



HAL
open science

Modélisation de l'épithélium bronchique par les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs)

Engi Ahmed

► **To cite this version:**

Engi Ahmed. Modélisation de l'épithélium bronchique par les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs). Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03625075

HAL Id: dumas-03625075

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03625075v1>

Submitted on 14 Apr 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement
Par

Engi AHMED

le 23 Septembre 2020

**Modélisation de l'épithélium bronchique par les cellules souches
pluripotentes induites humaines (hiPSCs)**

Directeur de thèse : **Pr Arnaud BOURDIN**, PU-PH

JURY :

Président : Pr Pascal DEMOLY (PU-PH)

Assesseurs : Pr Jean-Louis PUJOL (PU-PH)

Pr Arnaud BOURDIN (PU-PH)

Pr John DE VOS (PU-PH)

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs Honoraires

ALLIEU Yves	CALLIS Albert	JAFFIOL Claude	NAVRATIL Henri
ALRIC Robert	CANAUD Bernard	JANBON Charles	OTHONIEL Jacques
ARNAUD Bernard	CHAPTAL Paul-André	JANBON François	PAGES Michel
ASTRUC Jacques	CIURANA Albert-Jean	JARRY Daniel	PEGURET Claude
AUSSILLOUX Charles	CLOT Jacques	JOURDAN Jacques	PELISSIER Jacques
AVEROUS Michel	COSTA Pierre	LAFFARGUE François	POUGET Régis
AYRAL Guy	D'ATHIS Françoise	LALLEMANT Jean Gabriel	PUJOL Henri
BAILLAT Xavier	DEMAILLE Jacques	LAMARQUE Jean-Louis	RABISCHONG Pierre
BALDET Pierre	DESCOMPS Bernard	LAPEYRIE Henri	RAMUZ Michel
BALDY-MOULINIER Michel	DIMEGLIO Alain	LE QUELLEC Alain	RIEU Daniel
BALMES Jean-Louis	DUBOIS Jean Bernard	LESBROS Daniel	ROCHFORT Henri
BALMES Pierre	DUJOLS Pierre	LOPEZ François Michel	ROUANET DE VIGNE LAVIT Jean Pierre
BANSARD Nicole	DUMAS Robert	LORIOT Jean	SAINT AUBERT Bernard
BAYLET René	DUMAZER Romain	LOUBATIERES Marie Madeleine	SANCHO-GARNIER Hélène
BILLIARD Michel	ECHENNE Bernard	MAGNAN DE BORNIER Bernard	SANY Jacques
BLARD Jean-Marie	FABRE Serge	MARY Henri	SEGNARBIEUX François
BLAYAC Jean Pierre	FREREBEAU Philippe	MATHIEU-DAUDE Pierre	SENAC Jean-Paul
BLOTMAN Francis	GALIFER René Benoît	MEYNADIER Jean	SERRE Arlette
BONNEL François	GODLEWSKI Guilhem	MICHEL François-Bernard	SOLASSOL Claude
BOURGEOIS Jean-Marie	GRASSET Daniel	MION Charles	THEVENET André
BRUEL Jean Michel	GUILHOU Jean- Jacques	MION Henri	VIDAL Jacques
BUREAU Jean-Paul	HERTAULT Jean	MIRO Luis	VISIÉ Jean Pierre
BRUNEL Michel	HUMEAU Claude	NAVARRO Maurice	

Professeurs Emérites

ARTUS Jean-Claude	MARES Pierre
BLANC François	MAUDELONDE Thierry
BOULENGER Jean-Philippe	MAURY Michèle
BOURREL Gérard	MILLAT Bertrand
BRINGER Jacques	MONNIER Louis
CLAUSTRES Mireille	MOURAD Georges
DAURES Jean-Pierre	PREFAUT Christian
DAUZAT Michel	PUJOL Rémy
DAVY Jean-Marc	RIBSTEIN Jean
DEDET Jean-Pierre	SCHVED Jean-François
ELEDJAM Jean-Jacques	SULTAN Charles
GROLLEAU RAOUX Robe	TOUCHON Jacques
GUERRIER Bernard	UZIEL Alain
GUILLOT Bernard	VOISIN Michel
LANDAIS Paul	ZANCA Michel

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

PU-PH de classe exceptionnelle

ALBAT Bernard	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
ALRIC Pierre	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
BACCINO Eric	Médecine légale et droit de la santé
BASTIEN Patrick	Parasitologie et mycologie
BLAIN Hubert	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
BONAFE Alain	Radiologie et imagerie médicale
CAPDEVILA Xavier	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CHAMMAS Michel	Chirurgie orthopédique et traumatologique
COLSON Pascal	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
COMBE Bernard	Rhumatologie
COTTALORDA Jérôme	Chirurgie infantile
COUBES Philippe	Neurochirurgie
COURTET Philippe	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
CRAMPETTE Louis	Oto-rhino-laryngologie
CRISTOL Jean Paul	Biochimie et biologie moléculaire
DE LA COUSSAYE Jean Emmanuel	Médecine d'urgence
DE WAZIERES Benoît	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
DELAPORTE Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
DEMOLY Pascal	Pneumologie ; addictologie
DOMERGUE Jacques	Chirurgie viscérale et digestive
DUFFAU Hugues	Neurochirurgie
ELIAOU Jean François	Immunologie
FABRE Jean Michel	Chirurgie viscérale et digestive
FRAPIER Jean-Marc	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
HAMAMAH Samir	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale

HEDON Bernard	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
HERISSON Christian	Médecine physique et de réadaptation
JABER Samir	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
JEANDEL Claude	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
JONQUET Olivier	Médecine intensive-réanimation
JORGENSEN Christian	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
KOTZKI Pierre Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
LABAUGE Pierre	Neurologie
LARREY Dominique	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
LEFRANT Jean-Yves	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
LUMBROSO Serge	Biochimie et Biologie moléculaire
MARTY-ANE Charles	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MERCIER Jacques	Physiologie
MESSNER Patrick	Cardiologie
MONDAIN Michel	Oto-rhino-laryngologie
MORIN Denis	Pédiatrie
PAGEAUX Georges-Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PUJOL Pascal	Biologie cellulaire
QUERE Isabelle	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
RENARD Eric	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
REYNES Jacques	Maladies infectieuses, maladies tropicales
RIPART Jacques	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
ROUANET Philippe	Cancérologie ; radiothérapie
SOTTO Albert	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
TAOUREL Patrice	Radiologie et imagerie médicale
VANDE PERRE Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
YCHOU Marc	Cancérologie ; radiothérapie

PU-PH de 1^{re} classe

AGUILAR MARTINEZ Patricia	Hématologie ; transfusion
ASSENAT Éric	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
AVIGNON Antoine	Nutrition
AZRIA David	Cancérologie ; radiothérapie
BAGHDADLI Amaria	Pédopsychiatrie ; addictologie
BEREGI Jean-Paul	Radiologie et imagerie médicale
BLANC Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
BORIE Frédéric	Chirurgie viscérale et digestive
BOULOT Pierre	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
CAMBONIE Gilles	Pédiatrie
CAMU William	Neurologie
CANOVAS François	Anatomie
CAPTIER Guillaume	Anatomie
CARTRON Guillaume	Hématologie ; transfusion
CAYLA Guillaume	Cardiologie
CHANQUES Gérald	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CORBEAU Pierre	Immunologie
COSTES Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
COULET Bertrand	Chirurgie orthopédique et traumatologique
CYTEVAL Catherine	Radiologie et imagerie médicale
DADURE Christophe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DAUVILLIERS Yves	Physiologie
DE TAYRAC Renaud	Gynécologie-obstétrique, gynécologie médicale
DE VOS John	Histologie, embryologie et cytogénétique
DEMARIA Roland	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

DEREURE Olivier	Dermatologie - vénéréologie
DROUPY Stéphane	Urologie
DUCROS Anne	Neurologie
DUPEYRON Arnaud	Médecine physique et de réadaptation
FESLER Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
GARREL Renaud	Oto-rhino-laryngologie
GENEVIEVE David	Génétique
HAYOT Maurice	Physiologie
KLOUCHE Kada	Médecine intensive-réanimation
KOENIG Michel	Génétique
LAFFONT Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
LAVABRE-BERTRAND Thierry	Histologie, embryologie et cytogénétique
LAVIGNE Jean-Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LE MOING Vincent	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
LECLERCQ Florence	Cardiologie
LEHMANN Sylvain	Biochimie et biologie moléculaire
MARIANO-GOULART Denis	Biophysique et médecine nucléaire
MATECKI Stéfan	Physiologie
MEUNIER Laurent	Dermato-vénéréologie
MOREL Jacques	Rhumatologie
NAVARRO Francis	Chirurgie viscérale et digestive
NOCCA David	Chirurgie viscérale et digestive
PETIT Pierre	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PERNEY Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
PRUDHOMME Michel	Anatomie
PUJOL Jean Louis	Pneumologie ; addictologie
PURPER-OUAKIL Diane	Pédopsychiatrie ; addictologie

TOUITOU Isabelle

Génétique

TRAN Tu-Anh

Pédiatrie

VERNHET Hélène

Radiologie et imagerie médicale

PU-PH de 2ème classe

BOURDIN Arnaud

Pneumologie ; addictologie

CANAUD Ludovic

Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)

CAPDEVIELLE Delphine

Psychiatrie d'Adultes ; addictologie

CLARET Pierre-Géraud

Médecine d'urgence

COLOMBO Pierre-Emmanuel

Cancérologie ; radiothérapie

COSTALAT Vincent

Radiologie et imagerie médicale

CUVILLON Philippe

Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire

DAIEN Vincent

Ophtalmologie

DORANDEU Anne

Médecine légale et droit de la santé

FAILLIE Jean-Luc

Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie

FUCHS Florent

Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale

GABELLE DELOUSTAL Audrey

Neurologie

GAUJOUX Viala Cécile

Rhumatologie

GODREUIL Sylvain

Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

GUILLAUME Sébastien

Psychiatrie d'adultes ; addictologie

GUILPAIN Philippe

Médecine Interne, gériatrie et biologie du vieillissement; addictologie

GUIU Boris

Radiologie et imagerie médicale

HERLIN Christian

Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie

HOUEDE Nadine

Cancérologie ; radiothérapie

JACOT William

Cancérologie ; Radiothérapie

JUNG Boris

Médecine intensive-réanimation

KALFA Nicolas

Chirurgie infantile

KOUYOUMDJIAN Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
LACHAUD Laurence	Parasitologie et mycologie
LALLEMANT Benjamin	Oto-rhino-laryngologie
LE QUINTREC DONNETTE Moglie	Néphrologie
LETOUZEY Vincent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
LONJON Nicolas	Neurochirurgie
LOPEZ CASTROMAN Jorge	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
LUKAS Cédric	Rhumatologie
MAURY Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
MILLET Ingrid	Radiologie et imagerie médicale
MORANNE Olivier	Néphrologie
MURA Thibault	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
NAGOT Nicolas	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
PANARO Fabrizio	Chirurgie viscérale et digestive
PARIS Françoise	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PASQUIE Jean-Luc	Cardiologie
PELLESTOR Franck	Histologie, embryologie et cytogénétique
PEREZ MARTIN Antonia	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
POUDEROUX Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
RIGAU Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
RIVIER François	Pédiatrie
ROGER Pascal	Anatomie et cytologie pathologiques
ROSSI Jean François	Hématologie ; transfusion
ROUBILLE François	Cardiologie
SEBBANE Mustapha	Médecine d'urgence
SIRVENT Nicolas	Pédiatrie
SOLASSOL Jérôme	Biologie cellulaire

STOEBNER Pierre	Dermato-vénéréologie
SULTAN Ariane	Nutrition
THOUVENOT Éric	Neurologie
THURET Rodolphe	Urologie
VENAIL Frédéric	Oto-rhino-laryngologie
VILLAIN Max	Ophtalmologie
VINCENT Denis	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
VINCENT Thierry	Immunologie
WOJTUSCISZYN Anne	Endocrinologie-diabétologie-nutrition

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

1^{re} classe :

COLINGE Jacques (Cancérologie, Signalisation cellulaire et systèmes complexes)

2^{ème} classe :

LAOUDJ CHENIVESSE Dalila (Biochimie et biologie moléculaire)

VISIÉ Laurent (Sociologie, démographie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - Médecine générale

1^{re} classe :

LAMBERT Philippe

2^{ème} classe :

AMOUYAL Michel

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine Générale

CLARY Bernard

DAVID Michel

GARCIA Marc

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine

BESSIS Didier (Dermato-vénéréologie)

MEUNIER Isabelle (Ophtalmologie)

MULLER Laurent (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

PERRIGAULT Pierre-François (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

QUANTIN Xavier (Pneumologie)

ROUBERTIE Agathe (Pédiatrie)

VIEL Eric (Soins palliatifs et traitement de la douleur)

Maîtres de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers

MCU-PH Hors classe

BADIOU Stéphanie	Biochimie et biologie moléculaire
BOULLE Nathalie	Biologie cellulaire
CACHEUX-RATABOUL Valère	Génétique
CARRIERE Christian	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
CHARACHON Sylvie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
FABBRO-PERAY Pascale	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GIANSILY-BLAIZOT Muriel	Hématologie ; transfusion
HILLAIRE-BUYS Dominique	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PUJOL Joseph	Anatomie
RICHARD Bruno	Médecine palliative
RISPAIL Philippe	Parasitologie et mycologie
SEGONDY Michel	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH de 1^{re} classe

BERTRAND Martin	Anatomie
BOUDOUSQ Vincent	Biophysique et médecine nucléaire
BOURGIER Céline	Cancérologie ; Radiothérapie
BRET Caroline	Hématologie biologique
COSSEE Mireille	Génétique
GIRARDET-BESSIS Anne	Biochimie et biologie moléculaire
LAVIGNE Géraldine	Hématologie ; transfusion
LESAGE François-Xavier	Médecine et Santé au Travail
MATHIEU Olivier	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MENJOT de CHAMPFLEUR Nicolas	Radiologie et imagerie médicale
MOUZAT Kévin	Biochimie et biologie moléculaire
OLIE Emilie	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
PANABIERES Catherine	Biologie cellulaire
PHILIBERT Pascal	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
RAVEL Christophe	Parasitologie et mycologie
SCHUSTER-BECK Iris	Physiologie
STERKERS Yvon	Parasitologie et mycologie
THEVENIN-RENE Céline	Immunologie
TUAILLON Edouard	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH de 2^{ème} classe

CHIRIAC Anca	Immunologie
DE JONG Audrey	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DU THANH Aurélie	Dermato-vénéréologie
GOUZI Farès	Physiologie

HERRERO Astrid	Chirurgie viscérale et digestive
JEZIORSKI Éric	Pédiatrie
KUSTER Nils	Biochimie et biologie moléculaire
MAKINSON Alain	Maladies infectieuses, Maladies tropicales
PANTEL Alix	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
PERS Yves-Marie	Thérapeutique; addictologie
ROUBILLE Camille	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
SZABLEWSKY	Anatomie et cytologie pathologiques

Maîtres de Conférences des Universités - Médecine Générale

MCU-MG de 1^{re} classe

COSTA David

MCU-MG de 2^{ème} classe

FOLCO-LOGNOS Béatrice

OUDE ENGBERINK Agnès

Maîtres de Conférences associés - Médecine Générale

LOPEZ Antonio

MILLION Elodie

PAVAGEAU Sylvain

REBOUL Marie-Catherine

SERAYET Philippe

Praticiens Hospitaliers Universitaires

BARATEAU Lucie	Physiologie
BASTIDE Sophie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
DAIEN Claire	Rhumatologie
GATINOIS Vincent	Histologie, embryologie et cytogénétique
GOULABCHAND Radjiv	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
LATTUCA Benoit	Cardiologie
MIOT Stéphanie	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PINETON DE CHAMBRUN Guillaume	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
SOUICHE François-Régis	Chirurgie viscérale et digestive

REMERCIEMENTS

Au Professeur Pascal Demoly,

Merci d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de m'avoir accompagnée et aidée dans la gestion de la filière de pneumologie.

Au Professeur Jean-Louis Pujol,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre riche enseignement en oncologie thoracique lors de mon troisième semestre, mais également de m'avoir supervisée lors de mes premiers gestes.

Au Professeur John De Vos,

Je vous remercie d'avoir accepté de continuer à évaluer ce travail. Presque deux ans après être retournée à l'hôpital, je suis heureuse de voir que ces travaux aient « aboutis » grâce au travail de l'équipe. Merci de m'avoir fait découvrir le monde passionnant des cellules souches !

Au Professeur Arnaud Bourdin,

Je te remercie de ton enseignement, de m'avoir initiée à la recherche – la meilleure expérience de mon internat -, de m'avoir appris le métier de médecin, ou encore l'apprentissage des relations humaines au quotidien. Merci de ta confiance et de ta bienveillance. Je suis très heureuse de pouvoir intégrer l'équipe et de continuer d'apprendre à tes côtés.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

1.Introduction

I : La BronchoPneumopathie Chronique Obstructive	4
1. La BPCO	4
2. Un acteur clé de la BPCO : l'épithélium des voies aériennes distales.....	9
3. BPCO : Physiopathologie et nouveaux concepts	17
II : Les cellules souches pluripotentes humaines : un nouvel outil d'étude des maladies respiratoires	22
1. Les cellules souches embryonnaires humaines hESC	22
1.....	22
1.1. Historique et contexte	22
1.2. Définition	22
1.3. Origine et dérivation de cellules	23
1.3.1. Quelques rappels du développement embryonnaire humain précoce	23
1.3.2. Méthodes d'isolation et de dérivation des CSEh	25
1.4. Culture des cellules souches	25
1.5. Critères d'évaluation de la pluripotence des CSEh.....	25
2. Les cellules souches humaines pluripotentes induites	26
1.....	26
2.....	26
2.1. Historique de la reprogrammation	26
2.1.1. Transfert nucléaire [somatic cell nuclear transfer (SCNT)].....	26
2.1.2. Fusion cellulaire et transdifférenciation	27
2.2. L'ère des cellules souches pluripotentes induites	28
2.3. Le concept de mémoire épigénétique	28
III. Modélisation par les cellules souches pluripotentes induites	29
1.....	30
1.1. La différenciation des cellules souches pluripotentes vers un épithélium bronchique	30
1.1.1. Induction de l'APS	30

1.1.2.	Induction de l'endoderme définitif.....	32
1.1.3.	Induction de l'intestin antérieur primitif (Anterior Foregut Endoderm -AFE) et sa ventralisation.....	33
IV. Rationnel de l'étude et objectifs		34
1.1.	Etude INVECCO et méthodologie.....	35
1.1.1.	Critères de sélection des patients BPCO et des patients contrôles sains.....	35
1.1.2.	Que modéliser et comment ?.....	36
1.2.	Objectif	38

2.Article

3.Bibliographie

1. Introduction

I : La BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

1. La BPCO

1.1 Définition, diagnostic & limites

La définition de la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) en 2020 reste fonctionnelle -bien que controversée- se définit par un trouble ventilatoire obstructif persistant non réversible (Volume Expiratoire Maximale à la première Seconde/Capacité Vitale Forcée - ou VEMS/CVF - mesurés $< 0,7$). Le contexte clinique, notamment la présence d'une exposition environnementale (tabac, combustion de biomasse) sont des éléments majeurs de l'anamnèse afin d'évoquer le diagnostic.

GOLD 2019 :

« Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a common, preventable and treatable disease that is characterized by persistent respiratory symptoms and airflow limitation that is due to airway and/or alveolar abnormalities usually caused by significant exposure to noxious particles or gases. The main risk factor for COPD is tobacco smoking but other environmental exposures such as biomass fuel exposure and air pollution may contribute. Besides exposures, host factors predispose individuals to develop COPD. These include genetic abnormalities, abnormal lung development and accelerated aging. »

Les origines pédiatriques et le concept de vieillissement accéléré sont évoqués comme mécanismes impliqués de la maladie.

Les travaux de plusieurs équipes ont montré que la BPCO était une bronchiolite chronique, dont le siège initial serait les voies aériennes distales ¹. Ce compartiment anatomique est difficile à explorer, lui valant la dénomination de « zone silencieuse » du poumon. La mesure du VEMS ne peut pas renseigner sur l'atteinte de cette région anatomique. Le paragraphe « les voies aériennes distales dans la BPCO » permet d'appréhender les limites d'une telle définition qui est probablement imparfaite. En effet, l'exploration de la fonction respiratoire par un test évaluant les volumes ventilatoires proximaux ne permet pas d'évaluer le compartiment ou les anomalies naissent : les voies aériennes distales.

Cette définition fonctionnelle sous-estime très probablement le nombre de fumeurs atteints d'une phase « précoce » de la BPCO, c'est-à-dire une atteinte des VADS, non diagnostiquée par les tests fonctionnels respiratoires de routine ².

De récentes publications soulèvent à juste titre la faiblesse d'une telle définition en proposant de stratifier la probabilité du diagnostic de BPCO selon d'autres outils : les symptômes, le phénotype morphologique par TDM thoracique. Les auteurs proposent une nouvelle classification « COPDgene 2019 » selon laquelle le diagnostic de BPCO est exclu, possible probable ou certain (Figure1 & Tableau 1)³. Le diagnostic de BPCO devient alors possible chez un fumeur symptomatique ou ayant des anomalies morphologiques (épaississement bronchique, emphysème ou piégeage expiratoire), en l'absence d'anomalie fonctionnelle.

Les auteurs proposent une définition de la BPCO intégrant différentes données telle que la notion d'une exposition, les symptômes, la spirométrie et le phénotype morphologique. Il s'agissait d'une cohorte longitudinale (COPDgene) avec un suivi de 5 ans de patients à risque, c'est-à-dire des fumeurs (>10 PA). L'hypothèse formulée est que les données spirométriques sont insuffisantes pour établir le diagnostic d'une bronchopathie « BPCO » et pour apprécier la morbidité liée au tabagisme. L'objectif de l'étude est la mise au point d'un outil afin de classifier et identifier les personnes ayant un risque plus élevé de progression de la maladie et de mortalité

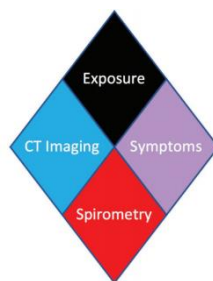


Figure 1 : Variables selon lesquelles l'algorithme de prédiction du diagnostic de BPCO, d'après Lowe, COPDgene

Exposition	Symptômes respiratoires	Anomalies TDM thorax	Anomalies fonctionnelles	Diagnostic de BPCO
X				Non
X	X			Possible
X		X		
X			X	
X	X	X		Probable
X	X		X	
X		X	X	
X	X	X	X	Certain

Tableau 1 : Classification de la probabilité du diagnostic de BPCO, COPDgene 2019.

1.2 Epidémiologie & facteurs de risque

Epidémiologie

La BPCO est un problème majeur de santé publique, dont la prévalence est probablement sous-estimée dans les études épidémiologiques, d'une part i) par l'absence de consensus pour la définition de la BPCO, GOLD (VEMS/CVF <0,7) ou limite inférieure de la normale (LLN), ii) une définition ne prenant en compte uniquement les données spirométriques et excluant les données cliniques et morphologiques, iii) un diagnostic reposant sur des données déclaratives.

