certaines manipulations génétiques sont nécessaires, ainsi l'acquisition de facteurs tels que OCT-4 SOX-2, KLF ou C-Myc est nécessaire pour la transformation des fibroblastes humains en iPS (223). L'utilisation de vecteurs rétroviraux à cette fin pourrait se révéler tumorigène (223).

### **VIII. CONCLUSION**

L'épithélium bordant les voies respiratoires constitue une barrière de défense contre de nombreux agents pathogènes ou chimiques. Cet épithélium est souvent lésé et même parfois totalement altéré suite à des atteintes inflammatoires sévères. En réponse à ces lésions, des cellules souches endogènes s'activent afin de régénérer la structure et restaurer l'intégrité et les fonctions de défenses de l'épithélium pulmonaire.

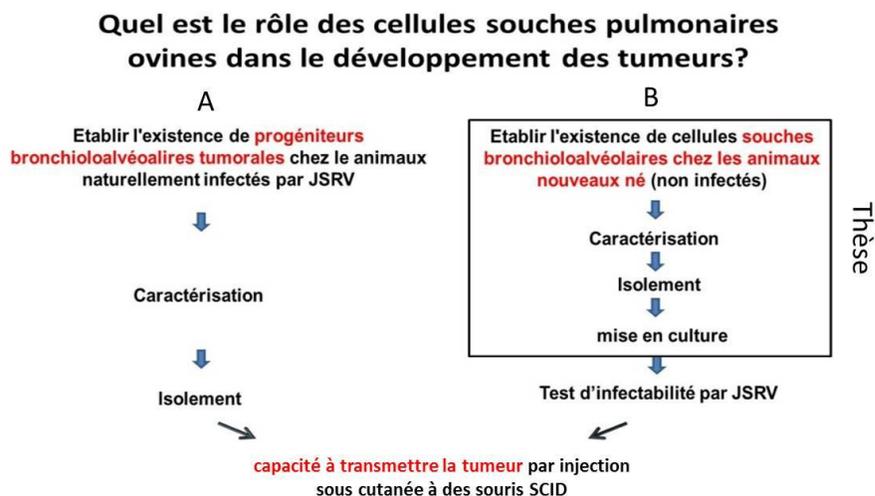
La nature des cellules souches ou des cellules progénitrices de l'épithélium pulmonaire a été très largement étudiée chez la souris, mettant en évidence les propriétés progénitrices de cellules bronchiolaires et alvéolaires. Les cellules basales trachéo-bronchique, les cellules de Clara bronchiolaires, les cellules souches bronchioloalvéolaires et les AEC II présentent des caractéristique de cellules souches et sont impliquées dans la régénération de l'épithélium pulmonaire après lésion. Cependant, malgré les avancées, la nature des cellules souches et cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire dans d'autres espèces notamment l'humain nécessite encore plus d'études.

## **CHAPITRE 2: TRAVAIL EXPERIMENTAL**



Notre équipe de recherche s'intéresse à un cancer pulmonaire naturel du mouton et plus rarement de la chèvre qui est l'adénocarcinome pulmonaire ovin induit par le beta-rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus). Les cellules cibles de ce virus oncogénique, sont majoritairement des cellules épithéliales alvéolaires et bronchiolaires, respectivement les AEC II et les cellules de Clara. Notre équipe de recherche a développé un système de culture *in vitro* des AEC II dérivés de poumons ovins tumoraux. De façon intéressante, nous avons mis en évidence une sous population de cellules co-exprimant la protéine SP-C (surfactant protein C), spécifique des AEC II et la protéine CCSP (Clara Cell Specific Protein), marqueur spécifique des cellules de Clara, suggérant la présence dans les tumeurs de cellules progénitrices bronchioloalvéolaires. Ces cellules représentent 0,2% à 17% de la population totale selon l'animal. Nous faisons l'hypothèse que ces cellules pourraient être infectées par JSRV et participer au développement de la tumeur chez l'animal (figure 12). La présence de cellules progénitrices bronchioloalvéolaires infectées par JSRV étant établie dans les tumeurs ovines, l'objectif de mon travail de thèse était d'établir l'existence de progéniteurs bronchioloalvéolaires dans les poumons naifs d'ovins nouveaux nés (âge 2 jours à 2 mois), de les isoler, de les caractériser et d'étudier leur potentiel de différenciation.

En dehors du fait que les cellules souches ou progénitrices du poumon de mouton n'ont jamais été décrites à ce jour, ce travail présentera une étape clé afin d'étudier l'implication des progéniteurs bronchioloalvéolaires dans le développement de la tumeur suite à leurs interactions avec le virus JSRV.



**Figure 12 : Implication possible des progéniteurs bronchioloalvéolaires dans le développement de l'adénocarcinome pulmonaire ovin.** A : Etablir l'existence des progéniteurs bronchioloalvéolaires chez les animaux infectés par JSRV. B : Etablir l'existence des progéniteurs bronchioloalvéolaires chez les animaux nouveaux nés non infectés

## MATERIEL ET METHODES

### I. ORIGINE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Dix-huit prélèvements de tissus pulmonaires ont été obtenus *post mortem* de poumons d'agneaux (0- 90 jours) provenant de l'abattoir de Corbas (69) ou de la plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE) de l'INRA de Tours Nouzilly (Dr Frédéric Lantier) (Tableau 1). Tous les tissus ont été recueillis selon les règles des comités d'éthique en expérimentation en vigueur et avec du matériel stérile à usage unique. Les échantillons ont été transportés en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA, Autriche) supplémenté de 100U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 2,5 µg/ml d'amphotéricine B, 50µg/ml de nystatine, 10µg/ml gentamicine (Sigma, France).

Agneaux	Age (jours)	Origine
1485	0	PFIE INRA Tours
1486	0	PFIE INRA Tours
1487	0	PFIE INRA Tours
1507	15	PFIE INRA Tours
1508	15	PFIE INRA Tours
1509	15	PFIE INRA Tours
<hr/>		
1473	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1510	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1513	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1514	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1541	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1545	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1725	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1726	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1728	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1729	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1730	± 90	Abattoir de Corbas, 69
1731	± 90	Abattoir de Corbas, 69

**Tableau 1 : Origine des prélèvements de poumon de moutons**

Une partie des prélèvements frais a été découpée stérilement en morceaux de ~0.5cm<sup>3</sup>, puis congelée par immersion dans l'azote et stockée à -80°C. Le reste des prélèvements frais a été immédiatement dissocié pour la préparation de suspension cellulaire (voir II).

Lors du prélèvement des poumons, des échantillons ont été fixés en formol et contrôlés par examen anatomopathologique (Pr F Thivolet-Béjui Service d'Anatomopathologie clinique, Hôpital Louis Pradel, Hospice Civil de Lyon, pôle Est) pour la recherche de lésions pulmonaires.

## **II. DISSOCIATION ENZYMATIQUE DU POUMON**

Toutes les préparations ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique de type II. Les poumons ont été finement découpés au scalpel puis incubés pendant 2 heures à 37°C dans du milieu DMEM additionné de 10µg/ml de DNase I, 1mg/ml de protéase XIV et 0,025% de collagénase de type IA (Sigma, France). Les suspensions cellulaires ont été filtrées sur un filtre de porosité 40µm (Greiner). Les cellules ont été centrifugées à 450g pendant 10 minutes à 4°C. Après 3 lavages en PBS 1X, les cellules ont été remises en suspension en PBS 1X additionné de 4% de sérum de veau fœtal décomplémenté à la chaleur (PAA). Les cellules ont été numérotées et leur viabilité évaluée par un test d'exclusion du Bleu Trypan en cellule de Malassez.

## **III. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES SP-C ET CCSP SUR DES COUPES DE TISSU PULMONAIRE OVIN**

Des cryocoupes de poumon (agneaux 1475, 1474, 1486, 1485) de 8µm ont été réalisées à partir de tissus pulmonaires conservés à -80°C. Elles ont été séchées à température ambiante, fixées avec 4% de paraformaldéhyde, perméabilisées avec 0,2% Triton X-100 pendant 3 minutes puis incubées 30 minutes en présence de 10% de sérum de chèvre normal et 1% d'albumine sérique bovine (Sigma). Les tissus fixés ont été incubés pendant une heure à température ambiante avec la solution de marquage (PBS 1X, 1% albumine sérique bovine) contenant un antisérum de lapin dirigé contre la protéine SP-C humaine ou d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine CCSP humaine (tableau 2). Après 3 lavages en PBS1X, les tissus ont été incubés avec une solution d'anticorps secondaires anti IgG de lapin couplés à l'Alexa Fluor 488 ou anti IgG de souris couplés à l'Alexa Fluor 633 (Invitrogen, France) pendant une heure à température ambiante à l'obscurité (tableau 2). Après 3 lavages en PBS1X, la coloration des noyaux a été réalisée avec 1 µg/ml de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) pendant 10 minutes à température ambiante à l'obscurité. Les coupes ont été montées entre lames et lamelles en solution Fluoromount (Sigma, France). Les lames ont été conservées à 4°C à l'obscurité jusqu'à leur observation sur un microscope droit Axiolmager

(Zeiss) équipé d'une caméra CoolSNAP (Plateau technique d'imagerie PLATIM de l'UMS 3444, Lyon). Les images ont été acquises *via* le logiciel Metamorph et analysées sur Image J.

Anticorps	Spécificité:	Origine	Dilution
polyclonal rabbit anti-human ProSP-C	Protéine C du surfactant pulmonaire ou SP-C	Millipore, France	1 :600
monoclonal mouse anti human CCSP	Protéine CCSP des Cellules de Clara	Abnova, France	1 :500
monoclonal Mouse anti Sheep CD45	CD45 ou LCA (Leucocyte common antigen) exprimé à la surface des leucocytes, lymphocytes, monocytes, granulocytes et thymocytes	AbD serotec, France	1 :250
monoclonal Mouse anti Human Vimentin	Vimentine (filaments intermédiaires des cellules d'origines mésenchymateuses)	Sigma, France	1 :400
monoclonal mouse anti Human Cytokeratin	Cytokératines 1, 5, 6 et 8 de type II	Sigma, France	1 :400
monoclonal mouse anti-sheep CD34	Glycoprotéine de 110kD exprimée à la surface des cellules progénitrices de la moelle osseuse, du foie et des cellules souches hématopoïétiques immatures	Pr Porada, USA	1 :200
polyclonal rabbit anti-human CD44v6	Molécule d'adhésion, glycoprotéine de surface exprimée dans plusieurs tissus avec de nombreux isoformes. CD44v6 est exprimée dans le tissu alvéolaire et dans certaines métastases	Chemicon, France	1 :600

**Tableau 2 : Anticorps utilisés**

#### IV. CULTURE DES CELLULES PRIMAIRES ISSUES DE LA DISSOCIATION DES POUMONS

Les cellules dissociées des tissus pulmonaires de 3 agneaux ont étéensemencées sur plaques de culture 6 puits préalablement traitées pendant 1h à température ambiante avec 40µg/ml de collagène de type I, 5µg/ml de collagène de type IV et de 10 µg/ml de fibronectine (Sigma, France) dans de l'eau ultra pure stérile. Après rinçage avec du PBS, les cellules ont étéensemencées à raison de  $2.10^5$  cellules par  $cm^2$  et cultivées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Quatre milieux de cultures ont été testés: le milieu synthétique CnT-17 (CELLNTEC Advanced cell systems, Suisse) favorisant la prolifération des cellules de l'épithélium des voies aériennes; le milieu synthétique Cnt-23 (CELLNTEC advanced systems) favorisant la différenciation des cellules de l'épithélium respiratoire murin et humain; le milieu synthétique Quantum 286 (PAA, France) adapté à la culture des cellules épithéliales pulmonaires supplémenté de 5ng/ml de HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Abcys), 10ng/ml de

KGF (Keratinocyte Growth Factor) (Abcys, France) comme précédemment décrit (7) et le milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veaux foetal décomplémenté. Les milieux synthétiques sans sérum ont été supplémentés avec 10 U/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine et le milieu DMEM avec sérum a été complété avec 100U/ml de pénicilline de 100µg/ml de streptomycine. Les milieux de culture ont été renouvelés toutes les 48 heures, pendant toute la durée de la culture.

## **V. TRI POSITIF DES CELLULES EXPRIMANT LA PROTEINE DE SURFACE CD34**

Juste après la dissociation de poumons ovins,  $10^7$  cellules pulmonaires ont été incubées avec une solution d'anticorps monoclonal anti-CD34 de mouton (Tableau 2) pendant 15 minutes sur la glace. Après 2 lavages en tampon de tri (PBS1X, 2mM EDTA et 0,5% d'albumine sérique bovine) et centrifugation à 450g pendant 10 minutes à 4°C, les culots cellulaires ont été incubés 15 min avec des billes magnétiques couplées à des IgG de souris (Macs Microbeads, Miltenyi, France). Après 2 lavages en tampon de tri et 2 centrifugations à 450g pendant 10 minutes à 4°C, le culot cellulaire a été repris dans le tampon et déposé sur une colonne magnétique (Mini Max, Miltenyi, France) prélavée avec 1ml du tampon de tri. La colonne est placée par la suite sur un aimant de séparation de type MS (Miltenyi, France) permettant la rétention des cellules exprimant CD34 et sur lesquelles les billes couplées à l'anticorps anti-CD34 sont fixées. Les cellules CD34<sup>POS</sup> ont été recueillies par élution de la colonne en tampon de tri de la colonne après retrait de la colonne de l'aimant.

## **VI. CULTURE DES CELLULES TRIÉES CD34<sup>POS</sup>**

### **VI.1. MAINTIEN DES CELLULES CD34<sup>POS</sup>**

Les cellules pulmonaires triées pour l'expression de CD34 ont été mises en culture sur des inserts constitués d'une membrane poreuse 0,4µm (Greiner) préalablement recouverts de 40µg/ml de collagène de type I, 5µg/ml de collagène de type IV et 10 µg/ml de fibronectine, en plaques de culture 24 puits (Figure 13A). Après rinçage en PBS, les cellules ont étéensemencées à raison de  $1,6 \times 10^5$  cellules par insert et cultivées à 37°C en atmosphère humide, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> en milieu synthétique Quantum 286 supplémenté de 5ng/ml de HGF, 10ng/ml de KGF, 10 U/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine (Figure 15). Ces cellules ont été maintenues pendant 3 à 4 passages réalisés par trypsination tous les 15 jours ou lorsque les cellules atteignaient 90 % de confluence.

## VI.2. DIFFERENCIATION DES CELLULES TRIÉES CD34<sup>POS</sup> EN AECII

Les cellules CD34<sup>POS</sup> ont étéensemencées directement sur des plaques de culture de 24 puits préalablement recouverts de 40µg/ml de collagène de type I, de 5µg/ml de collagène de type IV et 10 µg/ml de fibronectine (Figure 13 B). Les cellules ont étéensemencées à raison de 1,6.10<sup>5</sup> cellules par puits et cultivées à 37 °C en atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub> en milieu synthétique Quantum 286 supplémenté de 5ng/ml de HGF, 10ng/ml de KGF, 10 U/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine comme décrit précédemment (7). Les cultures ont été maintenues pour 3 ou 4 passages par traitement à la trypsine tous les 15 jours ou ± 90% de confluence.

## VI.3 DIFFERENCIATION DES CELLULES TRIÉES CD34<sup>POS</sup> EN CELLULES DE CLARA

Les cellules triées CD34<sup>POS</sup> ont été directementensemencées dans des plaques de culture de 24 puits préalablement traitées avec seulement 10 µg/ml de fibronectine. Les cellules ont étéensemencées à raison de 1,6.10<sup>5</sup> cellule par puits et cultivées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, dans le milieu synthétique Quantum 286 supplémenté de pénicilline et de streptomycine (Figure 13 C). Ces cultures ont été maintenues pendant 15 jours.

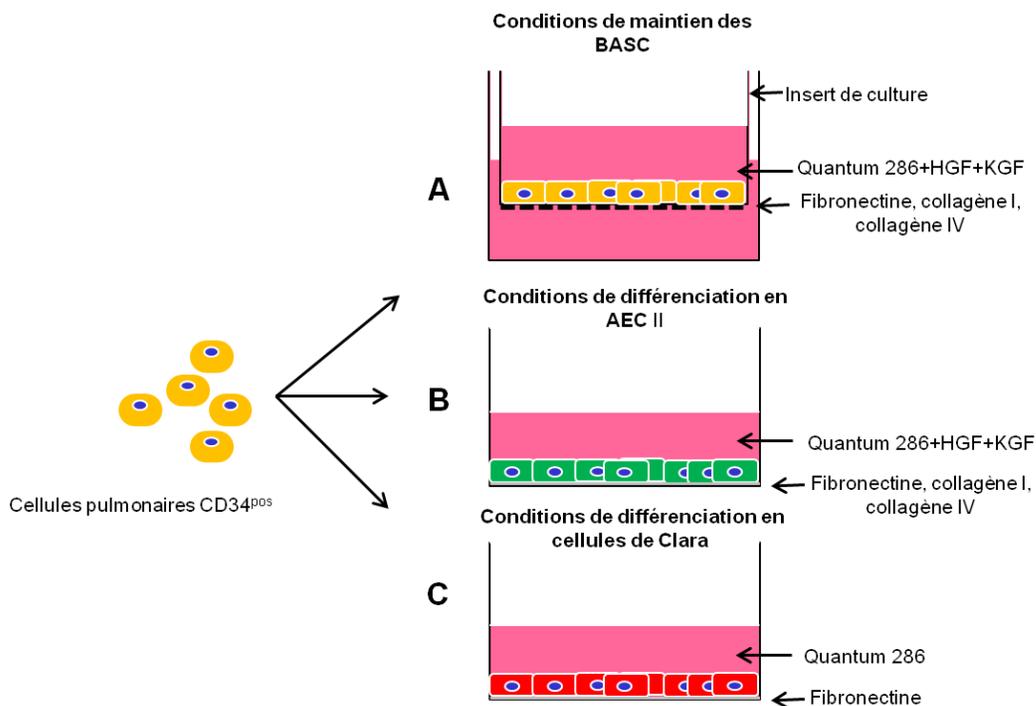


Figure 13 : Les conditions de culture des cellules pulmonaire CD34<sup>POS</sup>

## VII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS SP-C, CCSP, SP-A, CD44v6 ET CD34 PAR IMMUNOMARQUAGES

Des aliquotes de  $2.10^5$  cellules issues soit des dissociations de poumon, soit du tri positif CD34, soit de la mise en culture *in vitro*, ont été incubés pendant 30 minutes à 4°C avec les anticorps primaires spécifiques anti SP-C, anti CCSP, anti SP-A, anti CD44v6 et anti CD34 (tableau 2). Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS1X, centrifugées 10 minutes à 450g à 4°C puis incubées avec les anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488 ou la phycoérythrine pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité (tableau 2). Après deux lavages au PBS 1X, les cellules ont été remises en suspension dans 500 µl de paraformaldéhyde à 4%. Les échantillons ont été analysés pour l'expression de CD34, SP-C et CCSP au moyen d'un cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences) (Plateau technique de cytométrie de l'UMS 3444, Lyon) et analysées sur le logiciel Cell Quest pro.

En parallèle, Les cellules adhérentes dérivées *in vitro* ont été analysées par immunomarquages pour l'expression de la cytokératine, la vimentine, SP-C, CCSP, CD44v6 et CD34 (Tableau 2). Brièvement, les cellules ont été rincées avec du PBS1X, fixées avec 4% de paraformaldéhyde puis perméabilisées avec 0,2% Triton X-100 pendant 3 minutes. Les immunomarquages avec les anticorps primaires dilués dans une solution de marquage (PBS 1X; 1% albumine sérique bovine) ont été réalisés à température ambiante pendant 1 heure. Après 3 lavages en PBS 1X, les cellules fixées ont été incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin et de souris couplés à l'Alexa Fluor 488 ou à l'Alexa Fluor 633 pour une heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Après 3 lavages en PBS1X, la coloration des noyaux a été réalisée avec 1 µg/ml de DAPI pendant 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après lavage, les lames ont été recouvertes des lamelles en présence du milieu de montage Fluoromout puis conservées à 4°C à l'obscurité jusqu'à leur observation. L'acquisition des images en immunofluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope droit Axiomager (Zeiss).

## VIII. EXPRESSION DES GENES SP-C, CCSP, CD34, OCT4, NANOG ET BMI1 PAR RT-PCR

Le gène de référence utilisé dans cette étude était le gène de la GAPDH «Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase». La stabilité de son expression a été validée et les niveaux d'expression de ce gène étaient similaires dans différentes conditions expérimentales.

Un calibrant servant de contrôle et contenant les gènes cibles et de référence a été choisi. Ainsi la quantification relative est obtenue selon la méthode de Pfaffl:

$$R_{\text{(ratio)}} = [E_{\text{gène cible}}^{\Delta Ct(\text{gène cible})}] / [E_{\text{gène endogène}}^{\Delta Ct(\text{gène endogène})}]$$

avec :  $\Delta Ct_{(\text{gène cible})} = Ct_{\text{gène cible (calibrant)}} - Ct_{\text{gène cible (cellules analysées)}}$   
 et :  $\Delta Ct_{(\text{gène endogène})} = Ct_{\text{gène endogène (calibrant)}} - Ct_{\text{gène endogène (cellules analysées)}}$

L'extraction des ARN cellulaires totaux a été réalisée sur les culots cellulaires conservés à -80°C après tri CD34 pour les agneaux 1485, 1486, 1508, 1509, 1725, 1726, 1728 et sur les cellules triées des agneaux 1729, 1730, 1731 maintenues ou différenciées *in vitro*. Les ARN ont été extraits à l'aide du "mini RNeasy Kit" (Qiagen, France), selon les recommandations du fournisseur. Après extraction, la quantité et la qualité des ARN ont été contrôlées par dosage au Nanodrop (ND 1000) (Plateau technique de cytométrie en flux de l'UMS 3444, Lyon). Pour chaque échantillon, 200ng d'ARN cellulaires totaux ont été rétro-transcrits en ADNc, grâce au kit "iSCRIPT cDNAsynthesis" (Biorad, France) selon les recommandations du fournisseur. La réaction a été réalisée en présence des amorces oligo-dT et hexamères aléatoires à raison de 5 min à 25°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C sur un thermocycleur Mini-opticon cyclor (Bio-rad, France). L'amplification a été réalisée avec le produit de RT équivalent à 25 ng ARN avec le kit "KAPA SYBR FAST qPCR Master MIX 2X" (KAPABIOSYSTEMS), sur un thermocycleur Mini-opticon, avec des amorces déterminées sur des séquences ovines quand celles-ci étaient disponibles et sur des régions conservées des gènes d'intérêts chez l'homme et le bovin dans les autres cas:

*GAPDH*: sens 5'-CCACCAACTGCTTGGCCCC-3' et antisens 5'- CCTCGGCCATCACGCCACAG-3'.

*SP-C*: sens 5'-GCAACGCCTGGCCCTGAGT-3' et antisens 5'-CATAATGTAGCAGCAGGTTC-3

*CCSP*: sens 5'-GTCACCCTGACTCTCTTCTG-3' et antisens 5'-CAGGGCTGAAAGGTTCCAGG-3'

*CD34*: sens 5'-GATTGCACTGGTCACCTCG-3' et antisens 5'-CTCCACGTAATAAGGGTCTTC-3'

*OCT4*: sens 5'-CAAGAACATGTGTAAGCTGC-3' et antisens 5'-CGATACTCGTCCGCTTTCTC-3'.

*NANOG*: sens 5'-GGCAGAAAAACAACCTGGCCGAGGAA-3' et antisens 5'-

CCCCACATGGGCAGGTTTCCAG-3'

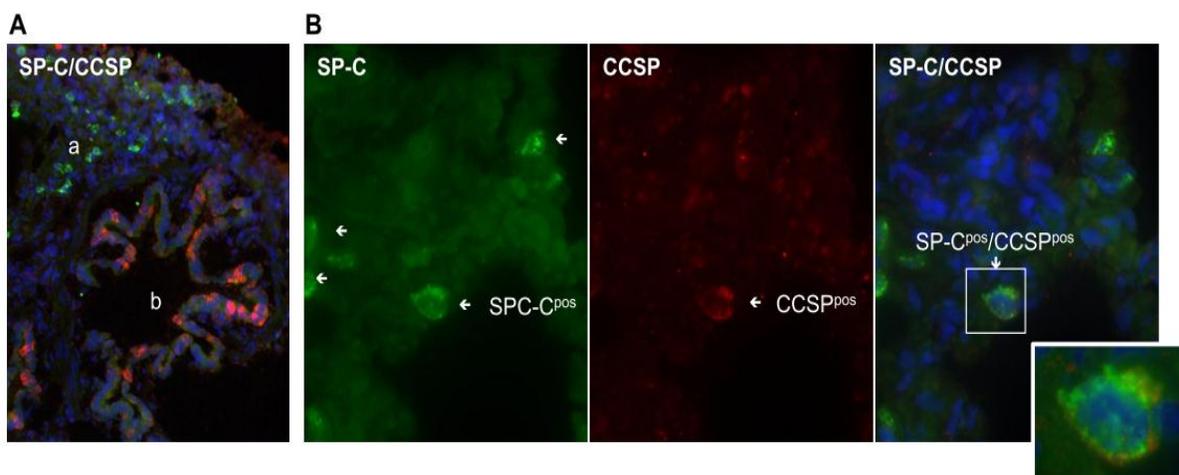
*BMI1* : sens 5'-GCCACAACCATAATAGAATGTC-3' et antisens 5'-CCCTGGAACATAATTTGTATAC-3'

Le programme de PCR consistait en une dénaturation de 3 min à 95°C, suivi de 35 cycles associant 10 sec à 95°C, 20 sec à 60°C et 1 sec à 72°C pendant. Les courbes de fusion ont été établies. La vérification de l'efficacité des amorces a été contrôlée sur une gamme de dilution des ADNc de 1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000ème. L'absence de pics d'amplification non spécifique des dimères d'amorces a été contrôlée. Les produits PCR ont été vérifiés aussi sur gel d'agarose à 2% en tampon TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA) additionné de "Syber Safe DNA gel stain" (Invitrogen) et visualisé par transillumination ultraviolette.

## RESULTATS

### I. MISE EN EVIDENCE DE PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES *IN SITU* CHEZ LES OVINS NOUVEAUX NES

Pour identifier des cellules présentant des caractéristiques de progéniteurs bronchioalvéolaires chez l'ovine nouveau-né, les populations cellulaires composant l'épithélium pulmonaire ont été analysées par immunomarquages sur des sections tissulaires de 10 poumons d'agneaux (0-3 mois) pour l'expression des protéines SP-C et de CCSP (Figure 14). L'expression de SP-C était mise en évidence spécifiquement dans des régions du parenchyme compatible avec les alvéoles (Figure 14 A, B). La protéine CCSP était détectable spécifiquement au niveau de cellules bronchiolaires (Figure 14 A, B). Dans les sections tissulaires analysées, de rares cellules co-exprimant ces deux protéines étaient visibles dans le parenchyme (Figure 14 B), suggérant l'existence de progéniteurs bronchioalvéolaires SP-C/CCSP dans le poumon de mouton nouveau-né.

