

Proposition de sujet de thèse (ED Galilée – campagne 2024)

Titre : Interactions entre cellules épithéliales respiratoires et précurseurs chondrocytaires au cours de la « régénération » de trachée après allogreffe par matrice aortique cryopréservée.

Unité de recherche : UMR INSERM U1272, « Hypoxie et Poumon », Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH, 1 rue de Chablis, 93000 Bobigny.

Direction/encadrement de thèse :

- Direction : Pr Carole Planès. Email : carole.planes@aphp.fr (01.48.95.56.38)
- Co-encadrement : Dr Maria-Luisa Pérez Lozano. Email : marialuisa.perezlozano@univ-paris13.fr (01.48.38.73.86)

Résumé

Le remplacement trachéal étendu reste un défi chirurgical dû à la difficulté de rétablir l'apport sanguin dans le greffon/la prothèse trachéale (1,2). Ces dernières années, les travaux pré-cliniques puis cliniques du Pr. Martinod et collaborateurs ont montré la faisabilité et l'efficacité de l'utilisation d'une allogreffe aortique cryopréservée soutenue par une endoprothèse pour le remplacement trachéal (3). En effet, le greffon aortique se transforme progressivement en une nouvelle voie aérienne fonctionnelle, avec la régénération de l'épithélium respiratoire et la génération de novo d'anneaux de cartilage provenant de cellules souches du receveur (3,4). Cette néochondrogénèse rigidifie le greffon aortique et permet le retrait de l'endoprothèse. Malheureusement, ce processus est plus lent chez l'homme que chez le gros animal (18 mois en moyenne vs 6 mois chez la brebis), ce qui expose les patients au risque de complications notamment infectieuses liées à l'endoprothèse. Les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à cette néochondrogénèse restent inconnus. Il est probable que microenvironnement des tissus adjacents intervienne dans la régénération trachéale, notamment les interactions épithélium-mésenchyme, comme cela a lieu lors du développement embryonnaire de la trachée (5). En effet, malgré la présence de l'endoprothèse qui induit un microenvironnement hypoxique localisé, la matrice aortique greffée est rapidement tapissée sur sa face luminale par des cellules épithéliales respiratoires indifférenciées (3).

Nous émettons l'**hypothèse** que l'épithélium respiratoire joue un rôle important dans la transformation de la matrice aortique en trachée, par la sécrétion des facteurs qui vont agir sur le mésenchyme aortique et sur des cellules progénitrices du cartilage. Les cellules progénitrices du néocartilage pourraient être des cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse du receveur et/ou des progéniteurs chondrocytaires provenant des anneaux cartilagineux de la trachée native du receveur adjacents au greffon aortique. L'identification des molécules impliquées et la compréhension des mécanismes de régulation de ces processus au niveau cellulaire et en utilisant la bioingénierie tissulaire devraient nous permettre d'élaborer des nouvelles stratégies pour améliorer la reconstruction trachéale, en accélérant la chondrogenèse et en diminuant les risques des complications pour les patients.

Le travail de thèse est constitué de 3 parties/objectifs :

1. Évaluation de l'impact du secrétome des cellules épithéliales bronchiques primaires humaines (hCEB) sur les propriétés fonctionnelles des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM).

Les effets des secrétomes des hCEB sur des hCSM provenant de la moelle osseuse, normalement recrutées lors des mécanismes de réparation tissulaire (2), sont mal connus. De plus, les facteurs

sécrétés par l'épithélium respiratoire varient selon que l'épithélium est en cours de prolifération, de différenciation ou est déjà différencié (6).

Le **premier objectif** de la thèse sera de déterminer les effets des sécrétomes des hCEB lors de différents états de différenciation (prolifération, en cours de différenciation et différenciés) sur les **fonctions** des hCSM *in vitro* : a) Viabilité cellulaire, b) Prolifération cellulaire, c) Migration cellulaire et d) Invasion cellulaire.

Cet objectif sera réalisé en collaboration avec le Dr Christelle Coraux (CR Inserm à l'UMR-S 1250 P3Cell, Univ. Reims), spécialiste reconnue des cellules épithéliales des voies aériennes, qui fournira les milieux conditionnés de hCEB à différents stades de prolifération/différenciation. Des expériences de cocultures cellulaires d'hCEB et d'hCSM seront également effectuées pour les études de migration et invasion cellulaire. Des Elisa Multiplex seront utilisés pour identifier dans les sécrétomes les facteurs potentiellement impliqués dans ces fonctions cellulaires. Le rôle des molécules identifiées seront étudiés par :

- Stimulation de la fonction de la molécule via l'utilisation des agonistes
- Déplétion de la fonction de la molécule par l'utilisation des molécules bloquantes.

2. Effets des hCEB sur la différenciation chondrocytaire des hCSM

Le **deuxième objectif** de la thèse consistera à tester l'effet du sécrétome des hCEB dans différents stades de différenciation sur la **différenciation chondrocytaire des hCSM *in vitro***. Nous prendrons en considération le microenvironnement hypoxique créé par l'endoprothèse du greffon en comparant des conditions expérimentales en **normoxie** (21% O₂) et en **hypoxie** (3%O₂). Les expériences seront réalisées sur des cultures 2D (cellules cultivées sur plaques de culture) et cultures en 3D (cellules cultivées en culots obtenus par centrifugation).

3. Etude du dialogue entre hCEB et des lignées des précurseurs chondrocytaires/hCSM.

Lors de la réparation et régénération tissulaire, le microenvironnement des tissus annexes a un rôle majeur dans la régénération du nouveau tissu. Les données du laboratoire suggèrent que des précurseurs chondrocytaires des anneaux cartilagineux natifs adjacents au greffon aortique pourraient participer la formation de novo du cartilage dans le greffon aortique.

Le **troisième objectif** de la thèse sera de **développer des études *ex vivo*** sur :

3.1. Coculture des cellules **précurseurs chondrocytaires** provenant de cartilage articulaire (et si possible d'anneaux cartilagineux de trachée humaine) pour étudier leur interaction avec des hCEB *ex vivo*. L'expression des marqueurs associés à la différenciation chondrocytaire (ex.SOX-9 et BMP-4) et des facteurs de la matrice extracellulaire sera étudiée, ainsi que l'expression des marqueurs impliqués dans la formation de la trachée au cours du développement trachéal (Shh, Fgf10, Sox-9, Gremlin-1) sera étudiée (7).

3.2. Coculture des cellules **hCEB** et/ou **précurseurs chondrocytaires/hCSM sur la matrice aortique cryopréservée**. L'invasion de la matrice aortique cryopréservée par les précurseurs chondrocytaires/hCSM sera étudiée. L'analyse des marqueurs associés à la différenciation chondrocytaire sera réalisée.

Bibliographie

- (1) Pierre Delaere & Dirk Van Raemdonck. J Thorac Dis. 2016.
- (2) Harry Etienne et al. Eur Respi J 2018.
- (3) Emmanuel Martinod et al. JAMA 2018.
- (4) Agatha Seguin et al. General Thoracic Surg 2013.
- (5) Jarod Zepp & Edward Morrissey. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019.
- (6) Emmanuel Martinod et al. Ann Thorac Surg. 2017.
- (7) Mary B. Goldring & Kaneyuki Tsuchimochi & Kosei Ijiri. J Cell Biochem. 2006