A l'échelle mondiale, la BPCO représente la première maladie respiratoire responsable du DALY (disability-adjusted life years) : c'est une mesure des années de vie en parfaite santé qui ont été perdues. Elle est la somme des années de vie perdues par mortalité prématurée et des années de vie en bonne santé perdues en raison d'une incapacité. Les données épidémiologiques évaluant le poids du fardeau épidémiologique des pathologies intitulées « Global Burden » actualisée dans le journal du Lancet en 2020, estimait qu'en 2017, plus de 4 millions de personnes dans le monde sont mortes de BPCO contre 3 millions en 2015, la plaçant comme la 3^{ème} cause de mortalité à l'échelle mondiale. Il s'agit d'une augmentation de la mortalité de 20% en comparaison à 1990 (Figure 2) ⁴. L'augmentation est en partie expliquée par la croissance démographique mondiale, le vieillissement de la population et l'augmentation de la prévalence de la BPCO chez les femmes. En France, une récente étude épidémiologique a modélisé l'évolution de la prévalence de la BPCO pour estimer la prévalence de la BPCO d'ici 2025 en se basant sur les données de 2005 ⁵. La

modélisation prédit une augmentation constante de la prévalence brute de la BPCO chez les sujets âgés de ≥ 45 ans de 2005 (estimation de la prévalence : 84,51 %) à 2025 (prévalence projetée : 95,76 %, + 0,56 % / an), une augmentation multipliée par 4 de la strate de patients BPCO de sévérité GOLD 3-4, une augmentation relative de 23% chez les femmes et une augmentation relative de 21% chez les sujets ≥ 75 ans.

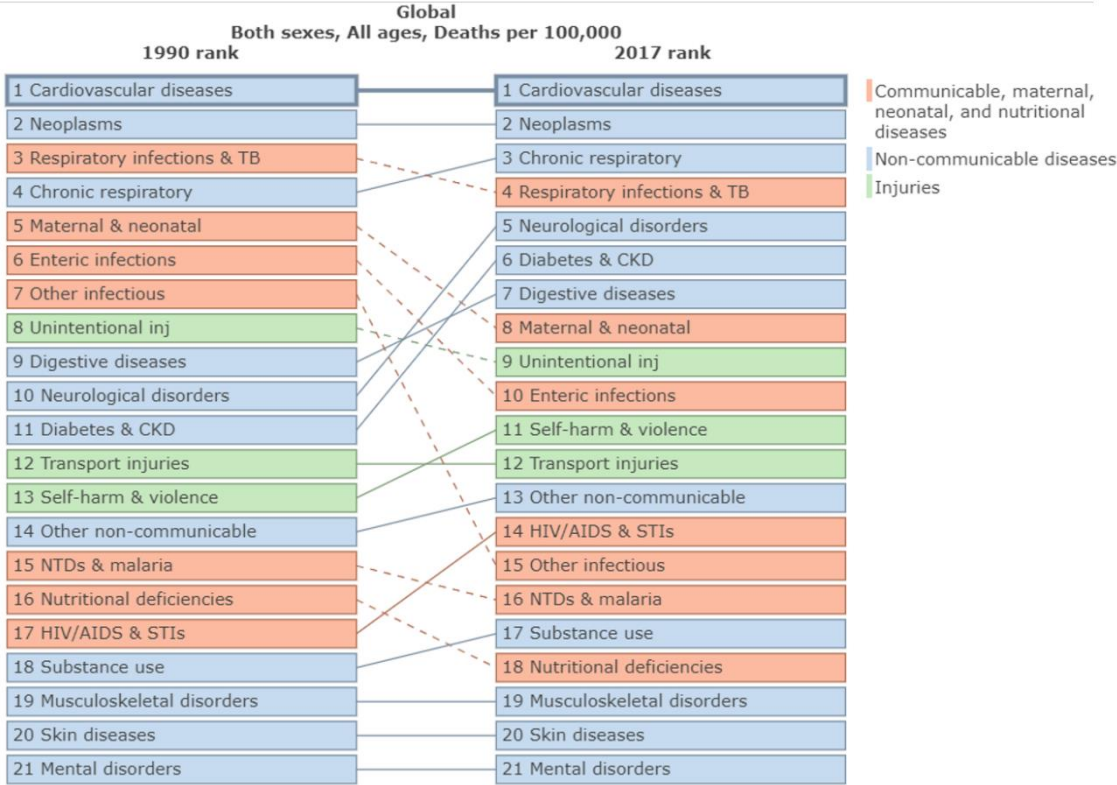


Figure 2 : Fardeau épidémiologique de la BPCO : 3^{ème} rang). D'après Soriano & al. Lancet Respir Med 2020.

Facteurs de risque

Dans les pays à fort revenu, le tabagisme actif et passif ⁶ représente le facteur de risque majeur de la BPCO (70%).

D'autres toxiques tels que le cannabis⁷, le narguilhé, l'héroïne⁸ ont été décrits comme étant des facteurs de risque indépendants du tabac de développer une BPCO .

Une étude récente menée en Angleterre a examiné les associations entre les expositions environnementales et la prévalence de la BPCO dans un échantillon de 100 000 habitants. La prévalence de la BPCO était évaluée à 5,6%. L'urbanisation et l'exposition à la pollution (augmentation du risque de 1,2 fois par tranche de 10µg/m³ de particules PM2.5) étaient associées à une probabilité plus élevée de développer une BPCO⁹.

Dans les pays à faibles revenus, ce sont les pollutions domestiques et industrielles qui représentent les principaux facteurs de risque telles que la combustion du bois dans les foyers, la pollution atmosphérique, la combustion de biomasse.

Par ailleurs, le faible statut socio-économique a souvent été décrit comme étant associée à un risque accru de décès prématuré, défini comme un décès survenant avant 75 ans dans un pays développé.

Une étude récente a étudié le lien entre inégalités sociales et mortalité prématurée en Angleterre. 35% des décès prématurés étaient imputables à l'inégalité socio-économique. Les pathologies imputables aux décès étaient les cardiopathies ischémiques, les néoplasies pulmonaires et la BPCO. Les inégalités étaient plus importantes chez les hommes dans la petite enfance et au décours de la 4^{ème} décennie de vie¹⁰.

2. Un acteur clé de la BPCO : l'épithélium des voies aériennes distales

2.1 Les voies aériennes distales

Les bronchopathies chroniques telles que l'asthme, la BPCO ou la mucoviscidose sont caractérisées par une atteinte précoce des voies aériennes distales (VADs), responsable d'une bronchiolite chronique. Les particules inhalées de $> 2 \mu\text{m}$ n'atteignent que les voies aériennes proximales de grand et moyen diamètre, tandis que les particules extra-fines ($< 2 \mu\text{m}$) s'impactent préférentiellement dans les VADs. A l'état physiologique, les VADs participent peu aux résistances, moins de 10% des résistances totales, et le flux d'air s'écoule de façon laminaire. De ce fait, une minime obstruction des bronchioles est responsable d'une augmentation importante des résistances. Il a été démontré que ce compartiment participe de façon majeure à l'augmentation des résistances des voies aériennes totales au décours de la BPCO et de l'asthme par rapport aux sujets sains¹¹.

Anatomiquement, les VADs incluent les voies aériennes de conduction de la huitième division (habituellement identifiées sur les coupes histologiques sous la forme de bronchioles non cartilagineuses de diamètre inférieur à 2mm) aux alvéoles pulmonaires. La bronchiole comprend la bronchiole terminale, ayant un rôle de conduction, et la bronchiole respiratoire qui communique directement avec les canaux alvéolaires. Le passage entre bronchiole terminale et respiratoire constitue une zone de transition entre la partie conductrice et la partie respiratoire de l'arbre bronchique.

Les travaux de l'équipe de J.Hogg ont remis en question la relation entre l'obstruction des petites voies respiratoires et la destruction emphysémateuse au cours de la BPCO, suggérant que la perte des bronchioles terminales précède le début de la destruction emphysémateuse¹², et que cette perte structurale est proportionnelle à la sévérité de la BPCO (score GOLD)(Figure 3). Koo & al. ont montré que 90% des bronchioles terminales étaient oblitérées chez les patients BPCO de stade IV¹³. Les auteurs ont également rapporté une réduction du nombre de bronchioles terminales et ce, en l'absence d'emphysème. Il existe une réduction significative des VADs même dans les formes

légères à modérées de BPCO, à savoir une réduction de près 30% et 50% dans les stades GOLD I et II respectivement.

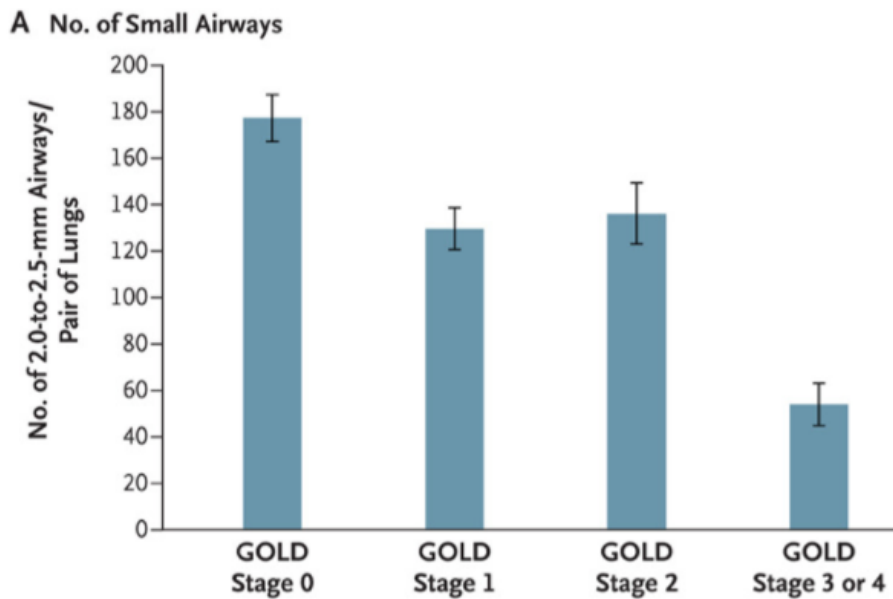


Figure 3 : Nombre de VADs mesurant de 2,0 à 2,5 mm de diamètre par paire de poumon (mesure par micro-CT) n= 78 patients BPCO. Par rapport au groupe témoin, on note une réduction de nombre de bronchioles, qui se majore avec la sévérité de la maladie (stratification GOLD) 22029978.

Les mécanismes par lesquels survient une raréfaction des bronchioles au décours de la BPCO n'est pas claire. Il existe deux hypothèses concernant l'origine de la disparition des VADs. Selon la première théorie, les bronchioles s'oblitérent et se détruisent secondairement au remodelage à l'inflammation (destruction anatomique progressive : destruction de la paroi bronchiolaire, affaissement, oblitération) ¹⁴. Cette théorie est alimentée par des données au scanner qui décrivent des voies respiratoires proximales possédant des bronches « filles » qui disparaissent, avec des lumières plus petites et des parois plus minces par rapport aux voies aériennes parentales soulevant la possibilité que les voies aériennes puissent rétrécir et subir une distorsion supplémentaire en cours de route à la disparition (Figure 4). Les limites de cette hypothèse sont étayées par des publications récentes utilisant les progrès de l'imagerie médicale (micro-CT-scanner) et la reconstruction 3D des voies aériennes distales.

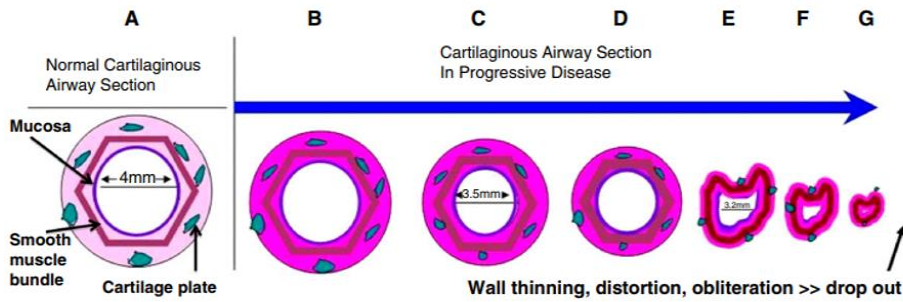


Figure 4 : Illustration de la première hypothèse de la disparition des VADs dans la BPCO. Selon les auteurs, cette disparition serait le reflet d'une destruction et d'un remodelage progressifs (continuum) qui aboutit à une distorsion, une oblitération de la lumière puis la disparition de la bronchiole. Cette hypothèse sous-tend que ces anomalies sont acquises avec le temps et seraient proportionnelles à la sévérité de la maladie. D'après Diaz & al., 2018

En effet, il s'avère que les patients BPCO non sévères ayant une forme débutante de la maladie ont déjà 20% de bronchioles manquantes par rapport à des fumeurs sains ou des sujets contrôles non-fumeurs, indépendamment de la sévérité de l'emphysème

La deuxième hypothèse pouvant expliquer ces lésions bronchiolaires serait celle de l'origine développementale, selon laquelle ces bronchioles n'auraient jamais été formées ou qu'elles aient toujours été « plus petites » ou anormales, prédisposant les individus à développer une maladie bronchique à l'âge adulte ¹⁴. Ce développement pathologique de l'arbre aérien distal impliquerait un défaut de branching, de différenciation de l'axe proximo-distal en rapport avec une atteinte des progéniteurs épithéliaux bronchiques bipotents SOX2/SOX9. On peut tout à fait imaginer que ce défaut de branching soit en partie en lien avec une prédisposition génétique. Une étude parue en 2018 ¹⁵ montre que les deux types de variations anatomiques des voies aériennes les plus fréquemment retrouvées par TDM sont associés à la BPCO et qu'il existe à chaque fois une forte agrégation familiale. La première variation anatomique la plus courante des voies aériennes retrouvée dans deux cohortes indépendantes (n = 5 054) et associée à la BPCO est une plus grande densité de bifurcation des voies aériennes. La deuxième variation anatomique la plus fréquente est également associée à la BPCO chez les fumeurs, et en rapport avec un rétrécissement de la lumière des voies aériennes dans tous les lobes. Ces variations anatomiques sont associées à des polymorphismes génétiques du gène codant pour la protéine FGF-10, acteur important dans le branching au cours du développement pulmonaire.

2.2 Les modifications structurales des voies aériennes distales

Les remaniements structuraux des VADs au cours de la BPCO affectent l'intégralité des compartiments anatomiques de la bronchiole : l'épithélium, la membrane basale, le muscle lisse

bronchique, la matrice extra cellulaire et les cellules du mésenchyme. Les modifications structurales des bronchioles comportent un épaississement de la paroi bronchiolaire associée à une fibrose péribronchiolaire¹⁶, une obstruction de la lumière bronchiolaire par des bouchons de mucus. Les alvéoles pulmonaires sont également le siège d'une destruction anatomique, l'emphysème. Les anomalies vont ensuite atteindre de proche en proche les troncs bronchiques de plus grand diamètre jusqu'aux voies aériennes proximales.

L'épithélium bronchiolaire est morphologiquement anormal et épaissi. Il est le siège d'une hyperplasie de cellules basales, d'une métaplasie malpighienne, et d'une hyperplasie des cellules à mucus (Figure 5). L'obstruction bronchique peut être en partie expliquée par deux remaniements structuraux majeurs : **la fibrose péribronchiolaire** et **les bouchons de mucus intraluminaux** (Figure 6).

Cette fibrose se caractérise par une accumulation de matrice extra-cellulaire aberrante (ECM) qui va participer à l'augmentation de l'épaisseur totale des voies aériennes. L'origine cellulaire de la fibrose n'est pas élucidée. Une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance profibrotiques dont le connective tissue growth factor (CTGF), le platelet-derived growth factor (PDGF) et le transforming growth factor (TGF)- β 1 a été identifiée dans des modèles murins de BPCO.

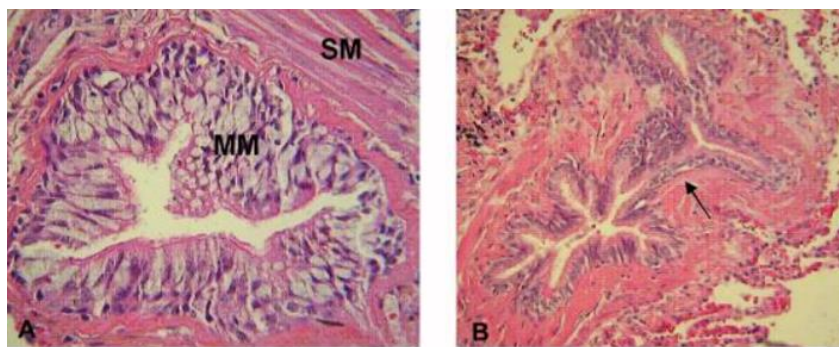


Figure 5 A) Métaplasie de cellules caliciformes (MM), ; B) Fibrose péribronchiolaire, d'après Kim 2008.

L'obstruction des bronchioles des patients BPCO par des bouchons à mucus a été initialement identifiée sur des études autopsiques dès 1989 et confirmée par les travaux de Hogg¹. Ses travaux montrent également que la présence de bouchon de mucus dans les bronchioles augmente avec la sévérité de l'obstruction bronchique. Une étude portant sur les pièces opératoires de patients en stades GOLD III et IV indique que la présence de bouchons de mucus dans les bronchioles est un facteur prédictif de mortalité^{1,18}.

La composition de ces bouchons de mucus reste mal connue. Une étude publiée en 2017 dans le *New England Journal of Medicine*¹⁹ a analysée la composition du mucus présent dans les voies aériennes de patients sains, BPCO et asthmatiques. Il en ressort que MUC5B était la mucine sécrétée dominante chez les participants témoins. Les concentrations absolues de MUC5B et de MUC5AC des patients BPCO sévères étaient 3 fois et 10 fois plus élevées, respectivement, que chez les témoins non-fumeurs.

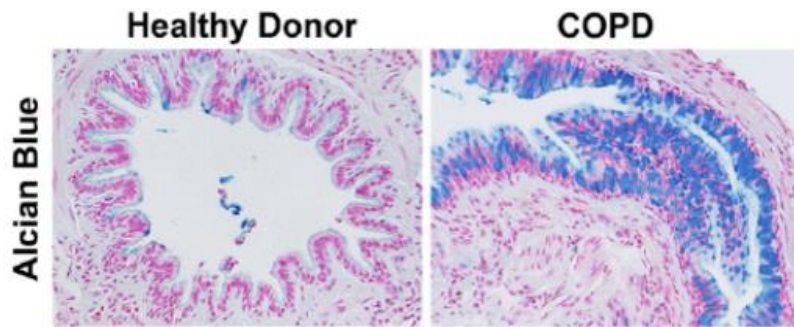


Figure 6 : Immunohistochimie. Coupe d'une bronchiole d'un sujet sain et d'un sujet BPCO. Coloration des mucines au Bleu Alcian. Notez la présence de bouchons muqueux obstruant la lumière bronchique. D'après Chen G & al. 2014.

2.3 L'épithélium bronchique à l'échelle de la cellule

L'ensemble des sous types cellulaires épithéliaux sont affectés au cours de la BPCO, en termes de proportion ou de fonction. Le tableau 2 récapitule les modifications histologiques et cellulaires au cours de la BPCO.

Les cellules basales reposent sur la membrane basale et assurent la cohésion de l'épithélium respiratoire via des complexes protéiques hautement spécialisés de type desmosomes (cellule-cellule) et hémidesmosomes (membrane basale-cellule). Elles sont considérées comme des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire capables de proliférer et de se différencier pour reconstituer un épithélium différencié²⁰. On les retrouve au niveau de l'épithélium pseudostratifié proximal des voies aériennes jusqu'aux bronchioles respiratoires.

Les cellules à mucus sont des cellules sécrétrices, responsables de la production de mucines, glycoprotéines de haut poids moléculaire²¹. Les mucines sont les principaux composants du mucus. L'ontogénie des cellules à mucus est complexe et notamment sous le contrôle du facteur de transcription SPDEF²². En plus de leurs propriétés rhéologiques et de leur rôle dans la clairance d'agents exogènes inhalés, les mucines jouent un rôle dans l'immunité innée décrit récemment²³.

Les cellules Club présentant un dôme apical en microscopie électronique qui leur doit leur nom Club (en dôme). Les cellules du club représentent la cellule sécrétoire majeure de l'épithélium adulte des voies aériennes distales chez l'homme, soit environ 20% des cellules. Elles ont une fonction de sécrétion comme en témoignent leurs nombreux granules cytoplasmiques. Elles sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion de CCSP (Club Cell Secretary Protein), encore appelée Club Cell (CC)- 10, CC16 ou Secretoglobin (SCGB) 1A1 ²⁴. Elles ont également un rôle de cellule xenobiotique et participe à l'immunité innée. Enfin, les cellules Club posséderaient un rôle de cellules progénitrices accessoire avec une spécificité régionale au sein de l'épithélium bronchiolaire. Une étude publiée en 2018 ont explorées l'ontogénie des cellules Club ²⁵.

Les cellules multiciliées sont les cellules épithéliales les plus représentées à l'état physiologique, avec un ratio 1:5 cellule ciliée/cellule à mucus ²⁶. Elles possèdent la caractéristique d'être multiciliée. Le couplage cil-mucus est fondamentale dans la clairance des agents exogènes environnementaux. Il était communément admis, sur l'extrapolation des données observées chez la souris, que l'origine des cellules ciliées pouvaient provenir des cellules progénitrices basales ou Club. De récentes études montrent que les cellules multiciliées dérivent de stade de différenciation intermédiaire appelées cellules deutérosomales ou hybrides.

Les cellules neuro endocrines

Les cellules neuroendocrines ont une morphologie pyramidale. On les retrouve de façon isolée, soit regroupées sous forme d'îlots appelés corps neuro-épithéliaux (NEB) ²⁷. Elles sont innervées et ont des fonctions de paracrinie, d'autocrinie, et de sécrétion dont les produits sont dirigés vers les cellules adjacentes ou des structures sous-jacentes à la membrane basale et correspondent à des amines bioactives et des peptides, dont la sérotonine, la calcitonine, la bombésine ou encore la calcitonine gene-related peptide (CGRP). Des rôles de chémosenseur, en particulier à l'hypoxie, et de cellule niche de cellules progénitrices (cellule Club) sont évoqués ²⁸.

Les cellules récemment découvertes

L'avènement du séquençage haut débit du transcriptome ou RNAseq permet de capturer le produit de l'expression des gènes à un moment donné dans un tissu spécifique ²⁹. Ces nouvelles techniques ont permis une caractérisation sans précédent de tissus sains ^{30 31} ou tumoral, contribuant au concept d'hétérogénéité intra-tumorale ³². Les concepts d'engagement cellulaire et de dynamique de différenciation selon une « pyramide », usuellement décrits comme une séquence d'activations et/ou d'inhibitions de facteurs de transcription commencent à être remise en question. La caractérisation des cellules pulmonaires (épithéliales et non épithéliales) s'est améliorée et a

permis la découverte de nouveaux types et de nouveaux états transitionnels de cellule au cours de la différenciation.