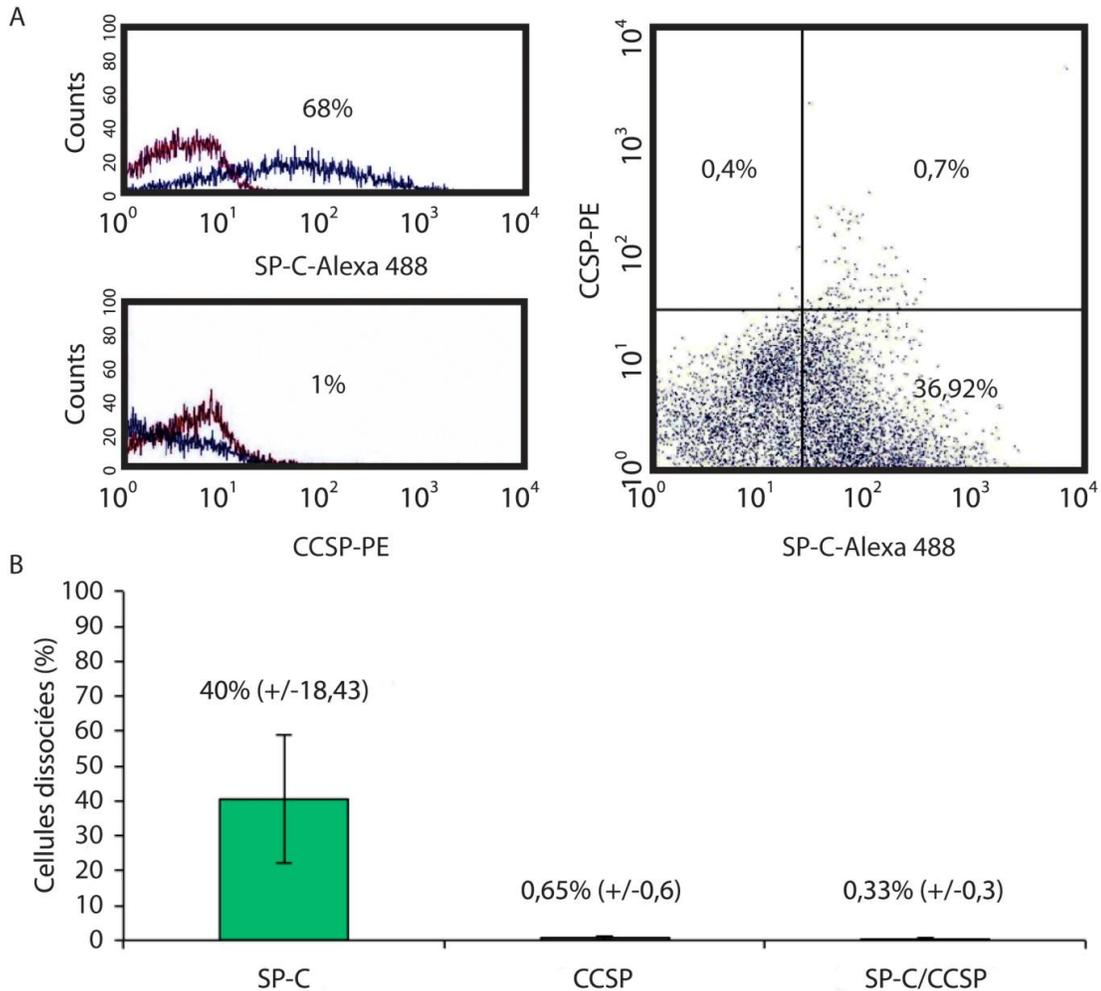


**Figure 14 : Localisation *in vivo* des cellules épithéliales SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>.** A: Expression de SP-C (vert) dans les alvéoles (a) et de CCSP (rouge) dans les bronchioles (b). (10x grossissement). B: détection de rares cellules SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> *in situ*. (Grossissement 40x). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu)

### II. QUANTIFICATION ET CARACTERISATION DES CELLULES EPITHELIALES PULMONAIRES ET MISE EN EVIDENCE DES PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES *EX VIVO*

L'analyse par cytométrie en flux des cellules isolées par digestion enzymatique des tissus pulmonaires de 10 animaux a mis en évidence une population majoritaire de cellules exprimant la protéine SP-C avec 40% ( $\pm 18,43$ ) de la population totale des cellules analysées (Figure 15 B). Les cellules exprimant CCSP sont plus rares et représentent seulement 0,65% ( $\pm 0,60$ ) de la

population totale (Figure 15 B). Une population minoritaire de cellules coexprimant les deux protéines était détectable dans tous les échantillons analysés. Cette population a été évaluée à 0,33% ( $\pm 0,31$ ) de cellules SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> sur les 10 échantillons analysés (Figure 15 B).

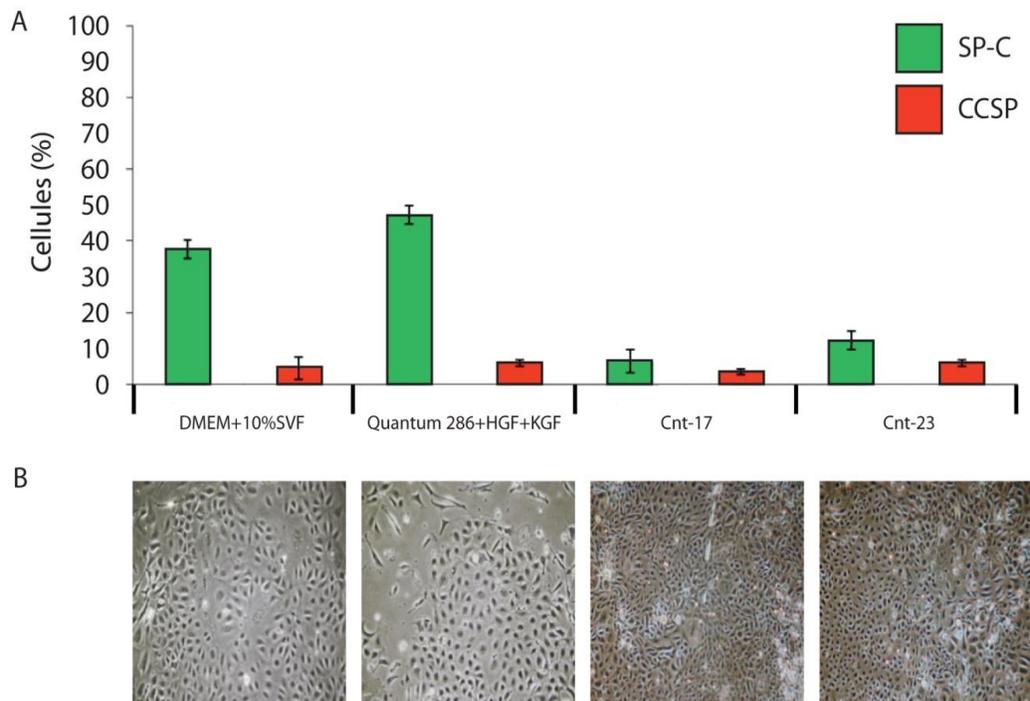


**Figure 15 : Quantification des cellules SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> ex vivo après dissociation des poumons.** Les cellules pulmonaires de 10 poumons d'agneaux âgés de 0 à 3 mois ont été analysées par cytométrie en flux pour l'expression de SP-C, CCSP et la co-expression de SP-C et CCSP. A Agneau # 1728. B: pourcentage (%  $\pm$  écart type) de cellules SP-C<sup>POS</sup>, CCSP<sup>POS</sup> et SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup>. N=10 agneaux

### III. CARACTERISATION DES COLONIES EPITHELIALES PULMONAIRES IN VITRO

Les cellules isolées par digestion enzymatique de 3 poumons d'agneaux ont été ensemencées dans différents milieux de culture afin d'identifier un milieu optimal pour la culture des cellules épithéliales pulmonaires ovines. Dans toutes les conditions de cultures, des cellules épithéliales étaient capables d'adhérer au support de culture quelques heures après leur ensemencement et de proliférer jusqu'à confluence en 10 à 15 jours. Au premier passage, dans

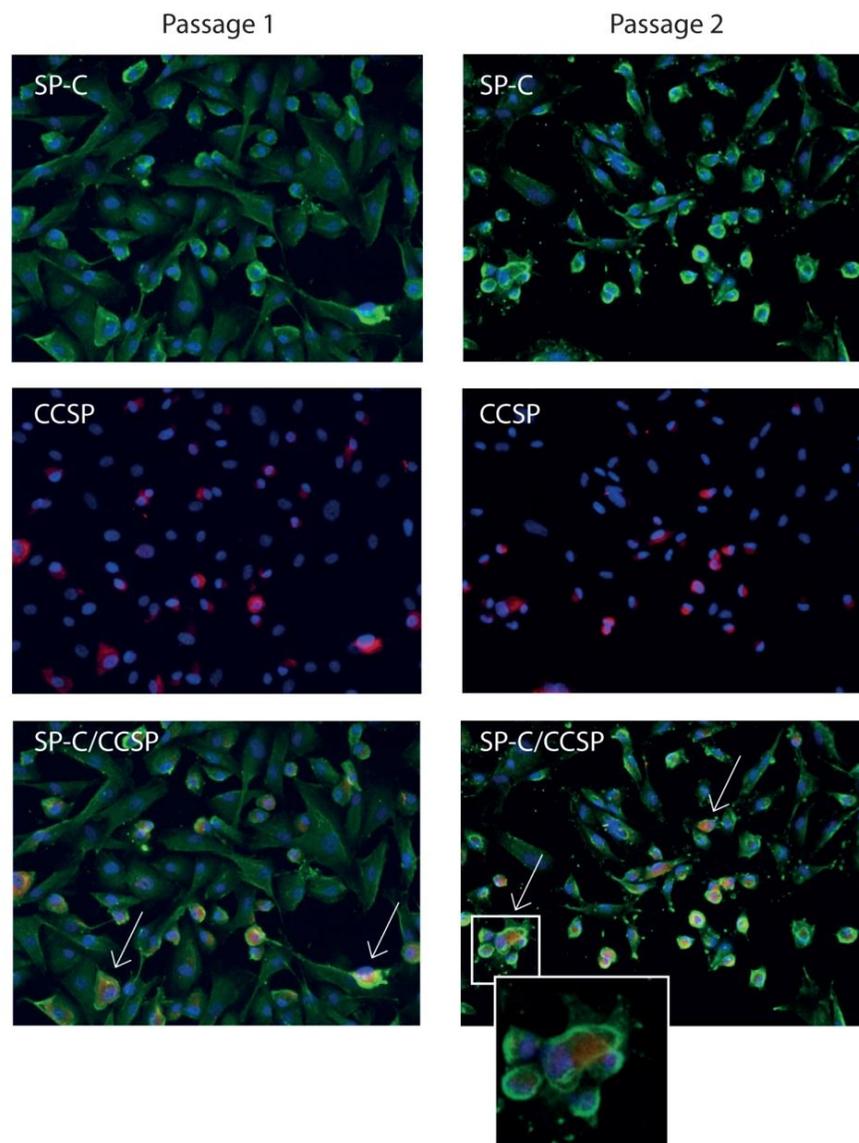
les milieux DMEM additionné de 10%SVF ou milieu Quantum 286 complété des facteurs de croissance HGF et KGF, les colonies générées étaient très hétérogènes dans certaines cultures avec parfois une invasion par des fibroblastes. Dans les milieux CnT-17 et CnT-23, les cellules étaient très jointives et formaient de grandes colonies sans contamination avec des fibroblastes (Figure 16 B). Afin de caractériser ces populations épithéliales, l'expression des protéines SP-C et CCSP a été évaluée dans les différents milieux testés. Dans toutes les conditions, la majorité des cellules exprimaient la protéine SP-C (Figure 16 A). La proportion la plus importante de cellules SP-C<sup>pos</sup> était observée dans le milieu Quantum 286 complété de HGF et KGF, avec 47,17±2,56% de cellules SP-C<sup>pos</sup> par rapport à la population totale (Figure 16 A) Le nombre de cellules exprimant la protéine CCSP était faible et peu variable d'un milieu à l'autre. Dans le milieu Quantum 286 complété de HGF et KGF, 5,9% (±0,9) des cellules étaient CCSP<sup>pos</sup> (Figure 16 A). Ce résultat suggère que le milieu synthétique Quantum 286 supplémenté de HGF et KGF est favorable au maintien et à la multiplication des AEC II exprimant SP-C et des cellules de Clara exprimant le CCSP.



**Figure 16 : Quantification des cellules SP-C<sup>pos</sup> et CCSP<sup>pos</sup> dans les différents milieux de culture.** A: Pourcentages de cellules exprimant les protéines SP-C et CCSP au premier passage dans les milieux de culture DMEM additionné de 10% SVF, Quantum 286 additionné des facteurs de croissance HGF et KGF, Cnt-17 et CnT-23. N=3 agneaux B: Phénotypes des colonies épithéliales issues d'un même animal et générées dans les 4 milieux de culture testés. Grossissement 20x.

### III.1. MISE EN EVIDENCE D'UNE POPULATION DE CELLULES EPITHELIALES CO -EXPRIMANT SP-C ET CCSP *IN VITRO*

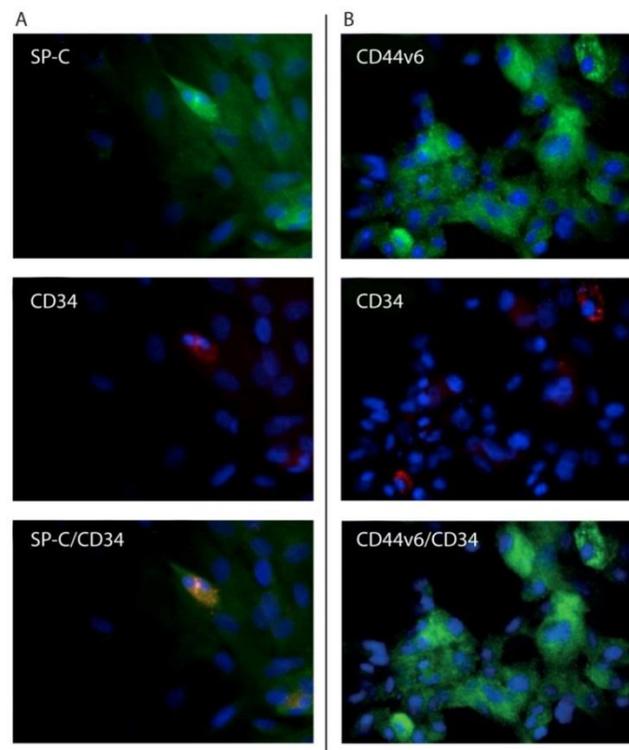
Par culture *in vitro* en milieu Quantum 286 supplémenté de HGF et de KGF de rares cellules semi adhérentes et de petites tailles étaient détectables dès le premier passage. Ces cellules co-exprimaient SP-C et CCSP (Figure 17). Ces cellules étaient capables de proliférer et de former de petites colonies sur au moins deux passages, tout en maintenant la co-expression concomitante des deux protéines (Figure 17).



**Figure 17: Présence de cellules SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> *in vitro*.** Les cellules épithéliales pulmonaires dissociées ont été cultivées sur une matrice de fibronectine et de collagènes I et IV dans le milieu Quantum 286 additionné de HGF et KGF. L'expression de SP-C (vert) et CCSP (rouge) doublement marquées SP-C et CCSP (→). Coloration des noyaux au DAPI (Bleu) (objectif 20). Dans le cadran se présente une colonie de cellules co exprimant SPC et CCSP

### III.2. MISE EN EVIDENCE D'UNE POPULATION DE CELLULES EPITHELIALES EXPRIMANT CD34 *IN VITRO*

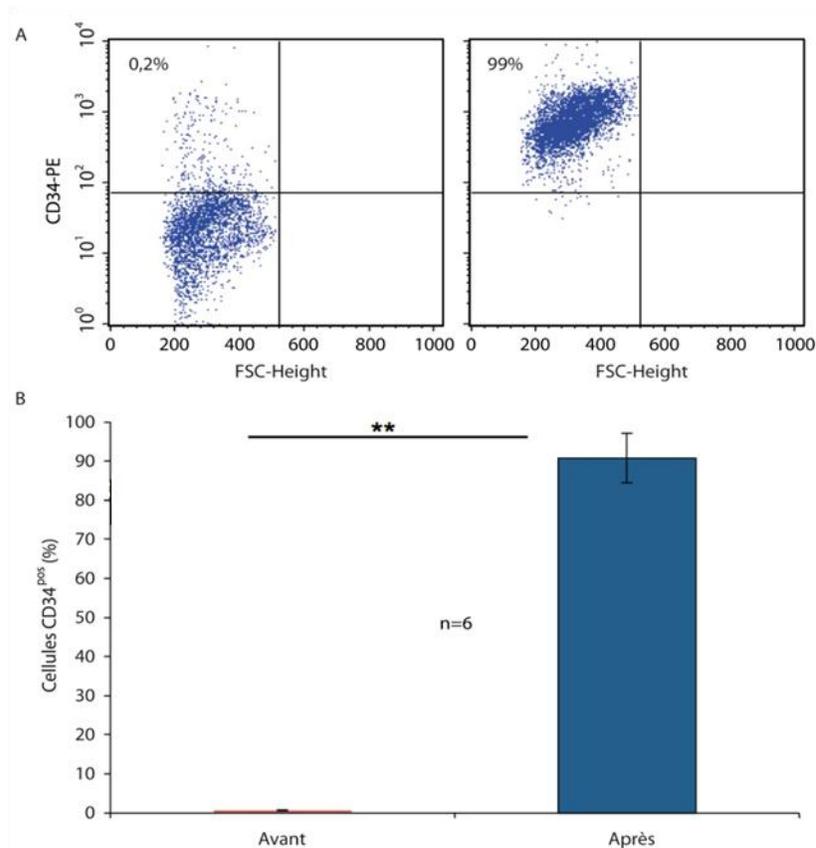
Nous avons mis en évidence l'expression de CD34 dans les cultures des cellules épithéliales pulmonaires ovines en milieu Quantum 286 supplémenté des facteurs de croissance HGF et KGF. De rares cellules épithéliales exprimaient spécifiquement l'antigène CD34 ( $2.9\% \pm 2.6$ ) (N=3). Ces rares cellules co-exprimaient aussi les protéines SP-C et l'antigène CD44v6, un isoforme de la protéine CD44 impliquée dans l'adhésion cellulaire et exprimé par les cellules alvéolaires (Figure 18). Ces cellules étaient semi adhérentes, de petites tailles et se maintenaient au cours des passages. La nature des anticorps disponibles et utilisés soit anticorps polyclonal anti proSP-C, anticorps polyclonal anti CCSP, anticorps monoclonal anti CD34 et anticorps monoclonal anti CCSP n'a pas permis de faire une détection directe par marquages SP-C/CCSP/CD34. Cependant, la forme arrondie et le caractère semi adhérent des cellules CD34<sup>pos</sup> identiques à ce que nous avons observé avec les cellules coexprimant SP-C et CCSP (Figure 18) et l'absence totale de cellules SP-C<sup>neg</sup>/CD34<sup>pos</sup> suggèrent que ces cellules SP-C<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> sont probablement les progéniteurs bronchioloalvéolaires SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup>.



**Figure 18: Présence de cellules SP-C<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> et CD44v6<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> *in vitro*.** Les cellules épithéliales pulmonaires dissociées ont été cultivées sur une matrice de fibronectine et de collagène I et IV en milieu Q286 additionné de HGF et KGF. A: L'expression de SP-C est détectée en vert et celle de CD34 en rouge. B: L'expression de CD44v6 est détectée en vert et celle de CD34 en rouge. Les noyaux sont colorés au DAPI (Bleu) (Objectif x20).

#### IV. ISOLEMENT DES CELLULES CD34<sup>POS</sup> PAR TRI IMMUNOMAGNETIQUE

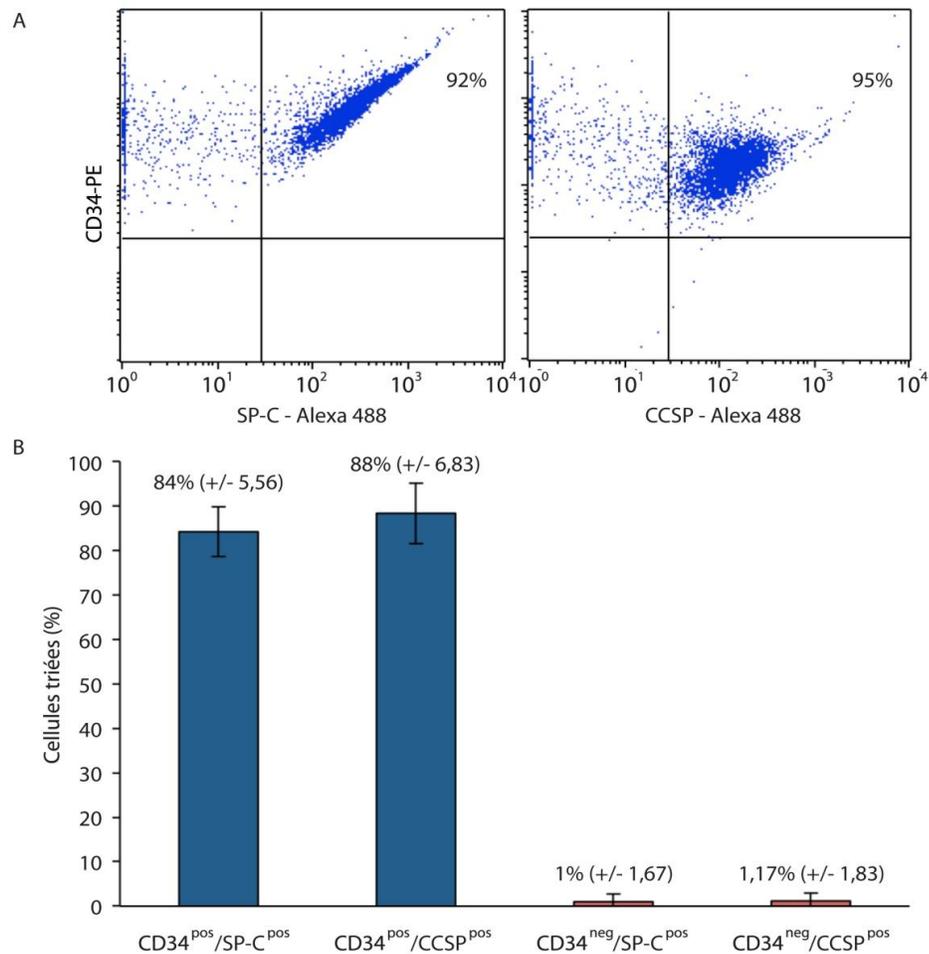
Pour isoler les progéniteurs bronchioloalvéolaires parmi les cellules pulmonaires ovines dissociées, un tri positif pour l'expression de la molécule de surface CD34 a été réalisé sur 6 poumons d'agneaux. Les cellules CD34<sup>POS</sup> avant tri dans les poumons étaient présentes mais rares et <1% de la population totale (0,3% ±0,12) (N=6) (Figure 19). Le tri positif pour l'expression de CD34 a permis d'enrichir une population viable (>85%) de cellules exprimant CD34 à plus de 90% (90,75% ± 6,4) (Figure 19).



**Figure 19: Enrichissement de la population des cellules pulmonaires CD34<sup>POS</sup>.** A: Niveau d'expression de CD34 déterminé par cytométrie en flux pour l'agneau #1508 avant et après tri positif CD34. B: Pourcentage de cellules CD34<sup>POS</sup> pour 6 agneaux avant et après tri \*\*p<0,01

La population des cellules CD34<sup>POS</sup> isolées a été analysée pour l'expression des protéines SP-C et CCSP par cytométrie en flux. Parmi les cellules CD34<sup>POS</sup>, la majorité exprimaient les protéines SP-C et CCSP soit 84% (±5,56) de cellules CD34<sup>POS</sup>/SP-C<sup>POS</sup> et 88% (±6,83) de cellules CD34<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> (Figure 20 B). A noter que la nature des anticorps utilisés (anticorps polyclonal anti proSP-C, anticorps polyclonal anti CCSP, anticorps monoclonal anti CD34 et

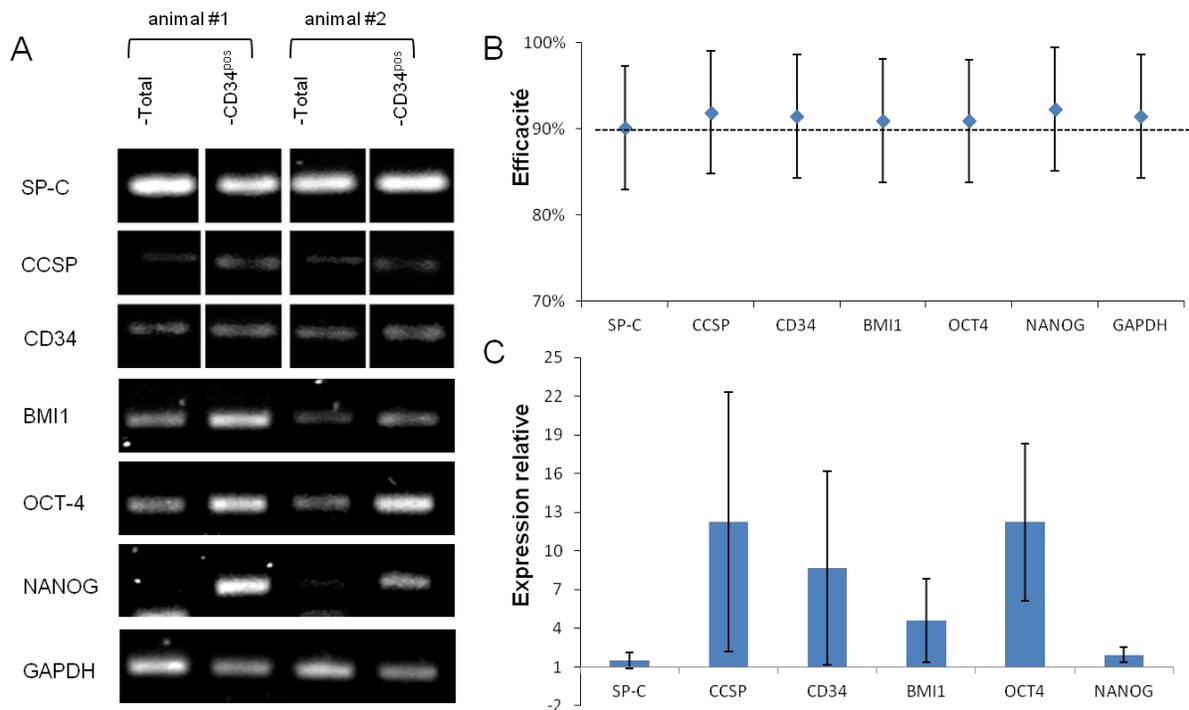
anticorps monoclonal anti CCSP) n'a pas permis de réaliser directement le triple marquage SP-C/CCSP/CD34. Les cellules  $CD34^{neg}/SP-C^{pos}$  et  $CD34^{neg}/CCSP^{pos}$  étaient présentes en quantité négligeable dans la population triée ( $1,0\% \pm 1,7$  et  $1,1\% \pm 1,8$  respectivement) (Figure 20 B) confirmant l'efficacité du tri des progéniteurs bronchioalvéolaires exprimant conjointement CD34, SP-C et CCSP.



**Figure 20 : Expression des protéines SP-C et CCSP dans les cellules  $CD34^{pos}$ .** Les cellules triées ont été analysées par cytométrie en flux pour l'expression des protéines CD34, SP-C, CCSP. A: Cytogrammes des co-expressions des protéines CD34 / SP-C et CD34/ CCSP pour l'agneau #1508. B: Histogramme du pourcentage de cellules  $SP-C^{pos}$ ,  $CD34^{pos}$  et  $CD34^{pos}/CCSP^{pos}$  de 6 animaux (% ± écart type).

