

## Inflammation bronchique précoce dans la mucoviscidose

par Edith Puchelle

INSERM Unité 514, IFR 53, Hôpital Maison Blanche, 45, rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France

Reçu le 3 décembre 2001

### RÉSUMÉ

La mucoviscidose (ou cystic fibrosis : CF) est la plus fréquente des maladies génétiques, transmise selon le mode autosomique récessif dans les populations caucasiennes nord-américaines et européennes. Le gène CF code une glycoprotéine transmembranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), qui est un canal Cl<sup>-</sup>, régulant la sécrétion luminale de chlore et les mouvements d'eau au pôle apical des cellules épithéliales respiratoires. Les mutations du gène CF conduisent à une dérégulation du canal Cl<sup>-</sup> et Na<sup>+</sup> associée à une déshydratation du mucus, une inflammation et infection bronchiques responsables de la morbidité et de la mortalité dans cette maladie. Bien que de très nombreux travaux aient été consacrés au gène CF et aux fonctions multiples de CFTR, la chronologie des événements liés aux anomalies de CFTR dans la pathologie pulmonaire inflammatoire est encore mal connue. Les désordres inflammatoires bronchiques sont décelés précocement chez les patients mais on ne sait pas avec précision si l'inflam-

mation précède ou est consécutive à l'infection. Il a été récemment mis en évidence, dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire de nourrissons CF, une augmentation de l'interleukine (IL-8) et une absence d'IL-10 en l'absence d'infection. Le déficit constitutif de la production d'IL-10 dans des cellules du sang périphérique et l'expression accrue d'IL-8, à l'état basal, dans le liquide bronchique recueilli dans des xénogreffes bronchiques CF naïves humanisées et dans le liquide sécrété par des cellules épithéliales CF, suggèrent qu'il existe un déséquilibre constitutif et endogène de la balance pro-vs-anti-inflammatoire dans la mucoviscidose. Il apparaît, au vu des données récentes de la littérature, que l'absence de canal Cl<sup>-</sup> et le défaut de maturation et d'adressage apical de CFTR muté, contribuent à son accumulation dans le réticulum endoplasmique et à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B associée à la dérégulation de la balance cytokinique par les cellules mucoviscidiques.

### SUMMARY Early airway inflammation in cystic fibrosis

Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic autosomal recessive disease in caucasian north-american and european populations. The CF gene codes for a transmembrane glycoprotein called CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), a chloride channel which regulates the luminal secretion of chloride and the active ion and water transport in the airway epithelial cells. Mutations of the CF gene lead to a dysregulation of chloride and sodium channel associated to airway mucus dehydration, neutrophil-dominated airway inflammation and chronic infection responsible for the morbidity and mortality of CF patients. Although a high number of studies has been devoted to the CFTR pleiotropic functions, the chronology of the physiopathological events leading to the airway inflammation linked to mutations of the CF gene is still an open question. The issue of whether airway inflammation takes place before infection or is a consequence of infection during CF pathogenesis is still controversial.

It has been recently reported that in broncho-alveolar lavages collected in CF infants, there is an increased level of interleukin IL-8 and abnormal low level of IL-10. The decreased IL-10 production has been confirmed in peripheral blood monocytes as well as in airway cell lines. Under basal conditions, the increased expression of the pro-inflammatory IL-8 cytokine has also been recently observed in the airway liquid secreted by CF naïve humanized airway xenografts and in the supernatant culture of CF human airway epithelial cells. These results suggest that CFTR dysfunction may result in a constitutive pro-inflammatory vs anti-inflammatory imbalance in CF disease. Recent data from the literature suggest that the failure of chloride transport, the maturation defect and mistrafficking of mutated CFTR, lead to its accumulation in the endoplasmic reticulum and activation of NF- $\kappa$ B, responsible for the imbalance in the CF airway cell cytokine production.



La mucoviscidose (ou cystic fibrosis CF) est la plus fréquente des maladies héréditaires graves, transmise selon le mode autosomique récessif, dans les populations nord-européennes. Cette maladie touche en France environ 1 enfant / 2500 à la naissance. Elle atteint de multiples organes, notamment respiratoire, gastro-intestinal et génital, suite au dysfonctionnement du transport de  $\text{Cl}^-$  et des anomalies de l'hydratation au niveau des épithéliums. L'atteinte de l'épithélium bronchique, caractérisée par une infection et une inflammation, est responsable de la majeure partie de la morbidité et de la mortalité dans cette maladie.

Le gène responsable de la mucoviscidose, composé de 27 exons, code une glycoprotéine transmembranaire, dénommée CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) qui est un canal contrôlant la sécrétion luminale de  $\text{Cl}^-$  et régulant les mouvements d'eau au pôle apical des cellules épithéliales respiratoires. Les mutations du gène CF sont très nombreuses, environ 1 000 mutations ont été identifiées à ce jour (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). La mutation la plus fréquente (70 %) est une délétion de 3 nucléotides entraînant l'absence d'une phénylalanine en position 508 dans la partie intracytoplasmique (NBF<sub>1</sub>) de la protéine CFTR. La complémentation des cellules épithéliales présentant un phénotype CF par la séquence codante du CFTR a permis *in vitro*, sur cellules en culture, de restaurer la fonction de transport du  $\text{Cl}^-$ . Ces résultats ont initialement apporté beaucoup d'espoir dans la thérapie génique de cette pathologie avec cependant beaucoup de déceptions liées à la difficulté *in vivo* de transduire CPTR avec efficacité et durée dans les cellules de l'épithélium respiratoire mucoviscidosique.