Les ionocytes et les tuft cells

Ces deux populations ont été décrites en 2018^{33,34} chez la souris et l'homme et correspondent à de nouveaux sous types cellulaires dont l'ontogénie dériverait d'un sous type de cellules basale, tout comme les cellules neuroendocrines . Les ionocytes représentent une sous population rare qui surexpriment fortement le canal ionique CFTR et pourraient jouer un rôle singulier au cours de la mucoviscidose. Le rôle des cellules tuft (ou en brosse) reste à ce jour non élucidé dans les voies aériennes depuis leur découverte. Elles doivent leur nom à la présence de nombreuses microvillosités à leur pôle apical (entre 120 à 140/cellule) et sont largement répandues et décrites dans l'épithélium intestinal. Dans l'épithélium respiratoire, elles sont rares (1/15 pneumocytes I et 1/20 pneumocytes II) et sont principalement retrouvées dans la région alvéolaire.

Histological phenotype	Cellular modifications	Molecular mediators
Basal cell hyperplasia /metaplasia More than a unique layer of basal cells above the basal membrane	Increase number of basal cells	Cigarette smoke : EGFR and NOTCH signaling Epigenetic reprogramming
Squamous cell metaplasia Loss of pseudo stratification 25% of airways in COPD	Aberrant basal cell differentiation into squamous cell involucrin +, KRT13/14	CXCL8 basal cell secretion driving neutrophilic inflammation EGFR pathway
Peribronchiolar fibrosis	Club cell loss ECM remodeling Senescence of bronchial fibroblasts Secretory phenotype of fibroblast into myofibroblast vimentin + Squamous cell metaplasia Epithelial phenotype changes Immune cells	IL-1 β -derived squamous cell metaplasia \rightarrow activation of integrin α V- β 8 in fibroblasts \rightarrow TGF- β activation in fibroblast Epithelial production of TGF β 3, GDF15, acting on fibroblasts TGF β R2 Epithelial growth factors : PDGF-b, TGF, CTGF Cigarette smoke (cadmium) IL-17 from Th17 cells, ILC2, IL-12, dendritic cells
Loss of proximal to distal patterning	Proximal airway epithelium identity in small airways Loss of club cells and CCSP secretion Loss of ciliated cells, structural & functional abnormalities	EGFR pathway
Goblet cell hyperplasia/metaplasia Mucus plugging	Proximal submucosal glands and distal airway secretory cells increase MUC5B plugging Neuronal stimulation of submucosal glands Secretory differentiation fate from metaplastic basal clone cells Immune cells	SPDEF, IL-13 inducing SPDEF, FOXA3, EGFR/amphiregulin activation (through CSE) FOXA2 loss Smad signaling inhibition induced by IL-13/IL-17A IL-17 axis \rightarrow Notch2 activation in basal cells
Epithelial to mesenchymal phenotype of airway epithelium	Mesenchymal signature (vimentin), EMT transcription factors , loss of highly specialized epithelial proteins (E-cadherin, tight junctions)	EGFR signaling TGF- β pathway
Emphysema	Apoptosis, Cigarette toxicity Protease/anti protease unbalance in bronchiolar and alveolar epithelium Senescence, exhaustion of AT II progenitors Immune cells	CS mediated toxicity Telomere attrition Auto immunity C1q mediated Th2 inflammation
Small airway smooth muscle Mass increase	Hypertrophy, hyperplasia ? Increase of proliferation rate	NOX4 protein Immune cells
Vascular remodeling Area increase	Morphological changes of the mucosal micro vessels, neo angiogenesis ? Endothelial activation, leads to immune cells recruitment	VEGF, TGF- β from epithelial cells FGF-2/FGF2-R axis from submucosal glands Epithelial mediators & IL-13 induced V-CAM1 on endothelium

Tableau 2 : Ensemble des modifications à l'échelle cellulaire et histologique au cours de la BPCO.

3. BPCO : Physiopathologie et nouveaux concepts

3.1 Physiopathologie de la BPCO : les hypothèses actuelles

L'hypothèse historique de l'inflammation

L'inflammation des voies aériennes est systématiquement retrouvée au cours de la BPCO dans les voies aériennes proximales et les VADs³⁵. L'étude anatomopathologique de Hogg et al. indique que le pourcentage de bronchioles contenant des polynucléaires neutrophiles, des macrophages, des lymphocytes T CD4+et CD8+, des lymphocytes B, ainsi que des follicules lymphoïdes augmente avec la sévérité de l'obstruction bronchique¹.

L'épithélium est également capable de produire des cytokines et des facteurs trophiques pro inflammatoires tels que le TNF-a, IL-1b, IL-6, GM-CSF, et l'IL-8 et le TGFb³⁶ et de ce fait, recruter des cellules inflammatoires.

L'inflammation dans les voies aériennes des patients BPCO est très hétérogène. Initialement décrite et caractérisée chez les patients asthmatiques, l'inflammation de type « Th2 éosinophilique » et non Th2 est également décrite dans la BPCO. Cependant, contrairement à l'asthme ou les thérapies biologiques anti Th2, en particulier ciblant les éosinophiles sont très prometteurs, les essais contrôlés randomisés dans la BPCO de type « hyperéosinophilique » ne sont pas convaincants.

L'inflammation non Th2 dans la BPCO est définie par une absence de sensibilité à la corticothérapie.

Les cellules épithéliales sont activées par la fumée de cigarette et produisent des médiateurs inflammatoires, notamment IL-8 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-17 GM-CSF^{36,37}. Ces médiateurs sont chémo attractants pour les **neutrophiles**, cellules prédominantes dans l'inflammation Th1. Ils sont capables de libérer plusieurs protéases, supposées être impliquées dans les lésions structurales bronchiques et de l'emphysème. L'immunité non Th2 implique également les **lymphocytes CD4+ Th17 (Th17)**.

L'inflammation de type Th2 se caractérise par la présence d'un acteur cellulaire clé : **l'éosinophile**, responsable du profil majoritairement cortico sensible. La définition d'une « BPCO hyperéosinophilique » n'est pas consensuelle et d'après les dernières méta-analyses correspondrait à un taux circulant $> 250/\text{mm}^3$, plutôt qu'un pourcentage.

L'**IL-5** joue un rôle clé dans l'inflammation à éosinophiles en favorisant la différenciation, la survie et leur activation. Une inflammation éosinophile peut également se produire via l'activation de cellules dites cellules lymphoïdes innées de type 2 (**ILC2**) capables de produire de l'IL-5 et de l'IL-13 en réponse à des « alarmines » dérivées de l'épithélium telles que l'IL-33, l'IL-25 et la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont une famille de cellules immunitaires innées dépourvues de récepteurs antigéniques spécifiques mais qui produisent une large gamme de cytokines. Il existe trois sous-types (ILC1, 2 et 3). Chez les patients atteints de BPCO sévère, une étude a montré une d'ILC2³⁸ dans les voies aériennes distales. L'expression de l'IL-33 est par ailleurs augmentée dans les cellules basales chez les patients atteints de BPCO³⁹.

L'hypothèse de l'auto-immunité

L'hypothèse auto immune a été suspectée dans la BPCO lorsque des études histologiques du tissu pulmonaire humain ont révélé la présence de lymphocytes T CD8 + dans les biopsies aériennes distales et proximales⁴⁰. A ce jour, les données actuelles ne permettent pas de considérer de façon certaine la BPCO comme étant une maladie auto-immune ⁴¹. Cependant, des traits d'auto-immunité sont également retrouvés dans la BPCO et l'emphysème ⁴². la présence de lymphocytes T dans les voies aériennes, une exposition environnementale (tabac, impliqué également dans la polyarthrite rhumatoïde); un profil de cytokines évocateur d'une rupture de tolérance (profil l'interleukine-1 ou le facteur TNF alpha), des GWAS rapportant des polymorphismes sur des candidats HLA ⁴¹. Par ailleurs, la présence de follicules tertiaires au sein des bronchioles plaide en faveur de cette hypothèse. Les lymphocytes B s'organisent en structures lymphoïdes tertiaires dans les bronchioles, retrouvées dans d'autres maladies auto immunes (polyarthrite rhumatoïde), appelées iBALT pour *inducible Bronchial Associated Lymphoid Tissue* et pourraient être impliqués dans l'auto-immunité dans les voies aériennes distales (Figure 7).

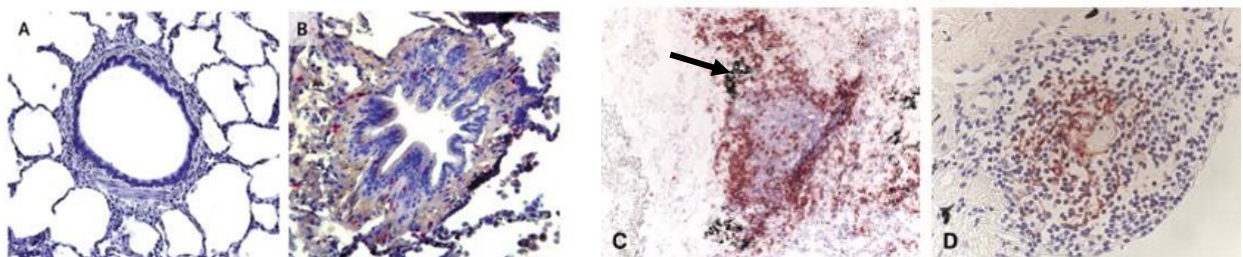


Figure 7 : Infiltration pariétale d'une bronchiole d'un patient BPCO (B) par des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, absent chez un patient sain (A). Follicule tertiaire iBALT dans une bronchiole d'un patient BPCO composé d'un infiltrat de Lymphocyte T en périphérie (C) et de lymphocytes B CD20+ au centre (D). Notez la présence d'un pigment noir en lien avec l'antracose (exposition au tabac dans le contexte) en périphérie du follicule (flèche).

75% de ces follicules contiennent des lymphocytes B mémoire présentant une prolifération oligoclonale, antigène spécifique, sans pouvoir mettre en évidence des peptides bactériens ou viraux ⁴³. De façon intéressante, un dépôt de pigment noir lié au tabac était retrouvé dans les follicules. L'un des composants du tabac pourrait être à l'origine de la stimulation des iBALT ⁴⁴.

L'hypothèse de la sénescence

Il n'existe pas à ce jour de définition précise de la sénescence mais repose sur un faisceau d'arguments biologiques. La sénescence cellulaire se traduit par un arrêt du cycle cellulaire entre les phases G1 et S, aboutissant à un arrêt permanent de la prolifération. ^{45 46}. Cette description est rapportée pour la première fois en 1961 par l'équipe d'Hayflick, où ce dernier découvre que le nombre de division des fibroblastes embryonnaires humains est limité ⁴⁷ et la prolifération ralentit jusqu'à un arrêt complet.

Cet arrêt du cycle cellulaire n'est pas synonyme de quiescence. En effet, ces cellules se caractérisent par un métabolisme métabolique singulier ⁴⁸ avec entre autre la sécrétion de cytokines et interleukines du SASP (Senescence Associated Secretome Proteins) ^{49 50}. Ce profil est relativement conservé d'un type cellulaire à l'autre et entre les espèces ⁵¹.

Deux types de sénescence sont classiquement décrits : la sénescence répllicative en réponse à un raccourcissement des télomères et la sénescence prématurée secondaire à un stress oxydatif (ou autre stress par UV, hyperoxie, stimulation oncogénique) ⁵².

Une récente étude de séquençage haut débit (RNAseq) a montré qu'il existe un haut degré de similitude dans les voies de signalisation dans les poumons de patients avec emphysème et FPI impliquant des acteurs de la sénescence ^{53 54}. Il existe une augmentation de l'expression de p53 dans le poumon des fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Cependant, l'arrêt du tabac ne reverse pas cette de p53 chez les patients atteints de BPCO ⁵⁵ suggérant une autonomisation de la maladie. Chez l'homme, des données de la littérature montrent l'existence de marqueurs de sénescence cellulaire (raccourcissement des télomères, induction de l'expression de la protéine p53) au niveau de leucocytes circulants chez des sujets fumeurs par rapport à des non-fumeurs ^{56 57}. Par ailleurs, l'exposition in vitro de cellules épithéliales alvéolaires murins et de fibroblastes humains à la fumée de cigarette induit une sénescence accélérée; ⁵⁸ partiellement inhibée par des antioxydants ⁵⁹.

3.2 La BPCO : une maladie du développement pulmonaire ?

L'étude de Lange et al. constitue un vrai changement de paradigme quant à la physiopathologie de la BPCO et met en exergue les racines pédiatriques de la maladie chez les patients développant une BPCO à l'âge adulte avec une fonction respiratoire altérée initiale mais sans déclin accéléré. Cette trajectoire de patients BPCO sans déclin accéléré a été décrite par d'autres équipes de façon récente, entre autres dans la cohorte ECLIPSE⁶⁰. L'étude montre qu'il s'agit de plus de 50% des patients BPCO. Elle remet en question la théorie de Fletcher publiée en 1977 où le déclin était décrit comme la seule trajectoire pouvant mener à la BPCO (Figure 8).

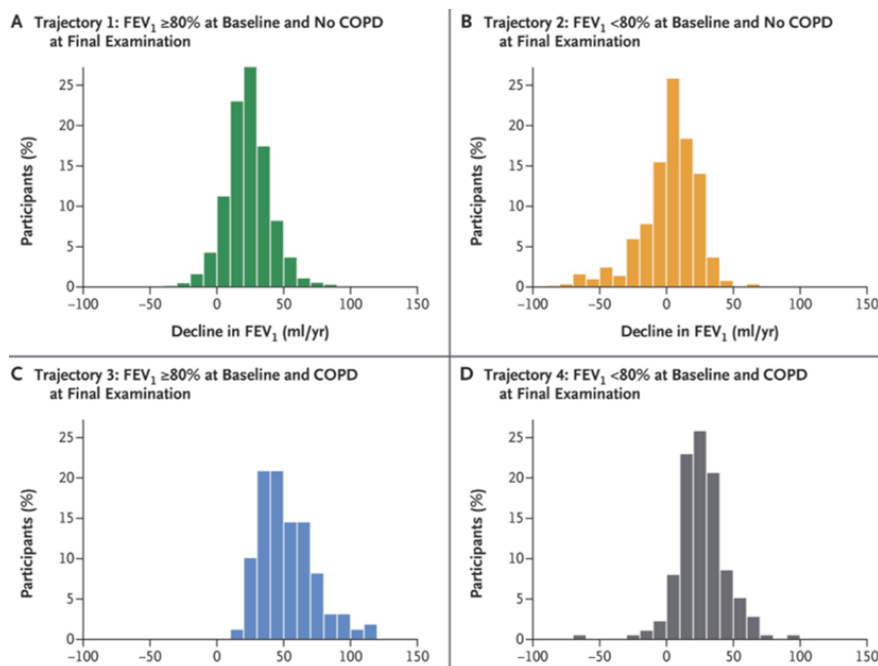


Figure 8 : Trajectoires fonctionnelles conduisant à la survenue d'une BPCO.

La trajectoire « BPCO sévère à début précoce » (< 55ans dans l'étude) montre que cette population est principalement de femmes (66%), dont le tabagisme cumulé est important et non sevré, un antécédent d'asthme dans l'enfance. Le tabagisme et la BPCO maternels ont été retrouvés de façon significativement plus fréquente chez les sujets atteints de BPCO précoce⁶¹.

Par ailleurs, les patients appartenant à cette trajectoire n'atteignent pas pour la majorité d'entre eux, « le plateau » de fonction maximale lors de la 2^{ème} décennie de vie. Le déterminant majeur de l'acquisition d'une fonction respiratoire maximale à l'âge adulte est conditionné par le développement pulmonaire dans l'enfance. Il est établi que le niveau maximal de la fonction

pulmonaire atteint après la puberté est un déterminant majeur du risque de développer une BPCO plus tard dans la vie^{62 63}.

L'étude Tucson a été la première cohorte longitudinale pédiatrique monitorant la fonction respiratoire de la naissance jusqu'à 24 ans. L'étude montre que la fonction respiratoire post natale dès 2 mois de vie prédit la fonction à l'âge adulte. Les nourrissons ayant la fonction respiratoire la plus basse (4^{ème} quartile) restaient dans ce couloir jusqu'à l'âge adulte⁶⁴. L'étude de Belgrave et al. montre qu'en grandissant, la majorité des enfants ayant un VEMS initialement bas retrouvait une EFR normale en grandissant (75%). Les enfants qui gardaient à l'âge adulte un trouble ventilatoire obstructif de façon persistante avaient des facteurs de risques précoces en rapport avec variants génétiques et des événements précoces tels qu'un asthme sévère dans l'enfance, l'apparition précoce d'un terrain atopique, ou encore le tabagisme passif au cours de la petite enfance⁶⁵. Enfin la cohorte TAHS est une étude longitudinale étudiant les trajectoires de la fonction pulmonaire de patients à partir de 7 ans jusqu'à la 5^{ème} décennie de vie. 75% des personnes atteintes de BPCO à l'âge adulte avaient des facteurs de risque modifiables dans la petite enfance et l'enfance : tabagisme passif ou actif, asthme difficile à contrôler dans l'enfance⁶⁶. De même, la cohorte longitudinale européenne European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) retrouvait l'asthme des parents, de l'enfant et les infections respiratoires dans la petite enfance (< 5ans), l'exposition au tabagisme in utero comme des facteurs de risque cumulatifs de BPCO à l'âge adulte⁶⁷.

Ces résultats indiquent ainsi des influences génétiques et du développement pulmonaire in utero comme des facteurs contributifs majeurs du plateau de la fonction pulmonaire maximale.

La morphogenèse pulmonaire est un processus hautement régulé qui peut être perturbé par des facteurs génétiques et environnementaux in utero. Parmi les événements pouvant interférer avec le développement pulmonaire, on décrit :

- Le tabagisme passif de l'enfant, mais plus particulièrement, l'exposition au tabagisme in utero^{68 69} (réduction environ de 20% du VEMS dans l'enfance) et durant l'adolescence,
- La prématurité et ses complications : la détresse respiratoire aigüe à la naissance, la ventilation (l'hyperoxie, les lésions induites), le Retard de Croissance In Utero (RCIU)⁷⁰
- Les infections broncho-pulmonaires dans l'enfance, virales principalement⁷¹
- Les facteurs génétiques, avec des variants ou mutations de gènes pouvant conduire à une susceptibilité accrue à développer une bronchopathie.

Par ailleurs, des études ont montré que l'on peut hériter de l'exposition environnementale de la mère, voire de la grand- mère. Des études épigénétiques montrent qu'il existe une signature du tabagisme générationnel dans le sang de cordon de l'enfant, avec des niveaux de méthylation

différents sur des gènes clés impliqués dans la détoxification et la transduction du signal des agents toxiques⁷².

II : Les cellules souches pluripotentes humaines : un nouvel outil d'étude des maladies respiratoires

1. Les cellules souches embryonnaires humaines hESC

1.1. Historique et contexte

Les premières cellules capables de donner naissance à tous les tissus d'un organisme ont été isolées il y a plus d'une cinquantaine d'années, à partir de cancers de testicule de souris, appelés tératocarcinomes ⁷³. Le tératocarcinome est une tumeur composée d'un contingent de tissus différenciés non tumoraux, et de carcinome embryonnaire indifférencié, par opposition au tératome qui désigne des tumeurs bénignes composées exclusivement de tissus différenciés. C'est en 1954 que Stevens & Little ⁷⁴ décrivent des tératocarcinomes testiculaires spontanés chez des souris mâles. Ils montraient alors que la persistance d'un contingent de cellules indifférenciées de carcinome embryonnaire permet de transplanter de façon itérative le même tératocarcinome à différentes souris, suggérant la présence de cellules de cellules « souches » indifférenciées capable de se différencier à chaque nouvelle transplantation. En 1964, Kleinsmith et Pierc ⁷⁵ démontrent qu'une seule des cellules du carcinome embryonnaire était capable de s'auto-renouveler et de se différencier vers les trois feuilletts embryonnaires. Cette découverte a ouvert le champ à la recherche des cellules souches pluripotentes chez la souris et l'Homme.

1.2. Définition

La définition de la cellule souche repose sur deux critères : capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. La division d'une cellule souche génère deux cellules-filles dont au moins une hérite de l'identité de cellule souche caractérisant la capacité d'auto-renouvellement. Si la seconde cellule-fille est une cellule de transition, elle possède une capacité prolifération limitée dans le temps et sera à l'origine de cellules différenciées et permettra de générer des tissus spécialisés.

Les cellules souches peuvent être classées selon leurs capacités de différenciation :

- i) Les cellules souches **pluripotentes**, qui peuvent se différencier vers les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) ainsi que les cellules germinales,

mais elles n'ont pas la capacité de produire un organisme entier ⁷⁶. Les cellules souches embryonnaires (CSE) font parties de cette catégorie (Figure 9).

- ii) Les cellules souches **multipotentes**, qui correspondent notamment aux « cellules souches adultes », celles de l'enfant ou celles présentes chez le fœtus. Ces cellules sont à l'origine de plusieurs types de cellules d'un tissu donné mais elles sont déjà engagées vers une voie de différenciation tissulaire comme par exemple les cellules souches hématopoïétiques ⁷⁷, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ⁷⁸
- iii) Les cellules **unipotentes** ne peuvent donner qu'un type cellulaire. Ce sont par exemple les kératinocytes de la peau ou les hépatocytes et les cellules souches satellites des muscles squelettiques ⁷⁹.

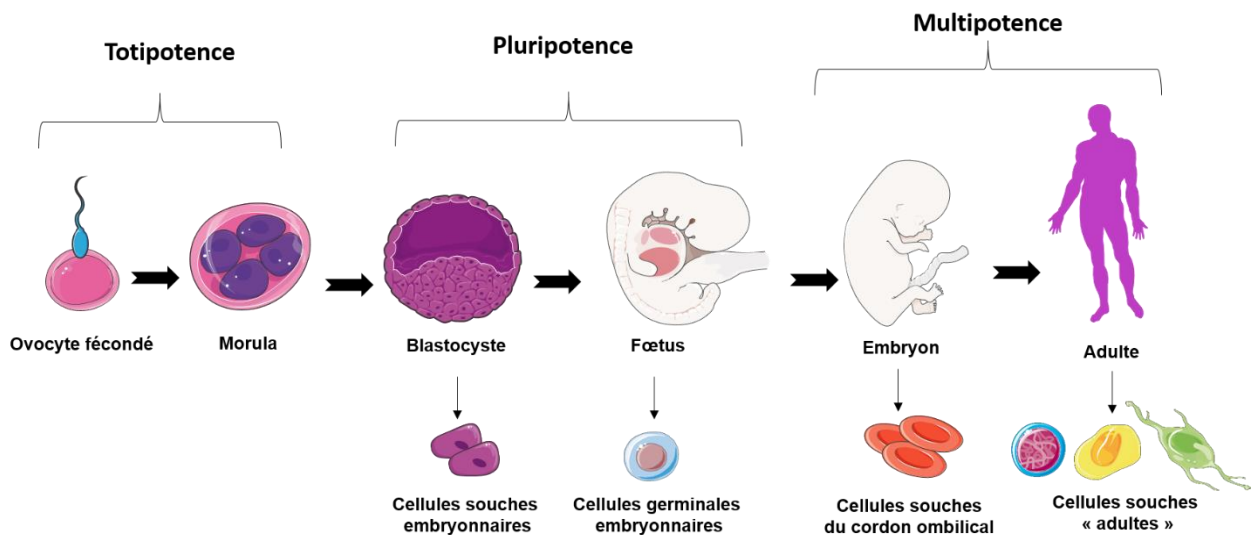


Figure 9 : Les différents types de cellule souche au cours du développement humain.