## V. EXPRESSION DES GENES CODANT POUR SP-C, CCSP, CD34, BMI1, OCT4 ET NANOG DANS LES PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES

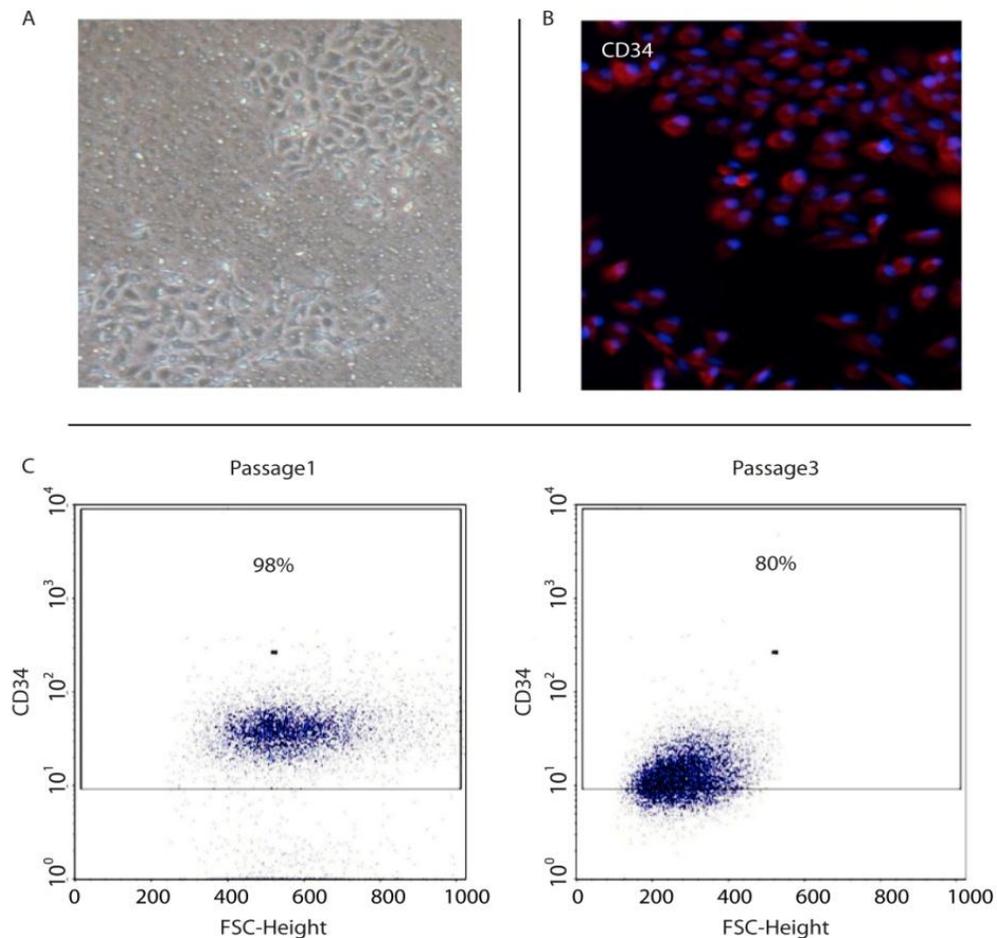
Afin de mieux caractériser la population des progéniteurs bronchioalvéolaires mis en évidence *ex vivo*, l'expression des ARNm de gènes exprimés dans les cellules souches comme *BMI1* impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches adulte, *OCT4* et *NANOG* impliqués dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires, a été analysée par RT-PCR quantitative. Le gène *GAPDH* a été utilisé comme gène de ménage. Comparé aux cellules dissociées du tissu pulmonaire, les cellules  $CD34^{pos}$  surexprimaient les ARNm de SP-C ( $1,54 \pm 0,6$  fois), CCSP ( $12 \pm 10$  fois), CD34 ( $8,6 \pm 7$  fois), BMI1 ( $4,6 \pm 3$  fois), OCT4 ( $12,4 \pm 6$  fois) et NANOG ( $1,9 \pm 0,6$  fois) (Figure 21 A, C), suggérant l'enrichissement des cellules souches durant le tri immunomagnétique  $CD34^{pos}$  (figure 21).



**Figure 21: Expression des ARNm de SP-C, CCSP, CD34, BMI1, OCT4 et NANOG dans les cellules triées  $CD34^{pos}$ .** L'amplification par RT PCR des ARNm de SP-C, CCSP, CD34, BMI1, OCT4, NANOG et GAPDH a été réalisée sur les ARN totaux extraits des cellules après dissociation (total) et après tri  $CD34^{pos}$ . A : Migration sur gel du résultat de la RT-PCR pour deux animaux B : Variations de l'efficacité issue de la pente pour chaque couple d'amorces supérieur à 90% C : Expressions relative des ARNm de SP-C, CCSP, CD34, BMI1, OCT4, NANOG dans les cellules  $CD34^{pos}$ . L'expression relative a été calculée selon la méthode de Pfaffl pour chaque échantillon de cellules triées  $CD34^{pos}$  relativement à l'échantillon de contrôle (cellules non triées) et une normalisation des données par le gène de référence GAPDH. Les expressions sont associées à leurs écarts types. N=3 animaux, en dupliquas.

## VI. MAINTIEN DE L'EXPRESSION DE CD34 *IN VITRO* PAR LES CELLULES TRIÉES

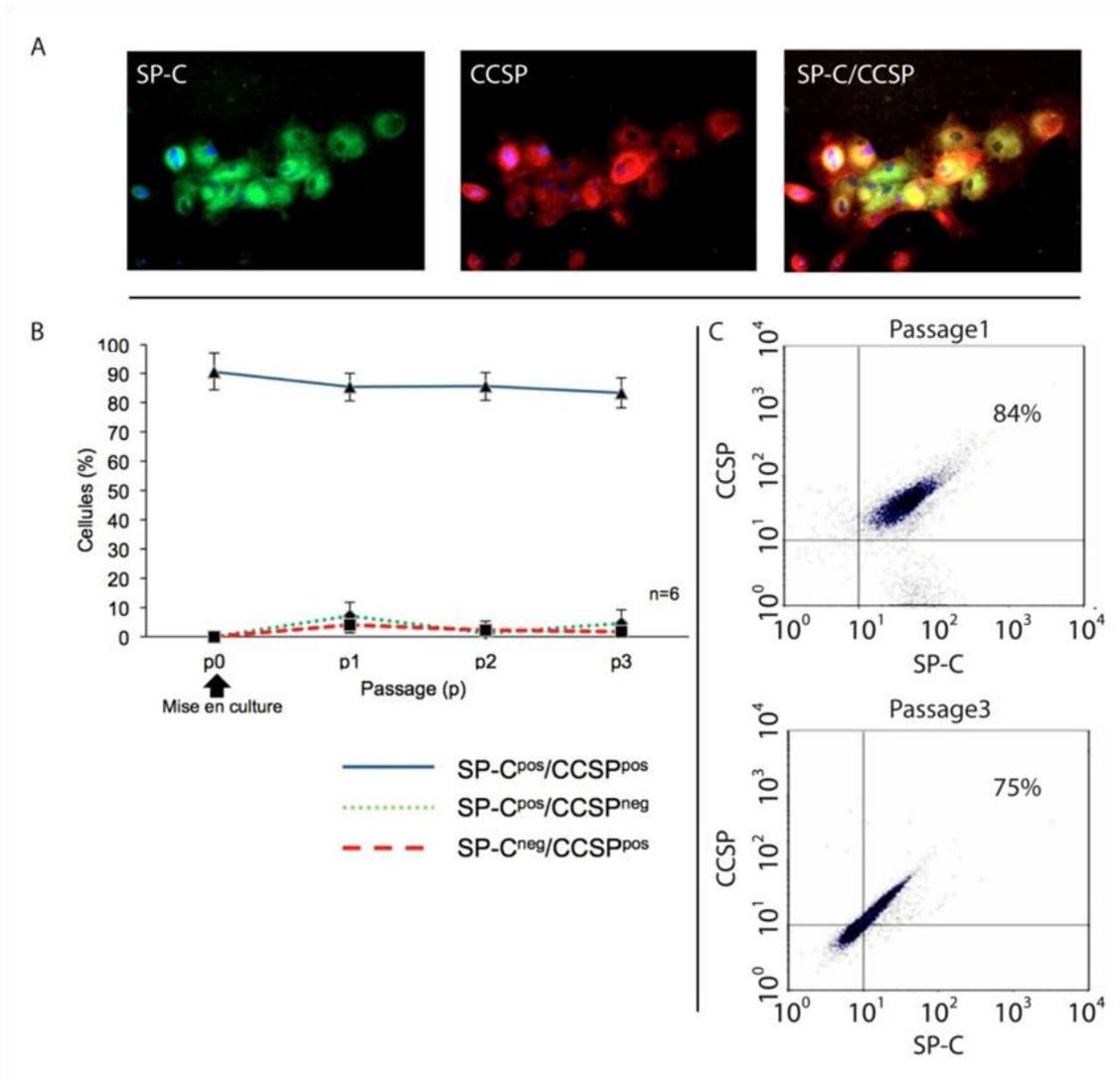
Les cellules triées pour l'expression de CD34 ont été ensemencées sur des membranes poreuses recouvertes de collagènes de type I, IV et de fibronectine. Les cellules CD34<sup>pos</sup> ont adhéré et proliféré sur les membranes jusqu'à confluence dans le milieu Quantum 286 additionné de HGF et de KGF. Après 3 passages (45 jours), les cellules formaient des colonies jointives et prolifératives (Figure 22A). Ces cellules ont maintenu l'expression de CD34 (Figures 22 B, C) aux cours des passages.



**Figure 22: Expression de CD34 dans les cellules triées maintenues *in vitro* en interface liquide/ liquide.** A: Observation en champ clair des colonies épithéliales formées de cellules petites cellules jointives au passage 1 (Grossissement x20). B: Expression de CD34 (rouge) au passage 1 (Grossissement x 20). Les noyaux ont été contre colorés au DAPI (bleu). C: Expression en cytométrie en flux de CD34 au 1<sup>er</sup> et au 3<sup>ème</sup> passage (agneau #1508).

Nous avons ensuite analysé par cytométrie en flux et par immunocytochimie l'expression des protéines SP-C et CCSP dans les cellules CD34<sup>pos</sup> composant des colonies obtenues en interface liquide-liquide aux passages 0, 1, 2 et 3. Au cours du temps, les colonies générées sur

les inserts de culture présentaient des cellules bien jointives et de formes cuboïdales. Au bout de 3 passages (45 jours *in vitro*), les cellules étaient toujours de petites tailles. Ces cellules ont maintenu la co-expression des deux protéines SP-C et CCSP (Figure 23 A). Environ 85% des cellules totales ont maintenu cette co-expression de SP-C et CCSP (figure 23 B et C). Très peu de cellules ont montré une différenciation en AEC II SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>neg</sup> ou en cellules de Clara SP-C<sup>neg</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> (Figure 23 B). A noter que pour une proportion des cellules l'expression de SP-C et CCSP n'étaient plus détectables au bout de 3 passages. (Figure 23C).

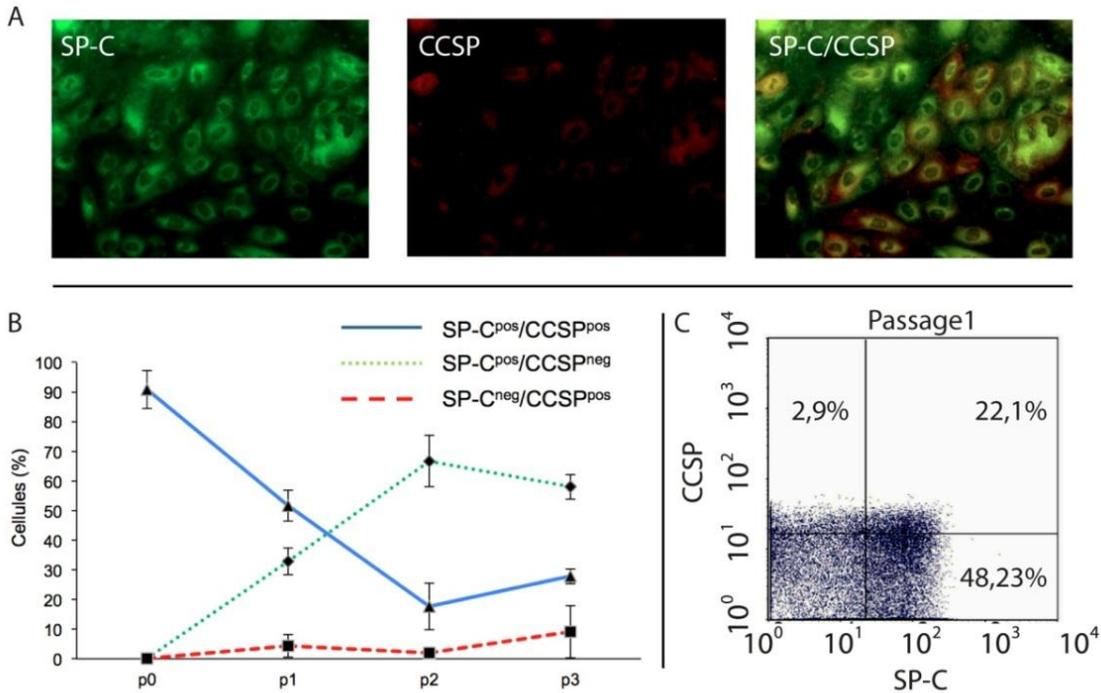


**Figure 23: Maintien de la population des progéniteurs bronchioalvéolaires par culture en interface liquide/liquide.** A: Une colonie de progéniteurs exprimant SP-C (vert) et CCSP (rouge), noyaux (bleu). B: Suivi au cours des passages du maintien de l'expression des protéines SP-C et CCSP (n=6). C: Analyse par cytométrie en flux des proportions de cellules co exprimant SP-C et CCSP au 1<sup>er</sup> et au 3<sup>ème</sup> passage d'un animal représentatif.

## VII. LES CELLULES CD34<sup>POS</sup>/ CCSP<sup>POS</sup>/ SP-C<sup>POS</sup> SE DIFFERENCIENT EN AEC II OU EN CELLULES DE CLARA

Afin d'analyser les capacités de différenciation des progéniteurs SP-C<sup>POS</sup>/ CCSP<sup>POS</sup>, les cellules CD34<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup>/SP-C<sup>POS</sup> ont été cultivées *in vitro* dans différentes conditions de culture favorisant la différenciation en AEC II ou en cellules de Clara. Après 15 jours de culture des cellules CD34, nous avons observé la formation de colonies épithéliales de cellules jointives et ce dans les deux conditions de différenciation en AEC II ou cellules Clara. Les cellules dérivées en conditions de différenciation en AEC II étaient plus étalées et prolifératives que celles générées dans les conditions de culture des cellules de Clara. Au bout de 3 passages (environ 45 jours), les cellules générées dans les conditions de cultures des AEC II étaient capables de proliférer et de reformer de larges colonies de cellules jointives. Les colonies générées dans les conditions de culture des cellules de Clara se maintenaient mais ne proliféraient plus dès le premier passage. Les différentes cultures ont été analysées au fur et à mesure des passages par immunomarquages et cytométrie de flux afin d'évaluer les proportions de cellules exprimant SP-C et/ou CCSP (Figure 24 et 25).

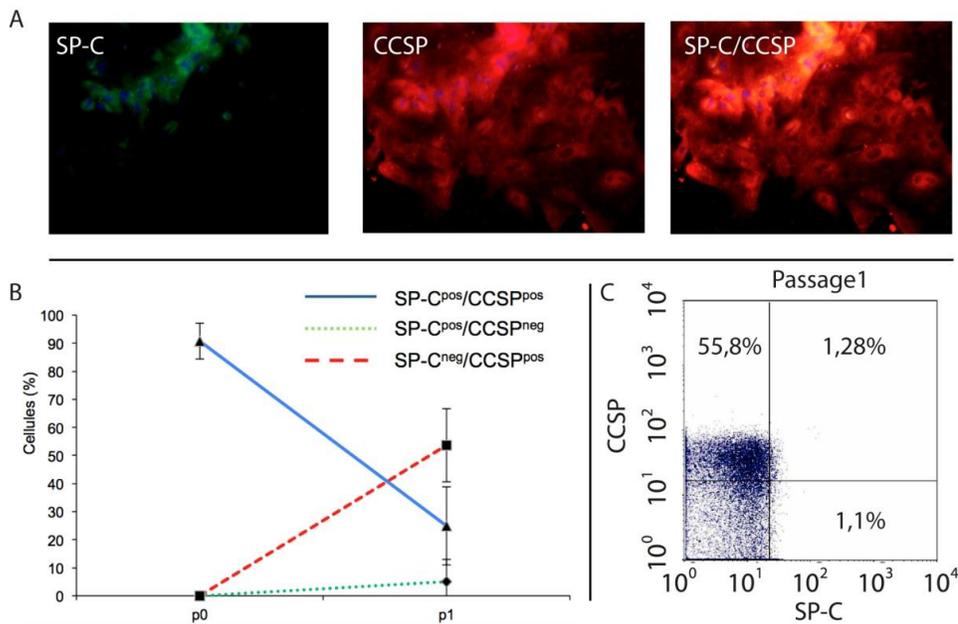
Cultivées en milieu Quantum 286 complémenté d'HGF et KGF sur une matrice de fibronectine et collagènes, les cellules exprimant la protéine SP-C<sup>POS</sup> (exprimé par les AECII au niveau des alvéoles) et ne présentant pas l'expression de la protéine CCSP (essentiellement exprimé par les cellules de Clara au niveau des bronchioles) augmentaient au sein de la population cellulaire totale au fur et à mesure des passages pour représenter 58% ( $\pm 4,14$ ) des cellules au 3<sup>ème</sup> passage (figure 24A et B). Parallèlement, la population de cellules SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> diminuait au cours des passages pour ne plus représenter que 27,8% ( $\pm 2,5$ ) au même stade (Figure 24A et B). Nous avons précédemment décrit l'absence de cellules SP-C<sup>POS</sup>/CD34<sup>NEG</sup> dans la fraction triée par expression de CD34 excluant l'émergence d'AECII à partir d'une population préexistante.



**Figure 24: Différenciation de la population des progéniteurs bronchioalvéolaires en AEC II.** A: Expression des protéines SP-C (vert) et CCSP (rouge) au premier passage. B: Suivi dans le temps de l'expression de SP-C et CCSP (n=6). C: Analyse par cytométrie en flux des proportions de cellules exprimant SP-C et CCSP au 1<sup>er</sup> passage (agneau # 1728).

Alternativement, les cellules CD34<sup>pos</sup> maintenues en milieu Quantum 286 sur une matrice fibronectine favorisant les cellules de Clara ont générées des colonies peu prolifératives, maintenues sur un seul passage (Figure 25 A). L'analyse par immunomarquage des cellules a permis de mettre en évidence une différenciation rapide des cellules souches bronchioalvéolaires SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> en cellules SP-C<sup>neg</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> compatibles avec des cellules de Clara.

Au bout de 15 jours, 53,6% ( $\pm 13$ ) des cellules en culture étaient SP-C<sup>neg</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> alors que la population des progéniteurs bronchioalvéolaires SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> régressait pour ne plus représenter que 24,9% ( $\pm 14$ ) des cellules présentes en culture (Figure 24 B). Comme nous l'avons montré, l'absence de cellules CCSP<sup>pos</sup>/ CD34<sup>neg</sup> dans les fractions triées exclut l'émergence de ces cellules de Clara à partir de cellules différenciées CCSP<sup>pos</sup>/ CD34<sup>neg</sup> préexistantes. Ces résultats suggèrent très fortement leur émergence par un phénomène de différenciation *in vitro* à partir des précurseurs CD34<sup>pos</sup>/ SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup>.

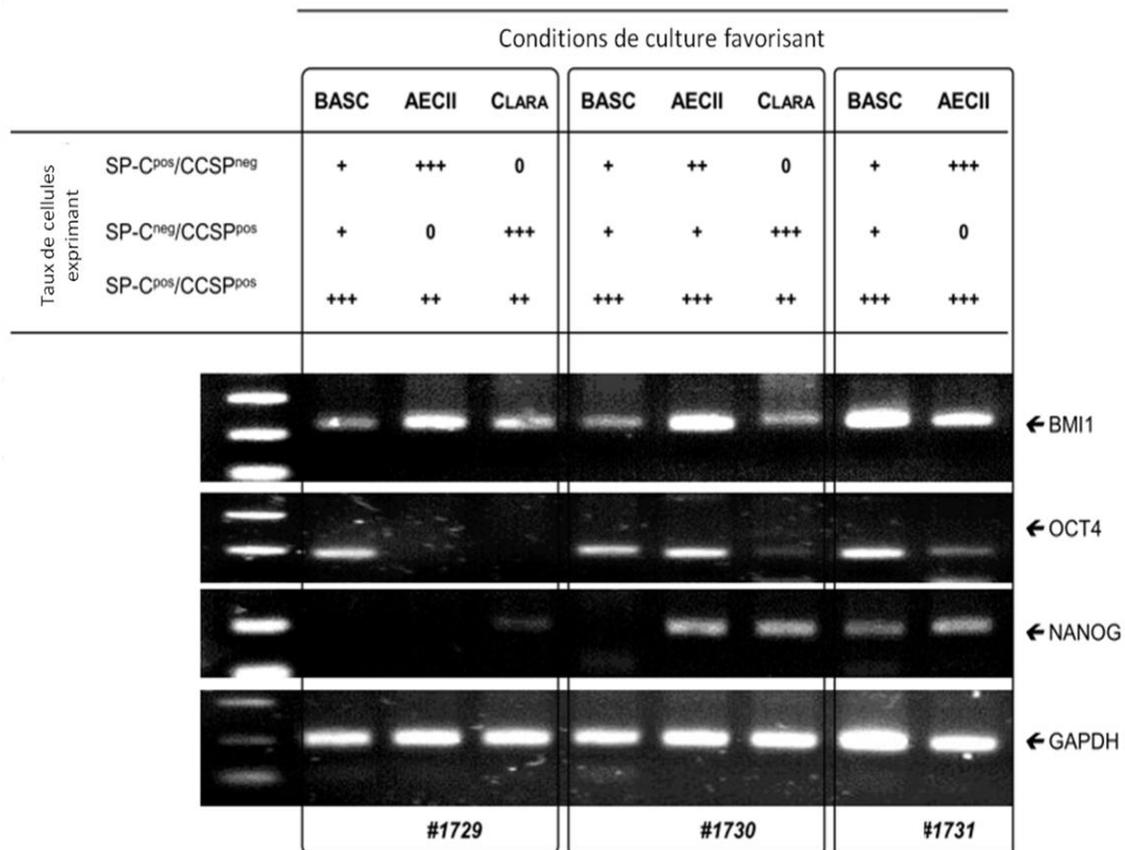


**Figure 25: Différenciation de la population des progéniteurs bronchioalvéolaires en cellules de Clara.** A: Expression des protéines SP-C (vert) et CCSP (rouge) au premier passage. B: Suivi au cours des passages de l'expression de SP-C et CCSP (n=4 animaux). C: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de SP-C et CCSP au 1<sup>er</sup> passage (agneau #1728).

### VIII. EXPRESSION DES GENES CODANT POUR CD34, BMI1, OCT4 ET NANOG DANS LES PROGENITEURS BRONCHIOALVEOLAIRES

L'expression des transcrits des gènes BMI1, OCT et NANOG a été analysée par RT-PCR sur les ARN extraits de progéniteurs bronchioalvéolaires (agneaux # 1729, # 1730 et # 1731) maintenus en culture dans les différentes conditions de maintien et de différenciation en AEC II ou en cellules de Clara. Nous avons corrélé ces niveaux d'expression à l'état de différenciation des progéniteurs estimé par l'analyse de SP-C et CCSP en cytométrie en flux. Nous avons défini les cellules par leur niveau d'expression en examinant 3 classes SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>, SP-C<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup> et SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup> et en appliquant une échelle semi quantitative où "0" correspond à aucune cellule du phénotype donné, "+" à moins de 15% de cellules du phénotype, "++" à entre 15 et 50% de cellules du phénotype et "+++" à plus de 50% de cellules. Le niveau d'expression des gènes d'intérêt a été rapporté à ces différentes classes de populations cellulaires nous permettant de relier l'expression génique et le phénotype cellulaire (Figure 26). L'ARNm de *BMI1* était exprimé dans les conditions de maintien et semblait ne pas être modifiée dans les conditions de différenciation. Le transcrite du gène *OCT4* a été détecté dans des conditions de maintien qui favorise la multiplication des cellules souches bronchioalvéolaires

et dans lesquels plus de 70% des cellules avaient un phénotype SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>. Dans les conditions de différenciation en AEC II et en cellules de Clara, l'expression d'*OCT4* a été réduite dans deux des trois agneaux analysés. L'expression élevée du transcrite d'*OCT4* dans les conditions de différenciation en AEC II de l'agneau # 1730 pourrait s'expliquer par la faible proportion des cellules SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup> par rapport aux deux autres animaux au passage 1. Ce résultat suggère que le transcrite du gène *OCT4* est préférentiellement exprimé par les progéniteurs bronchioloalvéolaires SPC<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>. Cette expression était réduite dans les AECII pour 2 des 3 animaux analysés et dans les cellules de Clara. L'expression du transcrite de *NANOG* semblait être moins stable dans les progéniteurs bronchioloalvéolaires maintenus *in vitro* par rapport aux cellules SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> *ex vivo* (Figure 26).



**Figure 26: Expression des gènes codant pour BMI1, OCT4 et NANOG dans les progéniteurs bronchioloalvéolaires et les cellules différenciées.** En fonction des conditions de culture (maintien, différenciation en pneumocytes de type II ou cellules de Clara), le taux de cellules SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup>, SP-C<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup> et SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> a été analysé par cytométrie en flux. "0" : pas de cellules exprimant le marqueur; «+»: cellules exprimant le marqueur <15%; "++": 15%< cellules exprimant le marqueur <50%; pour ; "+++": cellules exprimant le marqueur >50%. Le niveau d'expression des ARNm BMI1, OCT4 et NANOG ont été analysés par RT-PCR. GAPDH: gène de ménage.

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré l'existence de rares cellules co-exprimant les deux protéines SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> *in situ* au sein de poumon d'agneaux. Nous avons caractérisé et quantifié cette population par cytométrie en flux. Ces cellules représentaient moins de 0,5% des cellules pulmonaires dissociées du parenchyme pulmonaire. Cependant, bien que des résultats quant à l'identité des cellules souches bronchioloalvéolaires (SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>) aient été obtenus dans des études sur les souris, ces progéniteurs bronchioloalvéolaires n'ont pas encore été décrits chez d'autres espèces notamment l'ovin et l'humain.

Pour déterminer si les cellules SCP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> ovines avaient des propriétés de cellules souches bronchioloalvéolaires, nous avons isolé cette population rare à partir de cellules dissociées de l'épithélium respiratoire d'agneaux nouveaux nés. Nous avons effectué un tri positif des cellules exprimant l'antigène CD34. Nous avons analysé dans les cellules isolées CD34<sup>pos</sup>, l'expression de SP-C et CCSP. Nous avons mesuré par RT-PCR Quantitative l'expression des transcrits de certains gènes génériques des cellules souches tels que *OCT4*, *NANOG* et *BMI1*. Nous avons montré l'existence de cellules CD34<sup>pos</sup> co-exprimant SP-C et CCSP au sein du poumon ovin et exprimant fortement les transcrits des gènes *OCT4*, *NANOG* et *BMI1* par rapport aux cellules totales du poumon ovin. Nous avons établi leurs capacités de maintien et de différenciation. Dans des conditions de maintien, nous avons montré la capacité des cellules progénitrices à se multiplier et à maintenir au cours des passages l'expression des protéines SP-C, CCSP et CD34. En outre l'analyse par RT PCR a montré une forte expression des transcrits des gènes *OCT4*, *NANOG* par rapport aux cellules dissociées du tissu pulmonaire ovin. Ces cellules étaient maintenues et amplifiées pendant 3 passages (45 jours).