La mucoviscidose se traduit au niveau cellulaire par un défaut de sécrétion de  $\text{Cl}^-$  sous l'effet de la stimulation de la voie de l'AMP-c. Cette anomalie s'accompagne d'une réabsorption excessive de  $\text{Na}^+$  avec, pour conséquence, une déshydratation de la muqueuse respiratoire et un ralentissement de la clairance muco-ciliaire.

Malgré de très nombreuses controverses dans la littérature, il semble actuellement admis que le liquide de surface bronchique dans lequel baignent les cils soit isotonique et que seule, l'absorption excessive de  $\text{Na}^+$  et d'eau entraîne une rétention du mucus bronchique (Matsui *et al.*, 2000; Tarran *et al.*, 2001). Selon ces auteurs, l'accumulation de mucus à la surface de l'épithélium bronchique favoriserait la croissance bactérienne qui, associée à la diminution de la clairance muco-ciliaire, aurait pour conséquence la colonisation bactérienne à l'origine de l'infection et de l'inflammation bronchiques caractéristiques de cette pathologie.

Des résultats récents réalisés sur souris invalidées pour le gène CFTR suggèrent qu'en l'absence d'infection, la composition ionique du liquide de surface est peu différent chez les souris CF, comparativement aux souris non invalidées pour le gène CFTR (Zahm *et al.*, 2001). De plus, Bals *et al.* (2001) ont rapporté que l'activité antimicrobienne du liquide de surface est diminuée dans cette pathologie, indépendamment de toute augmentation de la salinité du mucus mais que cette activité est

## Pathogénie de la mucoviscidose (CF)

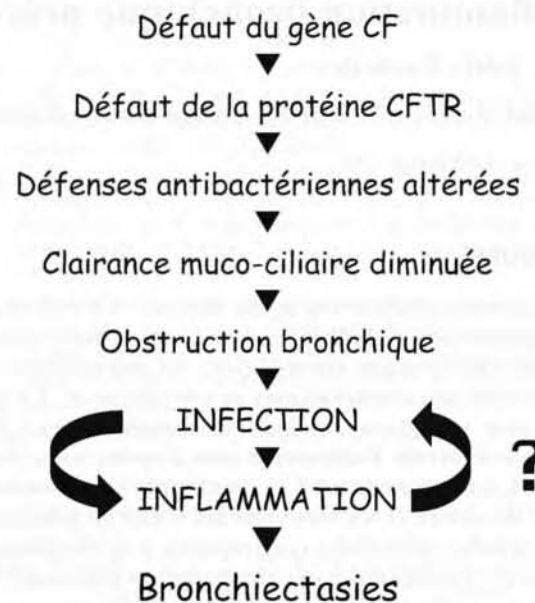


FIG. 1. – L'infection et l'inflammation bronchique jouent un rôle majeur dans le cercle vicieux conduisant aux lésions pulmonaires irréversibles dans la mucoviscidose. Le rôle précoce ou secondaire de l'inflammation est encore controversé.

d'autant plus faible que la salinité est élevée. Un certain nombre d'anomalies primitives de CFTR susceptibles d'expliquer l'infection et l'inflammation chroniques dans la CF ont été évoquées, notamment le défaut d'acidification intracellulaire responsable d'une sulfatation accrue des mucines (Zhang *et al.*, 1995) et donc d'une anomalie de l'adhérence et de l'internalisation bactérienne par les cellules épithéliales respiratoires (Pier *et al.*, 1997). Il a été très récemment rapporté que le dysfonctionnement de CFTR serait responsable d'une hyperacidification du réseau transgolgien s'accompagnant d'un défaut de glycosylation des glycoconjugués de membrane et d'une adhérence accrue de *Pseudomonas aeruginosa*. La normalisation du pH intracellulaire limiterait l'adhérence bactérienne (Poschet *et al.*, 2001).

L'inflammation bronchique et pulmonaire caractéristique de la mucoviscidose a jusqu'à ces dernières années été considérée comme la conséquence de l'infection bactérienne caractérisée par la présence de bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* qui apparaissent relativement tôt dans les sécrétions recueillies chez des enfants mucoviscidosiques et contribuent à une détérioration progressive pulmonaire avec apparition de bronchiectasies et installation d'une obstruction bronchique sévère. Bien que l'inflammation bronchique soit indéniablement amplifiée par la colonisation progressive des voies aériennes par *Pseudomonas aeruginosa*, un certain nombre de travaux récents plaident en faveur d'une inflammation bronchique précoce, liée à la mutation du gène CFTR et sus-