1.3. Origine et dérivation de cellules

1.3.1. Quelques rappels du développement embryonnaire humain précoce

Durant les premiers jours qui suivent la fécondation, le zygote subit une série de divisions appelée la segmentation. Ces divisions, sans croissance cellulaire, partagent le zygote en cellules filles appelées blastomères. Après quatre jours, les blastomères forment une structure ressemblant à une petite mûre, appelée morula. C'est également à ce stade que débute la ségrégation des blastomères en précurseurs de l'embryoblaste (masse cellulaire interne à l'origine de l'embryon) et du trophoblaste (à l'origine des structures annexes). Après le stade de morula, les blastomères vont

adhérer fortement entre eux : c'est la compaction (Figure 10). Celle-ci s'accompagne de l'apparition d'une polarité de certains blastomères aboutissant à la ségrégation de cellules au centre de la morula (future masse cellulaire interne) et d'autres à l'extérieur de celle-ci (trophoblaste). Puis une cavité apparaît, appelée blastocèle. Les cellules de la masse cellulaire interne forment un amas compact collé à la paroi de la cavité tandis que les cellules du trophoblaste s'organisent en périphérie. Ce stade correspond au blastocyste.

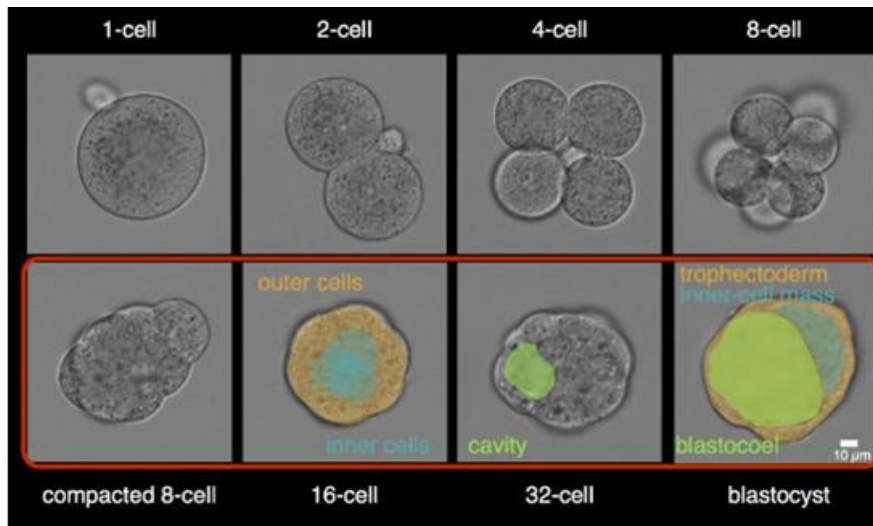


Figure 10 : Time-lapse du développement préimplantatoire de souris
 Maître JL & al. Nat Cell Biol. 2015

1.3.2. Méthodes d'isolation et de dérivation des CSEh

Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) sont dérivées *in vitro* à partir de blastocystes, entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour post fécondation, au stade préimplantatoire, c'est-à-dire avant la nidation dans la paroi utérine. Ce sont les cellules de la masse cellulaire interne qui vont être isolées afin d'être mise en culture et ainsi dériver les lignées de CSEh. Une fois isolée, ces cellules sont mises en co-culture sur des cellules nourricières de type fibroblastique, mitotiquement inactives, en présence d'un milieu contenant du sérum et des facteurs de croissance favorisant la pluripotence. Au bout de quelques jours, une population de cellules commence à proliférer, représentant les cellules souches embryonnaires. Ces cellules prolifèrent de manière extensive en culture, tout en conservant leur pluripotence et leur capacité de différenciation *in vitro* et *in vivo* vers les trois feuillets embryonnaires.

1.4. Culture des cellules souches

Les CSEh en culture sont des cellules adhérentes, de petite taille, s'organisant en colonies simulant un épithélium ⁸⁰. Le maintien de ces lignées en culture est un défi car elles peuvent acquérir une instabilité génomique au fur et à mesure des passages, en lien notamment avec la méthode de repiquage, ou se différencier spontanément. Il est donc fondamental de maîtriser les techniques de repiquage, mais également le choix des matrices et des milieux de culture, tout en monitorant l'apparition d'instabilité génétique au cours de la culture.

1.5. Critères d'évaluation de la pluripotence des CSEh

L'identification de marqueurs de surface et de marqueurs intracellulaires a permis de définir les bases moléculaires de l'identité de ces cellules souches. Il est maintenant bien établi que les CSEh expriment des marqueurs antigéniques de surface incluant les divers glycolipides et glycoprotéines, historiquement identifiés sur les blastomères humains (embryons préimplantatoires) et les cellules de carcinome embryonnaire humaine tels que TRA-1-60 et TRA-1-81 et SSEA3, SSEA4 ⁸¹. Les cellules pluripotentes sont caractérisées par un réseau de facteurs de transcription appelé « core regulatory circuitry » comportant OCT4 (Octamer-binding Transcription factor 3/4), SOX2 (Sex determining region Y-box 2) et NANOG ⁸². permettant le maintien d'auto-renouvellement et de la pluripotence (incluant NANOG et OCT4 eux-mêmes) ⁸².

En plus de ces éléments de pluripotence, les CSEh indifférenciées doivent répondre aux caractéristiques suivantes : i) division symétrique en culture (auto renouvellement), en théorie illimitée in vitro, ii) capacité de différenciation vers les trois feuillets embryonnaires (endoderme, ectoderme et mésoderme), de façon spontanée, dirigée in vitro ou in vivo par la formation de tératome si elles sont injectées dans une souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) , iii) garder leur intégrité génétique, actuellement évaluée par le caryotype.

2. Les cellules souches humaines pluripotentes induites

La génération de cellules ayant les mêmes caractéristiques de pluripotence et d'autorenouveaulement d'une CSEh et ne nécessitant pas par l'utilisation d'embryon permettrait à la communauté scientifique de contourner la question éthique de la destruction de l'embryon humain pour la recherche. La reprogrammation cellulaire a permis de convertir une cellule somatique différenciée en une cellule souche pluripotente dite induite et donc de sortir les cellules souches pluripotentes du domaine de la recherche sur l'embryon. Le processus de reprogrammation consiste en un remodelage épigénétique visant à restaurer le « noyau » du réseau transcriptionnel présent dans une cellule souche pluripotente.

2.1. Historique de la reprogrammation

2.1.1. Transfert nucléaire [somatic cell nuclear transfer (SCNT)]

Les premières expériences de reprogrammation cellulaire ont été réalisées avec succès à l'aide d'œufs et d'un batracien nord-américain (*Rana pipiens*) par Robert Briggs et Thomas King dans les années 50, et reprogrammaient des cellules embryonnaires précoces, des blastomères⁸³. Mais les tentatives de transfert nucléaire à partir de cellules plus différenciées avaient été un échec. C'est John Gurdon qui a réussi, en 1962, notamment grâce à l'utilisation d'un autre modèle de batracien (*Xenopus laevis*), le transfert nucléaire d'une cellule différenciée⁸⁴. Cette expérience de clonage consistait en un transfert du noyau d'une cellule d'épithélium intestinal de têtard de Xénope dans un œuf énucléé de la même espèce, qui conduisit à la formation d'un embryon, évoluant en un têtard puis une grenouille. A travers cette expérience, Gurdon démontra que toute l'information nécessaire à la formation d'un embryon est présente même dans des cellules adultes différenciées

et que le cytoplasme de la cellule œuf était capable de reprogrammer cette cellule. En effet, la mémoire épigénétique du génome somatique a pu être « effacée » et les cellules peuvent être ramenées à un état de pluripotence.

2.1.2. Fusion cellulaire et transdifférenciation

Lors de la fusion cellulaire, la cellule obtenue possède deux noyaux appelée hétérocaryon (4n) qui va en général se diviser et donner diploïdes (2n), portant l'information génétique des deux cellules dont il est issu. Ces travaux ont été confirmés chez l'Homme en 1983⁸⁵. En 2005, Cowan & al.⁸⁶ réalisaient la fusion de cellules somatiques avec des CSEh in vitro. L'analyse transcriptomique montrait que le profil des cellules hybrides (post fusion) était similaire à celui d'une CSEh (> 99% des transcrits analysés) et une extinction de la quasi-totalité des gènes somatiques, suggérant une reprogrammation efficace. Le profil de méthylation des îlots CpG des cellules hybrides était identique à celui des CSEh. Ces expériences de fusion cellulaire démontrent que la reprogrammation est d'ordre transcriptionnelle et épigénétique et qu'il existe des éléments présents dans le cytoplasme, rapidement mobilisables vers le noyau, et capable d'induire cette reprogrammation de façon rapide et persistante.

La transdifférenciation est la conversion d'un type cellulaire vers un autre via l'induction de l'expression d'un ou plusieurs facteurs de transcription. En 1987, la première transdifférenciation cellulaire a permis de convertir une cellule spécialisée de type fibroblaste en un cardiomyocyte, sans passer par le stade de cellule souche pluripotente⁸⁷ (Figure 11).

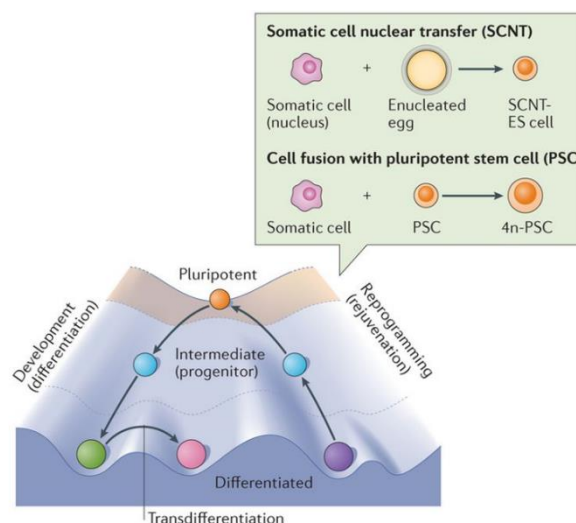


Figure 11: Diagramme de Warrington, illustrant les trajectoires d'une cellule et de sa plasticité : transdifférenciation, reprogrammation, différenciation. D'après Yamanaka, Nature Review 2010

2.2. L'ère des cellules souches pluripotentes induites

En 2006, l'équipe de Shinya Yamanaka réalise une avancée majeure dans l'histoire de la reprogrammation cellulaire en convertissant des cellules spécialisées en cellules souches pluripotentes par l'introduction et l'expression de gènes exogènes codant pour des facteurs de transcription « de pluripotence ». Ces cellules obtenues sont dites cellules souches pluripotentes induites (iPS)⁸⁸. Cette avancée lui vaut ainsi qu'à John Gurdon d'être récompensés par le prix Nobel de Médecine en 2012. Pour aboutir à ce résultat, Yamanaka et Takahashi ont tenté de déterminer le coeur du réseau transcriptionnel de la pluripotence, grâce à un crible de 24 facteurs de transcription candidats identifiés par analyse bibliographique. Les auteurs ont réalisé la co-expression forcée de différentes combinaisons de ces 24 facteurs grâce à des vecteurs rétroviraux dans les fibroblastes embryonnaires de souris afin d'évaluer s'ils étaient à même d'induire une conversion en cellules souches pluripotentes. Cette première étude a permis d'identifier une combinaison minimale de 4 facteurs, **Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OSKM)** capable d'induire la pluripotence. De façon surprenante, Nanog n'était pas indispensable dans le processus de reprogrammation.

A ce jour, différentes techniques de reprogrammation permettent d'induire l'expression de facteurs de transcription exogènes au sein des cellules spécialisées sous différentes formes (ADN, ARN, protéines) : i) vecteurs viraux intégratifs, induisant une forte expression des facteurs de transcription mais avec des risques élevés de mutagenèse insertionnelle au sein du génome de la cellule hôte et de réactivation inopinée de l'expression; ii) vecteurs viraux non intégratifs, conduisant généralement à une expression plus modérée des facteurs de transcription tout en limitant les risques d'insertion et d'anomalies dans le génome ; iii) techniques ne faisant pas appel à des vecteurs viraux : ARN modifiés, protéines, molécules chimiques. Parmi les virus non intégratifs, on retrouve le **virus Sendai SeV**. C'est un virus à ARN simple brin à réplication cytoplasmique. Ce sont parmi les plus efficaces à ce jour, avec des rendements de génération d'iPS 20 fois supérieurs à ceux des vecteurs lentiviraux ou adénovirus^{89 90}.

2.3. Le concept de mémoire épigénétique

Le processus de reprogrammation cellulaire induit des modifications majeures et profondes de l'épigénétique des cellules somatiques en parallèle de la mise en place du programme transcriptionnel de la pluripotence. Les études de transcriptome (séquençage, miRNA, RNA non

codants), d'épigénome mettent généralement en évidence des signatures transcriptionnelle et épigénétique globalement similaires entre les CSEh et les hiPSC.

S'il subsiste des traces du profil épigénétique de la cellule somatique parentale, on parle de mémoire épigénétique. Cette mémoire se traduit biologiquement par la persistance de l'expression de certains gènes somatiques au sein des iPSC générées^{91 92} qui tendent à s'effacer avec les passages⁹² et qui sont en lien avec une reprogrammation incomplète et imparfaite en lien avec un défaut d'extinction des gènes de la cellule parentale. C'est l'équipe de Marchetto qui a mis en lumière en 2009⁹³ que les iPSC générées par vecteurs non intégratifs avaient des profils similaires aux CSEh, mais que des clones mal reprogrammés gardaient en mémoire l'expression de gènes en rapport avec leur cellule parentale. Cependant, la signature transcriptionnelle d'hiPSC à passage tardif est plus proche de celle des CSEh qu'avec les hiPSC à passage précoce. De la même façon, une analyse d'expression des gènes par cluster hiérarchique indique que la différence entre différentes lignées de cellules iPSC humaines des lignées de CSEh est inférieure aux différences entre les lignées de CSEh.⁹⁴ **Les CSEh sont donc considérées au vu des connaissances actuelles comme « équivalentes » aux iPSC.**

III. Modélisation par les cellules souches pluripotentes induites

Il n'existe pas à ce jour de modèle de la BPCO employant les iPSCs ou les CSEh. Cependant, quelques équipes dans le monde ont pu différencier des iPSC humaines et CSEh en un épithélium bronchique, plus ou moins mature et fonctionnel. Ce qu'il en ressort est un manque de reproductibilité des protocoles permettant d'induire la différenciation, et une majorité des protocoles se focalisent sur la différenciation distale alvéolaire plutôt que proximale bronchique. La différenciation dirigée des iPSC nécessite une connaissance de l'embryologie animale et en particulier humaine. En effet, le moyen le plus efficace pour identifier les facteurs permettant de diriger la différenciation vers un type tissulaire donné reste la reproduction la plus fidèle possible des phénomènes de différenciation qui se produisent au cours du développement embryonnaire et fœtal normal. Or pour l'Homme, ces connaissances sont très parcellaires, tandis que pour la souris de très nombreuses études ont rapporté les conséquences d'une manipulation génétique dans le développement murin, notamment des KO ou des souris transgéniques, complets ou limités à un organe spécifique. C'est à partir de ces connaissances d'embryologie que vont ensuite dériver les protocoles de différenciation. Ce manque de données fondamentales pourrait au moins en partie expliquer l'absence d'un protocole reproductible capable de différencier des CSEh et des iPSCs en épithélium bronchique.

1.1. La différenciation des cellules souches pluripotentes vers un épithélium bronchique

La différenciation des hiPSCs nécessite d'exécuter à un moment précis et pour une durée déterminée, chaque étape de l'embryogénèse afin d'obtenir dans un premier temps des progéniteurs bronchiques NKX2.1+, qui seront ensuite différenciés en un épithélium bronchique. Ces étapes d'induction s'inspirent donc des connaissances embryologiques de l'organe respiratoire : c'est ce que l'on appelle le biomimétisme.

Il faut garder à l'esprit qu'une induction incomplète d'une étape sera limitante pour l'étape suivante, et perturbera *in fine* l'ensemble du processus de différenciation. Il est donc indispensable de connaître et de développer des outils permettant d'évaluer de façon fiable et rapide l'état de pureté des cellules obtenues à chaque étape clé du processus de la différenciation.

La séquence de différenciation est la suivante : induction du nœud primitif antérieur (**Anterior Primitive Streak** ou **APS**), puis induction d'en endoderme définitif (**Definitive Endoderm** ou **DE**) compétent pour générer les précurseurs bronchiques, puis induction de l'intestin antérieur primitif (**Anterior Foregut Endoderm** ou **AFE**) et enfin sa ventralisation (**Ventralized AFE** ou **VAFE**) correspondant à l'induction des **progéniteurs bronchiques multipotents NKX2.1+**.

1.1.1. Induction de l'APS

Cette étape correspond à la gastrulation, au cours de laquelle une EMT se produit et initie une migration des cellules ectodermiques via le nœud primitif antérieur pour former le feuillet endodermique. Cette étape n'est pas toujours bien individualisée dans les protocoles de différenciation de la littérature. A cette étape, il existe une grande plasticité permettant aux cellules de se différencier vers le feuillet mésodermique ou ectodermique. Il est donc nécessaire à la fois d'induire très fortement l'endoderme, et d'inhiber l'ectoderme et le mésoderme. **Les signaux d'induction de l'APS et du Posterior Primitive Streak étant totalement en opposition**, il est fondamental de contrôler l'ensemble des signaux de façon synchrone et dans un temps imparti, au risque de réinduire du mésoderme.

Pour cela, l'induction doit se faire par de **fortes concentrations d'Activine A** (>100ng/mL), c'est-à-dire **une induction de la voie Nodal/TGF- β canonique** dépendant de la phosphorylation des Smad 2/3. Une **modulation de la voie WNT** est également fondamentale, soit par une inhibition de la voie GSK3B induisant une activation de la voie Wnt par la molécule CHIR99021, à des concentrations inférieures à 3 μ M, ou l'ajout de la protéine recombinante Wnt3a⁹⁵. En effet, l'Activine A seule ne permet pas d'induire une différenciation correcte et il existe une grande proportion de cellules restant à l'état indifférenciées⁹⁶. L'Activine A empêche la différenciation vers le feuillet ectodermique, et les faibles concentrations de CHIR99021 (3 μ M) empêchent les cellules de s'engager vers le Nœud Primitif Postérieur (PPS), soit *in fine* le mésoderme (Figure 12). L'ajout d'un inhibiteur des ROCK kinases 1 et 2 grâce à la molécule Y27632 favorise la survie des cellules en début de différenciation, ainsi que la différenciation vers le feuillet endodermique.

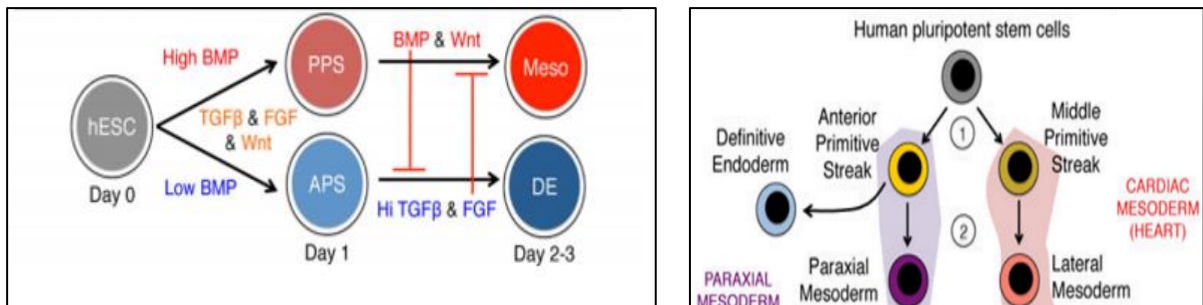


Figure 2 : Figure de gauche : Schéma récapitulatif des voies de signalisations conduisant à une polarisation vers l'APS, nécessitant de fortes concentrations de, de faibles concentrations de BMP. L'induction est brève et doit être maintenue au maximum 24h. **Figure de droite** : un échappement vers le mésoderme para axial (somites) après l'induction de l'APS est toujours possible et évitable en manipulant les voies BMP, WNT, TGF- β . D'après Loh & al. 2015 Cell Stem Cell.