Afin de déterminer la capacité des progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins à générer différents types cellulaires, des cellules CD34<sup>pos</sup> ont étéensemencées dans des conditions favorisant la culture soit des AEC II soit des cellules de Clara. Nous avons analysé la capacité des cellules triées à générer des colonies épithéliales dans les conditions de différenciation. Nous avons tout d'abord montré que ces cellules étaient capables de former des colonies dans les deux conditions de culture favorisant la différenciation. Du point de vue morphologique, sur la matrice simple de fibronectine, des colonies de cellules étaient observées au bout de 15

jours. Ces cellules étaient de petites tailles et très jointives. Sur la matrice complexe de fibronectine et de collagènes I et IV, les cellules épithéliales étaient relativement plus étalées, jointives et plus dynamiques (3 passages). Nous avons observé par analyse moléculaire et immunologique que les progéniteurs bronchioloalvéolaires perdaient l'expression de SP-C ainsi que les transcrits des gènes de cellules souches *OCT4* et *NANOG* lorsqu'elles étaient cultivées sur la matrice simple pour générer des cellules de Clara. En parallèle, ces progéniteurs perdaient l'expression CCSP sur la matrice complexe pour générer des AEC II. Sur la base des résultats que nous avons présenté précédemment ainsi que l'efficacité du tri immunomagnétique, nous pouvons conclure que les tapis cellulaires obtenu à partir des cellules épithéliales triées se sont développés à partir des seules cellules triplement marquées SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup>.

Les cellules souches bronchioloalvéolaires initialement décrites au niveau des jonctions bronchioloalvéolaires chez la souris ont été caractérisées par l'expression de Sca-1 (spécifique à la souris) et CD34, qui sont des marqueurs de cellules souches, et leur co expression de SP-C et du CCSP. Alors que nous avons réussi à montrer la présence des rares progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins *in vivo* chez les animaux nouveaux nés (moins de 3 mois), d'autres groupes n'ont pas pu identifier ces cellules chez les ovins adultes tout en analysant par immunomarquage sur des section de poumon la coexpression des protéines CCSP et SP-C (156), (143). De façon intéressante, deux études ont rapporté la présences de très rares cellules co-exprimant SP-C et CCSP au sein des tumeurs viro-induites chez les ovins (143, 176). Dans une étude très récente, nous avons isolé une population de cellules tumorales co exprimant SP-C et CCSP au sein des tumeurs induites par le même virus (Archer et Leroux, données non publiées). Pris ensemble, ces résultats sont cohérents avec la présence d'une population co exprimant SP-C et CCSP qui sont extrêmement rares *in vivo* dans les sections pulmonaires, représentant ainsi une population de cellules souches ou progénitrices. La différence entre notre étude et les études précédentes(143, 156) peut être expliquée par le faible niveau de co expression du SP-C et du CCSP dans les coupes de tissus par rapport à l'expression de ces marqueurs dans les AEC II et les cellules de Clara et par la méthode d'isolement et d'enrichissement de la population CCSP/SP-C que nous avons pratiqué. De même, dans notre équipe, nous avons souvent observé dans les cultures de cellules tumorales issues d'un adénocarcinome ovin induit par le rétrovirus JSRV, des cellules SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>

dans les conditions de culture en 3D qui favorise le maintien des conditions physiologiques les plus appropriées. Ces résultats nous ont encouragés à poursuivre leur caractérisation.

Les progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins sont rares et ne représentent que 0,33% ( $\pm$  0,3%) de la population totale des cellules du poumon dissociée. Nos résultats sont cohérents avec une étude récente qui montre que les cellules souches indifférenciées humaines identifiées par l'expression du *c-kit* sont de l'ordre 1 pour 6000 cellules dans les bronchioles et 1 pour 30 000 cellules dans les alvéoles chez les adultes (111). Dans le tissu pulmonaire foetal humain à 12-36 semaines de gestation, le taux de cellules souches varie de 1 pour 11000 à 1 pour 600 cellules, avec une moyenne de 1 pour 4100 cellules (111). L'enrichissement de la population CD34<sup>pos</sup> a été crucial pour isoler les cellules souches bronchioloalvéolaires des ovins nouveaux nés. Même si le nombre absolu de cellules CD34<sup>pos</sup>/ SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> a finalement été faible (quelques milliers de cellules), cette procédure nous a permis de confirmer l'existence de cette sous population rare. Toutes les étapes de sélection ont été effectuées *ex vivo*, sans culture cellulaire et en l'absence de sérum connus pour induire la différenciation cellulaire. Les cellules co-exprimant CD34<sup>pos</sup>/ SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup> ressemblent au BASC murines qui sont bien caractérisé du point de vu morphologique et phénotypique. Nous avons clairement montré que les cellules bronchioloalvéolaires ovines se comportent comme des progéniteurs en culture avec un potentiel de maintien et de différenciation *in vitro*.

Nous avons montré que les progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins *ex vivo* expriment les transcrits des gènes *BMI1*, *OCT4* et *NANOG*, qui sont parmi les marqueurs les plus importants de cellules pluripotentes indifférenciées et sont des acteurs majeurs dans le développement des cellules souches embryonnaires et adultes. *BMI1* est fortement exprimé dans les tumeurs et régule le destin des cellules cancéreuses et les cellules souches normales et tumorales (113, 134). Ce gène participe aussi au maintien des cellules souches endogènes par la répression des gènes impliqués dans la mort cellulaire et la sénescence (168). Chez la souris, *BMI1* est nécessaire pour l'expansion des BASC (52). Comme chez la souris, les progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins expriment *BMI1* dans les conditions de maintien et d'auto renouvellement. A noter que cette expression n'a pas été modifiée dans les conditions de différenciation.

*OCT4* qui est un membre de POU (Pit-Oct-Unc), de la famille des facteurs de transcription, est essentiel pour le maintien et l'auto-renouvellement des cellules souches. *NANOG*, interagit entre autre avec Oct4 pour co-activer des cibles et contribue à la détermination du destin des cellules pluripotentes au cours de l'embryogenèse (35, 37). *OCT4* et *NANOG* sont parmi les facteurs clés qui permettent la reprogrammation des cellules somatiques adultes en cellules souches pluripotentes (125, 165). De façon intéressante, il a été montré récemment que les iPS générés à partir de fibroblastes de moutons exprimaient *OCT4* et *NANOG* et bien d'autres marqueurs intracellulaires et à la surface associée à des cellules indifférenciées, comme chez les humains et les souris (125). Comme dans d'autres organes, *OCT4* et *NANOG* sont exprimés dans les cellules souches du poumon et leur co-expression peut induire à la formation de cellules souches tumorale (39, 133).

## **CHAPITRE 3: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



Dans notre travail, nous avons montré, pour la première fois chez les ovins nouveaux nés, l'existence d'une population de cellules épithéliales qui co-expriment le SP-C et le CCSP. Ces cellules isolées par tri immunomagnétique sur la base de leur expression spécifique d'un marqueur de cellule souche CD34, et cultivées *in vitro* en interface liquide-liquide, sont capables de régénérer des colonies de cellules non différenciées. De même, dans les conditions de différenciation, les colonies régénérées à partir des seules cellules souches bronchioloalvéolaires présentent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques similaires soit aux AEC II soit aux cellules de Clara. Les progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins présentent donc une capacité de différenciation multipotente pour donner soit des cellules alvéolaires soit des cellules bronchiolaires. Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que ces cellules peuvent être considérées, comme des cellules progénitrices des cellules de Clara et des AEC II (figure 27).

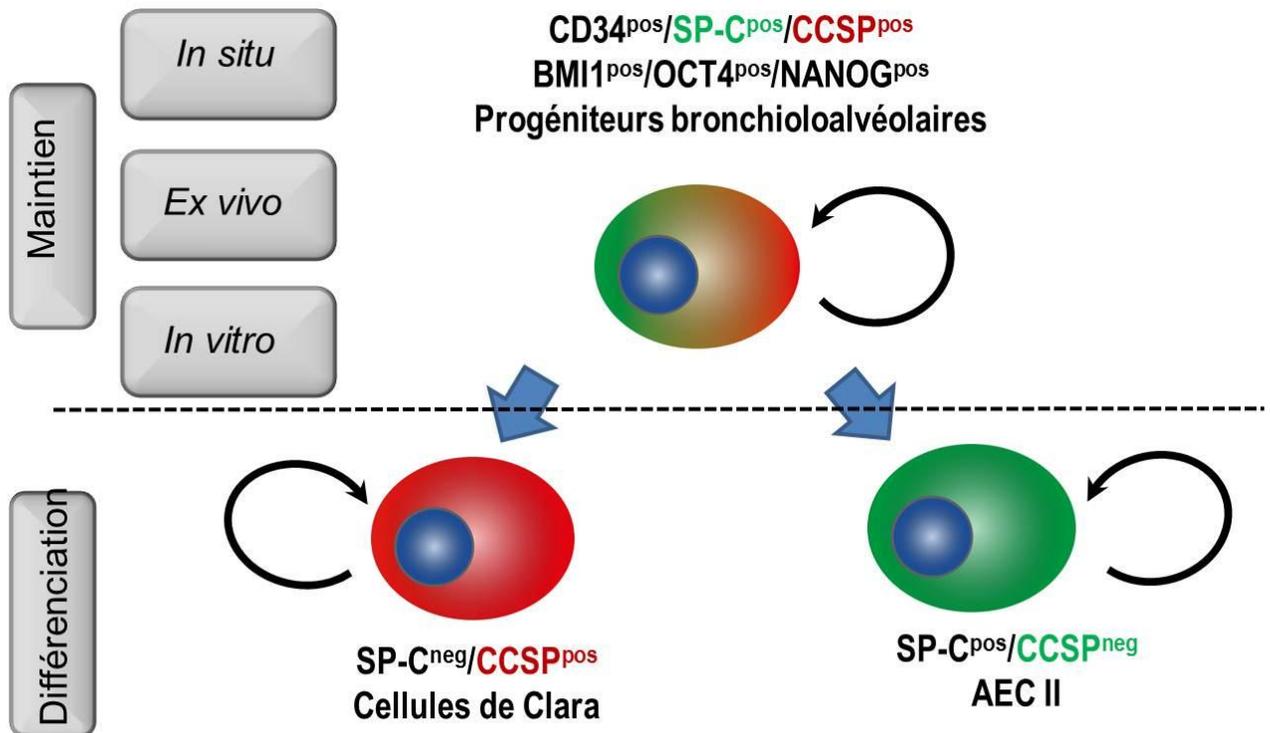


Figure 27 : Caractérisation des progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins

Les cellules isolées et l'épithélium reconstitué en monocouche par les cellules souches bronchioloalvéolaires ne sont cependant pas totalement caractérisés pour le moment. Il serait important d'identifier et de quantifier, sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques des différentes populations épithéliales pulmonaires et comparer les résultats obtenus aux données présentées dans la littérature au niveau d'un épithélium bronchiolaire et alvéolaire.

De plus dans le but de mieux caractériser les progéniteurs, il sera intéressant de déterminer l'activité enzymatique de la télomérase des cellules isolées. En effet, cette activité enzymatique est faiblement détectée dans les cellules souches quiescentes mais hautement présente dans les cellules à activité et prolifération importante, notamment les cellules progénitrices (233), alors qu'elle semble absente dans la plupart des cellules somatiques.

L'analyse des voies de signalisations impliquées dans le maintien et la différenciation des cellules souches, nous donnera plus d'informations sur le mécanisme de maintien de la niche des cellules souches bronchioloalvéolaires ovines.

Enfin, il serait important de réaliser des tests de reconstitution *in vivo* de l'épithélium bronchiolaire et alvéolaire. Ce test consiste à régénérer un épithélium bronchiolaire et / ou alvéolaire mature à partir de cellules souches purifiées et de tenter de reconstituer à nouveau un épithélium différencié à partir de ces cellules dans l'animal.

## PERSPECTIVES

Notre équipe de recherche s'intéresse entre autre à l'origine de cellules tumorales au cours du développement de l'adénocarcinome pulmonaire ovin viro-induit. L'adénocarcinome pulmonaire ovin induit par le  $\beta$ -rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus) est un cancer pulmonaire naturel du mouton. Il est radiologiquement, cliniquement et histologiquement apparenté à l'adénocarcinome pneumonique (P-ADC), une forme particulière de cancer du poumon chez l'homme. De façon intéressante, notre équipe de recherche a montré que certaines des cultures dérivées de poumons tumoraux et maintenues en conditions de culture tridimensionnelle, expriment à la fois des marqueurs de AEC II (SP-C, SP-A et CD44v6) et de cellules de Clara (CCSP). Ces résultats soulèvent l'hypothèse d'une origine des tumeurs ovines à partir de cellules souches pulmonaires. Ainsi, il serait important d'étudier l'implication des progéniteurs bronchioloalvéolaires décrits dans ce manuscrit, dans le développement de la tumeur suite à leurs interactions avec le virus JSRV (figure 28).

Il serait nécessaire de tester l'infectabilité des cellules souches CD34<sup>pos</sup> saines par JSRV, soit en co-culture sur insert avec des cultures primaires de cellules tumorales isolées de tumeurs soit par mise en contact avec le surnageant de cultures positives pour JSRV. En parallèle il serait important de transférer les cellules souches avec des vecteurs d'expression de l'enveloppe Env, puisque la protéine Env est le déterminant oncogénique de JSRV. Le pouvoir transformant de l'Env devrait être analysé par la formation de colonies en gélose et par l'apparition de foyer de transformation en monocouche.

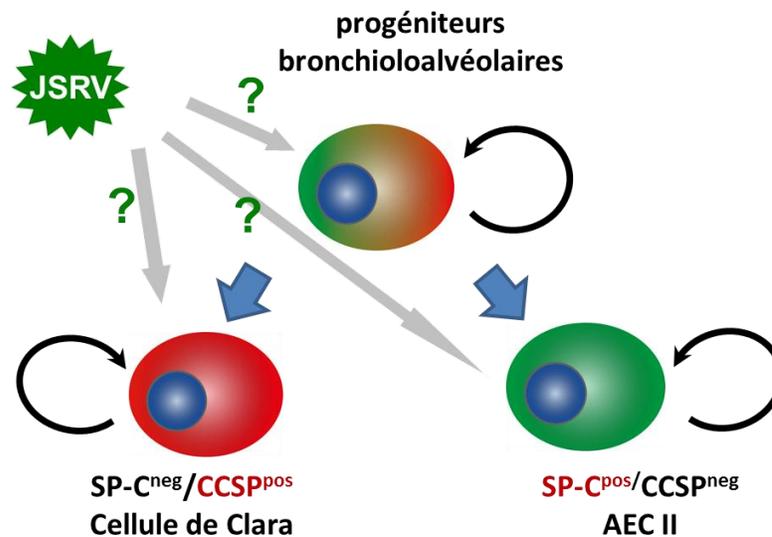


Figure 28 : Interaction possible des progéniteurs bronchioloalvéolaires ovins avec JSRV



## **CHAPITRE 4: PUBLICATION**

## REVIEWER #1 (COMMENTS TO THE AUTHOR (REQUIRED)):

---

*The manuscript entitled "Bronchioloalveolar stem cells from the lamb lungs can differentiate into Clara cells or alveolar type II cells" submitted by Abi-Rizk et al. is well written, very interesting and demonstrates for the first time isolation and differentiation of BASC from sheep lungs. However, my enthusiasm for this study is decreased by some technical concerns which are detailed below.*

A: We thank the reviewer #1 for his interest in our work.

*Q1: Results presented in Figure 1 for immunostaining and colocalization of CCSP and SPC should be performed using confocal imaging to exclude autofluorescent artifacts. Positive cells should be quantitated in the sections.*

A1: We performed tissue sections on 4 different normal tissues and performed 6 independent staining experiments. Lung sections were 6 mm thick and were observed with a high quality microscope (AxioImager Zi, Zeiss). We observed very rare double positive cells, highlighting the fact that those cells are very rare and difficult to observe upon histological screening. But this result was encouraging enough to prompt us to look for these cells using dissociated tissues and flow cytometry. We modified the text as follows in the manuscript:

See line 167-171: "Interestingly, among the 4 different lungs tested and stained several times, the SP-C/CCSP double positive cells remained rare events present in only few lung sections (Figure 1B). But this first evidence of the presence of bronchioloalveolar precursors *in vivo* in sheep prompted us to search this population on lung cells from dissociated tissues".

*Q2: Additionally, no gating strategy for flow cytometry analysis is detailed in the methods. How were dead cells excluded, what were controls used to set the gates? The legend states that one lamb data is pictured. means and SE should be presented along with the dot plots. Better compensation and gating may reveal more discreet populations of each SPC and CCSP positive. The dot plots presented do not make a convincing case that the staining even worked. Instead of using a secondary antibody detection for intracellular staining the investigators may try directly conjugating the primary to a dye using a commercially available kit.*

A2: Regarding the gating and controls, we modified the text in the "materials and methods" section to precisely indicate the gating conditions and the controls performed. See lines 142-145: "Populations of interest were gated regarding their physical properties (forward and size scatters) to eliminate dead cells and cell debris. Immunostaining using only the secondary antibody were used as controls to adjust the detection threshold for each measured wavelength"

We agree that primary antibodies directly conjugated to a dye may be more convincing. But, working with a large animal for which only few specific antibodies are available is challenging. We usually worked using reported results from related species such as cattle. We choose to select the best tools to perform both cytometry and immunostaining on cells or frozen sections. In the future we will directly conjugate the selected primary antibodies.

The legend of figure 1 in the original manuscript stated that "(C) SP-C and CCSP expression from a representative lamb (# 1507) in *ex vivo* dissociated cells by flow cytometry showing the presence of a SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> population. (D) Frequency of SP-C<sup>pos</sup>, CCSP<sup>pos</sup> and SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells from ten 0- to 3-month-old-lambs. The data are expressed as the mean ( $\pm$  SD) percentage of the cells expressing the cellular markers." Panel C shows as an illustration the dot plot from one representative animals but panel D gives means and SE for 10 animals.

*Q3: Figure 2. Doesn't appear CCSP staining worked at all. Would like to see some positive and negative controls.*

A3: CCSP staining was evidently low and CCSP<sup>pos</sup> cells rare in the dissociated lung tissues. But we are confident that this staining was specific looking at the flow cytometry analysis using the same antibody on the CD34 enriched population (figures 2B and 4B).

Q4: *Figure 3. RT-PCR on CD34 positive cells (not CCSP/SPC positive) could be representative of other primitive cell types present in the isolation (HSC, EPC etc).*

A4: We agree and we cannot exclude contamination with other CD34<sup>pos</sup> cells. In accordance to your comment, we slightly changed the text on lines 214-215: "We assumed that hematopoietic stem cells or endothelial progenitors could contribute the the SP-C<sup>neg</sup> and CCSP<sup>neg</sup> cells among the CD34<sup>pos</sup> population".

Q5: *Also no purity of this CD34 pos bead isolation is shown (by flow cytometry).*

A5: In the initial version of the manuscript, we wrote " In all of the 6 tested animals, the CD34 cell sorting remarkably enriched the CD34<sup>pos</sup> population from 0.7% ( $\pm$  0.12) after tissue dissociation to over 90% in the CD34-selected single cell suspension with greater than 85% viability, as measured by trypan blue exclusion". To illustrate this result, we added the figure 3 (line 202) showing the CD34 population before and after sorting in a single animal (3A) and for the 6 tested animals (6B).

Q6: *Immunostaining with 3 colors to colocalize in tissue or isolated cells would be more convincing.*

A6: We agree but as we stated for Q2, unfortunately only few reagents were (and are) available for these studies in sheep.

Q7: *Would like to see FUNCTIONAL analysis of epithelial cell differentiation not just immunostain for a marker. ALI, secretion of protein etc.*

A7: This would have been very interesting. Unfortunately, we did not have enough cells to perform all the approaches. To get to the results, we favored the *ex vivo* characterization and the *in vitro* differentiation.

#### **REVIEWER #2 (COMMENTS TO THE AUTHOR (REQUIRED)):**

---

AJP Review L-00110-2012

Q1: *This paper describes the presence of a CD34+ cell population purified from ovine lung that has the double staining (SPC+/CC10+) characteristics of the previously described BASC population purified from mouse. Although interesting, there are a number of issues and inconsistencies in the data presented that would need significant revision prior to publication in AJP. Recent debate about the identity of the BASC population and its significance also lessens enthusiasm for the work presented.*

A1: We thank the reviewer #2 for its comment. We know the debate on these specific precursors. But as most of the work had been done in mice, we thought that the description of similar precursors in a large animal might be of interest for the field.

Q2: *The immunohistochemistry shown in Fig 1 is difficult to see clearly in the figures provided, and is only weakly convincing. A number of methodologic details regarding how the flow cytometry was performed also make it difficult to interpret parts C and D of the figure. It is also unclear from the methods how the authors performed flow cytometry accurately for molecules that are intracellular (SPC/CC10). This information should be expanded to allow the reader to follow exactly what was done and facilitate potential replication of the results presented.*

A2: We modified the "materials and methods" section to answer to these specific points.

Q3: *The "before/after" label in fig 3 should be more specific to help guide the reader. Why is the CD34 band the same in both the sorted and unsorted populations? For the remaining expression markers, seeing either quantitative RT-PCR data or multiple replicates would make this result more convincing. The results in these cells appear to be different than published gene expression results from mouse BASCs, which should be discussed.*

A3: We slightly changed the legend of figure 4 (initially figure 3), see lines 458. We initially planned to quantify the transcripts but were stopped by the amount of RNA. Taking into account the quality and quantity of RNAs, we decided to go for a qualitative RT-PCR. We did not feel that the quantification would be more convincing. Our goal was to give a tendency for such or such marker. The quantification may have shown differences in CD34 expression as suggested by the intensity

of the bands. We are extending our study to get quantitative results on a larger panel of genes of interest;

*Q4: In figure 4, it is not clear from the methods described what the differences are between the various differentiation media, making the protocol difficult to follow. Greater clarity here would be required for the reader to be able to follow exactly what was done and interpret the differentiation experiments.*

A4: We agree and changed the "material and methods" section to be more precise about the maintenance and differentiation media.

*Q5: Overall, although the results may represent the presence of a CD34+ population capable of differentiating into SPC+ or CC10+ cells, some caution is required regarding the classification of these cells as ovine bronchoalveolar stem cells. The purification protocol used to derive the cells, and the conditions for their culture and maintenance are clearly different than that described for mouse BASCs. The conditions and results of maintaining these cultures, and the methods used to induce or allow differentiation, are unclear at best as described.*

A5: We agree that we described a population that may not be the exact same thing as the BASC described in mice. The starting point of our studying was our observation of SP-C/ CCSP positive cells in the lung and *in vitro* culture of lung epithelial cells. We selected the cells by the expression of CD34, also expressed in the murine BASC but in absence of an equivalent gene in sheep, we were not able to use Sca1, mostly described in mice. In the discussion, we mentioned that the ovine bronchioalveolar progenitor cells described in this paper presented some similarities with the BASCs as described in the mice model. We choose to call these cells "bronchioalveolar progenitors" in sheep, keeping the term "BASC" for the mouse cells. We are confident that we described a relevant population *in vivo* (Fig 1 and 2), present while rare in the lung and that these cells are progenitors able to differentiate in at least 2 cell types (Figure 5). These cells share expression of genes activated in stem cells. To stay coherent with our findings, we changed the title for " Bronchioalveolar progenitors cells from the lungs of lambs can differentiate into Clara cells or alveolar type II cells".

# **Bronchioloalveolar progenitor cells from the lungs of lambs can differentiate into Clara cells or alveolar type II cells**

Alain Abi-Rizk <sup>1-3\*</sup>, Fabienne Archer <sup>1-3\*</sup>, Vincent Cottin <sup>1-4</sup>, Sophie Desloire <sup>1-3</sup>,  
Christine Dolmazon <sup>1-3</sup>, Barbara Gineys <sup>1-3</sup>, François Guiguen <sup>1-3</sup>, Jean-François  
Mornex <sup>1-4</sup> and Caroline Leroux <sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon; <sup>2</sup>Université Lyon 1; <sup>3</sup> INRA, UMR754, "Rétrovirus et Pathologie Comparée", UMS 3444 SFR BioSciences Gerland - Lyon Sud; <sup>4</sup>Hospices Civils de Lyon, F-69007 Lyon, France.

\* The first two authors contributed equally to this study.

## Corresponding author

Caroline Leroux

UMR754 INRA Université de Lyon, Université Lyon 1, 50 avenue Tony Garnier,  
69007 Lyon Cedex 07, France

Phone: 33 437287620 Fax : 33 437287605 E-mail: caroline.leroux@univ-lyon1.fr

## Author Contributions:

AAR: Conception, design, acquisition, analysis and interpretation of the data and drafting of the article. FA: Substantial contribution to the conception, design, acquisition, analysis and interpretation of the data; drafting the manuscript and revising it for intellectual content and final approval. VC: Contributed to the conception and design of the experiments, drafting of the manuscript and revising it

for intellectual content and final approval. SD, CD, BG and FG: Acquisition and analysis of the data and final approval of the article. JFM: Contributed to the conception, design, analysis and interpretation of the data; drafting of the manuscript and revising it for intellectual content and final approval. CL: Substantial contribution to the conception and design of the experiments, acquisition of the data, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript, writing the article and final approval and revision for intellectual content.

Running title: Bronchioloalveolar progenitors in lamb lungs

Keywords: SP-C, CCSP, differentiation, maintenance, CD34 selection, BASC

1 **ABSTRACT**

2 Bronchioalveolar stem cells located at the bronchiolar/alveolar junction may be  
3 involved in embryogenesis or regeneration. These cells have not yet been described  
4 in large animals, and they may enable the development of new therapeutics to treat  
5 acute or chronic lung disease. In this study, we aimed to establish the presence of  
6 bronchioalveolar stem cells in ovine lungs and to characterize their stemness  
7 properties. Lung cells were studied using immunohistochemistry on frozen sections  
8 of the lung, and immunocytochemistry and flow cytometry were conducted on derived  
9 cells. The stem cells were identified by co-expression of CCSP, SP-C and the CD34  
10 hematopoietic stem-cell marker. A minor population of CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
11 cells (0.33% ± 0.31) was present *ex vivo* in cell suspensions from dissociated lungs.  
12 Using CD34 magnetic positive cell sorting, undifferentiated SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells  
13 were purified (>80%) and maintained in culture. Using synthetic media and various  
14 extracellular matrixes, SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells differentiated into either Clara cells or  
15 alveolar epithelial type-II cells. Furthermore, bronchioalveolar stem cells obtained  
16 *ex vivo* and *in vitro* expressed the stem cell-specific genes *NANOG*, *OCT4* and *BMI1*.  
17 We report for the first time in a large animal the existence of bronchioalveolar  
18 progenitors with dual differentiation potential and the expression of stem cell-specific  
19 genes.

20 **INTRODUCTION**

21 The airway epithelium is on the front line and is continuously exposed to inhaled  
22 environmental assailants, such as pollutants, allergens, and infectious agents.  
23 Epithelial regeneration is essential to maintain lung homeostasis and function; the  
24 epithelium must be able to quickly respond to injury and regenerate. Endogenous  
25 stem cells located in the tissue are thought to be essential to maintain or regain the  
26 integrity of the lung epithelium. Variants of Clara cells and other undifferentiated cells  
27 have been considered to be stem cells of the bronchioli and bronchioalveolar  
28 regions (12, 16, 23, 34, 37). The well-differentiated alveolar epithelial type-II cells  
29 (AECIIs) have the ability to replicate and to trans-differentiate into the alveolar  
30 epithelial type-I cells (AECIs) that line the alveolar walls (8, 19, 31). Conversely,  
31 AECIs may also give rise to AECIIs in fetal sheep via trans-differentiation (9).  
32 Additional lung cell types have been suggested to function as endogenous  
33 progenitors or stem cells. In the mouse conducting airways, basal cells, Clara cells,  
34 and some cells of the submucosal glands share properties with progenitors and stem  
35 cells (28, 32, 33). However, whether epithelial stem cells present within the lung can  
36 differentiate into AECIIs in large animals is currently unknown.