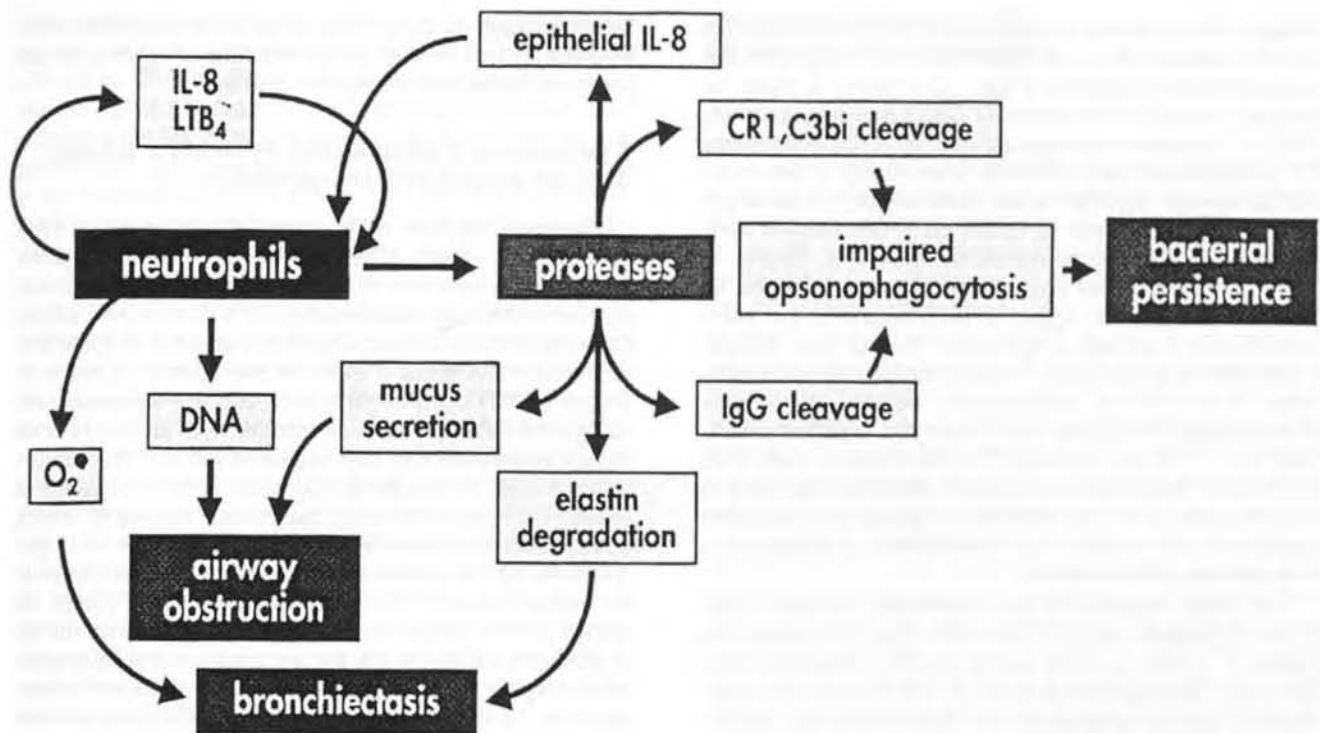


FIG. 2. – L'afflux de polynucléaires neutrophiles dans les voies aériennes CF au cours de l'inflammation bronchique est principalement lié à la sécrétion par les cellules épithéliales de chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-8. L'activation des polynucléaires neutrophiles et d'autres cellules inflammatoires joue un rôle délétère en stimulant la production de mucus, de radicaux oxydants, de DNA et de protéases qui, secondairement vont entraîner l'obstruction bronchique, la formation de bronchiectasies et favoriser l'infection bactérienne.

ceptible d'expliquer la plus grande sensibilité aux infections bronchiques identifiée dans cette pathologie.

Si tous les travaux de la littérature s'accordent à démontrer l'afflux de polynucléaires neutrophiles et leur migration dans la lumière bronchique, le déséquilibre précoce et endogène en faveur d'un environnement pro-inflammatoire dans la mucoviscidose lié à la dérégulation de CFTR est actuellement largement controversé. Nous nous attacherons donc à décrire les arguments en faveur de chacune des hypothèses 1) l'inflammation bronchique est consécutive à l'infection et 2) l'inflammation bronchique précède et favorise l'infection dans la mucoviscidose. Nous décrirons enfin les modèles animaux et humanisés qui ont permis d'étudier les désordres inflammatoires et infectieux de la muqueuse respiratoire dans la mucoviscidose.

### L'INFLAMMATION BRONCHIQUE EST LIÉE À L'INFECTION BACTÉRIENNE OU VIRALE DANS LA MUCOVISCIDOSE

Dans la mucoviscidose, l'évolution générale de la maladie correspond à l'installation progressive d'anomalies pulmonaires, caractérisées par un infiltrat inflammatoire principalement constitué de polynucléaires neutrophiles au sein de l'épithélium de surface, du chorion et des bronchioles et qui est généralement associé à une infection et une obs-

truction bronchique sévère. En fait, à un stade évolué de la maladie, la plupart des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* sont identifiées dans le mucus bronchique mais aussi au niveau cellulaire dans des zones de remaniement de l'épithélium respiratoire (De Bentzmann *et al.*, 1996). Ces résultats corroborent les données rapportées par Baltimore *et al.* (1989) qui ont montré sur pièces anatomiques que *Pseudomonas aeruginosa* était localisé dans les petites bronches inférieures à 1 mm de diamètre au niveau des lésions épithéliales et dans des zones de remaniements. Ces données suggèrent qu'en dehors des anomalies spécifiques de l'épithélium associées aux mutations du gène CF et des anomalies de la protéine CFTR, les remaniements de la muqueuse bronchique associés à l'inflammation peuvent en grande partie être responsables de la pérennité de l'infection bactérienne dans la CF.