1.1.2. Induction de l'endoderme définitif

L'**épiblaste** est l'une des deux premières couches cellulaires dérivant de la masse cellulaire interne. Lors de la gastrulation, les cellules épiblastiques convergent vers l'axe longitudinal dorsal du disque embryonnaire et y forment la **ligne primitive** à partir de laquelle les cellules épiblastiques migrent à travers cette ligne qui s'est transformée en sillon : c'est la **gastrulation** (Figure 13). Les cellules de l'épiblaste qui migreront au niveau caudal via le **nœud primitif antérieur (APS)** vont s'insérer au niveau de l'hypoblaste afin de donner l'endoderme définitif (DE).⁹⁷

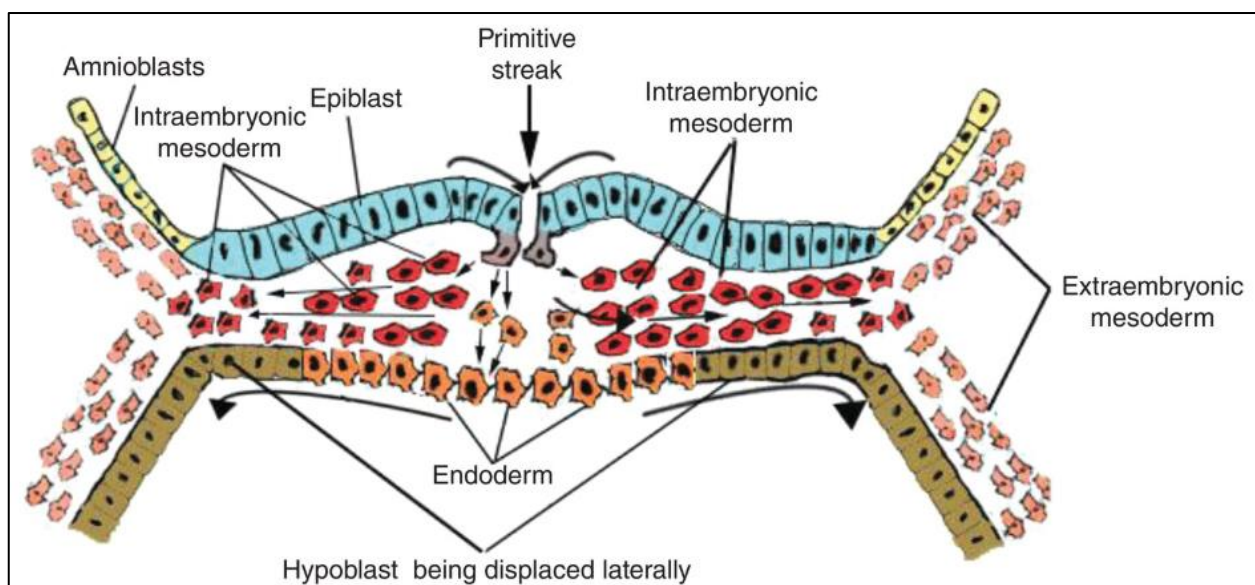


Figure 3 : Gastrulation avec EMT de certaines cellules de l'épiblaste à travers le nœud primitif antérieur (APS). Ces cellules vont s'insérer au niveau de l'hypoblaste qui migre latéralement. Ces nouvelles cellules constitueront le feuillet de l'endoderme définitif. D'après Chapter 2 Development of the Head, Face, and Mouth Joseph A. Grasso

L'orientation du destin cellulaire de l'APS entre le mésoderme para-axial (somites) ou l'endoderme définitif est régulée par la voie TGF- β , en particulier le ligand physiologique Nodal. Cette voie est finement régulée et la décision cellulaire dépend de la concentration et de l'activation spatio-temporelle de la voie. La disponibilité du peptide Nodal et son coût ont amené les équipes travaillant sur la modélisation de l'endoderme définitif à partir d'iPSCs d'employer l'Activine A, ligand de la voie canonique TGF- β . Plusieurs équipes dont initialement celle de D'Amour & al. ont montré que de fortes concentrations **d'Activine A en condition low-serum** permettent d'induire un endoderme définitif^{98 99}. Le milieu no/low-serum permet de lever l'inhibition du signal de différenciation exercé par l'insuline et l'IGF (Insuline Growth Factor) via la voie

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), qui empêche les hiPSCs et CSEh de répondre aux membres de la famille des facteurs TGF- β tels que l'Activine A et Nodal ¹⁰⁰.

La combinaison de marqueurs habituellement décrite dans la littérature pour caractériser les cellules du DE sont EpCAM+/CXCR4+/c-KIT mais également GATA6, SOX17, FOXA2 ainsi que l'extinction des marqueurs de pluripotence.

1.1.3. Induction de l'intestin antérieur primitif (Anterior Foregut Endoderm -AFE) et sa ventralisation

L'intestin primitif antérieur, dans sa **partie céphalique**, appelée intestin pharyngien, tapisse la lumière de la région branchiale et va être à l'origine de la cavité buccale, du pharynx, de l'œsophage ainsi que des **diverticules respiratoire** et thyroïdien. Dans sa partie caudale, l'intestin primitif antérieur est à l'origine de l'estomac, d'une partie du duodénum, du foie, des voies biliaires et du pancréas.

Le facteur transcriptionnel NK2 Homeobox 1 (**NKX2.1**) est décrit comme étant le marqueur le plus précoce à apparaître au sein des bourgeons bronchiques ¹⁰¹. Cependant, ce facteur n'est aucunement spécifique de progéniteurs pulmonaires car il est également exprimé par les progéniteurs de la thyroïde et du cerveau.

Les protocoles d'induction de l'AFE et de sa ventralisation afin d'induire des progéniteurs bronchiques NKX2.1 sont extrêmement différents et mettent en avant la **difficulté à l'induire** ¹⁰² ; son induction repose sur la modulation des voies TGF- β , BMP, FGF, Acide rétinoïque et Wnt. Parmi ces protocoles, certains suggèrent une double inhibition minimale de 48h des voies TGF- β et BMP, souvent établies par l'usage des petites molécules SB141524 (inhibition de TGF- β) et Noggin (inhibition de BMP). Cependant, Matsuno & al. ont montré que l'inhibition préalable de la voie BMP lors de l'induction du DE par le LDN-193189 permettait de s'affranchir de cette double inhibition en retirant simplement l'Activine A ¹⁰³. Par ailleurs, l'exposition des cellules du DE à l'Activine A **avant** la double inhibition est fondamentale afin d'empêcher la différenciation vers les progéniteurs neuronaux. ¹⁰⁴Il faut finalement s'assurer de l'absence de marqueurs thyroïdiens PAX8/TG et neuronaux PAX6 TUJ1 ou OTX2 SIX3. Quelques équipes telles que les équipes américaines de DN Kotton ^{105 106 107}, de HW Snoeck ^{108 109} et japonaise de M Mishima ^{110 111} ont montré que la différenciation des hiPSC vers des voies aériennes était possible. Cependant,

les taux des progéniteurs AFE observés par ces équipes restent faibles en dehors de stratégies de tri cellulaire.

IV. Rationnel de l'étude et objectifs

Les différentes trajectoires qui conduisent à la BPCO ne sont pas encore élucidées sur le plan biologique. A ce jour, il n'existe pas de modèle permettant d'étudier l'initiation de la maladie. Les modèles actuels permettent d'avoir une image à un instant t , en général à un temps tardif de l'évolution de la maladie (Figure 14).

D'un point théorique, deux types d'études *in vivo* permettraient de répondre à la question des différentes trajectoires clinico-biologiques :

- Mettre en place des cohortes de suivi de la naissance jusqu' à environ 50/60 ans chez d'individus exposés *in utero* au tabagisme maternel et/ou exposés dans la petite enfance et suivre leur devenir. Pour comprendre la maladie, il faudrait pouvoir phénotyper ces patients durant 5 décades par un examen clinique, des tests fonctionnels mais également des prélèvements du parenchyme pulmonaire et des bronches. L'idéal serait de mener une étude prospective contrôlée randomisée où des femmes seraient incluses dans le bras « fumeuses pendant la grossesse » vs non fumeuses. Ce scénario est non éthique sur tous les plans.
- Étudier des poumons d'embryons issus de femmes enceintes fumeuses, issus d'interruption de grossesse, ou médicale. Ce modèle a été décrit récemment : on appelle cela les HLE (human lung explants). On pourrait donc étudier l'effet du tabac au cours du développement pulmonaire précoce, cependant ce modèle n'étudie pas la BPCO.

Une alternative serait un modèle permettant de récapituler le phénotype de la maladie *in vitro*, depuis son initiation (développement *in utero* de la BPCO) jusqu'à un stade plus mature, et qui soit éthiquement acceptable. La mise en place de cette alternative est l'objet de cette thèse.

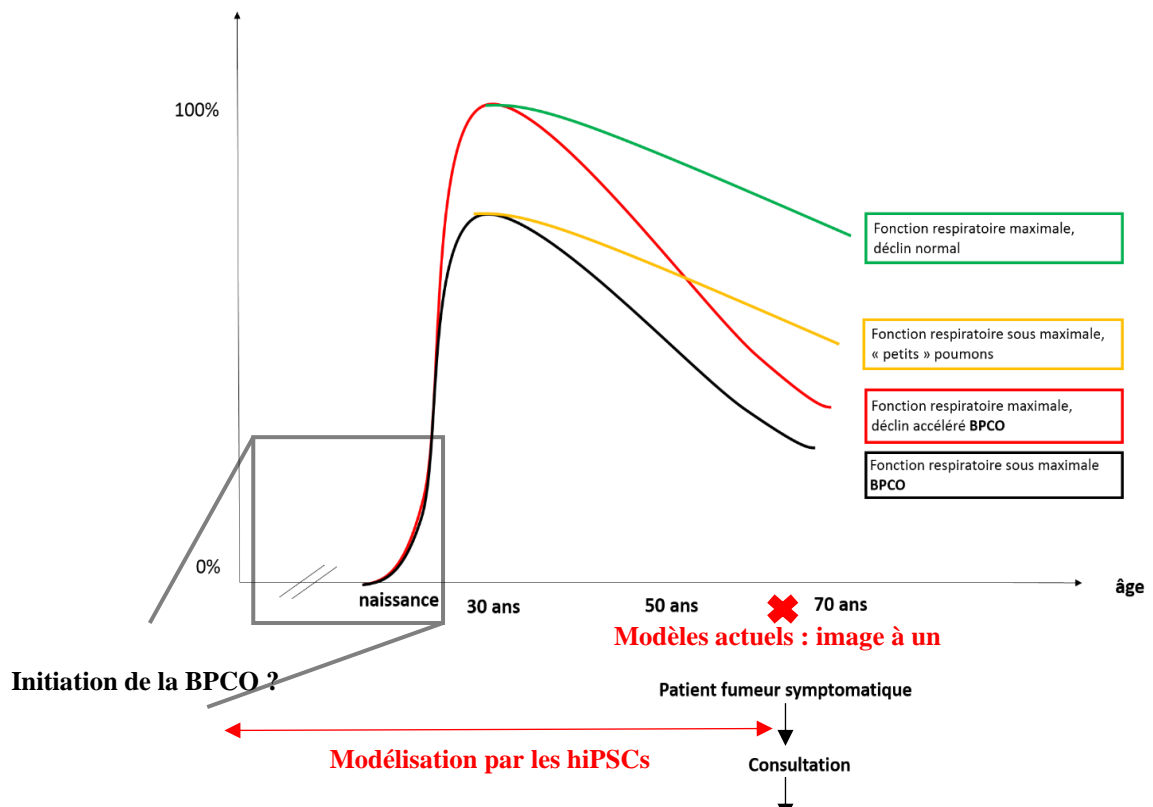


Figure 14 : Figure représentant les trajectoires de la BPCO et le défi de la modélisation de l'hypothèse développementale de la BPCO humaine.

1.1. Etude INVECCO et méthodologie

Cette étude s'effectue dans le cadre du projet INVECCO (Modeling Bronchial Epithelium Modifications Associated With COPD Using iPS, ClinicalTrials.gov Identifier : NCT03181204).

1.1.1. Critères de sélection des patients BPCO et des patients contrôles sains

Selon les études épidémiologiques les plus récentes, plus de 55% des patients BPCO auraient une origine pédiatrique de la maladie, pouvant être en lien avec susceptibilité génétique. Cependant, les GWAS ont jusqu'à présent échoué à identifier de façon reproductible des gènes candidats de « susceptibilité » de la BPCO, malgré une puissance croissante des études grâce à de très larges cohortes. Notre hypothèse pour expliquer cette discordance est que les patients BPCO sont souvent peu ou mal caractérisés et qu'il existe une très grande hétérogénéité des BPCO en fonction de facteurs tels que l'existence d'un « asthme » associé, les habitudes du

patient (fumeur/non-fumeur), la sévérité de la maladie, l'âge, les trajectoires différentes menant à la BPCO. Cette hétérogénéité pourrait être liée à d'éventuelles susceptibilités génétiques différentes, et expliquerait l'échec des études GWAS à identifier des gènes de prédisposition à la BPCO, communs à l'ensemble du spectre de la maladie.

Par conséquent, nous avons voulu constituer un groupe le plus homogène possible en incluant des patients hautement phénotypés et caractérisés afin de réduire au maximum ce biais et inclure des patients jeunes (< 50 ans), sévères (GOLD III/IV) avec un début précoce de la maladie, tout en excluant les formes monogéniques les plus fréquentes : le déficit en $\alpha 1$ anti-trypsine et les mutations TERT associées à la BPCO. L'hypothèse est que cette population avec une forme sévère et précoce nous permettrait de détecter avec plus « de chances cette susceptibilité » *in vitro*.

La seconde question qui s'est posée lors de l'élaboration de l'étude a été d'identifier le groupe contrôle le plus adapté afin de répondre à la question biologique de la susceptibilité de certains fumeurs à la BPCO par rapport à d'autres. Cette susceptibilité individuelle au tabac pourrait être innée ou acquise. Le groupe le plus adapté afin de répondre à cette question est donc un groupe de patients exposés au tabac mais indemnes de BPCO, dits « fumeurs résistants ». De la même manière que pour le groupe BPCO, nous avons choisi des patients hautement caractérisés et extrêmement caricaturaux : une exposition importante au tabac, des patients d'environ 50 ans qui n'ont développé aucune comorbidité liée au tabac (cardiovasculaire, cancer principalement).

Nous avons prévu d'inclure 4 patients « hautement susceptibles » et 4 patients « résistants ». A ce jour, nous avons inclus l'intégralité des patients BPCO et 1 fumeur sain (groupe contrôle).

1.1.2. Que modéliser et comment ?

Nous avons fait le choix de modéliser l'épithélium bronchique car il est le premier contingent anatomique directement en contact avec l'environnement, en particulier les agressions extérieures tel que le tabac. La littérature montre qu'il existe des anomalies de la réparation et du dialogue avec d'autres sous types cellulaires. Notre première hypothèse est qu'il serait le chef d'orchestre de la BPCO. Afin d'avoir l'opportunité de saisir une différence biologique pertinente, nous avons monitoré la différenciation au cours du modèle iPSC (Figure 15).

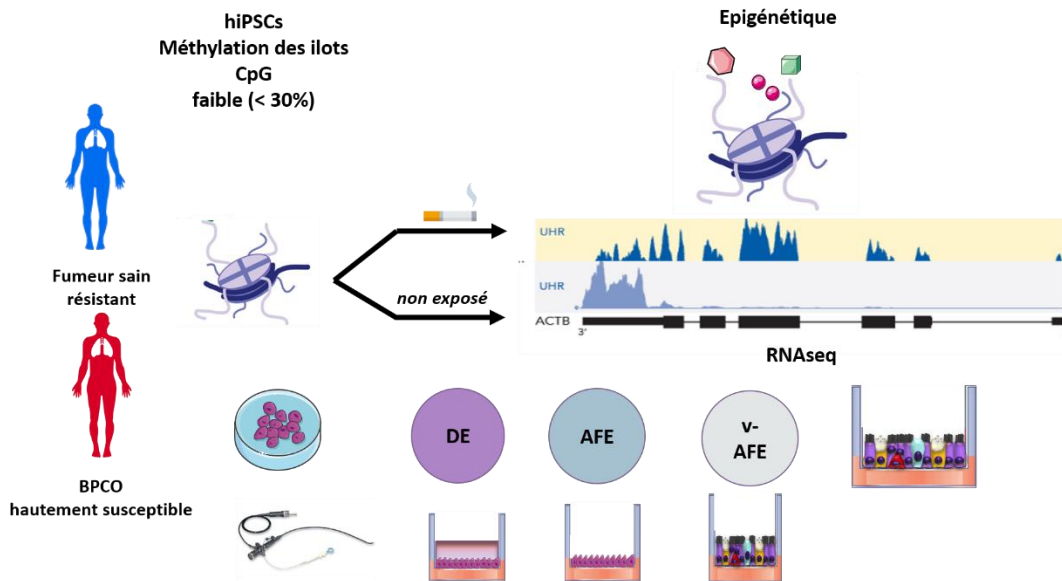


Figure 15 : Flowchart de l'étude. Les critères de jugement clé de l'étude sont le monitoring de la différenciation des iPSC en culture, en condition exposée et non exposée pour les deux groupes de malades (susceptibles et résistants). La reprogrammation induisant un effacement du paysage épigénétique de la cellule parentale, notre hypothèse est de récapituler la maladie en exposant les iPSC au tabac tout au long de la différenciation.

Le modèle que nous avons mis en place est la différenciation des hiPSCs en structures épithéliales bronchiques « like ». L'exposition au tabac de ces étapes modélise le facteur de risque le plus fortement associée « aux origines pédiatriques » de la BPCO : l'exposition in utéro au tabac. La différenciation des hiPSCs est monitorée par RNAseq, en condition exposée et non exposée à des différents moments de la différenciation, correspondant à des étapes clé du développement humain : endoderme définitif, AFE, v-AFE (progéniteurs bronchiques NKX2.1) et épithélium mature.

Le modèle iPSC offre le grand avantage de modéliser pour la première fois l'impact d'une exposition au tabac et son impact sur le développement humain pulmonaire précoce, tout en prenant en compte à la fois l'éventuelle part génétique et l'aspect épigénétique de la BPCO. En effet, nous anticipons que les différences retrouvées en RNAseq avant même toute exposition nous permettrons de mettre en évidence des différences entre les deux groupes de patient, indépendante de l'environnement : c'est la susceptibilité intrinsèque des patients, pouvant être rattachée à leur fond génétique.

Les différences de profil de RNAseq qui seront mise en évidence entre le groupe BPCO « hautement susceptible » et le groupe « résistant » après exposition au tabac pointeront des modulations de l'expression de gène en lien à la fois à la susceptibilité et à l'environnement (exposition). Il est important de noter que le groupe fumeur sains prend tout son sens dans cette

comparaison car seuls les gènes candidats retrouvés chez les BPCO (signature de la maladie) et non pas ceux régulés dans les groupes (signature liée au tabac) seront pris en compte. Aussi, la reprogrammation cellulaire permettant d’effacer la mémoire épigénétique initiale, nous pourrons suivre au cours de la différenciation des iPSC comment les signaux se « ré-allument » dans le groupe BPCO (Figure 16).

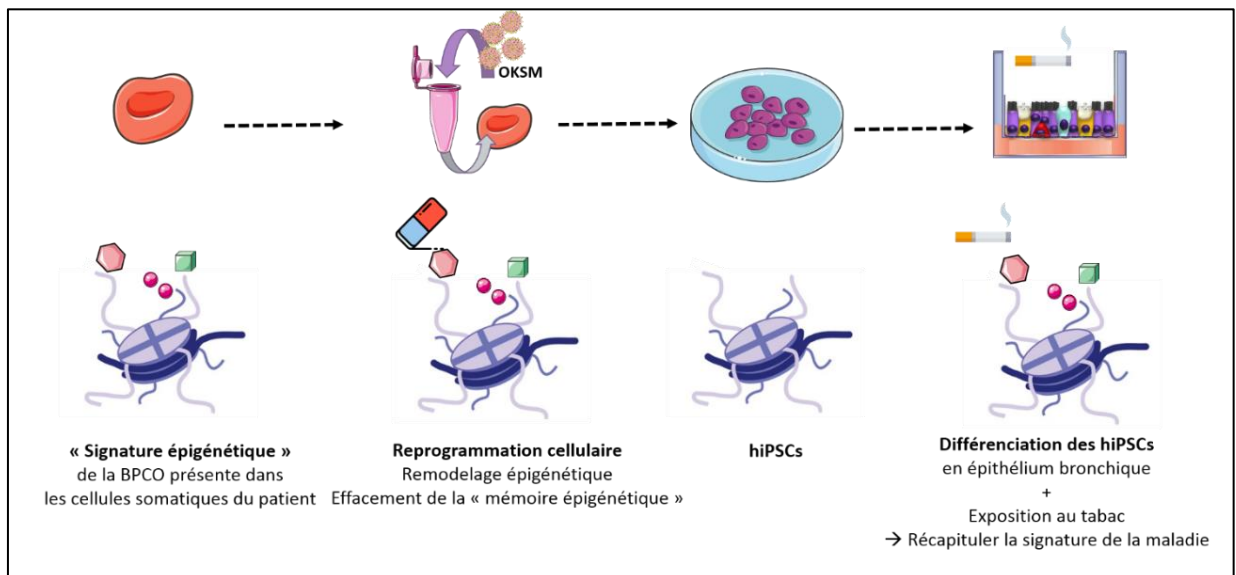


Figure 16 : Modifications dynamiques épigénétiques attendues au cours de l’étude.

1.2. Objectif

L’objectif de ces travaux est la mise en place d’un nouvel outil de modélisation in vitro de la BPCO afin de comprendre les origines et l’initiation de la maladie. Pour cela, nous avons mis au point protocole de différenciation dirigée des hiPSCs en progéniteurs bronchiques NKX2.1+ puis en structure bronchique « like ». Ce protocole de différenciation a été réalisée sur des hiPSCs de sujets sains non-fumeurs, fumeurs, BPCO sévère et d’un patient atteint de maladie monogénique (dyskinésie ciliaire primitive).



**Efficient differentiation of human induced pluripotent stem
cells into functional airway epithelium.**

Journal:	<i>American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine</i>
Manuscript ID	Blue-202006-2551OC
Manuscript Type:	OC - Original Contribution
Date Submitted by the Author:	26-Jun-2020
Complete List of Authors:	Ahmed, Engi; CHU Montpellier, Respiratory Disease Department and IRMB Fieldes, Mathieu; University of Montpellier, IRMB Bourguignon, Chloe; University of Montpellier, IRMB Mianne, Jofrey; University of Montpellier, IRMB Petit, Aurelie; CHU Montpellier, Respiratory Disease Department - Vernisse, Charlotte; CHU Montpellier, Respiratory Disease Department Jory, Myriam; Laboratoire Charles Coulomb (L2C), UMR 5221 CNRS-UM F34095 Cazevielle, Chantal; University of Montpellier, MRI-COMET boukhaddaoui, Hassan; University of Montpellier, Montpellier Ressources Imagerie (MRI) Garnett, James; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH and Co KG Forschungs- und Entwicklungs-Standort Biberach, Immunology & Respiratory Diseases Research Massiera, Gladys; Laboratoire Charles Coulomb (L2C), UMR 5221 CNRS-UM F34095 Vachier, Isabelle; CHRU Montpellier, Respiratory Disease Department Assou, Said; University of Montpellier, IRMB, INSERM U1183 Bourdin, Arnaud; CHU Montpellier, De Vos, John; University of Montpellier, IRMB; CHRU de Montpellier, UTC
Subject Category:	7.18 Mucosal Immunity of the Respiratory Tract < IMMUNOLOGY AND INFLAMMATION, 9.09 COPD: General < LUNG DISEASES, 3.24 Cell Fate, Non-Inflammatory Cell Types: Stem Cells/Tissue Regeneration < CELL AND MOLECULAR BIOLOGY
Keywords:	airway epithelium, chronic obstructive pulmonary disease, primary ciliary dyskinesia, disease modeling, human induced pluripotent stem cells

1 Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells
2 into functional airway epithelium.

3 Engi Ahmed ^{1,#}, Mathieu Fieldes ^{1,#}, Chloé Bourguignon ¹, Joffrey Mianné ¹, Aurélie Petit²,
4 Charlotte Vernisse³, Myriam Jory⁴, Chantal Cazevielle⁵, Hassan Boukhaddaoui^{5,6}, James P.
5 Garnett^{7,8}, Gladys Massiera⁴, Isabelle Vachier², Said Assou¹, Arnaud Bourdin^{2, 3,*}, John De
6 Vos^{1,9,*}

7 ¹ IRMB, Univ Montpellier, INSERM, CHU Montpellier, Montpellier, France

8 ² Department of Respiratory Diseases, Univ Montpellier, CHU Montpellier, INSERM,
9 Montpellier, France

10 ³ Centre PhyMedExp, Univ Montpellier, INSERM U1046, Montpellier, France.