37 The bronchioalveolar region has been extensively studied in normal and injured  
38 lungs of rats and mice in response to chemical treatments. Undifferentiated cells in  
39 the bronchioalveolar duct junction have been histologically identified as different  
40 from the AECIIs, Clara cells and ciliated cells (10, 40). These bronchioalveolar  
41 stem cells (BASCs) share phenotypic characteristics of both mature Clara cells and  
42 AECIIs, suggesting a niche of progenitors (12, 21, 29, 30, 40).

43 Recent studies conducted in mice have shown that bronchioalveolar stem cells co-  
44 express the Clara cell-specific marker CCSP (also referred to CC10 or SCGB1A1),  
45 the AECII-specific marker SP-C (surfactant protein C), and the hematopoietic stem-  
46 cell marker CD34 (12, 23). Bronchioalveolar stem cells appear to be resistant to  
47 bronchiolar and alveolar damage *in vivo*, proliferate during epithelial repair and have  
48 the potential to give rise to Clara cells and AEC Is or IIs (12, 23).

49 To further characterize bronchioalveolar stem cells and their role in lung  
50 physiology, we isolated CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells for the first time in a large  
51 animal. Using CD34 magnetic positive cell selection, we isolated a SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
52 viable cell population from the lungs of 0- to 3-month-old lambs. Synthetic media and  
53 various extracellular matrix were used to establish the *in vitro* conditions to maintain  
54 SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells in an undifferentiated and proliferative state or, alternatively, to  
55 induce their cellular differentiation into either Clara cells or AECIIs. The  
56 bronchioalveolar stem cells obtained *ex vivo* or maintained *in vitro* was further  
57 shown to express stem cell-specific genes, such as NANOG, OCT4 (Octamer-  
58 binding Transcription factor 4) and BMI1 (B-lymphoma Moloney murine leukemia  
59 virus Insertion region-1). The expression of these genes was modulated upon  
60 exposure to culture conditions favoring cell differentiation.

## 61 **MATERIALS AND METHOD**

### 62 **Animals**

63 Lungs were collected from 10 young lambs (0 to 3 months old) from a local  
64 slaughterhouse and from the large animal experimental facility at INRA, Nouzilly  
65 France (Dr. F Lantier, INRA Tours, France) in accordance with the national  
66 regulations and the institutional guidelines. Immediately after death, fractions of the  
67 lungs were processed as previously described (18). Lungs were minced into small  
68 pieces and incubated in 10 µg/ml of DNase I, 1mg/ml protease IV and 0.025%  
69 collagenase Ia for 2h at 37°C, filtered through 100 µm and 40 µm cell strainers and  
70 centrifuged at 450 g for 10 min at 4°C. The cell pellets were collected in a red blood  
71 cell lysis buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA) for 2 minutes, washed  
72 and re-suspended in 1X PBS supplemented with 4% of fetal calf serum. Cell number,  
73 concentration and viability were tested by trypan blue dye exclusion test on Malassez  
74 Chamber and were later confirmed by flow cytometry analysis upon propidium iodide  
75 (1mg/ml, Sigma) staining.

### 76 **Magnetic isolation of CD34+ cells**

77 Aliquots of 10<sup>7</sup> dissociated cells were labeled using an indirect CD34 labeling  
78 technique with magnetic beads attached to a secondary antibody. Briefly, according  
79 to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotech), the cells were incubated with a  
80 1:200 dilution of mouse anti-sheep CD34 antibodies (clone Eq8D11C1 kindly  
81 provided by Pr CD Porada, University of Nevada) for 15 min on ice, washed in a  
82 buffer containing 1X PBS, 2mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin. The mixture  
83 was then incubated for 15 min on ice with goat anti-mouse IgG microbeads (Miltenyi

84 France) at a 1:5 dilution in 1X PBS, 2mM EDTA, and 0.5% bovine serum albumin.  
85 The suspension was washed and centrifuged at 450 g for 10 min at 4°C. For the  
86 magnetic separation, Mini Macs separation columns (Miltenyi France) were rinsed  
87 with 500 µl of cold 1X PBS, 2mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin. The cell  
88 pellets were re-suspended at 10<sup>7</sup> cells per 500 µl of the same buffer and poured into  
89 the column reservoir. The CD34 positive (CD34<sup>pos</sup>) cells were retained onto the  
90 magnetized matrix of the column, whereas the non-labeled cells passed through and  
91 were collected as the “non-retained” fraction. The columns were rinsed three times  
92 with 500µl of 1X PBS, 2mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin to purify the  
93 magnetic fraction. In order to collect the CD34<sup>pos</sup> cells , the column were removed  
94 from the magnetic field, and were washed by gravity with 1.5ml of 1X PBS, 2mM  
95 EDTA.

#### 96 **Gene expression analysis of stem cell-specific mRNAs by RT-PCR**

97 Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen, France) and 200 ng of  
98 total RNAs were reverse transcribed into cDNA using the iScript cDNA Synthesis kit  
99 (Bio-Rad, France). Specific primers for ovine GAPDH, BMI1, OCT4 and NANOG  
100 were designed as follows: GAPDH-for 5'-CCACCAACTGCTTGGCCCCC-3',  
101 GAPDH-rev 5'-CCTCGGCCATCACGCCACAG-3', OCT4-for 5'-  
102 CAAGAACATGTGTAAGCTGC-3', OCT4-rev 5'-CGATACTCGTCCGCTTTCTC-3',  
103 NANOG-for 5'-GGCAGAAAAACAACCTGGCCGAGGAA-3', NANOG-rev 5'-  
104 CCCACATGGGCAGGTTTCCAG-3', BMI1-for 5'-  
105 GCCACAACCATAATAGAATGTC-3' and BMI1-rev 5'-

106 CCCTGGAACTAATTTGTATAC-3'. The PCR reactions were performed using 10 ng  
107 of cDNA with the KAPA SYBR FAST kit (Cliniscience, France) as recommended.

108 **In vitro cell cultures of total primary cells, bronchioloalveolar progenitors, AEC**  
109 **II and Clara cells**

110 After tissue dissociation,  $1.6 \times 10^5$  cells were seeded per well in 6-well plates  
111 previously coated with 10 mg/ml of fibronectin (Sigma), 1  $\mu$ g/ml of type I collagen  
112 (Sigma) and 5 mg/ml of type IV collagen (Sigma) in Quantum 286 medium (PAA,  
113 Austria) supplemented with 5 ng/ml of HGF (Hepatocyte Growth Factor; Abcys), 10  
114 ng/ml of KGF (Keratinocyte Growth Factor; Abcys), penicillin and streptomycin  
115 (named "complete Q286 medium") as previously reported (1) and maintained for 2 to  
116 3 passages.

117 To amplify the bronchioloalveolar precursors,  $5 \times 10^3$  CD34<sup>pos</sup> cells were seeded per  
118 insert placed in 6-well plates previously coated with fibronectin, type I and IV  
119 collagens in "complete Q286 medium" and maintained for 2 to 3 passages. These  
120 culture conditions had been defined as the "maintenance conditions"

121 In order to induce their differentiation into AECII,  $5 \times 10^3$  CD34<sup>pos</sup> cells per well were  
122 seeded in 24- well plates coated with fibronectin, and type I and IV collagens with  
123 "complete Q286 medium" and maintained in culture up to 3 to 4 passages. These  
124 culture conditions had been defined as the "AECII conditions". For their differentiation  
125 into Clara cells,  $5 \times 10^3$  CD34<sup>pos</sup> cells per well were seeded in 24- well plates coated  
126 with only 10 mg/ml of fibronectin and maintained in Quantum 286 without additional  
127 growth factors (then named "basic Q286 medium") for 1 passage. These culture  
128 conditions had been defined as the "Clara conditions"

129 **Phenotypic analysis**

130 The sorted cells were characterized for their expression of proSP-C and CCSP by  
131 flow cytometry. After their elution from the columns, cells were rinsed in the 1X PBS  
132 and 4% fetal calf serum then centrifuged at 450 g 10 min at 4°C. Aliquots of  $1.10^5$   
133 cells were stained with a 1:600 dilution of a rabbit anti-human pro-surfactant C  
134 polyclonal serum (Millipore, AB3786) and a 1:500 dilution of mouse anti-human  
135 CCSP monoclonal antibodies (Abnova H00007356-M01). After incubation at 4°C for  
136 1 hour, cells were stained with goat anti- rabbit IgGs conjugated to Alexa 488  
137 (Invitrogen) and/or goat anti- mouse IgGs (Whole molecule) conjugated to R-  
138 Phycoerythrin (Sigma) for 30 minutes, at 4°C in the dark. Stained cells were  
139 centrifuged at 1000 g for 2 min at 4°C then fixed with 2% paraformaldehyde before  
140 flow cytometry quantification on a Becton Dickson FACSCalibur™ Flow cytometer  
141 and analysis using the CellQuest Pro software. To avoid signal overflow a color  
142 compensation of 10 to 23% was applied. Populations of interest were gated  
143 regarding their physical properties (forward and size scatters) to eliminate dead cells  
144 and cell debris. Immunostaining using only the secondary antibody were used as  
145 controls to adjust the detection threshold for each measured wavelength.

146 Expression of CCSP and SP-C was analyzed on cultured cells or frozen lung  
147 sections. After fixation with 4% paraformaldehyde, cells or tissue sections were  
148 permeabilized with 0.2% Triton X, washed with 1X PBS and incubated 1h, at room  
149 temperature with a 1:600 dilution of a rabbit anti-human pro-surfactant C polyclonal  
150 serum or a 1:500 dilution mouse anti-human CCSP monoclonal antibodies. Cells  
151 were then washed and stained with goat anti- rabbit IgGs conjugated to Alexa 488 or  
152 anti- mouse IgGs (Whole molecule) conjugated to R- Phycoerythrin for 30 minutes, at

153 4°C in the dark. The nuclei had been stained with DAPI. As negative controls,  
154 labeling was conducted without primary antibodies. The slides were analyzed on an  
155 Axiolmager Microscope (Zeiss).

156

157 **RESULTS**

158 **SP-C<sup>POS</sup>, CCSP<sup>POS</sup> and SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> ovine pulmonary cells *in vivo***

159 The expression of SP-C and CCSP was analyzed in the lungs of 0- to 3-month-old  
160 lambs by immunohistochemistry on frozen sections using cross-reacting antibodies.  
161 As shown in Figure 1A, these antibodies specifically recognized SP-C in the alveoli  
162 and CCSP in the bronchioles, validating their use as specific markers in our study.  
163 AECIIs were easily detectable in most of the sections due to their high expression of  
164 SP-C (Figure 1B). Clara cells expressing CCSP were also present. Interestingly, rare  
165 SP-C<sup>POS</sup>/CCSP<sup>POS</sup> cells were observed in some lung sections (Figure 1B),  
166 demonstrating the presence of bronchioalveolar stem cells in newborn lambs.  
167 Interestingly, among the 4 different lungs tested and stained several times, the SP-  
168 C/CCSP double positive cells remained rare events present in only few lung sections  
169 (Figure 1B). But this first evidence of the presence of bronchioalveolar precursors *in*  
170 *vivo* in sheep prompted us to search this population on lung cells from dissociated  
171 tissues.

172 To quantify the AECIIs, the Clara cells and the stem cells proportion, cell  
173 suspensions obtained after the dissociation of the lung tissue from 10 lambs (0 to 3  
174 months old) were analyzed for the expression of SP-C and CCSP by flow cytometry.  
175 Single cell suspensions were obtained at a final concentration of approximately 1 X  
176 10<sup>8</sup> cells per lung. Based on the dot plot analysis from a representative lamb (Figure  
177 1C) and the compiled data from 10 lambs (Figure 1D), the suspensions of lung cells  
178 repeatedly contained 40% (± 18.5) SP-C<sup>POS</sup> cells and 0.65% (± 0.60) CCSP<sup>POS</sup> cells  
179 (Figure 1D). Co-expression of SP-C/CCSP was then examined to quantify the

180 bronchioalveolar stem cells in the lungs; the results indicated that 0.33% ( $\pm$  0.31) of  
181 the cells from the dissociated lungs co-expressed these two markers and presented  
182 an immunophenotype compatible with BASCs (Figure 1D).

### 183 ***In vitro* expansion and phenotypic characterization of primary airway epithelial** 184 **cells**

185 Dissociated cells were grown in culture with selective Q286 synthetic medium  
186 complemented with KGF and HGF (complete Q286 medium) on fibronectin-coated  
187 plates and maintained for two or three passages as previously described (1). Small  
188 and large cubical epithelial cell colonies and a few spindle-shaped cells were rapidly  
189 observed after 3 days of culture; the small cubical cells proliferated and were further  
190 characterized for the expression of SP-C and CCSP. As shown by specific labeling in  
191 immunocytochemistry and flow cytometry, a large majority of the cubical cells in the  
192 airway epithelial cultures were SP-C<sup>pos</sup> AECIIs, while few of them were CCSP<sup>pos</sup>  
193 Clara cells (Figure 2A and 2B). Interestingly, a minor population of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
194 cells compatible with the bronchioalveolar stem cells was clearly identified in  
195 culture (Figure 2A and 2B). Compared to the AECIIs, the SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells were  
196 semi-adherent round cells with small cytoplasmic extensions (Figure 2A). These  
197 double positive SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells were rare after lung dissociation but enriched  
198 and maintained upon *in vitro* culture with synthetic medium (Figure 2B).

### 199 **CD34 selection of bronchioalveolar stem cells**

200 To isolate and enrich a viable population of bronchioalveolar stem cells, *ex vivo*  
201 dissociated lung cells were positively selected using anti-CD34 antibody-coated

202 magnetic beads without any prior cell culture. Cell surface expression of CD34, a  
203 surface protein widely expressed by stem cells, was then measured by flow  
204 cytometry to assess the enrichment of the bronchioloalveolar stem cell population in  
205 the selected population. In all of the 6 tested animals, the CD34 cell sorting  
206 remarkably enriched the CD34<sup>pos</sup> population from 0.7% ( $\pm$  0.12) after tissue  
207 dissociation to over 90% in the CD34-selected single cell suspension with greater  
208 than 85% viability, as measured by trypan blue exclusion ([Figure 3](#)).

### 209 **Expression of SP-C and CCSP among the CD34<sup>pos</sup>-selected population**

210 To quantify the bronchioloalveolar stem cells among the CD34<sup>pos</sup> population, the  
211 selected cells were analyzed for the expression of CCSP and SP-C. By flow  
212 cytometry, the majority (over 80%) of the CD34<sup>pos</sup> cells co-expressed CCSP and SP-  
213 C with 88% ( $\pm$  6.8) and 84% ( $\pm$  5.5) positive cells, respectively (Figures 4A and 4B).  
214 We assumed that hematopoietic stem cells or endothelial progenitors may contribute  
215 to the SP-C<sup>neg</sup> and CCSP<sup>neg</sup> cells among the CD34<sup>pos</sup> population. Due to the nature of  
216 the antibodies used (i.e., polyclonal rabbit anti-proSP-C, mouse monoclonal or  
217 polyclonal rabbit anti-CCSP and monoclonal mouse anti-CD34), direct double  
218 labeling of SP-C and CCSP on the CD34<sup>pos</sup> population was not technically feasible.  
219 However, the large proportion of SP-C<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> and CCSP<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> cells clearly  
220 demonstrated that most of the CD34<sup>pos</sup> cells were SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> stem cells. The  
221 proportion of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells among the CD34<sup>pos</sup> population was highly  
222 consistent in the 6 lambs analyzed independently (Figure 4B). Importantly, the  
223 proportion of CD34<sup>neg</sup>/SP-C<sup>pos</sup> and CD34<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells was very low in the sorted  
224 cell suspension (1.0%  $\pm$  1.7 and 1.1%  $\pm$  1.8, respectively), confirming that the

225 procedure efficiently purified CD34<sup>pos</sup> cells and not AECIIs or Clara cells. Taken  
226 together, our results showed that a BASC-like population exists in lambs and that  
227 these cells co-express CD34, SP-C and CCSP.

228 To further characterize the CD34<sup>pos</sup> population, the mRNA expression of genes  
229 known to be preferentially but not exclusively expressed in stem cells, such as the  
230 self-renewal factor gene *BMI1* and the pluripotent state-specific transcription factor  
231 genes *OCT4* and *NANOG*, were analyzed. The expression of *GAPDH* was also  
232 analyzed as a housekeeping gene. Compared to the total lung-dissociated cells, the  
233 CD34<sup>pos</sup> population expressed higher levels of *BMI1*, *OCT4* and *NANOG*, suggesting  
234 the enrichment of stem cells during the purification process (Figure 3C). Interestingly,  
235 *NANOG* was almost absent from the unsorted population but was strongly expressed  
236 in the CD34<sup>pos</sup>-sorted cells (Figure 4C). Importantly, the expression of SP-C, CCSP  
237 and CD34 was maintained after CD34 selection (Figure 4C).

### 238 ***In vitro* proliferation of lamb bronchioloalveolar stem cells**

239 To assess their ability to proliferate *in vitro*, selected CD34<sup>pos</sup> BASCs were plated  
240 onto fibronectin/ collagens I- and IV-coated inserts in "complete Q286 medium" under  
241 "maintenance conditions" (Figure 5A, 5B and 5C). After 15 days, these CD34<sup>pos</sup> cells  
242 gave rise to small colonies of cubical epithelial cells, most of which expressed SP-C  
243 and CCSP (Figure 5A). The majority of these cells (>90%) maintained the co-  
244 expression of SP-C and CCSP for up to 3 passages (corresponding to approximately  
245 45 days in culture) (Figures 5B and 5C). When maintenance conditions were applied  
246 to cells from 6 independent animals, the same proportions of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells  
247 were generated, and the stem cell population was maintained over time. While SP-C

248 and CCSP expression persisted, the overall fluorescence intensity of these two  
249 markers decreased over time to reach a lower but easily detectable signal after 3  
250 passages.

251 **From lamb bronchioalveolar stem cells to differentiated epithelial pulmonary**  
252 **cells *in vitro***

253 In addition to their self-renewing properties, stem cells or progenitors may be able to  
254 differentiate into multiple cell types under specific conditions. Indeed, using synthetic  
255 medium and adapted cell culture conditions, CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
256 bronchioalveolar stem cells had the potential to differentiate into either AECIIs or  
257 Clara cells.

258 To induce the differentiation of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells into AECIIs, CD34<sup>pos</sup> cells were  
259 seeded onto plates coated with fibronectin and type I and IV collagens and cultured  
260 with "complete Q286 medium" used as the "AECII conditions". After 3 passages  
261 (approximately 45 days), we observed a switch in the cell surface immunophenotype  
262 such that the cells mostly expressed SP-C (Figures 5A and 5B), whereas the SP-  
263 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> population decreased over time (Figure 5B). Cultures from 6  
264 independent animals showed the same modulation with an increase in the proportion  
265 of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup> AECIIs (from < 5% to 58%; Figure 4C). In contrast, the  
266 population of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> stem cells rapidly decreased throughout the passages  
267 from over 90% to 27.8% (Figure 5C). Under these conditions, no CCSP<sup>pos</sup> cells  
268 emerged from the initial SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> population. Because we have previously  
269 shown that less than 1% ± 1.7 of the CD34<sup>neg</sup>/SP-C<sup>pos</sup> cells were present after CD34  
270 positive selection, our findings strongly argue for the *in vitro* differentiation of

271 bronchioalveolar stem cells into AECIIs and not the mere proliferation of pre-  
272 existing AECIIs.

273 Conversely, CD34<sup>pos</sup> progenitors cultured in "basic Q286 medium" (without growth  
274 factors) on fibronectin-coated plates in what we defined as the "Clara conditions"  
275 gave rise to colonies containing primarily SP-C<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells (53.6% ± 13) after  
276 15 days in culture (Figures 5A, 5B and 5C). Concurrently, SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
277 bronchioalveolar stem cells (24.9 %± 14) rapidly decreased, while SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup>  
278 AECIIs remained low to undetectable (5 %± 8; Figure 5C). Similar to the AECIIs, we  
279 have previously shown that no more than 1.1 ± 1.8% of the CD34<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells  
280 are present after CD34 positive selection from the 6 tested lambs, strongly  
281 suggesting the *in vitro* differentiation of bronchioalveolar stem cells into Clara cells.  
282 Together with the low proliferation rate of CCSP<sup>pos</sup> cells in the cultures, our findings  
283 strongly argue for the differentiation of bronchioalveolar stem cells into Clara cells  
284 rather than the proliferation of already existing Clara cells in the cultures.

### 285 **Expression of *NANOG*, *OCT4* and *BMI1* as markers of stem cells**

286 As previously mentioned, the expression of *NANOG* and *OCT4* is a strong indicator  
287 of a stem cell phenotype. *NANOG* and *OCT4* were expressed in the CD34<sup>pos</sup>/SP-  
288 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells enriched from dissociated tissue cells (Figure 4C). To further  
289 characterize the CD34<sup>pos</sup> cells that were maintained and differentiated *in vitro*, RT-  
290 PCR was used to examine the expression of *OCT4*, *NANOG* and *BMI1* in the BASCs  
291 maintained in culture and in the different enriched, but not pure, cultures of AECIIs  
292 and Clara cells derived from lambs #1729, #1730 and #1731 at passage 1 (Figure  
293 6A). *BMI1* was expressed at various levels and predominantly in the AECII medium

294 that favored the differentiation of bronchioloalveolar stem cells into AECIIs (Figure  
295 6B). Importantly, these cultures also contained greater than 50% SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
296 BASCs. Interestingly, *OCT4* was expressed in the maintenance conditions that  
297 favored expansion of bronchioloalveolar stem cells, in which greater than 70% of the  
298 cells displayed a SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> phenotype. In the differentiation conditions that  
299 generated AECIIs or Clara cells, *OCT4* expression was strongly reduced in 2 of the 3  
300 lambs. However, in lamb #1730, some expression of *OCT4* was detectable in cells in  
301 the AECII differentiation medium, which is compatible with the lower proportion of  
302 SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup> AECIIs compared to the 2 others lambs at passage 1 (Figure 6A).  
303 This result suggests that *OCT-4* expression is characteristic of cell progenitors and  
304 that its expression is lost upon differentiation. Surprisingly, the expression of *NANOG*  
305 appeared to be less stable in the bronchioloalveolar stem cells maintained *in vitro*  
306 (Figure 6) compared to the ones obtained *ex vivo*, as previously described (Figure  
307 4C), suggesting that the cultured SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells rapidly underwent a  
308 differentiation step.

309 **DISCUSSION**

310 In this study, we described the presence of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells in the lung  
311 parenchyma of 0- to 3-month-old lambs that appear phenotypically similar to the  
312 bronchioalveolar stem cells described in mice (12). These rare cells represented  
313 ~0.3% of the lung cells, could still be isolated after tissue dissociation, and co-  
314 expressed CD34, SP-C and CCSP, as shown by flow cytometry. SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
315 cells were maintained *in vitro* by culture on fibronectin-coated plates with synthetic  
316 medium supplemented with HGF and KGF. Upon microscopic observation, the SP-  
317 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells were small, semi-adherent cells with limited cytoplasmic  
318 extensions (compared to AECII) and were maintained for up to 2 or 3 passages (30-  
319 45 days).

320 Stem cells or pluripotent progenitors are defined by their ability to maintain and  
321 differentiate upon exposure to specific stimuli. To further characterize the ovine SP-  
322 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells observed *in vivo* and in dissociated lungs *ex vivo*, we established  
323 enrichment and culture procedures to efficiently select the double-positive cells in the  
324 cell suspensions from the dissociated lungs and analyzed the *in vitro* phenotype of  
325 these cells. We first performed positive selection for CD34 expression, a surface  
326 protein widely described on various stem cells and present on sheep hematopoietic  
327 stem/progenitor cells (27). A small population of cells was isolated that consisted of a  
328 few thousand highly purified SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells. These cells highly expressed  
329 mRNAs for *NANOG*, *OCT4* and *BMI1*, which are molecular markers of stem cells.  
330 They also retained their expression of *SP-C*, *CCSP* and *CD34* mRNAs. Importantly,  
331 the CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells were able to be maintained for up to 3 passages

332 *in vitro* when cultured in synthetic medium supplemented with KGF and HGF on  
333 fibronectin- and collagen-coated inserts. Next, the CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cell  
334 population was demonstrated to have the potential to differentiate into either AECIIs  
335 or Clara cells in specific culture conditions, further confirming their *in vitro*  
336 characterization as stem/progenitor cells. The CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells  
337 maintained *in vitro* highly expressed OCT4 and BMI1 mRNAs, which completed their  
338 characterization as multipotent stem cells.

339 BASCs have been reported in mice in an anatomically well-defined location at the  
340 bronchioalveolar junction where conducting and respiratory airways meet (12, 20,  
341 35). BASCs were initially described by their expression of Sca-1 and CD34, which  
342 are markers of stem cells, and their expression of SP-C and CCSP, which are  
343 markers of highly differentiated epithelial cells. Sca1 is not present in sheep, however  
344 we succeeded in demonstrating the *in vivo* presence of rare ovine bronchioalveolar  
345 stem cells in the lungs of newborn or young animals (less than 3 months old), while  
346 other groups have not identified bronchioalveolar stem cells in sheep upon  
347 searching for these cells using CCSP and SP-C immunostaining on lung sections  
348 (18, 22). Interestingly, two studies have reported rare to extremely rare SP-  
349 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells in virally-induced lung tumors in sheep (18, 26). In a recent study,  
350 we have found a population of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> in the same virus-induced tumors in  
351 adult sheep (Archer F. and Leroux C., unpublished data). Taken together, these  
352 results are consistent with SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells (which are extremely rare *in vivo* in  
353 frozen lung sections) representing a stem cell population. The discrepancy between  
354 our study and previous studies (18, 22) may be explained by the low (but clearly

355 above background) levels of SP-C and CCSP expression in double-positive cells  
356 compared to the expression of these markers in AECIIs and Clara cells, respectively.  
357 The visualization of double-positive cells in the complex lung is therefore challenging  
358 and the CD34 enrichment strategy enabled us to evidence and study this progenitor  
359 population. In addition, bronchioloalveolar stem cells may be more easily identified in  
360 lungs from newborn lambs. Of note, we have previously reported the presence of SP-  
361 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells in the sheep lung while describing the *ex vivo* isolation of tumoral  
362 AECIIs from a virus-induced lepidic lung adenocarcinoma (1). While culturing these  
363 cells in three-dimensional conditions to maintain more appropriate physiological  
364 conditions, we repeatedly observed SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> double-positive cells (data not  
365 shown). These results prompted us to pursue their characterization.