À un stade plus précoce de la maladie, chez de jeunes enfants CF, il n'a pas été rapporté d'anomalies histologiques majeures de la muqueuse respiratoire (Bedrosian *et al.*, 1976; Sturgess & Imrie, 1986). L'absence d'hyperplasie glandulaire à la naissance suggère que l'obstruction bronchique n'est probablement pas le facteur directement responsable de la susceptibilité accrue de l'épithélium respiratoire à l'infection bactérienne.

Afin de tenter de répondre à l'actuelle question-clé : *Dans la mucoviscidose, l'inflammation bronchique précoce est-elle précédée par une infection bactérienne ou virale?*, une étude bactériologique, cytologique et un

dosage des cytokines et chemokines pro-inflammatoires ont été réalisés chez des nourrissons CF nouvellement diagnostiqués (moyenne d'âge : 2-6 mois) à partir de lavages broncho-alvéolaires (LBA) (Armstrong *et al.*, 1995). Ces auteurs ont rapporté que 35 % des nourrissons CF présentaient une infection respiratoire à *Staphylococcus aureus* associée à une inflammation bronchique sévère caractérisée par un afflux de polynucléaires neutrophiles et une augmentation du taux d'IL-8 dans le LBA. À l'inverse, les nourrissons CF sans infection ne présentaient pas de signes d'inflammation. Le suivi annuel de ces enfants a également montré que, lorsque l'infection se pérennisait, l'inflammation était plus marquée. Il ressort des résultats de l'équipe australienne d'Armstrong (1995) que ce ne serait pas le défaut constitutif de CFTR qui initierait l'inflammation mais bien l'infection. Néanmoins ces auteurs admettent que dans la mucoviscidose, il peut exister un défaut de régulation constitutif des cytokines qui amplifierait et perpétuerait le processus inflammatoire.

Une étude prospective multicentrique, réalisée à partir de 11 produits de LBA recueillis chez 40 enfants très jeunes (< 3 ans) a révélé que la première bactérie identifiée est *Haemophilus influenzae* (38 % chez les nourrissons) puis la prévalence de *Staphylococcus aureus* apparaît. À 3 ans, 30 % des enfants CF sont déjà infectés par cette bactérie dont les facteurs de virulence sécrétés sont particulièrement délétères pour l'épithélium respiratoire et sont à l'origine d'une réponse inflammatoire sévère (Rosenfeld *et al.*, 2000). Se pose néanmoins la question de savoir si la concentration bactérienne retenue comme signe d'infection ( $10^5$  cfu/ml) représente réellement une preuve de primo-infection augurant d'une future colonisation. De plus, il est possible que les virus respiratoires, comme le virus respiratoire syncytial, interviennent dans le déclenchement et l'aggravation de l'inflammation bronchique. Le virus respiratoire syncytial augmente la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise l'inflammation neurogène et le développement de bronchiolites fréquentes chez les nourrissons atteints de mucoviscidose (Katznelson *et al.*, 1997). La mise en place, au début de l'année 2002, du dépistage néonatal de la mucoviscidose rendra cruciale la réponse relative à l'infection : quels critères utiliser pour diagnostiquer avec fiabilité cette infection ? S'agit-il réellement d'une infection ? Est-elle associée à une inflammation ? Infection et inflammation doivent-elles être traitées et quelles stratégies thérapeutiques adopter ?

### **L'INFLAMMATION BRONCHIQUE PRÉCÈDE L'INFECTION BACTÉRIENNE DANS LA MUCOVISCIDOSE**

La question de savoir si l'infection précède ou est consécutive à l'inflammation précoce dans la mucoviscidose est actuellement très discutée. Plusieurs études ont montré que, chez les très jeunes enfants CF, un certain nombre d'entre eux présentent des signes d'inflammation

(augmentation du % de PMN et de la concentration d'IL-8) dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire, avant toute infection bactérienne décelable.