11 ⁴ Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5221, Laboratoire Charles Coulomb, Univ
12 Montpellier, Montpellier, France

13 ⁵ Institut des Neurosciences de Montpellier, Univ Montpellier, Montpellier, France

14 ⁶ Montpellier Ressources Imagerie (MRI), Univ Montpellier, Montpellier, France

15 ⁷ Immunology & Respiratory Diseases Research, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.
16 KG, Biberach an der Riss, Germany

17 ⁸ Translational and Clinical Research Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne,
18 United Kingdom

19 ⁹ Department of Cell and Tissue Engineering, Univ Montpellier, CHU Montpellier,

20 Montpellier, France

21 #* These authors contributed equally to this work

22 * Co-senior authors

23

For Review Only

24

25 **Corresponding authors:**

26 Arnaud Bourdin, Department of Respiratory Diseases, Hôpital Arnaud de Villeneuve,
27 Montpellier, France. Email: a-bourdin@chu-montpellier.fr

28 John De Vos, Department of Cell and Tissue Engineering, Hôpital Saint-Eloi, 80 Avenue
29 Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France. Email: john.devos@inserm.fr

30

31 **Author Contributions**

32 E.A., M.F., S.A., A.B., and J.D.V designed the study and analyzed data; E.A., M.F., S.A., C.B.,
33 J.M., A.P., C.V., M.J., C.C., H.B. performed the experiments, collected and analyzed data; M.J.
34 and G.M. analysed biophysical data .E.A., M.F., S.A., I.V., J.P.G, A.B., and J.D.V wrote the
35 paper. All authors approved the final version prior to submission.

36 **Category numbers:** 7.18, 9.09 and 3.24

37 **Key words:** airway epithelium; chronic obstructive pulmonary disease; primary ciliary
38 dyskinesia; disease modeling; human induced pluripotent stem cells.

39 Running title: turning blood into iALI

40 Word count:

41 Abstract: 250

42 Manuscript: 3614

43

44 This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content
45 online at www.atsjournals.org.

46 **Funding**

47 Supported by grants from the University Hospital of Montpellier (Appel d'offre interne, projet
48 CILIPS 9174, projet INVECCO), the association "Gueules Cassées" (Grant #17-2015), the
49 association Vaincre la Mucoviscidose (Grant #RIF20170502048), the Fondation pour la
50 Recherche Médicale (Grant #FDM20170638083), the Labex Numev (ANR-10-LAB-20) and
51 Boehringer Ingelheim.

53 **Abstract**

55 **Rationale**

56 Highly reproducible *in vitro* generation of human bronchial epithelium from pluripotent stem
57 cells is an unmet key goal for drug screening to treat lung diseases. The possibility of using
58 induced pluripotent stem cells (hiPSC) to model normal and diseased tissue *in vitro* from a
59 simple blood sample will reshape drug discovery for chronic lung, monogenic and infectious
60 diseases.

61 **Methods**

62 We devised a simple and reliable method that drives a blood sample reprogrammed into hiPSC
63 subsequently differentiated within 45 days into air-liquid interface bronchial epithelium (iALI),
64 through key developmental stages, definitive-endoderm (DE) and Ventralized-Anterior-
65 Foregut-Endoderm (vAFE) cells.

66 **Results**

67 Reprogramming blood cells from one healthy and 3 COPD patients, and from skin-derived
68 fibroblasts obtained in one PCD patient, succeeded in 100% of samples using Sendai viruses.
69 Mean cell purity at DE and vAFE stages was greater than 80%, assessed by expression of
70 CXCR4 and NKX2.1, avoiding the need of cell sorting. When transferred to ALI conditions,
71 vAFE cells reliably differentiated within 4 weeks into bronchial epithelium with large zones
72 covered by beating ciliated, basal, goblets, club cells and neuroendocrine cells as found *in vivo*.
73 Benchmarking all culture conditions including hiPSCs adaptation to single-cell passaging, cell
74 density and differentiation induction timing allowed for consistently producing iALI bronchial
75 epithelium from the five hiPSC lines.

76 **Conclusions**

77 Reliable reprogramming and differentiation of blood-derived hiPSCs into mature and
78 functional iALI bronchial epithelium is ready for wider use and this will allow better
79 understanding lung disease pathogenesis and accelerating the development of novel gene
80 therapies and drug discovery.

81

82 **Introduction**

83 Lung chronic diseases result from exposure to environmental aggressors (e.g. microorganisms,
84 tobacco smoke, particles from biomass combustion or air pollution), genetic abnormalities, and
85 unknown factors. Chronic lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease
86 (COPD), are one of the leading causes of death worldwide (1). Highly efficient, reproducible,
87 and reliable protocols to produce fully differentiated airway epithelium are required for high-
88 throughput screening of therapeutic small molecules, mechanistic studies, and gene or cell
89 therapy development. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent an attractive opportunity
90 compared with the existing solutions because they can yield a virtually unlimited amount of
91 any differentiated cell type (2). The recent description of protocols to differentiate human
92 pluripotent stem cells (PSCs) into bronchial epithelium has been encouraging (3–11). Overall,
93 these protocols rely on the knowledge gathered on normal lung development in mammals
94 (12). Briefly, lung embryogenesis starts with the formation of the definitive endoderm (DE).
95 Then, during the 4th week of human embryonic development, the primitive gut appears and can
96 be divided into foregut, midgut, and hindgut. Early pulmonary development starts from the
97 ventral area of the anterior foregut endoderm (vAFE). From this zone, which is characterized
98 by the expression of the transcription factor NKX2.1, the respiratory diverticulum will emerge
99 and form the trachea, and then bronchi, bronchioles, and finally alveoli. These steps can be
100 recapitulated *in vitro* by differentiating PSCs first into DE by exposure to high doses of activin
101 A, and then by driving DE cells towards vAFE differentiation by dual inhibition of the BMP
102 and TGF β signalling pathways (13). Finally, vAFE cells are specifically differentiated into lung
103 progenitors and then bronchial cells. However, the protocols for PSC differentiation into
104 bronchial epithelium present several limitations, and multiplicity of protocols were rarely
105 described in detail. Most of them are effective on a very limited number of cell lines, most often

106 reprogramming healthy control cells or require an enrichment step based on a specific NKX2.1+
107 cell selection at the vAFE stage using flow cytometry and cell surface markers (e.g.
108 carboxypeptidase M (CPM)+ cells(9) or CD47^{hi}CD26^{lo} cells (14)), or a final differentiation step
109 in 3D culture conditions (8, 10). Others require important technical skills and are difficult to
110 replicate (15). We searched PubMed and Embase (abstracts) and examined all other potential
111 sources (meeting abstracts, social networks) linking PSC to airway epithelial cell derivation up
112 to 10 February 2020.

113 Here, we developed an approach to differentiate human iPSCs (hiPSCs) into proximal airway
114 epithelium enriched in ciliated cells, using a straightforward protocol that does not require any
115 cell purification step. Careful in-home reprogramming and then culture adaptation to single-
116 cell passaging together with a precise timing and reagent benchmarking for each differentiation
117 step led to the successful generation of fully differentiated and functional bronchial epithelium
118 in air-liquid interface (ALI) culture conditions from hiPSCs (iALI bronchial epithelium). We
119 successfully used this protocol to differentiate five hiPSC lines, among which three were
120 derived from patients with severe COPD. This study highlights the criticality of evaluating
121 expansion and differentiation conditions for achieving optimal phenotypic and functional
122 endpoints such as ciliary beat frequency (CBF), mucus flow velocity, presence of differentiated
123 cells, transepithelial electrical resistance (TEER). This simple protocol to produce hiPSC-
124 derived bronchial epithelium in ALI culture conditions (iALI bronchial epithelium) will
125 facilitate modelling small airway diseases *in vitro*, developing novel gene or cell therapies, and
126 drug discovery.

127

128

129 **Materials and Methods**

130 **Clinical characteristics of reprogrammed and differentiated cells.**

131 Patients included were defined as severe, with early-onset COPD as FEV1/FVC less than 0.70
132 and FEV1 percent predicted less than 50% on postbronchodilator spirometry in subjects less
133 than 55 years of age. Normal donors and patients with primary ciliary dyskinesia (PCD) were
134 recruited in the framework of the CILIPS project. More detailed clinical data are **available**
135 **online (Supplemental Figure 1, supplemental Tables 1 & 2).**

136

137 **Human ESC and iPSC generation and maintenance**

138 The hiPSC lines PCD02.30 (UHOMi001-A)(16), HY03 (UHOMi002-A), iCOPD2
139 (UHOMi003-A), iCOPD8 (UHOMi004-A) and iCOPD9 (UHOMi005-A) were reprogrammed
140 using the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific, cat.no
141 A16517), according to the manufacturer's instructions (unpublished results). Emerging hiPSC
142 clones were mechanically selected and clonally expanded using mechanical passaging at early
143 passages (<10 passages). At least three clones for each patient were maintained and their genetic
144 stability was confirmed (Supplemental figure 2). Pluripotency was confirmed by alkaline
145 phosphatase activity staining, SSEA3/4 and TRA1-60 cell surface expression by flow
146 cytometry as previously published(16). The human ESC line HD291 was derived in our
147 laboratory (17). The RSP4 and 131007 iPSC lines were derived by the Safe IPS platform
148 (Montpellier, France) using retroviruses and Sendai vectors, respectively. PSC lines were
149 maintained in undifferentiated state in feeder-free conditions on growth factor-reduced Geltrex
150 (Thermo Fisher Scientific) in E8 medium (Thermo Fisher Scientific). Cells were cultured in

151 35-mm dishes at 37 °C and were dissociated mechanically (under an optical microscope) or
152 into single cells at 90% of confluence (every 4-5 days). Single-cell passaging was performed
153 by adding the Versene solution (Thermo Fisher) at 37°C for 5 min and then seeding at 1:10 to
154 1:20 ratio with addition of 10µM of the ROCK inhibitor Y-27632 (Tocris). The E8 maintenance
155 medium was changed every day.

156

157 **PSC differentiation**

158 Differentiation was carried out as described in figure 2A, using reagents at the concentrations
159 listed in supplemental tables 2 and 3. Cells were plated at high-density (one 35mm dish for two
160 Transwell inserts) on Transwell inserts coated with Geltrex. During the differentiation process,
161 medium was changed every day. Cells were differentiated under hypoxia condition (5% O₂,
162 37°C).

163 **Statistical analysis**

164 Data are presented as means and standard deviations (s.d. or S.E.M), and graphs were generated
165 with GraphPad (Prism, v 6.01). All shown data are from experiments repeated at least three
166 time. P <0.05 indicated significant differences between groups.

167

168 **Results**

169 **Reprogramming from a blood sample or skin-derived fibroblasts**

170 Skin-derived fibroblasts from the patient with primary cilia dyskinesia (PCD)(16) or peripheral
171 blood mononuclear cells from the healthy control and the three patients with severe COPD and
172 were reprogrammed using Sendai virus to generate the PCD02.30, HY03, iCOPD2, iCOPD8,
173 and iCOPD9 hiPSC lines, respectively (figure 1). From venepuncture, PBMC were Ficoll-

174 isolated and cultured using stem SPAN SFEMII ® kit enriched with cytokines (IL3, SCF, EPO)
175 in order to promote Erythroid Progenitor (EP) expansion. CD45, CD34, CD71 and CD36
176 monitoring were required to optimize yield of EP expansion before Sendai virus transduction.
177 C-myc, KLF4, SOX2 and OCT4-containing Sendai viruses were concomitantly added once to
178 the EP culture for three days. After transfer into Geltrex, hiPSC clones were observed 30 days
179 after blood sampling. For all the 4 studied samples, the success rate was 100%. Pluripotency
180 was confirmed by demonstrating phosphatase alkaline activity, cell surface SSEA3/4 and
181 TRA1-60 expression, and OCT4, NANOG, SOX2 mRNA expression. HiPSC genetic integrity
182 was assessed by ddPCR (iCS digital) (supplemental figure 2A and B)(18). One of the COPD-
183 reprogrammed iPSC clones (iCOPD2) was found to harbour one genomic abnormality, copy
184 number gain in 20q11.21, yet differentiation could still be achieved with this clone.

185 **Adaptation of hiPSCs to single-cell culture is mandatory for a successful differentiation**
186 **process and allows high rate of definitive endoderm induction.**

187 The differentiation protocol, including the successive developmental steps leading from hiPSC
188 to iALI, is schematized in figure 2A. To develop a robust differentiation protocol, we
189 benchmarked the timing, the cell density and the method of passaging, factors that were crucial
190 for achieving reliable rates of DE purity and quality. hiPSC lines were passaged as single cells
191 because hiPSC clumps were partly resistant to DE induction, as evidenced by OCT4 expression
192 persistence. Optimal cell adaptation was obtained by gentle colony dissociation into small
193 clumps for five passages, and then into single cells for at least 5-10 passages, using Versene
194 (EDTA) in the presence of Y-27632 (figure 2B). Adaptation to single-cell passaging was
195 deemed mandatory to prevent massive cell death after cell plating for APS induction (Figure
196 2C). Then, the differentiation process was started by adding activin A, and CHIR99021 (a
197 GSK3 inhibitor that acts as a WNT pathway agonist) in the presence of the ROCK inhibitor Y-

27632 for one day (day 1; Anterior Primitive Streak figure 2A and supplemental table 3) followed by activin A, LDN-193189 and Y-27632 for 1-2 days, leading to DE induction. To optimize the protocol, various intervals between hiPSC plating and anterior primitive streak (APS) induction, as well as different cell densities (from 70 to 130K cells/cm²) were tested (figure 2D-E). Indeed, plating cells at too low density led to important cell death, whereas too high density led to persistent and sustained OCT4 expression (figure 2F). This optimized protocol robustly yielded in average more than 80% of CXCR4⁺ DE cells within 2-3 days without cell sorting, and was validated using the five hiPSC lines described above and compared with one human embryonic stem cell (ESC) and two other hiPSC lines (n=170 independent experiments, using eight different PSC lines) (figure 3A-C and supplemental figure 3). Moreover, DE cells expressed characteristic endoderm transcription factors FOXA2 and SOX17 (figure 3D-E). Pluripotent markers NANOG, SOX2 and OCT4 progressively switched off with the stage progression (figure 4E). Morphological changes, such as the emergence of cuboidal-shaped cells, were a reliable indicator of optimal DE differentiation (day 2-3, figure 3A).

Efficient induction of high purity NKX2.1+ lung progenitors without need for cell sorting

The comparison of various combinations of growth factors for vAFE induction showed that DE cells needed minimal cell signalling, and therefore, were grown in RPMI1640 basal medium with B27 minus vitamin A (figure 2A and Supplemental tables 2, 4 and 5). For efficient vAFE induction, a DE cell population with at least 80% of CXCR4⁺ cells was required. Time course experiments showed that at 24-36 hours after LDN-193189 addition, there was a narrow window when cells showed optimal conditions (i.e. high CXCR4 expression and high viability) for vAFE induction. 3D bud-like structures emerged between days 4-8 and appeared to be a good morphological indicator of vAFE differentiation that could be followed by optical

222 microscopy (figure 3A, red arrows). In these conditions, >80% of cells consistently expressed
223 NKX2.1, as indicated by flow cytometry and confirmed by immunolabelling, in six different
224 PSC lines (n=46 independent experiments, using six different PSC lines) (figure 4 A and B,
225 supplemental figure 3). The optimum percentage of NKX2.1+ cells (>80%) was observed
226 around day 3 after vAFE induction (figure 4C). This result was confirmed by immunostaining
227 at v-AFE, that showed a gradual increase of NKX2.1 expression over the time (Supplemental
228 figure 4A). This NKX2.1 expression level was required to induce an efficient differentiation
229 process towards iALI. When this NKX2.1 expression level was not reached, usually in
230 association with high cell loss, cells were discarded, and the differentiation protocol restarted.
231 Interestingly, we were able to detect SOX2, SOX9 expression at protein level by
232 immunostaining. Three populations were observed, SOX2+/SOX9-, SOX2-/SOX9+ and
233 bipotent progenitors SOX2+/SOX9+, as previously reported *in vivo* during human lung
234 development (figure 4D, supplemental figure 4B)(19). Extinction of pluripotency markers such
235 as OCT4 and NANOG expression were observed at this stage, compared with the DE stage
236 (figure 4E-G). NKX2.1 bronchial progenitor cells exhibited a high proliferation rate, assessed
237 by Ki67 labelling (Supplemental figure 4C). Terminal airway epithelial markers (keratin 5
238 (KRT5), tumour protein 63 (TP63), forkhead box J1 (FOXJ1)) were not detected during v-AFE
239 induction, ascertaining the immature feature of these progenitor cells. Proliferative, relatively
240 undifferentiated features of bronchial progenitor cells are consistent with other human iPSC
241 protocol differentiation(14) and with *in vivo* mouse lung development(19) (20). As NKX2.1 is
242 also expressed in other developing tissues (figure 4F), we also assessed the purity of NKX2.1
243 cells by confirming the absence of contamination by RT-qPCR analysis of specific mRNA for
244 thyroid gland (thyroglobulin (TG)) and brain (Paired Box 6 (PAX6)) cell markers, as well as
245 liver (alpha-fetoprotein (AFP)) and gut (caudal type homeobox 2 (CDX2)) markers (figure 4G).

246 Absence of liver contamination was also confirmed at the protein level by AFP
247 immunolabelling (Supplemental figure 4D).

248 **Specification of NKX2.1 lung progenitor cells under 2D ALI culture conditions lead to**
249 **functional, multi ciliated airway epithelium.**

250 iPSC-derived ALI (iALI) bronchial epithelium was obtained from five different iPSC lines,
251 including the three COPD-hiPSC lines (n>3 independent experiments per cell line). v-AFE cells
252 were mechanically dissociated into small clumps and plated at high density on Transwell inserts
253 in PneumaCult-Ex Plus medium (Day 9, figure 2A). At day 2 post-seeding in PneumaCult-Ex
254 Plus medium, cells were progressively switched to PneumaCult-ALI maintenance medium.
255 Four days after seeding on Transwell inserts, medium was removed from the apical side to
256 switch to ALI culture (“polarization”). DAPT, a γ -secretase inhibitor that blocks NOTCH signal
257 transduction, was added to the culture medium present in the basolateral part of the Transwell
258 from day 14 to day 28 post ALI (figure 2A and supplemental table 3).

259

260 **Epithelium with barrier function**

261 iPSC-derived epithelial cells reached confluence after the four days of submerged growth
262 conditions (figure 3A). Features consistent with epithelium could be identified by optical
263 microscopy at late iALI stage (day 42+; figure 5A) and attested by E-cadherin protein
264 expression (figure 5A). Transmission electron microscopy of day 34 post-ALI cultures
265 identified adherent junctions confirming the presence of junctional complexes (Supplemental
266 figure 5A). Barrier integrity of cells during ALI 2D-culture differentiation was assessed by
267 transepithelial electric resistance (TEER). TEER increased significantly during the
268 differentiation process (Supplemental figure 5B), reaching around 300 Ω .cm² and could be
269 maintained for >200 days of culture.

270

iALI generates both major and rare solitary human airway epithelial cells

272 After 45 days of differentiation, the main bronchial epithelium cell types were observed: basal
273 cells (KRT5 and TP63), ciliated cells (tubulin beta 4, TUBIV), goblet cells (mucin-5AC,
274 MUC5AC), club cells (CCSP, SCGB1A1) and neuroendocrine cells (chromogranin A, CHGA)
275 (figure 5B to F). Club cells and goblet cells could be detected in iALI culture as early as day 14
276 (figure 5G and I). MUC5AC positive cells were detected by immunofluorescence (figure 5E
277 and G) and supported by a protein release in the supernatant detected by Dot blot analysis,
278 Alcian blue staining and Periodic acid Schiff (PAS) (figure 5H and I). Interestingly, we were
279 able to detect either CCSP⁺/MUC5AC⁻ cells and CCSP⁻/MUC5AC⁺ but also a small number of
280 double positive CCSP⁺/MUC5AC⁺ cells as soon as day 14 post ALI (figure 5G), by
281 colocalization confocal analysis (Supplemental figure 5C). Scanning electron microscopy
282 (SEM) revealed the formation of mucin bundles in culture (Supplemental figure 5A, right lower
283 panels). Concentration of secreted CCSP ranged from 23 to 486 ng/mL, depending on the cell
284 line and experiment (figure 5H). Neuroendocrine cells were also detected both at mRNA and
285 protein level, assessed by CHGA (figures 5F, K). Finally, SEM and TEM acquisitions
286 suggested the presence of another rare epithelial subset of cells harbouring microvilli, also
287 known as brush/tuft cells (Supplemental figure 5A, red asterisk), previously described in
288 proximal airway and in terminal bronchioles (21, 22).

289

Functional multiciliated cells airway epithelium

291 Ciliogenesis was revealed by observation of cilia beating by optical microscopy and by
292 immunofluorescent labelling of the cilia-associated protein β 4-tubulin (TUBIV) (figure 6A).
293 Apically localized cilia identified by immunofluorescence labelling were usually observed only
294 after 21 to 28 days post-ALI in all five iPSC derived lines irrespective of the underlying disease.

295 Dynein axonemal heavy chain 5 (DNAH5) staining was observed throughout the ciliary
296 axoneme (Supplemental figure 5D). This is consistent with *in vivo* findings of human airway
297 epithelial cells isolated by brushing obtained at endoscopy (23). The morphology of
298 multiciliated cells was examined using optical microscopy and electron microscopy, either by
299 SEM or TEM (figure 6B-C). TEM cilia structure was characterized as expected by a nine
300 peripheral doublet and a central pair of singlet microtubules (figure 6C), specific of motile cilia
301 (24).

302 Cilia length in iALI was assessed by both optical microscopy and SEM and compared with
303 freshly acquired epithelial cells obtained during endoscopic brushing and classical ALI-
304 cultured airway epithelium. Average cilia length was roughly similar in ALI and iALI when
305 measured either by optical microscopy or SEM (figure 6D). No obvious difference in cilia
306 length was observed between COPD patient-derived iALI and healthy patient-derived iALI or
307 ALI or bronchial brushing. We were able to observe cilia beating using a high-speed camera
308 after isolation of patches of iALI epithelium (Supplemental movie 1), but also on Transwell
309 membrane (Supplemental movie 2). In addition, we acquired cilia beating by live
310 immunostaining using SiR-conjugated fluorogenic probes, SiR-tubulin (Supplemental movie
311 3).

312 To establish the mucociliary clearance capacity of the 2D cultures, CBF and mucociliary flow
313 were recorded. iALI cultures had a CBF of 14.3 ± 1.8 Hz, consistent with the frequency of
314 ciliated cells from ALI-cultured primary airway epithelium (figure 6E) (25).

315 Cultures presented cup-shaped structures with high density of ciliated cells actively beating,
316 giving rise occasionally to localized vortexes (figure 6E, left bottom panel, Supplemental movie
317 2). The estimated flow velocity of the vortex was approximately 5.6 ± 6.5 $\mu\text{m/s}$. The iALI
318 bronchial epithelia maintained beating cilia for more than 300 days without cell passaging and

319 without aneuploidy appearance (Supplemental figure 2B). Moreover, cultures could be
320 passaged at least three times after iALI generation.