366 SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> double-positive bronchioloalveolar stem cells are rare and  
367 represent only 0.33% of the total population of cells from dissociated lungs. In  
368 comparison, a recent study has established that undifferentiated human stem cells  
369 identified by c-kit immunosorting are present at a frequency of 1 per 6,000 cells in the  
370 bronchioles and 1 per 30,000 cells in the alveoli in adults (11). In fetal human lung  
371 tissue at 12-36 weeks of gestation, the frequency of stem cells varies from 1 per  
372 11,000 to 1 per 600 cells, with an average of 1 per 4,100 cells (11). The CD34<sup>pos</sup>  
373 selection procedure was crucial to isolate bronchioloalveolar stem cells from the lung  
374 even though the absolute number of CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells was ultimately  
375 low (a few thousands cells); this procedure enabled the confirmation of the existence  
376 of a rare population of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> bronchioloalveolar stem cells. Importantly, all  
377 of the selection steps were performed *ex vivo*, without cell culture and in the absence

378 of serum; these conditions are known to induce cell differentiation. The CD34<sup>pos</sup>/SP-  
379 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> population resembles the now well-characterized murine BASCs in  
380 terms of both morphology and cell markers. We clearly demonstrated that ovine  
381 bronchioloalveolar stem cells behave as stem cells in culture and have maintenance  
382 and differentiation potential upon modulation of the culture conditions.

383 We then demonstrated that the *ex vivo*-derived ovine bronchioloalveolar stem cells  
384 retained the expression of *BMI1*, *OCT4* and *NANOG*, which are some of the most  
385 important markers of undifferentiated pluripotent cells and are major players in  
386 embryonic and adult stem cells. *BMI1* is a member of the PcG family of transcription  
387 repressors that play crucial roles in development, stem cell biology and cancer (2).  
388 *BMI1* is also highly expressed in tumors and regulates the cell fate of cancer cells  
389 and normal and tumoral stem cells (13, 17). *BMI1* participates in the maintenance of  
390 endogenous stem cells, partly by repressing genes involved in cell death and  
391 senescence (6). In mice, *BMI1* is necessary for bronchioloalveolar stem cells  
392 expansion (7). Similar to murine BASCs, ovine bronchioloalveolar stem cells  
393 expressed *BMI1* under maintenance/self-renewing conditions, and this expression  
394 was not modified by exposure to differentiation conditions.

395 While *OCT4*, a member of the POU (Pit-Oct-Unc) transcription factor family, is  
396 essential for the maintenance of self-renewal capacities, *NANOG* (a downstream  
397 target of *OCT4*) contributes to the cell fate determination of pluripotent cells during  
398 embryogenesis (3, 4). *OCT4* and *NANOG* are among the few key factors that enable  
399 the reprogramming of adult somatic cells into pluripotent stem cells (15, 24, 25, 36,  
400 41). Interestingly, induced pluripotent cells (iPSCs) generated from sheep fibroblasts

401 have recently been demonstrated to exhibit an embryonic stem cell-like morphology  
402 and to express OCT4 and NANOG among other intracellular and surface markers  
403 associated with undifferentiated cells, as in humans and mice (14). As in other stem  
404 cells, OCT4 and NANOG are expressed in lung stem cells, and their co-expression  
405 may enhance malignancy by inducing cancer stem cell-like properties (5, 16). With  
406 respect to the recently described human c-kit lung stem cell (11), it would be  
407 interesting to study the expression of c-kit in lamb tissue sections and in the SP-  
408 C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> bronchioloalveolar stem cells population to better understand the  
409 hierarchical organization of stem/progenitors cells in the complex lung.

410 To summarize, we reported the first direct characterization of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>  
411 bronchioloalveolar stem cells from the lung of a large animal. While extremely rare,  
412 these cells can be purified and enriched from the lungs of newborn lambs. These  
413 cells clearly share functions, such as stem cell maintenance and differentiation, with  
414 the now well-characterized murine BASCs. The SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> bronchioloalveolar  
415 stem cells express stem cells markers, such as NANOG, BMI1 and OCT4, *in vivo*  
416 and *in vitro*, indicating that newborn lung stem cells retain characteristics typical of  
417 stem cells residing in the developing organ. These data enable the study of the  
418 development of the bronchiolar and alveolar epithelia. Sheep, an alternative animal  
419 model that is closer to humans than mice, are already largely used to study lung  
420 physiology and pathology. Ovine bronchioloalveolar stem cells may offer new tools  
421 that may contribute to the understanding of lung physiology.

422 **ACKNOWLEDGEMENTS**

423 Ligue Nationale de Recherche sur le Cancer, Ardèche committee, Rhône Alpes  
424 Region. The “Platim” and “AniRA – Flow cytometry” platforms are part of the UMS  
425 3444 SFR BioSciences Gerland - Lyon Sud. AAR was the recipient of an AUF  
426 (Agence Universitaire de la Francophonie) Ph.D. fellowship and received financial  
427 support from Saint Esprit de Kaslik University, Lebanon.

428 **FIGURE LEGENDS**

429 **Figure 1: *In vivo* localization of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> epithelial cells.** Frozen lung  
430 sections from ten 0- to 3-month-old lambs were analyzed by immunohistochemistry  
431 for the expression of SP-C (green), CCSP (red) and the co-expression of SP-C and  
432 CCSP. The nuclei were stained with DAPI (blue). (A) Lung cross sections showed  
433 the expression of CCSP in the bronchioli (b) and SP-C in the alveoli (a) (10x  
434 magnification). (B) Immunostaining of rare SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells *in situ* (40x  
435 magnification) Inset: enlargement of a double-positive cell. (C) SP-C and CCSP  
436 expression from a representative lamb (# 1507) in *ex vivo* dissociated cells by flow  
437 cytometry showing the presence of a SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> population. (D) Frequency of  
438 SP-C<sup>pos</sup>, CCSP<sup>pos</sup> and SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells from ten 0- to 3-month-old-lambs. The  
439 data are expressed as the mean ( $\pm$  SD) percentage of the cells expressing the  
440 cellular markers.

441 **Figure 2: *in vitro* expansion of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> bronchioloalveolar stem cells.**  
442 Pulmonary epithelial cells from dissociated lung tissues were cultured *in vitro* on  
443 fibronectin-coated plates supplemented with "complete Q286 medium". (A) Lung  
444 epithelial cells derived from lamb #1487 were analyzed by immunostaining for the  
445 expression of SP-C (green), CCSP (red) and the co-expression of SP-C and CCSP  
446 (40x magnification). Inset: enlargement of double-positive cells. (B) Flow cytometry  
447 analysis of a representative animal shows the percentage of SP-C<sup>pos</sup> cells and  
448 CCSP<sup>pos</sup> cells above the background fluorescence. The double staining shows an  
449 enriched culture of AEC IIs with the presence of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> bronchioloalveolar  
450 stem cells after dissociation, and at the first and second passage *in vitro*. For each

451 condition, the left graph (smaller) corresponds to controls and the right graph (larger)  
452 presents SP-C and CCSP specific immunostaining.

453 **Figure 3: Enrichment in CD34<sup>pos</sup> epithelial cells by magnetic cell sorting.** Lung  
454 primary epithelial cells from lamb lungs were subjected to magnetic cell sorting with  
455 anti-ovine CD34, then analyzed by flow cytometry. A: Representative dot plot from  
456 one animal showing expression of CD34<sup>pos</sup> cells in the dissociated tissue (Before  
457 sorting) and after the positive selection (After sorting) B: Enrichment of CD34<sup>pos</sup> cells  
458 from independent magnetic cell sorting from 6 lambs shown as the mean  $\pm$  SD. \*\*: p  
459 < 0.01

460 **Figure 4: Expression of SP-C<sup>pos</sup> and CCSP<sup>pos</sup> in CD34<sup>pos</sup>-sorted cells.** (A) Dot  
461 blot analysis from a representative animal (lamb #1744) showing the expression of  
462 SP-C and CCSP in the majority (>90%) of the CD34<sup>pos</sup> cells. (B) Combined results  
463 from 10 lambs showing the enrichment of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells in the CD34-  
464 selected cell fraction. The data are shown as the mean  $\pm$  SD. \*\*: p < 0.01. Before:  
465 before CD34 sorting; After: after CD34 sorting. (C) Expression of *SP-C*, *CCSP*,  
466 *CD34*, *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* and *GAPDH* mRNAs in the unselected and in the  
467 CD34-selected cells as measured by RT-PCR.

468 **Figure 5: Lamb bronchioalveolar stem cell maintenance and differentiation *in***  
469 ***vitro*.** CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells from explanted lungs were maintained either in  
470 a. "maintenance conditions" with "complete Q286 medium" on fibronectin and  
471 collagen- coated inserts, b. differentiated in "AECII conditions" with "complete Q286  
472 medium" on fibronectin and collagen-coated plates or c. in "Clara conditions" with  
473 "basic Q286 medium" on fibronectin-coated plates. (A) Representative

474 immunostaining from cells isolated from one lamb for SP-C (green) and CCSP (red).  
475 Co-expression was performed on *in vitro* maintained bronchiololaveolar stem cells  
476 (SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>) or differentiated AECIIs (SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup>) or Clara cells (SP-  
477 C<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup>). (B) The population of CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells from a  
478 representative lamb grown in maintenance or differentiation media was quantified by  
479 flow cytometry for the expression of SP-C or CCSP. The results are presented as dot  
480 plots of the expression of both markers. (C) CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells from 6  
481 independent lambs cultured in maintenance or differentiation media were followed  
482 over three passages (p0 to p3) by flow cytometry for the expression of SP-C and  
483 CCSP. The results are presented as the mean ± SD of the cells expressing each  
484 phenotype.

485 **Figure 6: *BMI1* and *OCT4* mRNA expression in maintained and differentiated**  
486 **CD34<sup>pos</sup>/SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup> cells.** (A) Depending on the culture medium conditions  
487 (maintenance, AECII or Clara medium), the relative proportions of SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>pos</sup>,  
488 SP-C<sup>pos</sup>/CCSP<sup>neg</sup> or SP-C<sup>neg</sup>/CCSP<sup>pos</sup> were determined at the first passage by flow  
489 cytometry and reported in the table as the following: 0% for no cells, + for <15%, ++  
490 ≥15% and ≤50%, and +++ for ≥50%. (B) The *BMI1*, *OCT4* and *NANOG* mRNAs were  
491 detected by RT-PCR from the total cell RNAs extracted from the three culture  
492 conditions at passage 1 and compared to the ovine *GAPDH* housekeeping gene.

493 **FOOTNOTE**

494 We would like to mention our reluctance to use the term "Clara cells." In 2010,  
495 studies reported the conditions necessary for the discovery of these cells (38, 39). In  
496 the absence of an alternative name, we will use the term Clara cells in this  
497 publication to refer to the epithelial bronchiolar cells.

498 **REFERENCES**

- 499 1. **Archer F, Jacquier E, Lyon M, Chastang J, Cottin V, Mornex JF, Leroux C.**  
500 Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for  
501 JSRV expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 534-540, 2007.
- 502 2. **Bracken AP, Helin K.** Polycomb group proteins: navigators of lineage  
503 pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 773-784, 2009.
- 504 3. **Cavaleri F, Scholer HR.** Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell  
505 orchestra. *Cell* 113: 551-552, 2003.
- 506 4. **Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A.**  
507 Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in  
508 embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655, 2003.
- 509 5. **Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT,**  
510 **Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW.** Coexpression of Oct4 and Nanog  
511 enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like  
512 properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res* 70:  
513 10433-10444, 2010.
- 514 6. **Cousens C, Bishop JV, Philbey AW, Gill CA, Palmarini M, Carlson JO,**  
515 **DeMartini JC, Sharp JM.** Analysis of integration sites of Jaagsiekte sheep  
516 retrovirus in ovine pulmonary adenocarcinoma. *J Virol* 78: 8506-8512, 2004.
- 517 7. **Dovey JS, Zacharek SJ, Kim CF, Lees JA.** Bmi1 is critical for lung  
518 tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U*  
519 *S A* 105: 11857-11862, 2008.

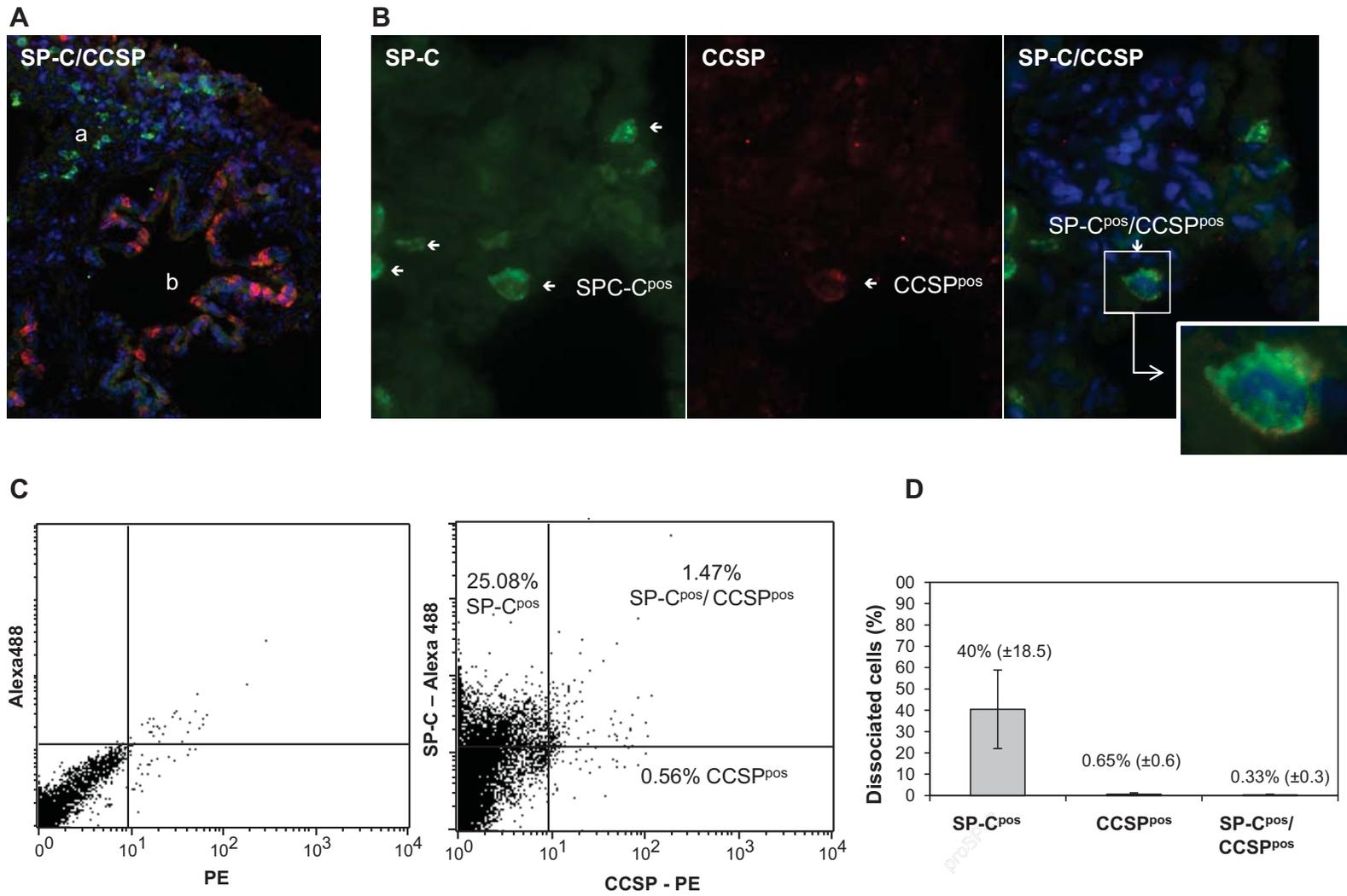
- 520 8. **Flecknoe S, Harding R, Maritz G, Hooper SB.** Increased lung expansion  
521 alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep.  
522 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L1180-1185, 2000.
- 523 9. **Flecknoe SJ, Wallace MJ, Harding R, Hooper SB.** Determination of alveolar  
524 epithelial cell phenotypes in fetal sheep: evidence for the involvement of basal  
525 lung expansion. *J Physiol* 542: 245-253, 2002.
- 526 10. **Freeman BA.** Tissue slices in study of lung metabolism and toxicology.  
527 *Environmental health perspectives* 56: 51-60, 1984.
- 528 11. **Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, Zheng H,**  
529 **Ogorek B, Rondon-Clavo C, Ferreira-Martins J, Matsuda A, Arranto C,**  
530 **Goichberg P, Giordano G, Haley KJ, Bardelli S, Rayatzadeh H, Liu X,**  
531 **Quaini F, Liao R, Leri A, Perrella MA, Loscalzo J, Anversa P.** Evidence for  
532 human lung stem cells. *N Engl J Med* 364: 1795-1806, 2011.
- 533 12. **Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S,**  
534 **Crowley D, Bronson RT, Jacks T.** Identification of bronchioalveolar stem cells  
535 in normal lung and lung cancer. *Cell* 121: 823-835, 2005.
- 536 13. **Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimosato O,**  
537 **Fujimura Y, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T.** Bmi1  
538 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small-cell lung  
539 cancer cells. *Cancer Sci* 102: 983-990, 2011.
- 540 14. **Li Y, Cang M, Lee AS, Zhang K, Liu D.** Reprogramming of sheep fibroblasts  
541 into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined  
542 factors. *PLoS One* 6: e15947, 2011.
- 543 15. **Li Y, Zhao H, Lan F, Lee A, Chen L, Lin C, Yao Y, Li L.** Generation of human-  
544 induced pluripotent stem cells from gut mesentery-derived cells by ectopic  
545 expression of OCT4/SOX2/NANOG. *Cell Reprogram* 12: 237-247, 2010.
- 546 16. **Ling TY, Kuo MD, Li CL, Yu AL, Huang YH, Wu TJ, Lin YC, Chen SH, Yu J.**  
547 Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of  
548 their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. *Proc Natl*  
549 *Acad Sci U S A* 103: 9530-9535, 2006.
- 550 17. **Liu X, Driskell RR, Engelhardt JF.** Stem cells in the lung. *Methods Enzymol*  
551 419: 285-321, 2006.

- 552 18. **Martineau HM, Cousens C, Imlach S, Dagleish MP, Griffiths DJ.** Jaagsiekte  
553 sheep retrovirus infects multiple cell types in the ovine lung. *J Virol* 85: 3341-  
554 3355, 2011.
- 555 19. **Mason RJ, Williams MC, Moses HL, Mohla S, Berberich MA.** Stem cells in  
556 lung development, disease, and therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 355-  
557 363, 1997.
- 558 20. **McQualter JL, Brouard N, Williams B, Baird BN, Sims-Lucas S, Yuen K,**  
559 **Nilsson SK, Simmons PJ, Bertoncetto I.** Endogenous fibroblastic progenitor  
560 cells in the adult mouse lung are highly enriched in the sca-1 positive cell  
561 fraction. *Stem Cells* 27: 623-633, 2009.
- 562 21. **McQualter JL, Yuen K, Williams B, Bertoncetto I.** Evidence of an epithelial  
563 stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S*  
564 *A* 107: 1414-1419, 2010.
- 565 22. **Murgia C, Caporale M, Ceesay O, Di Francesco G, Ferri N, Varasano V, de**  
566 **las Heras M, Palmarini M.** Lung adenocarcinoma originates from retrovirus  
567 infection of proliferating type 2 pneumocytes during pulmonary post-natal  
568 development or tissue repair. *PLoS Pathog* 7: e1002014, 2011.
- 569 23. **Nolen-Walston RD, Kim CF, Mazan MR, Ingenito EP, Gruntman AM, Tsai L,**  
570 **Boston R, Woolfenden AE, Jacks T, Hoffman AM.** Cellular kinetics and  
571 modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration. *Am J*  
572 *Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L1158-1165, 2008.
- 573 24. **Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S.** Generation of germline-competent induced  
574 pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317, 2007.
- 575 25. **Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch**  
576 **MW, Daley GQ.** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with  
577 defined factors. *Nature* 451: 141-146, 2008.
- 578 26. **Platt JA, Kraipowich N, Villafane F, DeMartini JC.** Alveolar type II cells  
579 expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins  
580 are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma.  
581 *Vet Pathol* 39: 341-352, 2002.
- 582 27. **Porada CD, Harrison-Findik DD, Sanada C, Valiente V, Thain D, Simmons**  
583 **PJ, Almeida-Porada G, Zanjani ED.** Development and characterization of a

- 584 novel CD34 monoclonal antibody that identifies sheep hematopoietic  
585 stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 36: 1739-1749, 2008.
- 586 28. **Raiser DM, Kim CF.** Commentary: Sca-1 and Cells of the Lung: A matter of  
587 Different Sorts. *Stem Cells* 27: 606-611, 2009.
- 588 29. **Rawlins EL.** Lung epithelial progenitor cells: lessons from development. *Proc*  
589 *Am Thorac Soc* 5: 675-681, 2008.
- 590 30. **Rawlins EL, Hogan BL.** Epithelial stem cells of the lung: privileged few or  
591 opportunities for many? *Development* 133: 2455-2465, 2006.
- 592 31. **Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD,**  
593 **Warburton D, Driscoll B.** Isolation of a putative progenitor subpopulation of  
594 alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L658-  
595 667, 2004.
- 596 32. **Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR.** Neuroepithelial bodies of  
597 pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial  
598 regeneration. *Am J Pathol* 156: 269-278, 2000.
- 599 33. **Reynolds SD, Hong KU, Giangreco A, Mango GW, Guron C, Morimoto Y,**  
600 **Stripp BR.** Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor  
601 function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*  
602 278: L1256-1263, 2000.
- 603 34. **Rock JR, Hogan BL.** Epithelial Progenitor Cells in Lung Development,  
604 Maintenance, Repair, and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 493-512, 2011.
- 605 35. **Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR.** Endogenous lung stem cells and  
606 contribution to disease. *J Pathol* 217: 254-264, 2009.
- 607 36. **Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, Lim ML, Khodadadi K, Verma PJ.**  
608 NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J*  
609 *Anim Sci* 89: 2708-2716, 2011.
- 610 37. **Teisanu RM, Lagasse E, Whitesides JF, Stripp BR.** Prospective isolation of  
611 bronchiolar stem cells based upon immunophenotypic and autofluorescence  
612 characteristics. *Stem Cells* 27: 612-622, 2009.
- 613 38. **Winkelmann A, Noack T.** The Clara cell: a "Third Reich eponym"? *Eur Respir*  
614 *J* 36: 722-727, 2010.

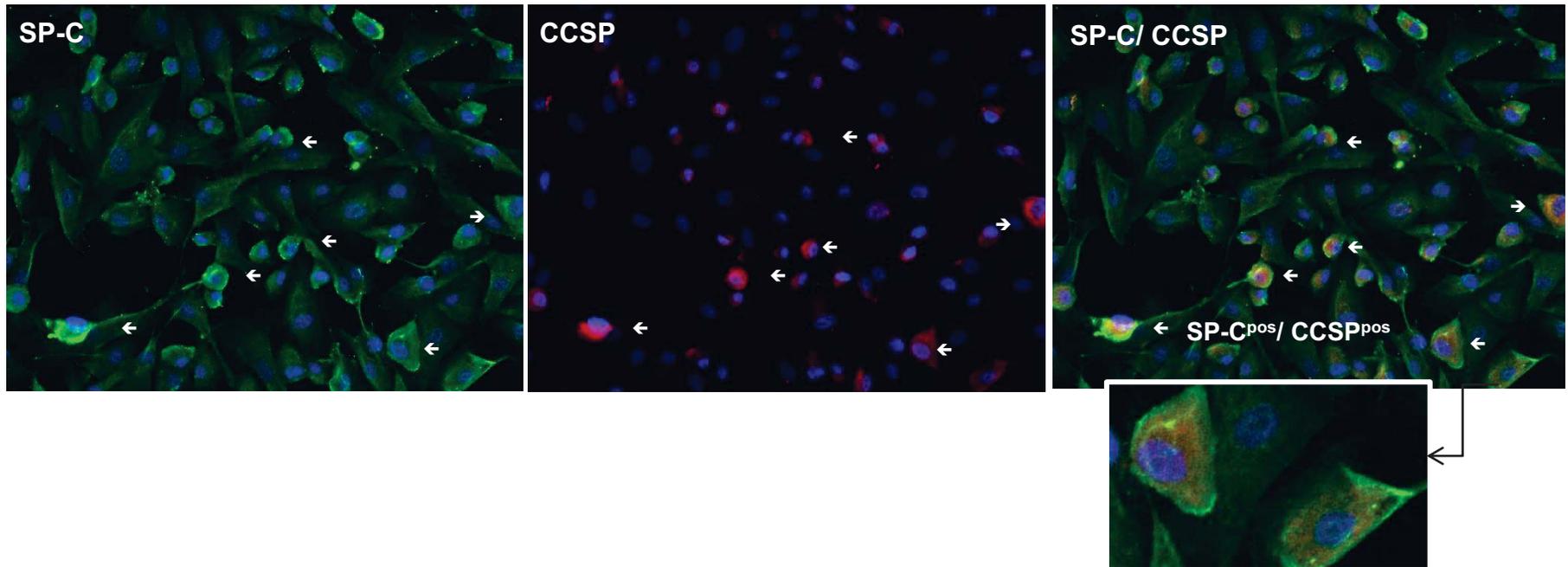
- 615 39. **Woywodt A, Lefrak S, Matteson E.** Tainted eponyms in medicine: the "Clara"  
616 cell joins the list. *Eur Respir J* 36: 706-708, 2010.
- 617 40. **Wuenschell CW, Sunday ME, Singh G, Minoo P, Slavkin HC, Warburton D.**  
618 Embryonic mouse lung epithelial progenitor cells co-express  
619 immunohistochemical markers of diverse mature cell lineages. *J Histochem*  
620 *Cytochem* 44: 113-123, 1996.
- 621 41. **Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian**  
622 **S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA.**  
623 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*  
624 318: 1917-1920, 2007.