### **Évaluation de l'inflammation bronchique précoce dans des lavages broncho-alvéolaires CF**

Plusieurs équipes américaines (Kahn *et al.*, 1995 ; Balough *et al.*, 1995 ; Muhlebach *et al.*, 1999) ont rapporté, à partir de lavages broncho-alvéolaires réalisés chez de très jeunes enfants, une augmentation de la densité des cellules inflammatoires et du taux d'IL-8 en l'absence de toute évidence bactériologique d'infection bactérienne. Konstan et Berger (1997) confirment la précocité des anomalies des marqueurs inflammatoires en mettant en évidence, chez de jeunes nourrissons CF, une augmentation de l'IL-8 et une absence d'IL-10. Le groupe de Noah (1997) a également montré que, pour une charge bactérienne identique, le taux d'IL-8 était significativement plus élevé dans les LBA d'enfants CF comparativement aux valeurs observées chez les enfants non-CF. De plus, les travaux de l'équipe de Berger (1995) ont mis en évidence un déficit constitutif de la production d'IL-10, qui est une cytokine anti-inflammatoire et régulatrice de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce déficit a également été identifié dans les lymphocytes périphériques chez des patients adultes CF (Moss *et al.*, 2000). Dans la mesure où l'IL-10 est capable en temps normal d'inhiber la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, et donc de maintenir un équilibre de l'état pro/anti-inflammatoire, il est vraisemblable que l'absence ou la diminution de l'IL-10, de façon constitutive, peut contribuer à un déséquilibre de l'immunité innée favorable à une inflammation bronchique précoce dans la mucoviscidose. Ce déséquilibre peut non seulement favoriser l'inflammation bronchique constitutive, mais il peut aussi favoriser une réponse inflammatoire excessive en réponse à une infection bactérienne. Les travaux de Chmiel *et al.* (1999) réalisés chez des souris IL-10 $^{-/-}$  démontrent en effet clairement que la réponse inflammatoire à des bactéries communément présentes dans les bronches CF comme *P. aeruginosa* est excessive et que cette réponse est atténuée après traitement par l'IL-10 recombinante.

### **Étude de l'inflammation bronchique précoce chez le fœtus CF**

Pour des raisons éthiques, il n'est pas envisageable en France de réaliser des lavages broncho-alvéolaires chez des nourrissons. Nous avons donc recherché, à partir de tissus fœtaux humains, l'existence d'un éventuel défaut de l'immunité locale et avons analysé au cours du développement fœtal sur des coupes tissulaires de trachées et de poumons CF la distribution de marqueurs inflammatoires (Hubeau *et al.*, 2001). Nous avons quantifié, par analyse d'images en cytométrie, le nombre et la distribution de neutrophiles, mastocytes, macrophages et lymphocytes B et T. La comparaison entre tissus fœtaux CF et non-CF n'a pas permis de mettre en évidence une distribution différente des cytokines pro- et anti-inflammatoires, IL-8, IL-6 et IL-10 étaient identifiées dans les cel-

lules épithéliales trachéales sécrétoires CF et non-CF tout au long du développement. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et l'inhibiteur du facteur de transcription I $\kappa$ B- $\alpha$  étaient également présents exclusivement au niveau cytosolique dans les deux groupes étudiés. Ces résultats suggèrent que la dérégulation de l'équilibre des cytokines et de l'activation de NF- $\kappa$ B, liée au gène CF peut nécessiter la transition air-liquide, observée à la naissance. En ce qui concerne les cellules immunes, les seules différences observées entre les tissus fœtaux CF et non-CF concernaient les mastocytes trachéaux et les macrophages pulmonaires dont le nombre atteignait un plateau au cours du développement dans les fœtus CF alors que le nombre de ces deux populations cellulaires s'accroissait au stade tardif (sacculaire et alvéolaire) du développement fœtal.

De façon intéressante, cette augmentation était précédée d'une phase de retard au cours des deux premiers trimestres de développement. Nous n'avons observé aucune augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles dans les tissus fœtaux. Au total, bien que nous n'ayons pu mettre en évidence une inflammation bronchique intrinsèque, le profil différent de maturation des mastocytes et des macrophages au cours du développement fœtal humain suggère que ces cellules pourraient être impliquées dans la phase précoce de l'inflammation chez le nourrisson CF.

#### Évaluation de l'inflammation bronchique précoce dans des cultures cellulaires bronchiques humaines

Les travaux récemment réalisés par plusieurs équipes sur des tissus pulmonaires CF, sur des cellules épithéliales glandulaires humaines CF en culture (Tabary *et al.*, 1998) et sur des lignées cellulaires immortalisées CF et CF corrigées, mettent en évidence que le dysfonctionnement de CFTR, dû à l'absence de canal Cl<sup>-</sup> et au défaut de maturation et d'adressage apical de CFTR, entraîne l'activation de NF- $\kappa$ B associée à une expression basale accrue de l'IL-8 (Weber *et al.*, 2001). Comment le dysfonctionnement de CFTR contribue-t-il à l'activation et la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B reste encore mal défini. La dérégulation de l'activation de NF- $\kappa$ B apparaît indépendante du contenu en ClNa du liquide sécrété par les cellules épithéliales glandulaires CF (Tabary *et al.*, 2000).

Selon Blackwell *et al.* (2001), plusieurs voies d'activation de NF- $\kappa$ B à l'état constitutif peuvent être impliquées, incluant une stimulation endogène (liée à la protéine CFTR mutée retenue dans le réticulum endoplasmique), par une voie Ca<sup>2+</sup>-dépendante et par la dérégulation du complexe NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B- $\beta$  dans la CF. On sait en effet que l'hypophosphorylation d'I $\kappa$ B- $\beta$  peut être impliquée dans la persistance de l'activation de NF- $\kappa$ B. On peut également faire l'hypothèse qu'une anomalie de l'acidification du pH intracellulaire dans la mucoviscidose (Barasch *et al.*, 1999), pourrait non seulement induire un défaut de glycosylation des glycoconjugués de membrane et favoriser l'adhérence de *Pseudomonas* (Poschet *et al.*, 2001), mais serait également susceptible d'affecter en amont l'activité des kinases (IKK- $\alpha/\beta$ ) qui contrôlent la phosphorylation du facteur inhibiteur I $\kappa$ B.