321

322 **Discussion**

323 In this study, we described the generation of iALI bronchial epithelium that represents an
324 attractive alternative to animal models and *ex vivo* cultures of differentiated bronchial
325 epithelium from endobronchial biopsy specimens. Our differentiation protocol offers a virtually
326 unlimited source of homogeneous reliable human bronchial epithelium. Multi-cellularity is
327 required for optimized platforms to uncover new drugs using patient-derived iPSCs (26).
328 Importantly, this protocol was carried out successfully by four different members of the
329 research group, at least 3 times for each cell lines.

330 We identified several critical factors that ensure the efficiency and reproducibility of airway
331 epithelium differentiation from human PSCs. First, reprogramming and differentiation were
332 achieved in the same facility by the same team and we do believe this greatly helped for
333 optimally handling hiPSC and decide when to optimally start differentiation for example,
334 Selection of clones should be cautious, relying on 1) absence of peripheral signs of spontaneous
335 differentiation, 2) differentiation abilities assessed by levels of CXCR4 expression at the DE
336 stage and 3) ruling out genetic abnormalities by karyotyping or copy counting approaches (18).
337 We noted that PSCs must be adapted to single-cell culture to obtain a homogeneous cell
338 seeding. Non-adapted cells rapidly die when plated as single cells at low-medium densities,
339 even in the presence of the ROCK inhibitor Y-27632. When we tried to plate non-adapted cells
340 as large clumps or at high cell density, cell death was reduced, but differentiation was hampered
341 (figure 2E). This could be explained by sustained expression of pluripotency transcription
342 factors within the clumps and/or by altered YAP/TAZ signalling activity. DE and vAFE cell
343 enrichments (assessed by CXCR4 and NKX2.1 expression) achieved at least in 80% of cells at

344 the relevant step were good predictors of the final success of the differentiation process. Based
345 on the work by Matsuno et al (13), we found that APS induction by activation of the activin
346 A/nodal and WNT pathways for 24h, followed by two additional days of activin A activity and
347 TGF β pathway inhibition for DE induction, without addition of other cytokines or small
348 molecules during vAFE stage, was the most effective strategy. Both SOX2 and SOX9 were
349 observed at the vAFE stage with double positive cells. These bipotent cells were only found in
350 human in the literature and this increased our confidence in the model as it fits with the
351 progenitor patterning (19). Another key point was the use of the PneumaCult differentiation
352 medium. This proprietary medium, the composition of which is not disclosed, efficiently
353 promotes the differentiation of primary cells obtained from bronchial biopsies. While we cannot
354 exclude that this medium might contain a NOTCH pathway inhibitor, we nonetheless added
355 DAPT to our differentiation protocol. NOTCH signalling inhibition promotes the
356 differentiation into multi-ciliated cell at the expenses of club cells (27). This protocol generated
357 epithelia containing double positive CCSP⁺/MUC5AC⁺ cells, single CCSP⁺/MUC5AC⁻ and
358 CCSP⁻/MUC5AC⁺ positive cells but largely predominated by basal and ciliated cells.
359 Interestingly, rare cells such as chromogranin A-expressing neuroendocrine cells and tuft cells
360 were found in our model. Altogether, these features suggest that the generated epithelia
361 reproduced many features of a fully differentiated bronchiolar epithelium (28). The
362 physiological relevance of the model was reinforced by similar to *in vivo* plugs of mucus
363 evidenced both by Alcian blue and PAS staining, the formation of vortexes of mucociliary
364 clearance, cilia length and CBF matching with physiological data.

365 Besides its reproducibility and simplicity, our protocol provides a 2D bronchial epithelium,
366 unlike other methods that lead to 3D ciliated organoids (8, 10, 11). 2D iALI cultures offers an
367 affordable model to recapitulate a multicellular bronchiolar epithelium, in which both the
368 serosal and luminal surfaces are accessible for measurements and manipulation and are

369 amenable to higher complexity, such as the addition of immune cells, but potentially also
370 smooth muscle and nerves in the future (29). To the best of our knowledge, these three COPD
371 hiPSC lines are the first described in the literature whereas difficulties could be expected given
372 the relative circulating CD34 deficiency previously reported (30). Moreover, functional, and
373 genetically stable one iALI derived from a COPD patient could be kept consistently
374 differentiated for nearly 400 days at the time of writing. As expected for a disease with
375 multifactorial genetic susceptibility to environmental triggers (e.g. cigarette smoke), the COPD
376 hiPSC lines used here did not show any obvious differentiation specificities, but more work is
377 needed. Whether these cell lines are more susceptible to stress induced by cigarette smoke or
378 biomass combustion compared with hiPSC lines obtained from individuals without COPD,
379 especially healthy smokers are worth investigations.

380 In conclusion, we describe here an easy and reliable method to drive PSC differentiation into
381 2D multicellular bronchial epithelium. This method is highly reproducible, efficient, does not
382 require a cell sorting step and is achievable from samples of patients with pulmonary polygenic
383 diseases or monogenic diseases.

384

385

386 **Acknowledgements**

387 We are grateful to Pascal Chanez and Delphine Gras for reagents. This work was supported by
388 the grants FDM20170638083 (FRM) and RF20160501664 (Vaincre la Mucoviscidose), and by
389 Boehringer Ingelheim. The clinical studies were conducted by DRCI CHU de Montpellier with
390 protocol numbers UF 9791 and UF 9174.

391 We wish to thank Montpellier Rio Imaging for access to their imaging technological facilities
392 (<http://www.mri.cnrs.fr/en/>). We thank Elena Hauser for her technical help. We thank Dr
393 Sebastien Bommart for chest CT scan analyses. We thank iPSC platform for RSP4 and 131 000
394 iPSCs cell lines.

395

396 **Declaration of interests**

397 AB reports grants, personal fees, non-financial support and other from AstraZeneca; grants,
398 personal fees, non-financial support and other from Boeringher Ingelheim; grants, personal
399 fees, non-financial support and other from GlaxoSmithKline; personal fees, non-financial
400 support and other from Novartis; personal fees and non-financial support from Teva; personal
401 fees, non-financial support and other from Regeneron; personal fees, non-financial support and
402 other from Chiesi Farmaceuticals; grants, personal fees, non-financial support and other from
403 Actelion; personal fees from Gilead; non-financial support and other from Roche; other from
404 Nuvaira, outside the submitted work. JDV reports personal fees and other from Stem Genomics;
405 personal fees and other from MedXCell Science; personal fees from Gilead; personal fees from
406 Celgene, outside the submitted work. In addition, JDV and SA have a patent EP20150306389
407 pending. SA reports personal fees and other from Stem Genomics, outside the submitted work.
408 JPG is employee of Boehringer Ingelheim. EA, MF, CB, JM, AP, CV, MJ, CC, HB, GM, IV
409 declare no conflict of interest.

410

411

412 **Figures**

413 **Figure 1: Workflow of the study protocol: from iPSC generation to iPSC-derived airway**
414 **epithelium.**

415 Left panel: recovery of cell source Day 0 to Day 10. Peripheral blood mononuclear cells
416 (PBMC) (a) were
417 isolated from whole blood sample from healthy and COPD patients. CD34⁺ subpopulation (b)
418 was amplified into erythroid progenitor cell (EPC). Fibroblasts were isolated from a skin biopsy
419 of a PCD patient and amplified *in vitro*. Middle panel: Cell reprogramming step Day 11 to 40.
420 EPC or fibroblast were transduced using Sendai virus constructs containing Oct3/4, Sox2, Klf4
421 and c-Myc. Induced pluripotent cell (IPS) colony were visible at Day 40 (c). Right panel: iPSC
422 differentiation into airway epithelium, from day 41 to Day 100+ (d).

423 COPD: chronic obstructive disease; PCD: primary ciliary dyskinesia, EPC: erythroid progenitor
424 cell.

425 **Figure 2. Adaptation to single-cell culture is required before starting differentiation**

426 (A) Schematic representation of the differentiation protocol. (B) Left: Confluent hiPSC colony
427 culture passaged in mechanical clumps. Middle: Non-adapted hiPSC cells (<5 single-cell
428 passages) undergo massive cell death. Right: Adapted cells after serial single-cell passages.
429 APL: Alkaline Phosphatase staining on hiPSC that were plated at low density and grown for
430 one week. Hy03 cell line. (C) Left panels: Non-adapted hiPSCs show massive cell apoptosis at
431 the APS/DE stage. Right panels: Confluent cell layer at the APS/DE step when using adapted
432 cells, Hy03 cell line. (D) Design of the experiments to optimize the interval between hiPSC
433 plating and APS induction (two plating densities: 35 000 and 70 000 cells per cm⁻²). (E) Results
434 of the optimization experiments based on CXCR4 expression (DE marker). (F) Too low
435 (35K.cm⁻²) and too high (140K.cm⁻²) cell plating density lead to massive cell death or

436 incomplete OCT4 inhibition, respectively. Optimal cell density (here 70K.cm²) induces strong
437 OCT4 inhibition and high SOX17 expression (iCODP8 cell line).

438 **Figure 3. Differentiation of induced pluripotent stem cells into bronchial airway**
439 **epithelium**

440 (A) Morphological changes during the different differentiation steps. Day 0: hiPSC cells plated
441 as single cells. Day 1: Anterior primitive streak. Day 2-3: Definitive endoderm. Day 4, 6 and 8:
442 Anterior foregut endoderm; red arrows: bud-like structures. Day 9: Lung progenitors after
443 mechanical clump passage and plating on Transwell inserts. Day 14 (polarization day):
444 Epithelial layer. Day 42+: Multi-ciliated bronchial epithelial layer. Scale bar 200µm. (B)
445 Quality of DE induction based on CXCR4 expression by flow cytometry analysis in the
446 different PSC lines used (n=8) (C) Time course of DE induction (n=3, HY03 hiPSC line). (D)
447 Immunofluorescence analysis of OCT4, SOX17 and FOXA2 expression in DE cultures derived
448 from PCD cell line. (E) Quantification of SOX17 and FOXA2 positive cells as percentage of
449 all DAPI-positive cells, (n=3, PCD02.30 cell line).

450

451 **Figure 4. Anterior foregut endoderm characterization**

452 (A) Percentage of NKX2.1-positive cells after vAFE induction in the indicated cell lines.
453 Undifferentiated hiPSCs: negative control. (B) Expression of NKX2.1, a ventral anterior
454 foregut endoderm marker, assessed by immunofluorescence (Hy03 cell line). (C) Kinetics of
455 NKX2.1 expression (n=3, HY03 cell line). (D) Expression of SOX2 and SOX9. Note, the
456 presence of SOX2/SOX9 double-positive cells. (E) Analysis of the pluripotency markers
457 NANOG and OCT4 in hiPSCs (top), definitive endoderm (DE; middle) and ventral anterior
458 foregut endoderm stage (vAFE; bottom) (Hy03 cell line). (F) Model of hiPSC differentiation

459 into the three embryonic layers, emphasizing that NKX2.1 expression is shared by bronchial,
460 neuroectodermal and thyroid progenitors, the two later being a potential source of cell
461 contamination in NKX2.1 positive cells during iPSC differentiation into lung progenitors. (G)
462 Quantitative PCR analysis to assess contamination by thyroid gland (TG), liver (AFP), brain
463 (PAX6) or intestine (CDX2) and confirm progressive extinction of pluripotency marker OCT4
464 and NANOG. Positive controls: brain mRNA, gut mRNA, thyroid mRNA, HepG2 (human liver
465 cancer cell line) mRNA. IPS used for pluripotency control. Scale bar = 20 μ m.

466

467 **Figure 5. HiPSC-derived bronchial airway epithelium at 45 days of differentiation**

468 **(iALI)**

469 (A) Epithelial cells: Optical microscopy image (left panel), and E-cadherin expression (right
470 panel). iCOPD9 cell line (B, C) Basal cells: TP63 and KRT5 expression, Hy03 and iCOPD9
471 cell line, respectively. (D) Multi-ciliated cells: expression of the terminal differentiation marker
472 TUBIV, iCOPD2 cell line. (E) Rare clusters of CHGA-positive neuroendocrine cells, iCOPD9
473 cell line. (F) Muc5AC-positive goblet cells, iCOPD9 cell line. (G) Immunostaining of CCSP+
474 club cells and MUC5AC+ goblet cells in cultures grown without DAPT. Note the presence of
475 CCSP/MUC5AC double-positive cells, iCOPD9 cell line. (H) Dot blot analysis to detect the
476 presence of MUC5AC in supernatants of one iALI bronchial epithelium culture (derived from
477 Hy03 cell line) from Day 28 to Day 44. (I) Alcian blue staining and Periodic acid Schiff (PAS),
478 labelling mucus in supernatants of iCOPD9 culture. (J) CCSP quantification at Day 45 in
479 supernatants from iALI bronchial epithelium cultures derived from the HY03, iCOPD9, and
480 iCOPD8 hiPSC lines (K) Quantitative PCR analysis to assess the expression of Foxj1 (ciliated
481 cells), SFTPB (alveolar cells), CHGA (neuroendocrine cells) and Muc5AC (goblet cells). ALI

482 airway epithelium control was obtained from a bronchial biopsy cultured in Lonza BEGM
483 culture medium Panel Scale bar: 20 μ m

484

485 **Figure 6. Multi-ciliated bronchial epithelium and cilia characterization at 45 days of**
486 **differentiation**

487 (A) Confocal microscopy analysis of TUBIV (ciliated cell marker) and KRT5 (basal cell
488 marker) expression, iCOPD2 cell line. (B) Optical microscopy images of ciliated cells used for
489 cilia length determination, Hy03 cell line. (C) Top left: Scanning electron microscopy (SEM)
490 image of ciliated cells used for cilia length determination. iCOPD9 cell line. Scale bar 10 μ m.
491 Right panels: Cilia cross sections by transmission electron microscopy. (D) Determination of
492 cilia lengths by SEM and optical microscopy according to cell lines. Cilia length measurement
493 was performed respectively on primary cells in ALI, n=91 by SEM and n=45 by O.M , bronchial
494 brushing from COPD patients n=141 by O.M , iCOPD2 n=428 by SEM, iCOPD8 n= 98 by
495 SEM and n=120 by O.M, HY03 n=51 by O.M, iCOPD9 n=66 by O.M. (E) Top: Ciliary beating
496 frequency map from a movie (500 frames per second), iCOPD2 cell line Scale bar 50 μ m.
497 Bottom left: Mean ciliary beating frequency distribution. Bottom right: vectors representing the
498 orientation and celerity of the vortex flow generated by ciliary beating, iCOPD8 cell line Scale
499 bar 20 μ m. Hz=hertz

500

501

502 **Supplemental data**

503

504 Supplemental Table 1: Baseline characteristics of COPD patients

505 COPD = chronic obstructive pulmonary disease. FVC = forced vital capacity. FEV1 = forced
506 expiratory volume, RV= residual volume. GORD = gastro-oesophageal reflux disease, PaO₂ =
507 partial pressure of oxygen. WA ratio= Wall Area ratio. Wall thickness was expressed as a ratio
508 of the wall thickness to the total airway diameter (WA ratio) and mean value was calculated for
509 each patient from all the bronchi measured. In this study, quantitative assessment of
510 emphysema was assessed by the percentage of low attenuation area (LAA%) divided by lung
511 or lobe volume(s). A threshold of - 950 Hounsfield Units (HU) was used.

512 *: other substance abuse included cannabis, intravenous heroin, Subutex misuse (patient
513 COPD2), and cannabis (patient COPD8).

514 **: Pulmonary hypertension was diagnosed on transthoracic echocardiography; if abnormal,
515 right heart catheterization was performed.

517 Supplemental Table 2: Baseline characteristics of PCD patient

518 PCD: Primary ciliary dyskinesia. FVC=forced vital capacity. FEV1=forced expiratory volume.

520 Supplemental Table 3: Media composition by culture period**522 Supplemental Table 4: Molecules and used concentration****524 Supplemental Table 5: List of reagents and consumables**

525

526 **Supplemental Table 6: List and sequences of the primers used for RT-qPCR**

527

528

529 **Supplemental figure 1. Clinical characteristics of patients.**

530 (A) COPD patients. Left panel: high-resolution inspiratory CT images showing apical
531 centrilobular, para-septal severe emphysema (column apex). In patients COPD2 and COPD8,
532 bronchiectasis and increased airway wall thickness could also be observed (column base). Right
533 panel: rate of change in forced expiratory volume in 1 second (FEV1) over the years since
534 diagnosis. Loss of lung function (% change from baseline) seems more accelerated in COPD
535 patients in this study, around 20 to 30% during the follow up. The mean rate of FEV1 decline
536 in iCOPD2, iCOPD8 and iCOPD9 was respectively 40 mL/year, 83 mL/year, 65 mL/year. (B)
537 PCD patient. Top-left panel: segregation analysis from the studied family demonstrating
538 recessive inheritance of the CCDC40 mutations. Proband was compound heterozygous for
539 Coiled-Coil Domain Containing 40 (CCDC40) gene, carrying two mutations,
540 [c.1116_1117delCT (Exon 7) and c.3180+_1G>_A (Intron 19)]. The parents were found to
541 be carriers, segregation analysis showed that c.1116_1117delCT (Exon 7) mutation was
542 inherited from the father and that the mutation c.3180+_1G>_A (Intron 19) was inherited
543 from the mother. Her affected sibling was also carrying both CCDC40 mutations. No
544 consanguinity has been reported in this family. Top-right panel: clinical details for the family
545 are shown in the table. Proband exhibited severe rhinosinusitis affection, exacerbations due to
546 bronchiectasis disease and infertility. Her sibling, died prematurely due to congenital heart
547 disease with heterotaxia, comprising transposition of the great arteries (TGA), single ventricle,
548 pulmonary stenosis and dextrocardia. He also suffered from airway ciliary dysfunction. Lower
549 panel: lung computer tomography (CT) scan of the PCD patient. Bronchiectasis can be

550 identified on inspiratory CT images (a), present mainly in the middle lobe (b). There were
551 thickening of the airway wall (c), central mucous plugs (d) and some area of lung consolidation
552 (e). Small airway disease was illustrated by impaction in bronchioles and small nodules (f);
553 however, expiratory CT image did not demonstrate areas of air trapping (data not shown).

554

555 **Supplemental Figure 2: Genetic integrity of the hiPSC lines used for differentiation into**
556 **iALI bronchial epithelia**

557 (A) Genomic integrity evaluation of the hiPSC lines using the iCS-digital test (18). Copy
558 number variation analysis using droplet digital PCR and DNA extracted from the different
559 hiPSC lines in culture (iCOPD8, iCOPD9, iCOPD2, PCD02.30 and HY03). All the hiPSC lines
560 remained euploids, except iCOPD2 (clone A13) that displayed a copy number gain on
561 chromosome 20q at mechanical passage 70 and clumps passage 3 (M70CL3) and was therefore
562 later on discarded. Error bars indicate the Poisson distribution (95% confidence intervals).

563 (B) Same analysis, using the iCS-digital Aneuploidy test to screen the 23 chromosomes in one
564 iALI bronchial epithelium culture that was maintained for twelve months in culture.

565

566 **Supplemental Figure 3 NKX2.1 and CXCR4 FACS gating strategy**

567 (A) Gating strategy for the isolation of CXCR4 positive cells.

568 Flow cytometry gating strategy to viable CXCR4 cell subsets at the Definitive endoderm stage.

569 Staining of single-cell solutions using isotype and CXCR4 conjugated antibodies and analysis

570 by flow cytometry. (A-C) Gating strategy to exclude doublet (B) and isolate real single-cell unit

571 (C). Among single cells, live cells were selected on absence of Zombie violet staining (D). (E)

572 CXCR4 expression of cells compared to isotype control on PE staining **(B)** Gating strategy for
573 the isolation of NKX2.1 positive cells.

574 (A) Flow cytometry gating strategy to viable NKX2.1 cell subset at the Anterior Foregut
575 Endoderm stage. Staining of single-cell solutions using different unconjugated antibody and
576 analysis by flow cytometry. (A-C) Gating strategy to exclude doublet and isolate real single-
577 cell unit. (D) Among single cells, live cells were selected on absence of Zombie violet staining
578 (E) NKX2.1 expression of cells compared to isotype control on Alexa 488 staining.

579

580 **Supplemental Figure 4. Characterization of v-AFE progenitors SOX9 expression and**
581 **time course expression of NKX2.1 during v-AFE induction.**

582 (A) Kinetic expression of NKX2.1 by immunostaining during v-AFE induction, in Hy03 cell
583 line. Note increasing expression during the time course. Scale bar: 20µm.

584 (B) Immunostaining of Hy03 -derived v-AFE cells for SOX9 (green) nuclear proteins. during
585 v-AFE stage. Scale bars: 20 µm.

586 (C) Immunolabelling of Hy03 cell line v-AFE stage for NKX2.1 (orange) and ki67 (green).
587 Nuclei counterstained with DAPI.

588 (D) Immunofluorescence of v-aFE stage showing no contamination by AFP positive (liver)
589 cells (PCD02.30 cell line). These results were available for all the others iPSC cell lines (data
590 not shown). HepG2 hepatoma cell line was used as positive control, characterized by AFP
591 expression (red). Scale bar 50µm.

592

593 **Supplemental Figure 5: iALI**

594 (A) Electron microscopy of hiPSC derived airway epithelium grown at an air-liquid interface
595 (iALI) after 45 days of differentiation (iCOPD2 and iCOPD9 cell lines).

596 Column 1: Transmission Electron Microscopy of mature epithelium. Top: presence of two
597 contiguous ciliated cells. Red arrows head show epithelial features highlighted by tight junction
598 and desmosomes. Bottom: at the apical pole, red stars parts of cilia section.

599 Column 2: Scanning electron microscopy of epithelial layer. Top: goblet cell layer; middle: red
600 arrows indicate cilia of multiciliated cell and orange ones indicate mucus globules. Bottom: red
601 asterisks show microvilli. Orange arrow indicate cluster of mucus. Red arrow exhibit
602 multiciliated cells. Scale bar is 10 μm .

603 (B) Tight-junction integrity during the course of culturing was assessed by measuring the
604 TEER. At least three inserts were analysed at each point of the time course and the data
605 represents the mean \pm SD (iCOPD9 cell line).

606 (C) Colocalization of two colours confocal image of CCSP/MUC5AC. MUC5AC protein (red)
607 colocalizes with CCSP protein (green) at day 14 of ALI. Orthogonal views (XY, XZ, YZ)
608 illustrating colocalization of CCSP and MUC5AC. Colocalization is visible as a yellow colour.
609 iCDOP9 cell line. Scale bar is 20 μm .

610 (D) Multiciliated cell characterization using DNAH5 and TUBIV antibody. DNAH5
611 immunolabelling exhibit an axoneme in iCOPD9 cell line (left panel). TUBIV
612 immunofluorescence show only a cilia staining (middle). Merge of DNAH5 and TUBIV
613 staining (right panel), iCODP9 cell line. Scale bar is 10 μm .