625



**Figure 1**

A:



B:

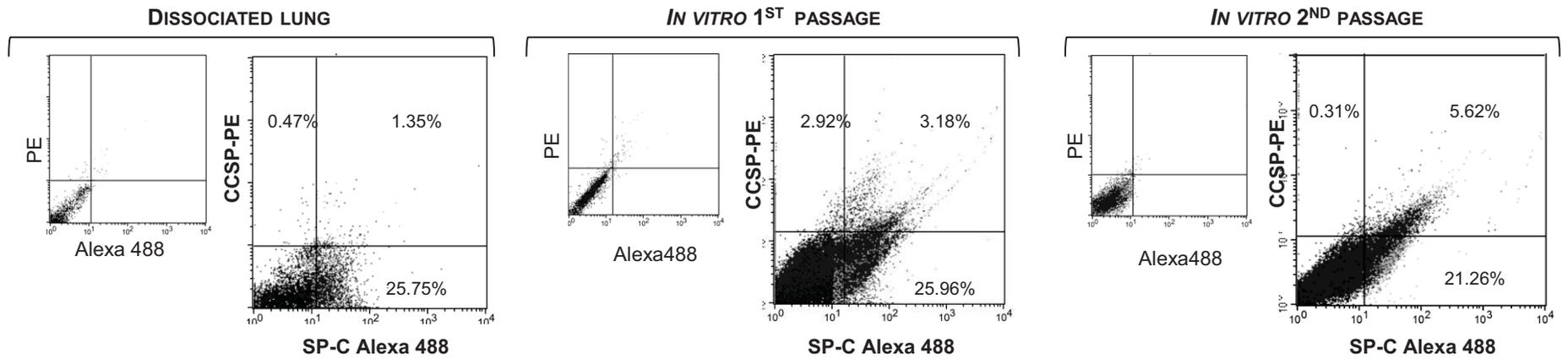
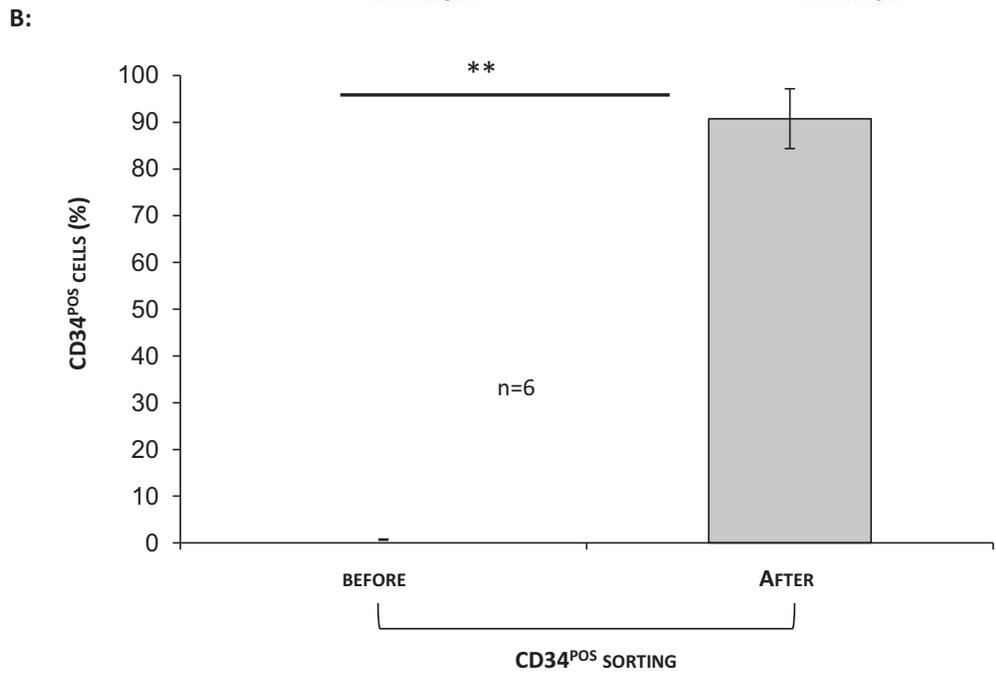
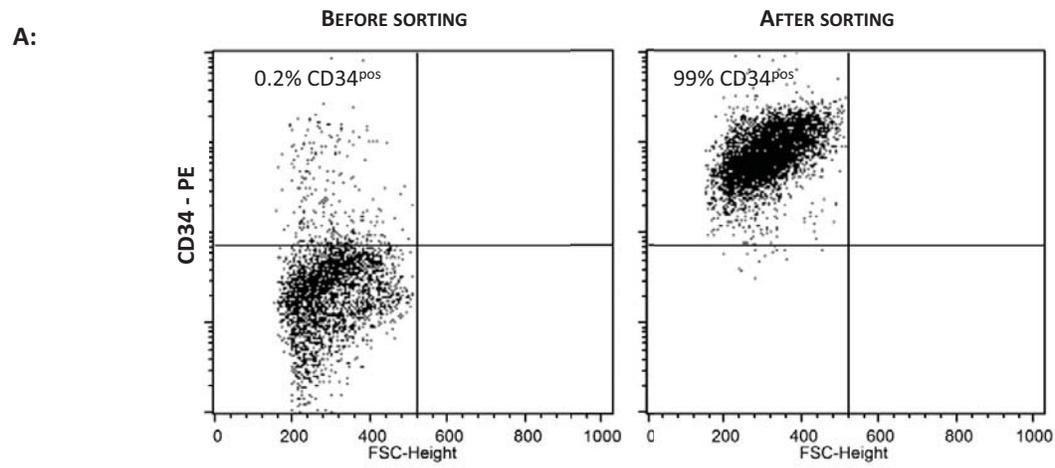


Figure 2



**Figure 3**

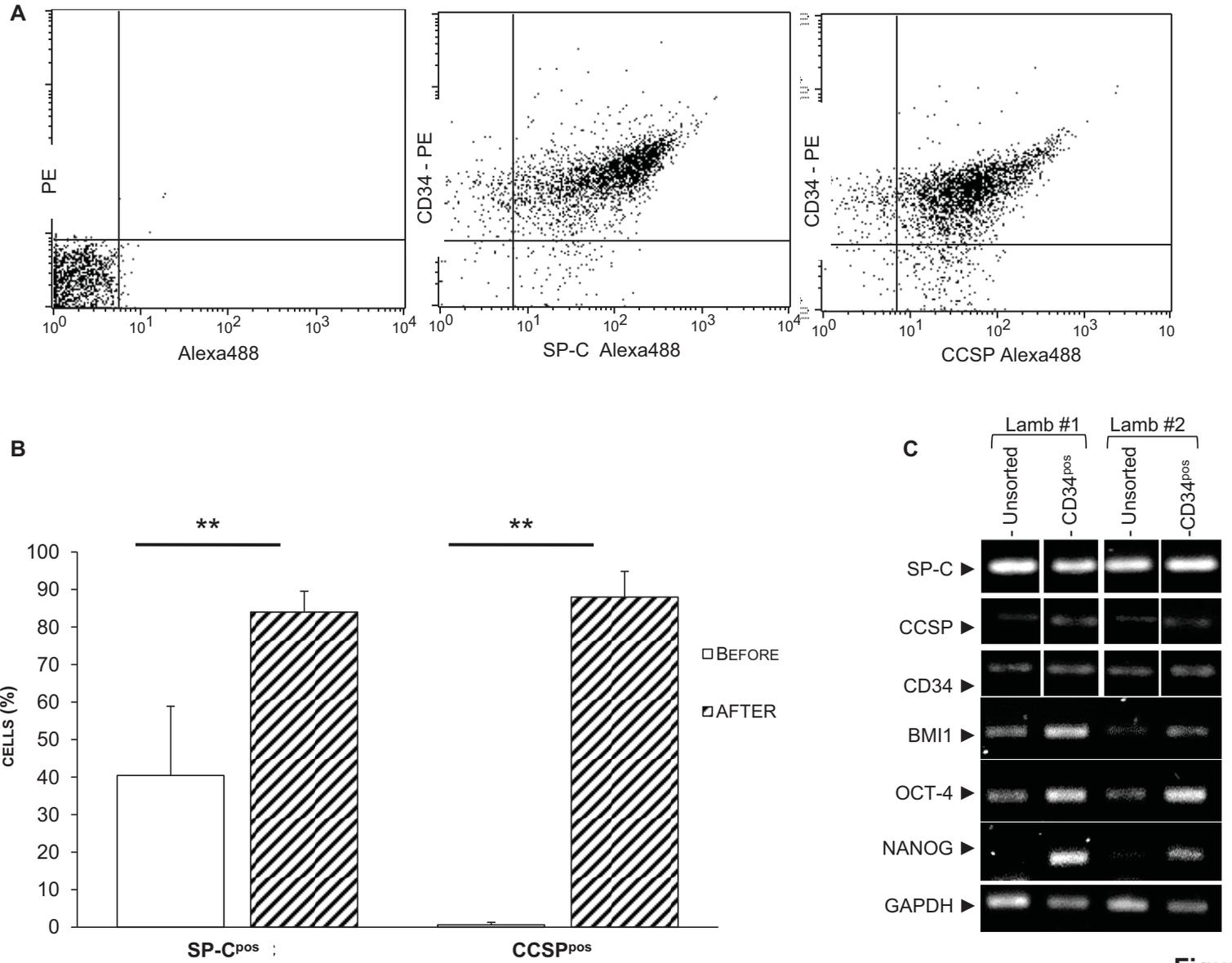


Figure 4

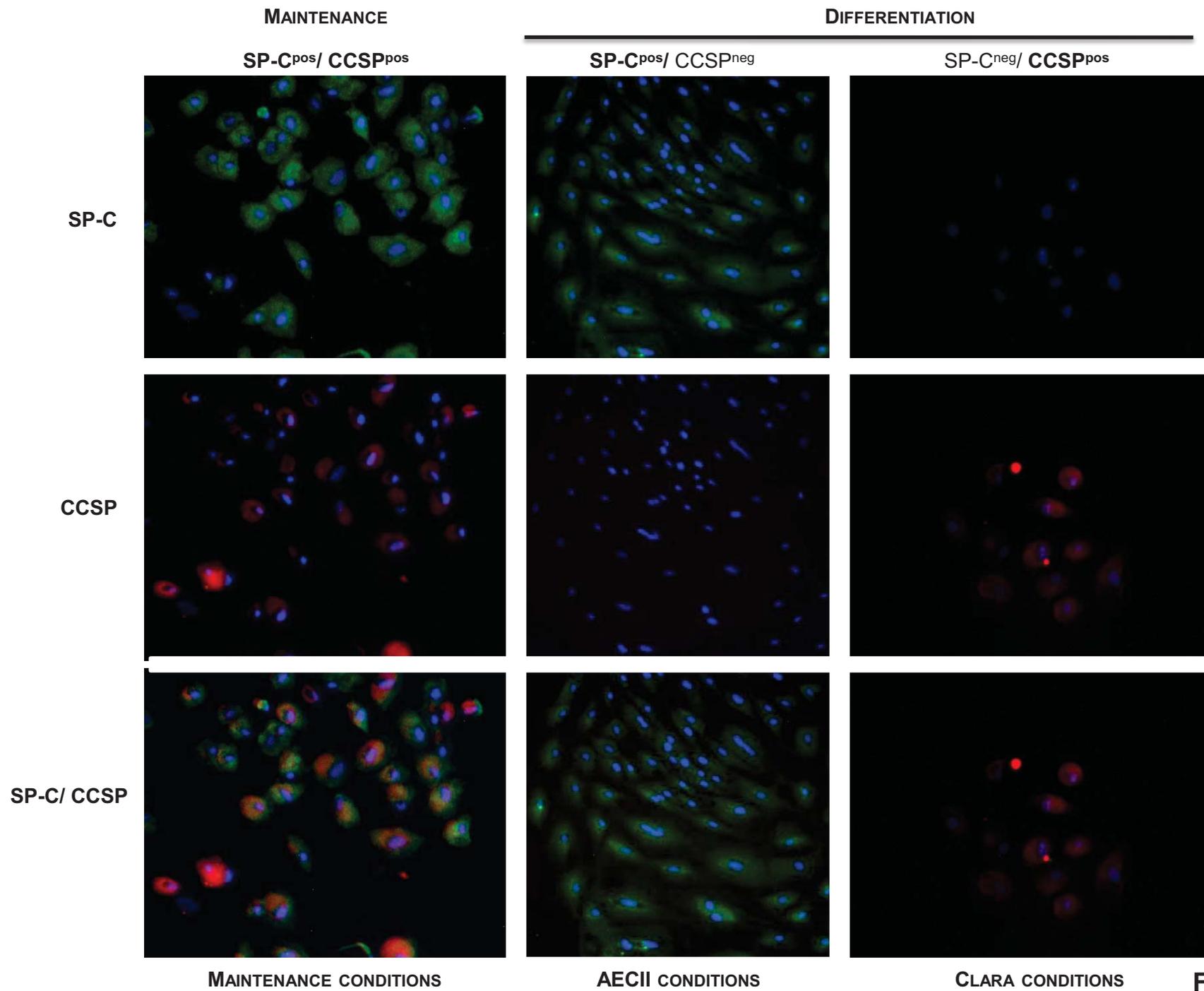
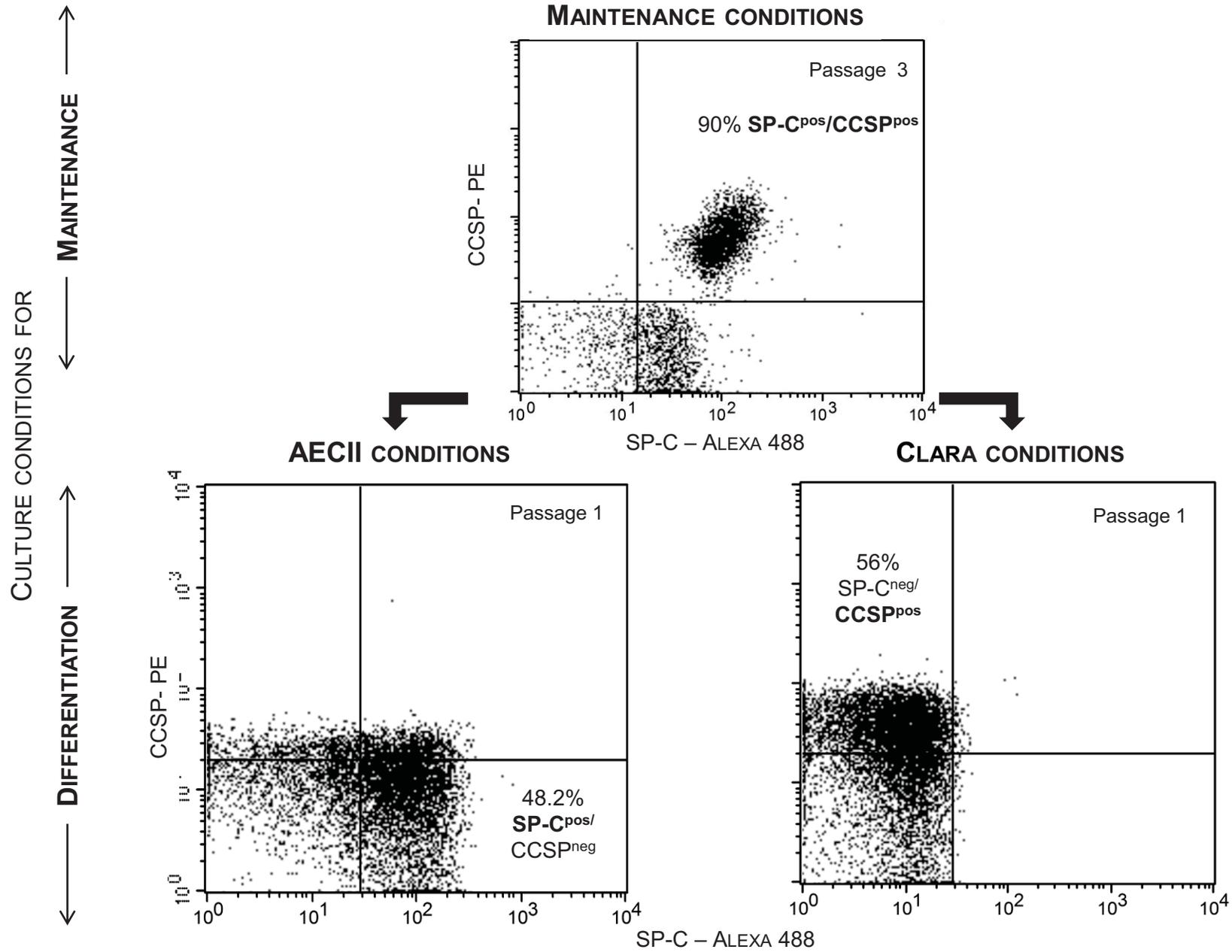


Figure 5A



**Figure 5B**

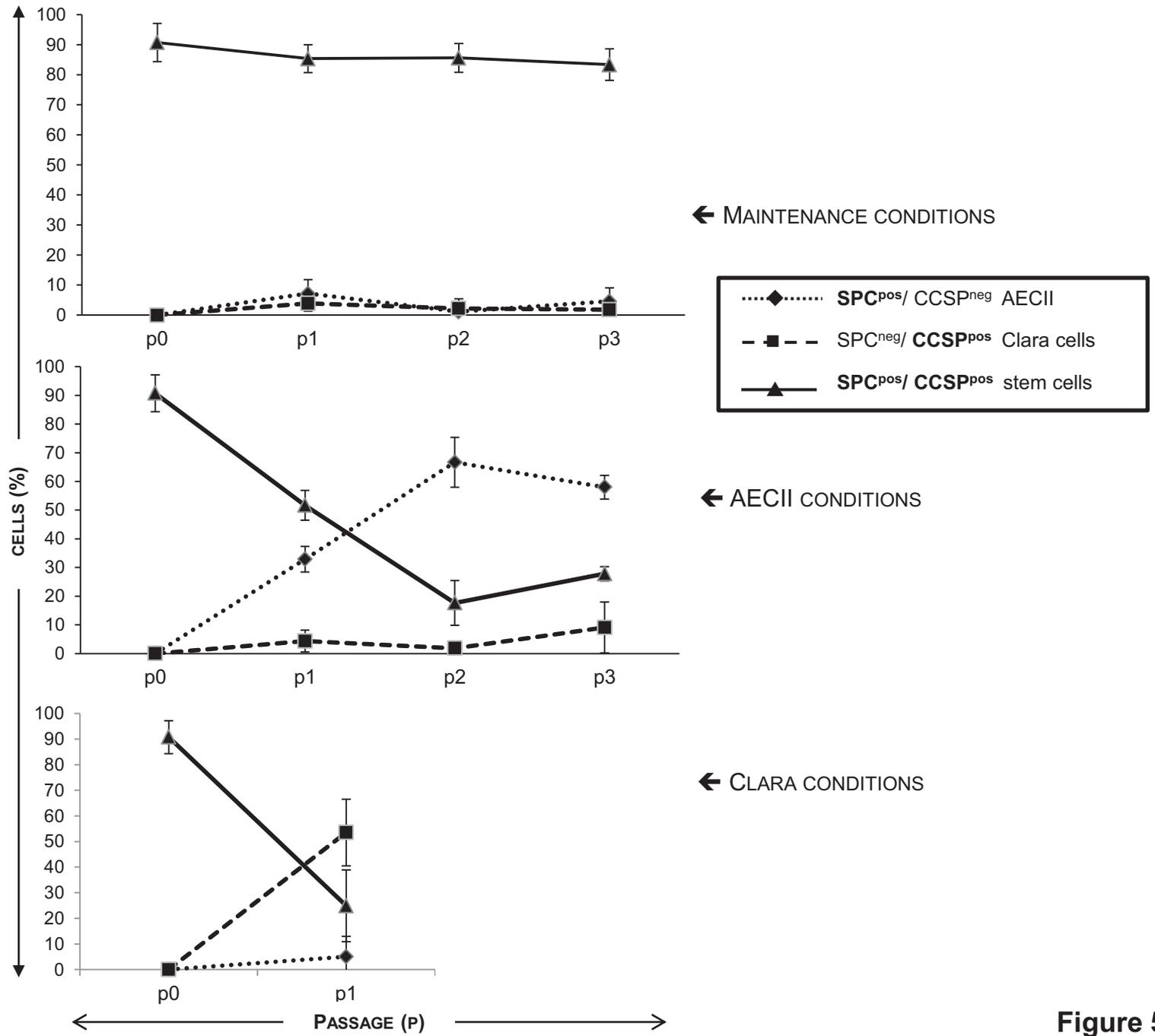
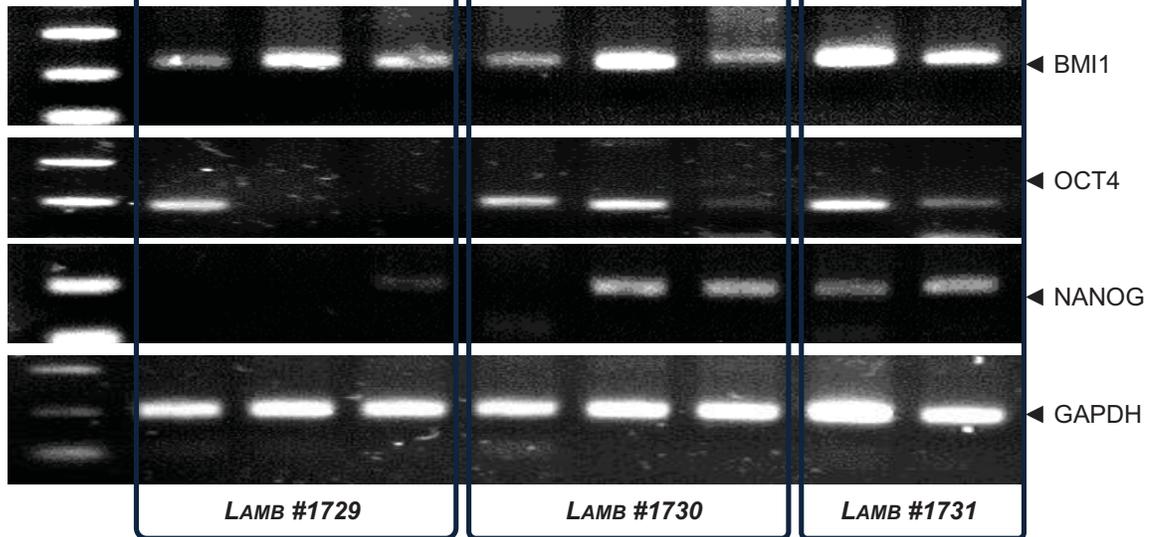


Figure 5C

**A**

CULTURE CONDITIONS FAVORING :

		STEM CELLS	AECII	CLARA	STEM CELLS	AECII	CLARA	STEM CELLS	AECII
PROPORTION OF CELLS	<b>SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>neg</sup></b>	+	+++	0	+	++	0	+	+++
	<b>SP-C<sup>neg</sup>/ CCSP<sup>pos</sup></b>	+	0	+++	+	+	+++	+	0
	<b>SP-C<sup>pos</sup>/ CCSP<sup>pos</sup></b>	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++

**B****Figure 6**



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Adams FH.** Functional development of the fetal lung. *J Pediatr* 68: 794-801, 1966.
2. **Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, and Clarke MF.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988, 2003.
3. **Alcorn DG, Adamson TM, Maloney JE, and Robinson PM.** A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep. *Anat Rec* 201: 655-667, 1981.
4. **Alexandrovich A, Qureishi A, Coudert AE, Zhang L, Grigoriadis AE, Shah AM, Brewer AC, and Pizzey JA.** A role for GATA-6 in vertebrate chondrogenesis. *Dev Biol* 314: 457-470, 2008.
5. **Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, and Thomson JA.** Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227: 271-278, 2000.
6. **Amos CI, Xu W, and Spitz MR.** Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res* 151: 3-12, 1999.
7. **Archer F, Jacquier E, Lyon M, Chastang J, Cottin V, Mornex JF, and Leroux C.** Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for JSRV expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 534-540, 2007.
8. **Aruzzo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, and Seed B.** CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61: 1303-1313, 1990.
9. **Aslam M, Baveja R, Liang OD, Fernandez-Gonzalez A, Lee C, Mitsialis SA, and Kourembanas S.** Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1122-1130, 2009.
10. **Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, and Lovell-Badge R.** Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-140, 2003.
11. **Ayach BB, Yoshimitsu M, Dawood F, Sun M, Arab S, Chen M, Higuchi K, Siatskas C, Lee P, Lim H, Zhang J, Cukerman E, Stanford WL, Medin JA, and Liu PP.** Stem cell factor receptor induces progenitor and natural killer cell-mediated cardiac survival and repair after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2304-2309, 2006.
12. **Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, and Rich JN.** Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760, 2006.
13. **Baumann M, Krause M, and Hill R.** Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 8: 545-554, 2008.
14. **Behfar A, Hodgson DM, Zingman LV, Perez-Terzic C, Yamada S, Kane GC, Alekseev AE, Puceat M, and Terzic A.** Administration of allogenic stem cells dosed to secure cardiogenesis and sustained infarct repair. *Ann N Y Acad Sci* 1049: 189-198, 2005.
15. **Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, and Hogan BL.** Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 124: 4867-4878, 1997.
16. **Benachi A, Delezoide AL, Chailley-Heu B, Preece M, Bourbon JR, and Ryder T.** Ultrastructural evaluation of lung maturation in a sheep model of diaphragmatic hernia and tracheal occlusion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 805-812, 1999.
17. **Bennett AR, Farley A, Blair NF, Gordon J, Sharp L, and Blackburn CC.** Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity* 16: 803-814, 2002.
18. **Berger PJ, Smolich JJ, Ramsden CA, and Walker AM.** Effect of lung liquid volume on respiratory performance after caesarean delivery in the lamb. *J Physiol* 492 ( Pt 3): 905-912, 1996.
19. **Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo Vullo S, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabro E, Pastorino U, and Sozzi**

- G. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16281-16286, 2009.
20. **Bianco P, and Gehron Robey P.** Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663-1668, 2000.
21. **Bishop JM.** The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311, 1987.
22. **Bonfield TL, Koloze M, Lennon DP, Zuchowski B, Yang SE, and Caplan AI.** Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L760-770, 2010.
23. **Booth C, and Potten CS.** Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105: 1493-1499, 2000.
24. **Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, and Randell SH.** Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 662-670, 2001.
25. **Bowden DH.** Cell turnover in the lung. *Am Rev Respir Dis* 128: S46-48, 1983.
26. **Bowes D, Clark AE, and Corrin B.** Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax* 36: 108-115, 1981.
27. **Breeze RG, and Wheeldon EB.** The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 116: 705-777, 1977.
28. **Bruscia EM, Price JE, Cheng EC, Weiner S, Caputo C, Ferreira EC, Egan ME, and Krause DS.** Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2965-2970, 2006.
29. **Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, and Gilbertson RJ.** A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11: 69-82, 2007.
30. **Cameron ER, and Neil JC.** The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene* 23: 4308-4314, 2004.
31. **Campbell LL, and Polyak K.** Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6: 2332-2338, 2007.
32. **Caplan AI.** Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res* 31: S9-14, 1995.
33. **Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, and Dalton S.** LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132: 885-896, 2005.
34. **Castell JV, Donato MT, and Gomez-Lechon MJ.** Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1: 189-204, 2005.
35. **Cavaleri F, and Scholer HR.** Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 113: 551-552, 2003.
36. **Challen GA, and Little MH.** A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 24: 3-12, 2006.
37. **Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, and Smith A.** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655, 2003.
38. **Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, and Chiou SH.** Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 3: e2637, 2008.
39. **Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, and Wu CW.** Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res* 70: 10433-10444, 2010.
40. **Chistiakov DA.** Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation. *J Biomed Sci* 17: 92, 2010.

41. **Chuang PT, and McMahon AP.** Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397: 617-621, 1999.
42. **Cole BB, Smith RW, Jenkins KM, Graham BB, Reynolds PR, and Reynolds SD.** Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. *Am J Pathol* 177: 362-376, 2010.
43. **Collins AT, and Maitland NJ.** Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 42: 1213-1218, 2006.
44. **Collins LG, Haines C, Perkel R, and Enck RE.** Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 75: 56-63, 2007.
45. **Cyranoski D.** Stem cells: 5 things to know before jumping on the iPS bandwagon. *Nature* 452: 406-408, 2008.
46. **Davies KE, and Grounds MD.** Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell* 127: 1304-1306, 2006.
47. **De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, and Luyten FP.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928-1942, 2001.
48. **Debeb BG, Xu W, and Woodward WA.** Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14: 11-17, 2009.
49. **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, and Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317, 2006.
50. **Donnelly GM, Haack DG, and Heird CS.** Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. *Cell Tissue Kinet* 15: 119-130, 1982.
51. **Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, and Wicha MS.** Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36 Suppl 1: 59-72, 2003.
52. **Dovey JS, Zacharek SJ, Kim CF, and Lees JA.** Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11857-11862, 2008.
53. **Driscoll B, Buckley S, Bui KC, Anderson KD, and Warburton D.** Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1191-1198, 2000.
54. **Drukker M.** Immunogenicity of embryonic stem cells and their progeny. *Methods Enzymol* 420: 391-409, 2006.
55. **Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, and Reya T.** Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6: 314-322, 2005.
56. **Eberhard D, and Tosh D.** Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci* 65: 33-40, 2008.
57. **Eisenberg LM, and Eisenberg CA.** Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 209-218, 2003.
58. **Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, and Hochedlinger K.** Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41: 968-976, 2009.
59. **Engelhardt JF, Schlossberg H, Yankaskas JR, and Dudus L.** Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development* 121: 2031-2046, 1995.
60. **Eramo A, Haas TL, and De Maria R.** Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene* 29: 4625-4635, 2010.
61. **Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, and De Maria R.** Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15: 504-514, 2008.
62. **Evans MJ, Cabral-Anderson LJ, and Freeman G.** Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Lab Invest* 38: 648-653, 1978.