## MODÈLES ANIMAUX CF ET MODÈLES HUMANISÉS

### Modèles murins CF

La découverte et l'identification du gène responsable de la mucoviscidose a rapidement conduit au développement de souris invalidées pour le gène *cftr*. Plus de 10 types de souris *cftr*<sup>-/-</sup> ont été décrites dans la littérature. Dans la majorité des cas, les mutations ont porté sur l'exon 10 et ont été réalisées avec des souches murines d'origine différente. L'expression des ARNm de CFTR est variable, certaines souris invalidées par CFTR n'exprimant aucun ARNm résiduel (ex : souris *cftr*<sup>m1Unc</sup>/*cftr*<sup>m1Unc</sup>) alors que d'autres ont un taux d'ARNm de type sauvage qui peut atteindre 10 à 15 % (ex : souris *cftr*<sup>m11GU</sup>/*cftr*<sup>m11GU</sup>). Toutes ces souris présentent une atteinte digestive sévère mais la pathologie respiratoire spontanée est faible voire absente. Nous avons cependant pu montrer, chez la souris *cftr*<sup>m1Unc</sup>/*cftr*<sup>m1Unc</sup>, une augmentation du taux basal d'IL-8 dans le liquide de surface bronchique comparativement aux souris témoins non invalidées. Par ailleurs, nous avons observé chez la souris *cftr*<sup>m11GU</sup>/*cftr*<sup>m11GU</sup>, élevée dans des conditions axéniques, une diminution de la clairance muco-ciliaire associée à une augmentation du nombre de lymphocytes au sein de la *lamina propria* (Zahm *et al.*, 1997). Ces résultats plaident en faveur d'une dérégulation précoce de la balance inflammatoire en relation avec la mutation du gène *cftr*.

Les modèles murins invalidés pour le gène *cftr* sont intéressants mais présentent un certain nombre de désavantages liés au fait que la structure histologique de la muqueuse respiratoire est différente chez la souris et chez l'homme (la souris n'a que de très rares glandes bronchiques au niveau trachéal). D'autre part, chez la souris, la présence de canaux Cl<sup>-</sup>-Ca<sup>2+</sup>-dépendants peut efficacement compenser l'absence de CFTR.

### Modèles de xéno greffes respiratoires humanisées

Pour ces différentes raisons ont été mis au point des modèles de xéno greffes bronchiques humanisées réalisées à partir de greffes de trachées fœtales ou de cellules adultes chez la souris SCID et NUDE (Peault *et al.*, 1994; Dupuit *et al.*, 2000). Le modèle de greffe humanisée fœtale est basé sur l'implantation de tissus respiratoires fœtaux humains chez des souris xénotolérantes (absence de lymphocytes T et B). Après plusieurs semaines de maturation suivant l'implantation sous-cutanée chez la souris hôte, les ébauches proximales (trachée ou bronches) présentent un stade de différenciation identique à celui observé *in vivo* chez le fœtus mature (épithélium de surface pseudo stratifié et glandes sous-muqueuses). L'intérêt majeur de ce modèle est de permettre l'étude de la physiologie et physiopathologie d'un épithélium humain différencié en dehors de toute infection préalable (Tiruvanziam *et al.*, 2000). Nous avons pu observer qu'à maturité, l'épithélium CF et non-CF ne présentent pas de différence histologique; par contre, il existe, dans les xéno greffes CF, une anomalie des transports ioniques

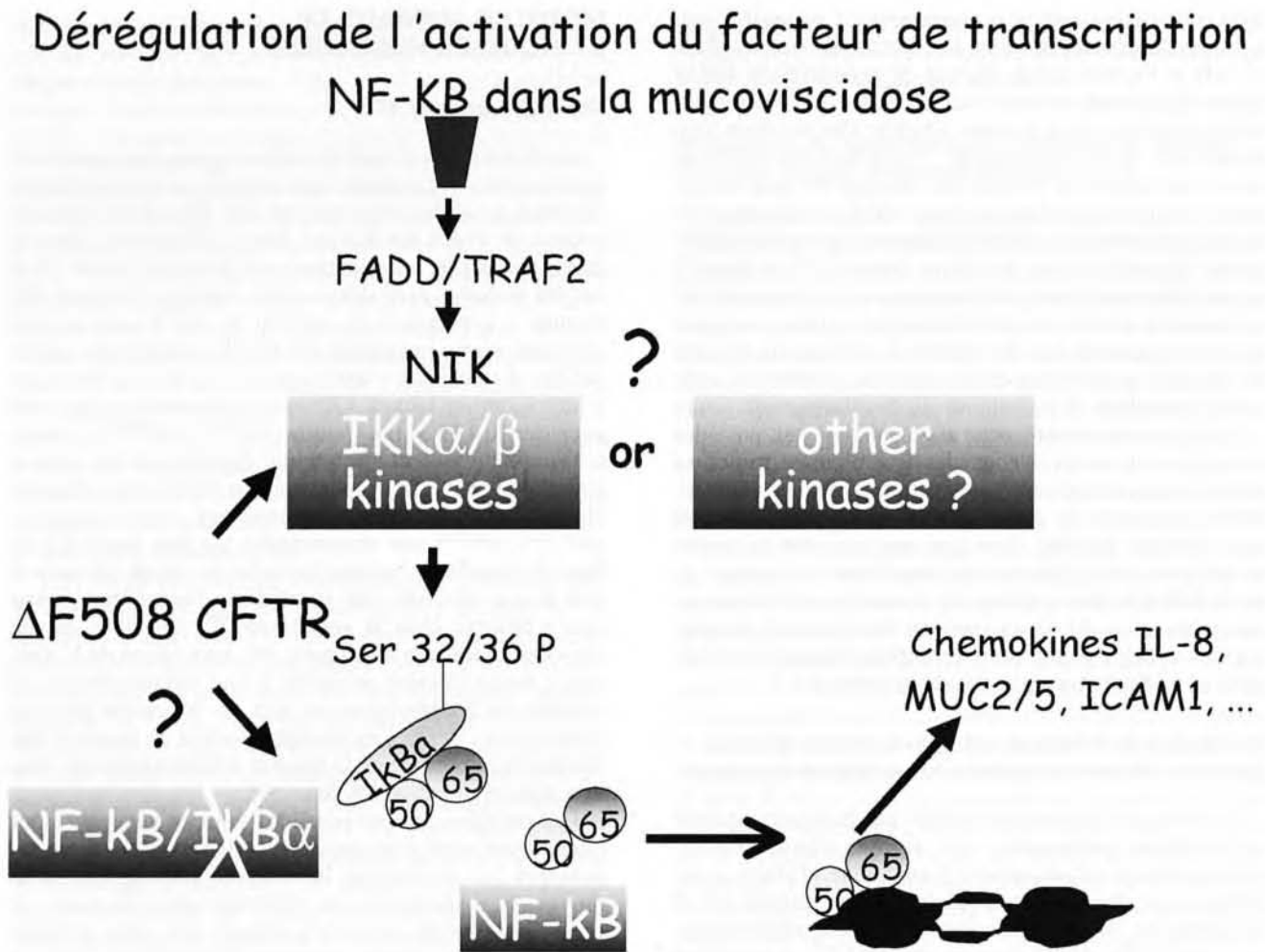


FIG. 3. – La dérégulation de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans la mucoviscidose semble être un désordre primitif. La mutation de CFTR peut conduire à une activation des kinases IKK $\alpha$  et  $\beta$  et à une dégradation du facteur inhibiteur I $\kappa$ B. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est ainsi constitutivement activé et sa translocation nucléaire s'accompagne d'une augmentation de la production de chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et l'IL-6.

identique à celle observée dans le tissu épithélial respiratoire humain adulte CF. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence dans les greffes CF une augmentation marquée du taux d'IL-8 et une accumulation de leucocytes d'origine humaine et murine sous la membrane basale alors que leur distribution était plus profonde dans les greffes de trachée fœtale non-CF. L'afflux de leucocytes dans l'épithélium de surface nécessitait le contact avec des bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*) mais la réponse de l'épithélium à l'infection bactérienne était très différente dans les greffes CF, se traduisant après quelques heures d'infection par une desquamation de l'épithélium de surface tandis qu'aucune lésion épithéliale n'était observée dans les greffes non-CF. Ce modèle de xéno-greffe fœtale nous a donc permis de démontrer la réalité de l'inflammation précoce de la muqueuse respiratoire dans la mucoviscidose et la très grande fragilité de l'épithélium respiratoire aux facteurs de virulence bactériens.

Nous avons plus récemment développé un modèle de

xéno-greffe bronchique humanisé « ouvert ». Ce modèle consiste à réépithélialiser, par des cellules épithéliales adultes humaines préalablement dissociées (bronches ou polypes nasaux) une trachée hôte préalablement dénudée et implantée chez la souris nue (Dupuit *et al.*, 2000). Ce dernier modèle présente l'avantage de permettre le recueil séquentiel du liquide sécrété par les cellules épithéliales, d'étudier le profil cytokinique avant et après introduction de molécules d'origine bactérienne, et d'analyser les variations de l'inflammation constitutive ou induite sous l'action de molécules anti-inflammatoires. Nous avons ainsi confirmé qu'en l'absence de tout stimulus infectieux, le liquide de sécrétion des greffes CF se caractérisait par un taux d'IL-8 plus élevé que celui obtenu dans les greffes non-CF et que ce taux augmentait de façon significative après stimulation par l'endotoxine LPS de *Pseudomonas aeruginosa*.

En conclusion, au vu des différents résultats de la littérature, il apparaît clairement que dans la mucoviscidose,

l'inflammation bronchique apparaît très précocement au cours de l'évolution de la maladie. La dérégulation de la sécrétion des chimiokines pro (IL-8, IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10) en relation avec une dérégulation de la voie I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, représente une cible thérapeutique potentielle dans le traitement précoce de cette maladie.