63. **Evans MJ, Johnson LV, Stephens RJ, and Freeman G.** Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>. *Lab Invest* 35: 246-257, 1976.
64. **Evans MJ, Shami SG, Cabral-Anderson LJ, and Dekker NP.** Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO<sub>2</sub>. *Am J Pathol* 123: 126-133, 1986.
65. **Fehrenbach H, Schmiedl A, Wahlers T, Hirt SW, Brasch F, Riemann D, and Richter J.** Morphometric characterisation of the fine structure of human type II pneumocytes. *Anat Rec* 243: 49-62, 1995.
66. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, and Mavilio F.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530, 1998.
67. **Field JK, Smith RA, Aberle DR, Oudkerk M, Baldwin DR, Yankelevitz D, Pedersen JH, Swanson SJ, Travis WD, Wisbuba, II, Noguchi M, and Mulshine JL.** International Association for the Study of Lung Cancer Computed Tomography Screening Workshop 2011 report. *J Thorac Oncol* 7: 10-19, 2011.
68. **Flecknoe SJ, Wallace MJ, Cock ML, Harding R, and Hooper SB.** Changes in alveolar epithelial cell proportions during fetal and postnatal development in sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L664-670, 2003.
69. **Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, and Alison MR.** Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)* 103: 355-369, 2002.
70. **Franken C, Kramps JA, Meyer CJ, and Dijkman JH.** Localization of a low molecular weight protease inhibitor in the respiratory tract. *Bull Eur Physiopathol Respir* 16 Suppl: 231-236, 1980.
71. **Fuchs E, and Segre JA.** Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100: 143-155, 2000.
72. **Gage FH.** Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438, 2000.
73. **Germano D, Blyszczuk P, Valaperti A, Kania G, Dirnhofer S, Landmesser U, Luscher TF, Hunziker L, Zulewski H, and Eriksson U.** Proliferin-1/CD133+ lung epithelial progenitors protect from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 939-949, 2009.
74. **Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, and Stripp BR.** Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9286-9291, 2009.
75. **Giangreco A, Reynolds SD, and Stripp BR.** Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 161: 173-182, 2002.
76. **Giangreco A, Shen H, Reynolds SD, and Stripp BR.** Molecular phenotype of airway side population cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L624-630, 2004.
77. **Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, and Dontu G.** ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1: 555-567, 2007.
78. **Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, and Rottier R.** Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev Biol* 317: 296-309, 2008.
79. **Gonzalez RF, Allen L, and Dobbs LG.** Rat alveolar type I cells proliferate, express OCT-4, and exhibit phenotypic plasticity in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1045-1055, 2009.
80. **Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, and Mulligan RC.** Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806, 1996.
81. **Goodman MR, Link DW, Brown WR, and Nakane PK.** Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis* 123: 115-119, 1981.
82. **Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, and Shi S.** Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13625-13630, 2000.

83. **Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, and Rajagopal J.** Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development* 136: 1751-1759, 2009.
84. **Hackett TL, Shaheen F, Johnson A, Wadsworth S, Pechkovsky DV, Jacoby DB, Kicic A, Stick SM, and Knight DA.** Characterization of side population cells from human airway epithelium. *Stem Cells* 26: 2576-2585, 2008.
85. **Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, and Krasnow MA.** sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* 92: 253-263, 1998.
86. **Hare WC.** The broncho-pulmonary segments in the sheep. *J Anat* 89: 387-402, 1955.
87. **Hassan HT.** c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leuk Res* 33: 5-10, 2009.
88. **Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, and Heeschen C.** Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313-323, 2007.
89. **Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, and Krystal GW.** Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ* 6: 769-779, 1995.
90. **Hinnrasky J, Chevillard M, and Puchelle E.** Immunocytochemical demonstration of quantitative differences in the distribution of lysozyme in human airway secretory granule phenotypes. *Biol Cell* 68: 239-243, 1990.
91. **Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, and Shay JW.** Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87: 895-902, 1995.
92. **Ho MM, Ng AV, Lam S, and Hung JY.** Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 67: 4827-4833, 2007.
93. **Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, and Yamanaka S.** Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460: 1132-1135, 2009.
94. **Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, and 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* 24: 671-681, 2001.
95. **Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, and Stripp BR.** Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 164: 577-588, 2004.
96. **Hook GE, Brody AR, Cameron GS, Jetten AM, Gilmore LB, and Nettesheim P.** Repopulation of denuded tracheas by Clara cells isolated from the lungs of rabbits. *Exp Lung Res* 12: 311-329, 1987.
97. **Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, and Sun S.** Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* 68: 6533-6540, 2008.
98. **Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, and Boman BM.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69: 3382-3389, 2009.
99. **Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, and Melton DA.** Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26: 1269-1275, 2008.
100. **Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, Martinet N, Thibault C, Huelsken J, Brambilla E, and du Manoir S.** SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One* 5: e8960, 2010.

101. **Hyatt BA, Shanguan X, and Shannon JM.** FGF-10 induces SP-C and Bmp4 and regulates proximal-distal patterning in embryonic tracheal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1116-1126, 2004.
102. **Ingham PW.** Transducing Hedgehog: the story so far. *Embo J* 17: 3505-3511, 1998.
103. **Ishii Y, Rex M, Scotting PJ, and Yasugi S.** Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev Dyn* 213: 464-475, 1998.
104. **Ito T, and Kanisawa M.** Endocrine cells and brush cells at the bronchiolo-alveolar junctions of neonatal Syrian hamster lungs. *J Morphol* 206: 217-223, 1990.
105. **Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, and Lemischka IR.** Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442: 533-538, 2006.
106. **Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, and Katz RL.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 7: 330-338, 2009.
107. **Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, and 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* 99: 1966-1971, 2002.
108. **Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, and Hilton J.** Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 85: 2742-2746, 1995.
109. **Jordan CT, Guzman ML, and Noble M.** Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355: 1253-1261, 2006.
110. **Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, and Groffen J.** Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11: 415-421, 1995.
111. **Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, Zheng H, Ogorek B, Rondon-Clavo C, Ferreira-Martins J, Matsuda A, Arranto C, Goichberg P, Giordano G, Haley KJ, Bardelli S, Rayatzadeh H, Liu X, Quaini F, Liao R, Leri A, Perrella MA, Loscalzo J, and Anversa P.** Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 364: 1795-1806, 2011.
112. **Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, and Jacks T.** Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121: 823-835, 2005.
113. **Kimura T, and Nakano T.** Induction of pluripotency in primordial germ cells. *Histol Histopathol* 26: 643-650, 2011.
114. **Kleber M, and Sommer L.** Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* 16: 681-687, 2004.
115. **Klonisch T, Wiehac E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, and Los M.** Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med* 14: 450-460, 2008.
116. **Krause DS.** Bone marrow-derived cells and stem cells in lung repair. *Proc Am Thorac Soc* 5: 323-327, 2008.
117. **Krystal GW, Hines SJ, and Organ CP.** Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* 56: 370-376, 1996.
118. **Kwei KA, Kim YH, Girard L, Kao J, Pacyna-Gengelbach M, Salari K, Lee J, Choi YL, Sato M, Wang P, Hernandez-Boussard T, Gazdar AF, Petersen I, Minna JD, and Pollack JR.** Genomic profiling identifies TTF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene* 27: 3635-3640, 2008.
119. **Lamb D, and Reid L.** Histochemical and autoradiographic investigation of the serous cells of the human bronchial glands. *J Pathol* 100: 127-138, 1970.

120. **Lange S, Heger J, Euler G, Wartenberg M, Piper HM, and Sauer H.** Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 81: 159-168, 2009.
121. **Lee KS, Lee YS, Lee JM, Ito K, Cinghu S, Kim JH, Jang JW, Li YH, Goh YM, Chi XZ, Wee H, Lee HW, Hosoya A, Chung JH, Jang JJ, Kundu JK, Surh YJ, Kim WJ, Ito Y, Jung HS, and Bae SC.** Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer. *Oncogene* 29: 3349-3361, 2010.
122. **Leri A, Kajstura J, and Anversa P.** Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 85: 1373-1416, 2005.
123. **Levina V, Marrangoni A, Wang T, Parikh S, Su Y, Herberman R, Lokshin A, and Gorelik E.** Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop. *Cancer Res* 70: 338-346, 2010.
124. **Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, and Lokshin AE.** Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One* 3: e3077, 2008.
125. **Li B, Xu L, Lu WY, Xu W, Wang MH, Yang K, Dong J, Ding XY, and Huang YH.** A whole-mechanical method to establish human embryonic stem cell line HN4 from discarded embryos. *Cytotechnology* 62: 509-518, 2010.
126. **Li C, Hu L, Xiao J, Chen H, Li JT, Bellusci S, Delanghe S, and Minoo P.** Wnt5a regulates Shh and Fgf10 signaling during lung development. *Dev Biol* 287: 86-97, 2005.
127. **Li K, Nagalla SR, and Spindel ER.** A rhesus monkey model to characterize the role of gastrin-releasing peptide (GRP) in lung development. Evidence for stimulation of airway growth. *J Clin Invest* 94: 1605-1615, 1994.
128. **Li L, Black R, Ma Z, Yang Q, Wang A, and Lin F.** Use of Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells to Treat Acute Kidney Injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011.
129. **Li QL, Kim HR, Kim WJ, Choi JK, Lee YH, Kim HM, Li LS, Kim H, Chang J, Ito Y, Youl Lee K, and Bae SC.** Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 223-228, 2004.
130. **Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, and Chang JC.** Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100: 672-679, 2008.
131. **Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, and Chan RJ.** Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105: 635-637, 2005.
132. **Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, and Herman JG.** Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* 29: 895-904, 2008.
133. **Ling TY, Kuo MD, Li CL, Yu AL, Huang YH, Wu TJ, Lin YC, Chen SH, and Yu J.** Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9530-9535, 2006.
134. **Liu X, Driskell RR, and Engelhardt JF.** Stem cells in the lung. *Methods Enzymol* 419: 285-321, 2006.
135. **Liu X, and Engelhardt JF.** The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. *Proc Am Thorac Soc* 5: 682-688, 2008.
136. **Lobo NA, Shimono Y, Qian D, and Clarke MF.** The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 675-699, 2007.
137. **Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Thu KL, Garnis C, Malloff CA, Campbell J, Williams AC, Hwang D, Zhu CQ, Buys TP, Yee J, English JC, Macaulay C, Tsao MS, Gazdar AF, Minna JD, Lam S, and Lam WL.**

Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. *PLoS Med* 7: e1000315, 2010.

138. **Loeffler M, and Roeder I.** Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells Tissues Organs* 171: 8-26, 2002.

139. **Mailleux AA, Tefft D, Ndiaye D, Itoh N, Thierry JP, Warburton D, and Bellusci S.** Evidence that SPROUTY2 functions as an inhibitor of mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Mech Dev* 102: 81-94, 2001.

140. **Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, and Mukherjee AB.** Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem* 268: 20343-20351, 1993.

141. **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* 78: 7634-7638, 1981.

142. **Martin LP, Hamilton TC, and Schilder RJ.** Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 14: 1291-1295, 2008.

143. **Martineau HM, Cousens C, Imlach S, Dagleish MP, and Griffiths DJ.** Jaagsiekte sheep retrovirus infects multiple cell types in the ovine lung. *J Virol* 85: 3341-3355, 2011.

144. **Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, and Simon MC.** O2 regulates stem cells through Wnt/beta-catenin signalling. *Nat Cell Biol* 12: 1007-1013, 2010.

145. **McDowell EM, Barrett LA, Glavin F, Harris CC, and Trump BF.** The respiratory epithelium. I. Human bronchus. *J Natl Cancer Inst* 61: 539-549, 1978.

146. **Meller D, Dabul V, and Tseng SC.** Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. *Exp Eye Res* 74: 537-545, 2002.

147. **Mercer JF, Grimes A, Ambrosini L, Lockhart P, Paynter JA, Dierick H, and Glover TW.** Mutations in the murine homologue of the Menkes gene in dappled and blotchy mice. *Nat Genet* 6: 374-378, 1994.

148. **Meuwissen R, and Berns A.** Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev* 19: 643-664, 2005.

149. **Miettinen PJ, Warburton D, Bu D, Zhao JS, Berger JE, Minoo P, Koivisto T, Allen L, Dobbs L, Werb Z, and Derynck R.** Impaired lung branching morphogenesis in the absence of functional EGF receptor. *Dev Biol* 186: 224-236, 1997.

150. **Miller TL, Shashikant BN, Pilon AL, Pierce RA, Shaffer TH, and Wolfson MR.** Effects of an intratracheally delivered anti-inflammatory protein (rhCC10) on physiological and lung structural indices in a juvenile model of acute lung injury. *Biol Neonate* 89: 159-170, 2006.

151. **Moodley Y, Manuepillai U, and Weiss DJ.** Cellular therapies for lung disease: a distant horizon. *Respirology* 16: 223-237, 2011.

152. **Moore BB, and Hogaboam CM.** Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L152-160, 2008.

153. **Morimoto M, Liu Z, Cheng HT, Winters N, Bader D, and 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* 123: 213-224, 2010.

154. **Moriyama Y, and Omote H.** Vesicular glutamate transporter acts as a metabolic regulator. *Biol Pharm Bull* 31: 1844-1846, 2008.

155. **Mucenski ML, Wert SE, Nation JM, Loudy DE, Huelsken J, Birchmeier W, Morrisey EE, and Whitsett JA.** beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J Biol Chem* 278: 40231-40238, 2003.

156. **Murgia C, Caporale M, Ceesay O, Di Francesco G, Ferri N, Varasano V, de las Heras M, and Palmarini M.** Lung adenocarcinoma originates from retrovirus infection of proliferating type 2 pneumocytes during pulmonary post-natal development or tissue repair. *PLoS Pathog* 7: e1002014, 2011.

157. **Nakanishi K, Hiroi S, Kawai T, Suzuki M, and Torikata C.** Argyrophilic nucleolar-organizer region counts and DNA status in bronchioloalveolar epithelial hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Hum Pathol* 29: 235-239, 1998.
158. **Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, Hodges MG, Jelinek I, Madala S, Karpata S, and Mezey E.** Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5652-5657, 2010.
159. **Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, and Smith A.** Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391, 1998.
160. **Nowell PC.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28, 1976.
161. **Odorico JS, Kaufman DS, and Thomson JA.** Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19: 193-204, 2001.
162. **Ohnishi S, and Nagaya N.** Tissue regeneration as next-generation therapy for COPD--potential applications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3: 509-514, 2008.
163. **Ohtsuka N, Urase K, Momoi T, and Nogawa H.** Induction of bud formation of embryonic mouse tracheal epithelium by fibroblast growth factor plus transferrin in mesenchyme-free culture. *Dev Dyn* 222: 263-272, 2001.
164. **Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, and Sato K.** Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport* 12: 4003-4007, 2001.
165. **Okita K, Ichisaka T, and Yamanaka S.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317, 2007.
166. **Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, Nagano K, Tanaka Y, Terada K, Sugiyama T, Umeyama K, Matsumoto K, Yamamoto T, and Endo F.** Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 38: 104-113, 2003.
167. **Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, and Daley GQ.** Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134: 877-886, 2008.
168. **Park IK, Morrison SJ, and Clarke MF.** Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 113: 175-179, 2004.
169. **Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, and Whitsett JA.** Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 151-157, 2006.
170. **Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, and Down JD.** Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5431-5436, 2007.
171. **Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, and Gold LI.** Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 115: 1091-1105, 1991.
172. **Pepicelli CV, Lewis PM, and McMahon AP.** Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* 8: 1083-1086, 1998.
173. **Pera MF, and Trounson AO.** Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 131: 5515-5525, 2004.
174. **Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, and Williams L.** Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *Embo J* 13: 3296-3301, 1994.
175. **Pevny L, and Placzek M.** SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 15: 7-13, 2005.

176. **Platt JA, Kraipowich N, Villafane F, and DeMartini JC.** Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet Pathol* 39: 341-352, 2002.
177. **Plopper CG, Mariassy AT, and Lollini LO.** Structure as revealed by airway dissection. A comparison of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 128: S4-7, 1983.
178. **Polak JM, Becker KL, Cutz E, Gail DB, Goniakowska-Witalinska L, Gosney JR, Lauweryns JM, Linnoila I, McDowell EM, Miller YE, and et al.** Lung endocrine cell markers, peptides, and amines. *Anat Rec* 236: 169-171, 1993.
179. **Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, and Cornelius JG.** Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6: 278-282, 2000.
180. **Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, and 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* 4: 525-534, 2009.
181. **Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D, and Driscoll B.** Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L658-667, 2004.
182. **Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, DiDonna S, Decary S, Hentati F, Saillant G, Butler-Browne GS, and Mouly V.** Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol* 35: 711-719, 2000.
183. **Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, and Bongso A.** Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18: 399-404, 2000.
184. **Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, and Weissman IL.** A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409-414, 2003.
185. **Reynolds S, and Ruohola-Baker H.** The role of microRNAs in germline differentiation. 2008.
186. **Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, and Stripp BR.** Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 156: 269-278, 2000.
187. **Reynolds SD, Shen H, Reynolds PR, Betsuyaku T, Pilewski JM, Gambelli F, Di Giuseppe M, Ortiz LA, and Stripp BR.** Molecular and functional properties of lung SP cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L972-983, 2007.
188. **Reynolds SD, Zemke AC, Giangreco A, Brockway BL, Teisanu RM, Drake JA, Mariani T, Di PY, Taketo MM, and Stripp BR.** Conditional stabilization of beta-catenin expands the pool of lung stem cells. *Stem Cells* 26: 1337-1346, 2008.
189. **Rivera C, Rivera S, Lorient Y, Vozenin MC, and Deutsch E.** Lung cancer stem cell: new insights on experimental models and preclinical data. *J Oncol* 2011: 549181, 2010.
190. **Robinson D, Ash H, Yayon A, Nevo Z, and Aviezer D.** Characteristics of cartilage biopsies used for autologous chondrocytes transplantation. *Cell Transplant* 10: 203-208, 2001.
191. **Rochat A, Kobayashi K, and Barrandon Y.** Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76: 1063-1073, 1994.
192. **Rock JR, Randell SH, and Hogan BL.** Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 3: 545-556, 2010.
193. **Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, and Brigham KL.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 145-152, 2005.
194. **Rolletschek A, and Wobus AM.** Induced human pluripotent stem cells: promises and open questions. *Biol Chem* 390: 845-849, 2009.

195. **Ryan DH, Chapple CW, Kossover SA, Sandberg AA, and Cohen HJ.** Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. *Blood* 70: 814-821, 1987.
196. **Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar CE, and Varticovski L.** Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 102: 1636-1644, 2010.
197. **Salincarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, and Noda M.** Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287: 289-300, 2003.
198. **Samadikuchaksaraei A, Cohen S, Isaac K, Rippon HJ, Polak JM, Bielby RC, and Bishop AE.** Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 12: 867-875, 2006.
199. **Scadden DT.** The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441: 1075-1079, 2006.
200. **Schoch KG, Lori A, Burns KA, Eldred T, Olsen JC, and Randell SH.** A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L631-642, 2004.
201. **Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, and Kato S.** Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21: 138-141, 1999.
202. **Serra R, Pelton RW, and Moses HL.** TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures. *Development* 120: 2153-2161, 1994.
203. **Serrano-Mollar A, Nacher M, Gay-Jordi G, Closa D, Xaubet A, and Bulbena O.** Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1261-1268, 2007.
204. **Shay JW, and Wright WE.** Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 72-76, 2000.
205. **Shimizu T, Nishihara M, Kawaguchi S, and Sakakura Y.** Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 85-94, 1994.
206. **Shu W, Jiang YQ, Lu MM, and Morrisey EE.** Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development* 129: 4831-4842, 2002.
207. **Singh G, and Katyal SL.** Clara cell proteins. *Ann N Y Acad Sci* 923: 43-58, 2000.
208. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, and Dirks PB.** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828, 2003.
209. **Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, and Dirks PB.** Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401, 2004.
210. **Sleigh MA.** Ciliary function in mucus transport. *Chest* 80: 791-795, 1981.
211. **Snyder JC, Teisanu RM, and Stripp BR.** Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol* 217: 254-264, 2009.
212. **Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, Pastorino S, Yang M, Hoffman RM, Kesari S, and Verma IM.** Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4274-4280, 2011.
213. **Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, and 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* 100: 2397-2402, 2003.
214. **Spicer SS, Mochizuki I, Setser ME, and Martinez JR.** Complex carbohydrates of rat tracheobronchial surface epithelium visualized ultrastructurally. *Am J Anat* 158: 93-109, 1980.
215. **Springer J, Groneberg DA, Pregla R, and Fischer A.** Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regul Pept* 124: 195-201, 2005.

216. **Stojkovic M, Lako M, Strachan T, and Murdoch A.** Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 128: 259-267, 2004.
217. **Stone KC, Mercer RR, Freeman BA, Chang LY, and Crapo JD.** Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue. *Am Rev Respir Dis* 146: 454-456, 1992.
218. **Stripp BR, Maxson K, Mera R, and Singh G.** Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *Am J Physiol* 269: L791-799, 1995.
219. **Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, and Fine A.** Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L97-104, 2003.
220. **Sunday ME, Hua J, Dai HB, Nusrat A, and Torday JS.** Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 199-205, 1990.
221. **Sung JM, Cho HJ, Yi H, Lee CH, Kim HS, Kim DK, Abd El-Aty AM, Kim JS, Landowski CP, Hediger MA, and Shin HC.** Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 163-167, 2008.
222. **Taieb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, and Yahi N.** The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett* 278: 164-173, 2009.
223. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
224. **Takahashi K, and Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
225. **Tefft JD, Lee M, Smith S, Leinwand M, Zhao J, Bringas P, Jr., Crowe DL, and Warburton D.** Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of Drosophila sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Curr Biol* 9: 219-222, 1999.
226. **Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, and Scott EW.** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545, 2002.
227. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
228. **Tiozzo C, De Langhe S, Yu M, Londhe VA, Carraro G, Li M, Li C, Xing Y, Anderson S, Borok Z, Bellusci S, and Minoo P.** Deletion of Pten expands lung epithelial progenitor pools and confers resistance to airway injury. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 701-712, 2009.
229. **Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, Rocco G, and Pirozzi G.** The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 36: 446-453, 2009.
230. **Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Wert SE, Keiser AR, Smith AN, Lang R, and Whitsett JA.** Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells. *PLoS One* 4: e8248, 2009.
231. **Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, and Yankelewitz D.** International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6: 244-285, 2011.
232. **Tropea KA, Leder E, Aslam M, Lau AN, Raiser DM, Lee JH, Balasubramaniam V, Fredenburgh LE, Mitsialis SA, Kourembanas S, and Kim CF.** Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal

stromal cell treatment in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012.

233. **Umamoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Terasawa M, Yang J, Nishida K, Kobayashi Y, and Okano T.** Expression of Integrin beta3 is correlated to the properties of quiescent hemopoietic stem cells possessing the side population phenotype. *J Immunol* 177: 7733-7739, 2006.
234. **Urase K, Mukasa T, Igarashi H, Ishii Y, Yasugi S, Momoi MY, and Momoi T.** Spatial expression of Sonic hedgehog in the lung epithelium during branching morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 161-166, 1996.
235. **van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, Rey-Parra GJ, Galipeau J, Haromy A, Eaton F, Chen M, Hashimoto K, Abley D, Korbitt G, Archer SL, and Thebaud B.** Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1131-1142, 2009.
236. **Van Scott MR, Hester S, and Boucher RC.** Ion transport by rabbit nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5496-5500, 1987.
237. **Visvader JE.** Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 23: 2563-2577, 2009.
238. **Visvader JE, and Lindeman GJ.** Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8: 755-768, 2008.
239. **Wagers AJ, and Weissman IL.** Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116: 639-648, 2004.
240. **Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, and Wetsel RA.** A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4449-4454, 2007.
241. **Wang D, Morales JE, Calame DG, Alcorn JL, and Wetsel RA.** Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. *Mol Ther* 18: 625-634, 2010.
242. **Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NA, Jr., Spees JL, Bertucci D, Peister A, Weiss DJ, Valentine VG, Prockop DJ, and Kolls JK.** Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 186-191, 2005.
243. **Warburton D, Bellusci S, De Langhe S, Del Moral PM, Fleury V, Mailleux A, Tefft D, Unbekandt M, Wang K, and Shi W.** Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res* 57: 26R-37R, 2005.
244. **Watson TM, Reynolds SD, Mango GW, Boe IM, Lund J, and Stripp BR.** Altered lung gene expression in CCSP-null mice suggests immunoregulatory roles for Clara cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1523-1530, 2001.
245. **Weaver M, Dunn NR, and Hogan BL.** Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* 127: 2695-2704, 2000.
246. **Weissman IL.** Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446, 2000.
247. **Wesson RN, and Cameron AM.** Stem cells in acute liver failure. *Adv Surg* 45: 117-130, 2011.
248. **Wharton J, Polak JM, Bloom SR, Ghatei MA, Solcia E, Brown MR, and Pearse AG.** Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature* 273: 769-770, 1978.
249. **Wicha MS, Liu S, and Dontu G.** Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66: 1883-1890; discussion 1895-1886, 2006.
250. **Widdicombe JG, and Pack RJ.** The Clara cell. *Eur J Respir Dis* 63: 202-220, 1982.
251. **Winn B, Tavares R, Fanion J, Noble L, Gao J, Sabo E, and Resnick MB.** Differentiating the undifferentiated: immunohistochemical profile of medullary carcinoma of the colon with an emphasis on intestinal differentiation. *Hum Pathol* 40: 398-404, 2009.

252. **Wright JR, and Clements JA.** Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 136: 426-444, 1987.
253. **Wuenschell CW, Sunday ME, Singh G, Minoo P, Slavkin HC, and Warburton D.** Embryonic mouse lung epithelial progenitor cells co-express immunohistochemical markers of diverse mature cell lineages. *J Histochem Cytochem* 44: 113-123, 1996.
254. **Wurmser AE, and Gage FH.** Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 416: 485-487, 2002.
255. **Xu J, Qu J, Cao L, Sai Y, Chen C, He L, and Yu L.** Mesenchymal stem cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *J Pathol* 214: 472-481, 2008.
256. **Yanada M, Yaoi T, Shimada J, Sakakura C, Nishimura M, Ito K, Terauchi K, Nishiyama K, Itoh K, and Fushiki S.** Frequent hemizygous deletion at 1p36 and hypermethylation downregulate RUNX3 expression in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 14: 817-822, 2005.
257. **Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, and Peck AB.** In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8078-8083, 2002.
258. **Yi H, Cho HJ, Cho SM, Jo K, Park JA, Lee SH, Chang BJ, Kim JS, and Shin HC.** Effect of 5-FU and MTX on the Expression of Drug-resistance Related Cancer Stem Cell Markers in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 16: 11-16, 2012.
259. **Ying QL, Nichols J, Evans EP, and Smith AG.** Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545-548, 2002.
260. **Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, and Chang C.** Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 251: 549-557, 1998.
261. **Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, and Thomson JA.** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920, 2007.
262. **Yu Y, Flint A, Dvorin EL, and Bischoff J.** AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 277: 20711-20716, 2002.
263. **Zemke AC, Teisanu RM, Giangreco A, Drake JA, Brockway BL, Reynolds SD, and Stripp BR.** beta-Catenin is not necessary for maintenance or repair of the bronchiolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 535-543, 2009.
264. **Zhang M, Atkinson RL, and Rosen JM.** Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3522-3527, 2010.
265. **Zhao J, Bu D, Lee M, Slavkin HC, Hall FL, and Warburton D.** Abrogation of transforming growth factor-beta type II receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture. *Dev Biol* 180: 242-257, 1996.
266. **Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, and Ding S.** Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384, 2009.
267. **Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, and Sorrentino BP.** 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* 7: 1028-1034, 2001.
268. **Zhu X, Zhou X, Lewis MT, Xia L, and Wong S.** Cancer stem cell, niche and EGFR decide tumor development and treatment response: A bio-computational simulation study. *J Theor Biol* 269: 138-149, 2011.
269. **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, and Hedrick MH.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228, 2001.