**Remerciements.** – Ce travail a reçu le soutien de l'INSERM et de l'Association Vaincre la Mucoviscidose

## BIBLIOGRAPHIE

- Armstrong D. S., Grimwood K., Carzino R., Carlin J. B., Olin-sky A. & Phelan P. D., Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ*, 1995, 310, 1571-1572.
- Balough K., McCubbin M., Weinberger M., Smits W., Ahrens R. & Fick R., The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.*, 1995, 20, 63-70.
- Bals R., Weiner D. J., Mcegalla R. L., Accurso F. & Wilson J. M., Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2001, 25, 21-25.
- Baltimore R. S., Christie C. D. & Smith G. J., Immunohisto-pathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, 140, 1650-1661.
- Barasch J., Kiss B., Prince A., Saiman L., Gruenert D. & al-Awqati Q., Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, 1991, 352, 70-73.
- Bedrossian C. W., Greenberg S. D., Singer D. B., Hansen J. J. & Rosenberg H. S., The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum. Pathol.*, 1976, 7, 195-204.
- Berger M. & Konstan M., Inflammation and anti-inflammatory therapy in CF. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1999, 5, 63-64.
- Chmiel J. F., Konstan M. W., Knesebeck J. E., Hilliard J. B., Bonfield T. L., Dawson D. V. & Berger M., IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas* infection in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, 160, 2040-2047.
- de Bentzmann S., Roger P., Dupuit F., Bajolet-Laudinat O., Fuchey C., Plotkowski M. C. & Puchelle E., Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 1582-1588.
- Dupuit F., Gaillard D., Hinrasky J., Mongodin E., de Bentzmann S., Copreni E. & Puchelle E., Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2000, 278, L165-L176.
- Hubeau C., Puchelle E. & Gaillard D., Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, 108, 524-529.
- Katznelson D., Szeinberg A., Augarten A. & Yahav Y., The critical first six months in cystic fibrosis: a syndrome of severe bronchiolitis. *Pediatr. Pulmonol.*, 1997, 24, 134-136; Discussion, 159-161.
- Khan T. Z., Wagener J. S., Bost T., Martinez J., Accurso F. J. & Riches D. W., Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, 151, 1075-1082.
- Konstan M. W., Hilliard K. A., Norvell T. M. & Berger M., Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, 150, 448-454.
- Matsui H., Davis C. W., Tarran R. & Boucher R. C., Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 1419-1427.
- Moss R. B., Hsu Y. P. & Olds L., Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, 120, 518-525.
- Muhlebach M. S., Stewart P. W., Leigh M. W. & Noah T. L., Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, 160, 186-191.
- Noah T. L., Black H. R., Cheng P. W., Wood R. E. & Leigh M. W., Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.*, 1997, 175, 638-647.
- Peault B., Tirouvanziam R., Sombardier M. N., Chen S., Perri-caudet M. & Gaillard D., Gene transfer to human fetal pulmonary tissue developed in immunodeficient SCID mice. *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5, 1131-1137.
- Pier G. B., Grout M. & Zaidi T. S., Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 12088-12093.
- Poschet J. F., Boucher J. C., Tattersall L., Skidmore J., Van Dyke R. W. & Deretic V., Molecular basis for defective glycosylation and *Pseudomonas pathogenesis* in cystic fibrosis lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 13972-13977.
- Rosenfeld M., Gibson R. L., McNamara S., Emerson J., Burns J. L., Castile R., Hiatt P., McCoy K., Wilson C. B., Inglis A., Smith A., Martin T. R. & Ramsey B. W., Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.*, 2001, 32, 356-366.
- Sturgess J. & Imrie J., Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am. J. Pathol.*, 1982, 106, 303-311.
- Tabary O., Escotte S., Couetil J. P., Hubert D., Dusser D., Puchelle E. & Jacquot J., High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J. Immunol.*, 2000, 164, 3377-3384.
- Tabary O., Zahm J. M., Hinrasky J., Couetil J. P., Cornillet P., Guenounou M., Gaillard D., Puchelle E. & Jacquot J., Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Pathol.*, 1998, 153, 921-930.
- Tarran R., Grubb B. R., Parsons D., Picher M., Hirsh A. J., Davis C. W. & Boucher R. C., The CF salt controversy: *in vivo* observations and therapeutic approaches. *Mol. Cell.*, 2001, 8, 149-158.
- Tirouvanziam R., de Bentzmann S., Hubeau C., Hinrasky J., Jacquot J., Peault B. & Puchelle E., Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2000, 23, 121-127.
- Weber A. J., Soong G., Bryan R., Saba S. & Prince A., Activation of NF-kappa B in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl channel function. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2001, 281, L171-L178.
- Zahm J. M., Baconnais S., Davidson D. J., Webb S., Dorin J., Bonnet N., Balossier G. & Puchelle E., X-ray microanalysis of airway surface liquid collected in cystic fibrosis mice. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2001, 281, L309-L313.
- Zahm J. M., Gaillard D., Dupuit F., Hinrasky J., Porteous D., Dorin J. R. & Puchelle E., Early alterations in airway mucociliary clearance and inflammation of the lamina propria in CF mice. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272, C853-C859.
- Zhang Y., Doranz B., Yankaskas J. R. & Engelhardt J. F., Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 1995, 96, 2997-3004.