614

615 **Supplemental Movie 1: iALI bronchial epithelium obtained from the iCOP9 hiPSC cell**
616 **line (X20)**

617 Cilia beating was clearly visible on this video from iCOPD9 at Day 45. Acquisition was
618 performed with inverted microscopy during cell culture routine check-up. The video represents

619 cells that have been dissociated, before passaging cells into another coated Transwell.
620 Dissociation was performed using Trypsin 10 minutes at 37°.

621

622 **Supplemental Movie 2: iALI bronchial epithelium obtained from the iCOPD8 hiPSC**
623 **cell line (X40)**

624 This acquisition was used for biophysics analysis i.e. Ciliary Beat Frequency (CBF).
625 The video was recorded at 500 frames per second. This video includes 1500 frames.

626 **Supplemental Movie 3: iALI bronchial epithelium obtained from the iCOPD9 hiPSC**
627 **cell line and with live immunofluorescence for TubIV**

628 **Supplemental Information: Supplemental Methods and Supplemental Clinical data**

629

630 **References**

- 631 1. GBD CODC. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of
632 death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global
633 Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392:1736-1788.
- 634 2. Ahmed E, Sansac C, Assou S et al. Lung development, regeneration and plasticity:
635 From disease physiopathology to drug design using induced pluripotent stem cells.
636 *Pharmacol Ther*. 2018;183:58-77.
- 637 3. Green MD, Chen A, Nostro MC et al. Generation of anterior foregut endoderm from
638 human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011;29:267-272.
- 639 4. Wong AP, Bear CE, Chin S et al. Directed differentiation of human pluripotent stem
640 cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nature*
641 *Biotechnology*. 2012;30:876-882.

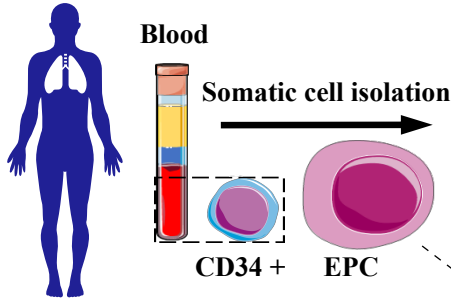
- 642 5. Mou H, Zhao R, Sherwood R et al. Generation of Multipotent Lung and Airway
643 Progenitors from Mouse ESCs and Patient-Specific Cystic Fibrosis iPSCs. *Cell Stem*
644 *Cell*. 2012;10:385-397.
- 645 6. Huang SX, Islam MN, O'Neill J et al. Efficient generation of lung and airway epithelial
646 cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32:84-91.
- 647 7. Firth AL, Dargitz CT, Qualls SJ et al. Generation of multiciliated cells in functional
648 airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National*
649 *Academy of Sciences of the United States of America*. 2014
- 650 8. Dye BR, Hill DR, Ferguson MA et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell
651 derived lung organoids. *Elife*. 2015;4:e05098.
- 652 9. Konishi S, Gotoh S, Tateishi K et al. Directed Induction of Functional Multi-ciliated
653 Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells.
654 *Stem Cell Reports*. 2016;6:18-25.
- 655 10. Chen Y-W, Huang SX, de Carvalho ALRT et al. A three-dimensional model of human
656 lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*.
657 2017;372:3.
- 658 11. McCauley KB, Hawkins F, Serra M, Thomas DC, Jacob A, Kotton DN. Efficient
659 Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via
660 Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell*. 2017
- 661 12. Morrissey EE, Hogan BLM. Preparing for the first breath: genetic and cellular
662 mechanisms in lung development. *Developmental Cell*. 2010;18:8-23.
- 663 13. Matsuno K, Mae SI, Okada C et al. Redefining definitive endoderm subtypes by robust
664 induction of human induced pluripotent stem cells. *Differentiation*. 2016;92:281-290.

- 665 14. Hawkins F, Kramer P, Jacob A et al. Prospective isolation of NKX2-1-expressing
666 human lung progenitors derived from pluripotent stem cells. *J Clin Invest.*
667 2017;127:2277-2294.
- 668 15. Gomperts BN. Induction of multiciliated cells from induced pluripotent stem cells. *Proc*
669 *Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:6120-6121.
- 670 16. Ahmed E, Sansac C, Fieldes M et al. Generation of the induced pluripotent stem cell
671 line UHOMi001-A from a patient with mutations in *CCDC40* gene causing Primary
672 Ciliary Dyskinesia (PCD). *Stem Cell Res.* 2018;33:15-19.
- 673 17. Bai Q, Ramirez JM, Becker F et al. Temporal analysis of genome alterations induced by
674 single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24:653-662.
- 675 18. Assou S, Girault N, Plinet M et al. Recurrent Genetic Abnormalities in Human
676 Pluripotent Stem Cells: Definition and Routine Detection in Culture Supernatant by
677 Targeted Droplet Digital PCR. *Stem Cell Reports.* 2020
- 678 19. Miller AJ, Hill DR, Nagy MS et al. In Vitro Induction and In Vivo Engraftment of Lung
679 Bud Tip Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell*
680 *Reports.* 2018;10:101-119.
- 681 20. Millien G, Beane J, Lenburg M et al. Characterization of the mid-foregut transcriptome
682 identifies genes regulated during lung bud induction. *Gene Expr Patterns.* 2008;8:124-
683 139.
- 684 21. Montoro DT, Haber AL, Biton M et al. A revised airway epithelial hierarchy includes
685 CFTR-expressing ionocytes. *Nature.* 2018
- 686 22. Reid L, Meyrick B, Antony VB, Chang LY, Crapo JD, Reynolds HY. The mysterious
687 pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *Am J Respir Crit Care Med.*
688 2005;172:136-139.

- 689 23. Fliegau M, Olbrich H, Horvath J et al. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in
690 respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care*
691 *Med.* 2005;171:1343-1349.
- 692 24. Gibbons IR, Rowe AJ. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from
693 Cilia. *Science.* 1965;149:424-426.
- 694 25. Papon JF, Bassinet L, Cariou-Patron G et al. Quantitative analysis of ciliary beating in
695 primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:78.
- 696 26. Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug
697 discovery. *Nat Rev Genet.* 2019
- 698 27. Lafkas D, Shelton A, Chiu C et al. Therapeutic antibodies reveal Notch control of
699 transdifferentiation in the adult lung. *Nature.* 2015;528:127-131.
- 700 28. Okuda K, Chen G, Subramani DB et al. Localization of Secretory Mucins MUC5AC
701 and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. *Am J Respir Crit Care Med.*
702 2019;199:715-727.
- 703 29. Herbert JA, Deng Y, Hardelid P et al. β 2 integrin LFA1 mediates airway damage
704 following neutrophil trans-epithelial migration during RSV infection. *Eur Respir J.*
705 20201902216.
- 706 30. Palange P, Testa U, Huertas A et al. Circulating haemopoietic and endothelial
707 progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J.* 2006;27:529-541.
- 708

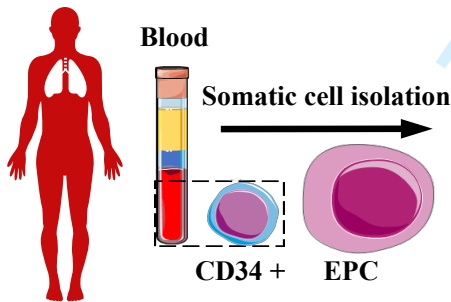


Healthy

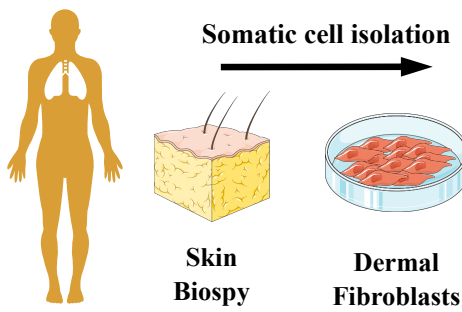


Disease

COPD

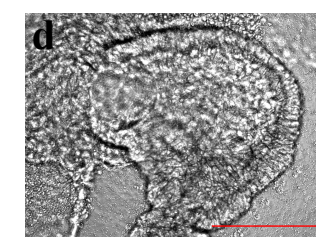
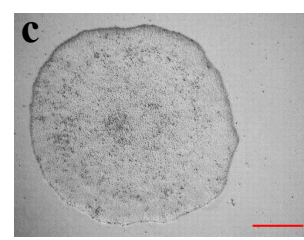
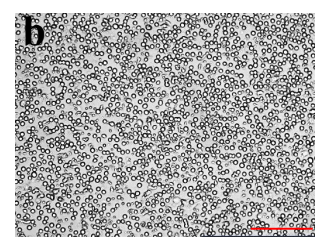
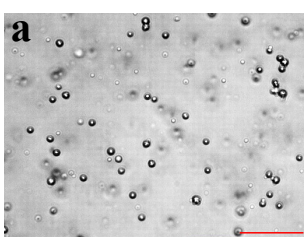
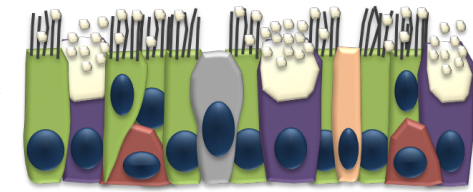
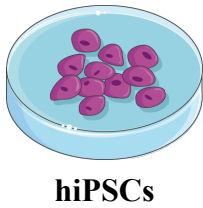


PCD



For Review Only

Sendai virus

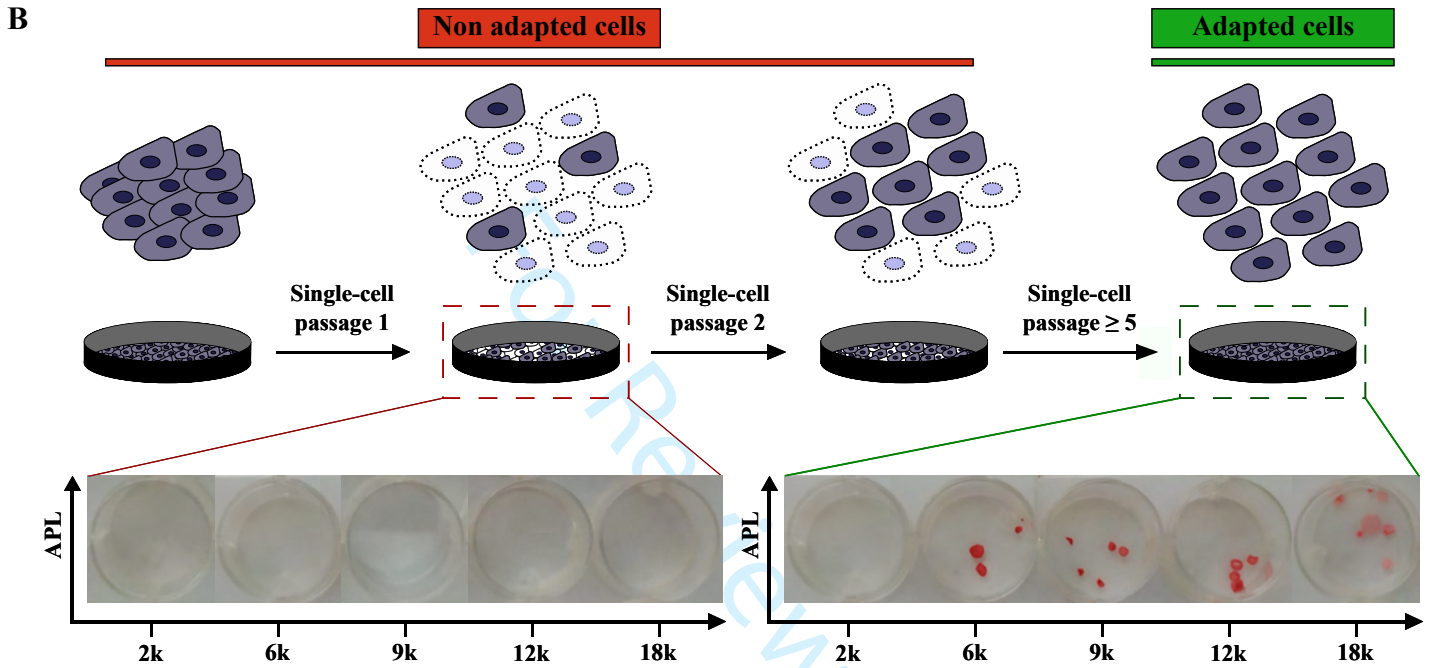
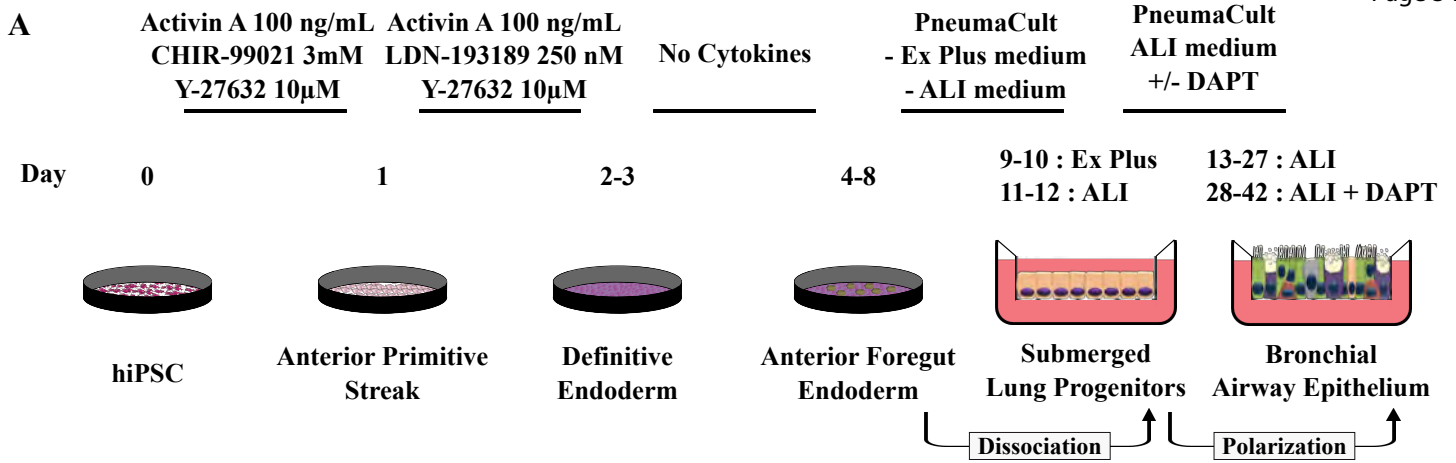


DAYS

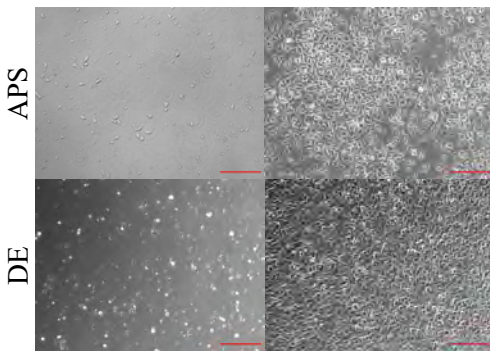
0-10

11-40

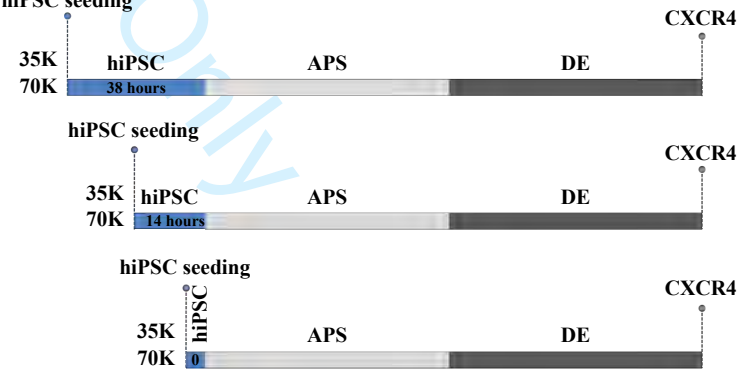
41-100+



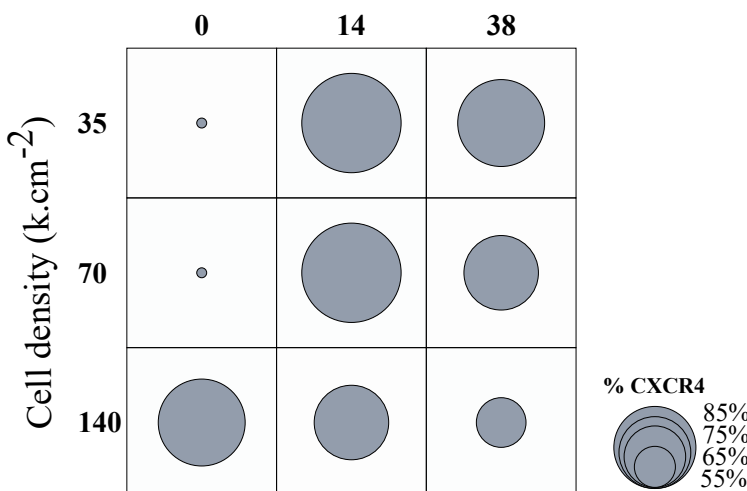
C Non adapted hiPSC Adapted hiPSC



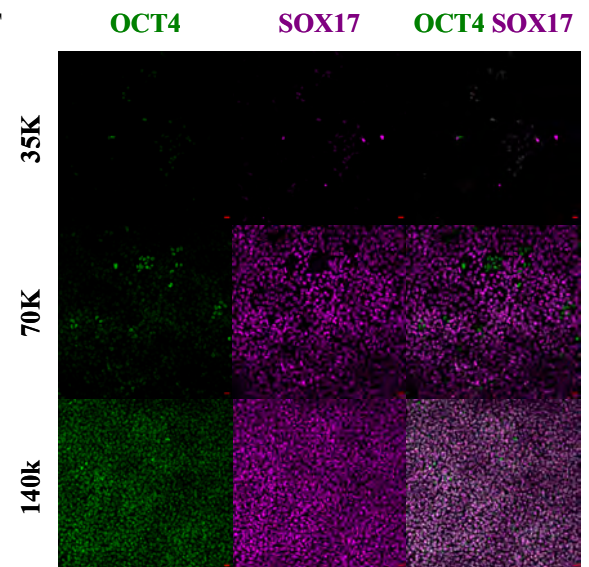
D hiPSC seeding



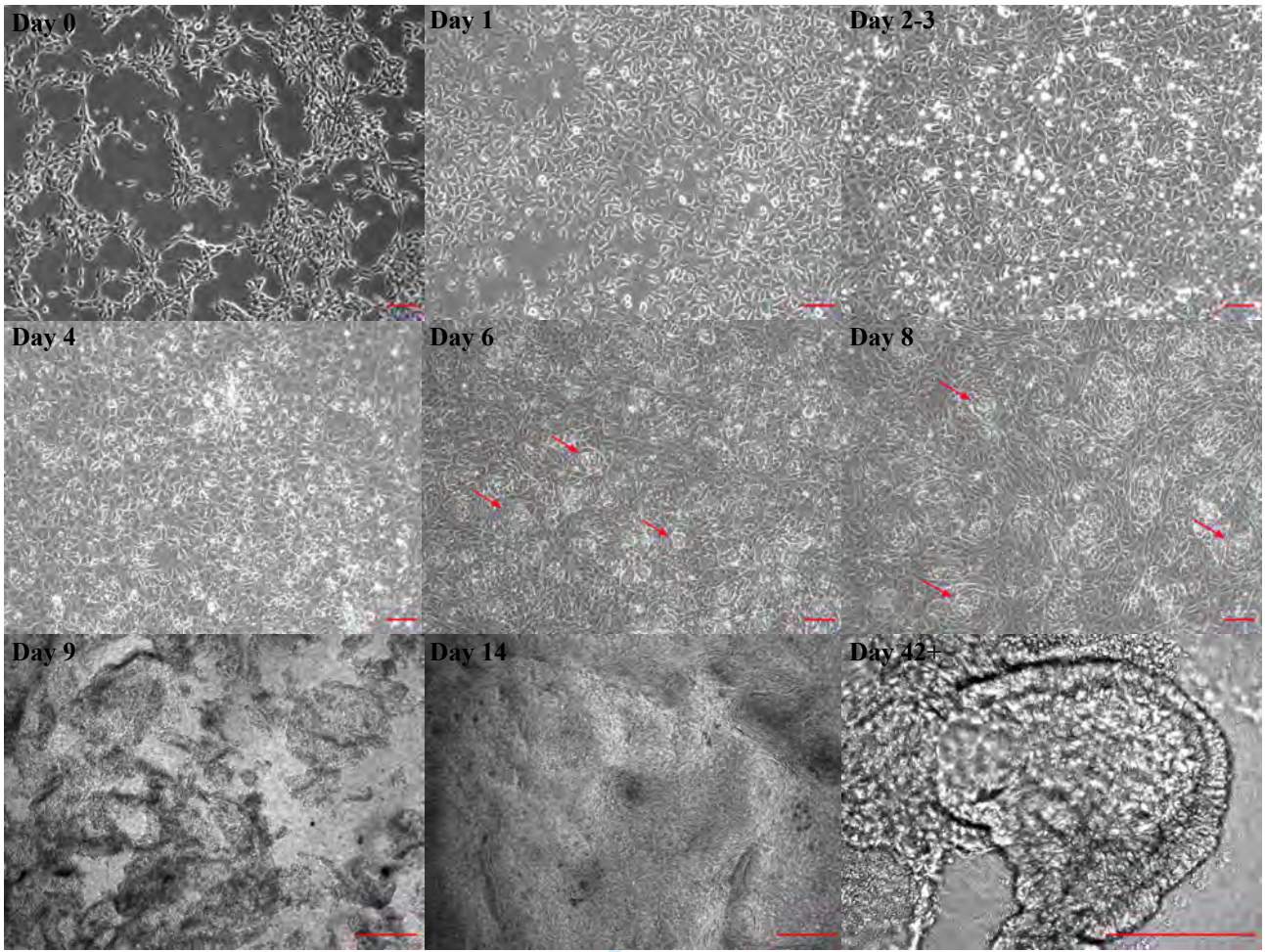
E Timing of APS induction after hiPS plating (hours)



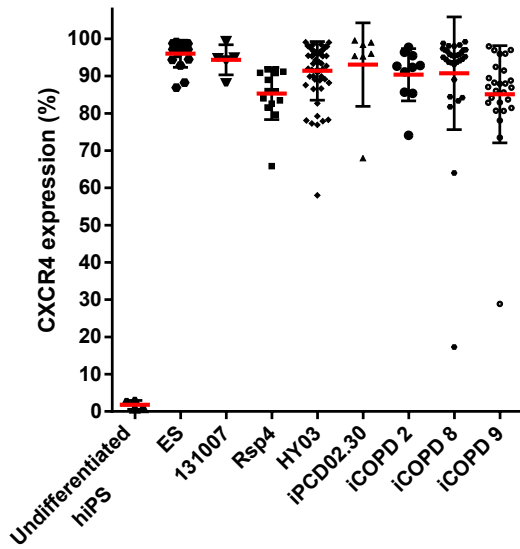
F



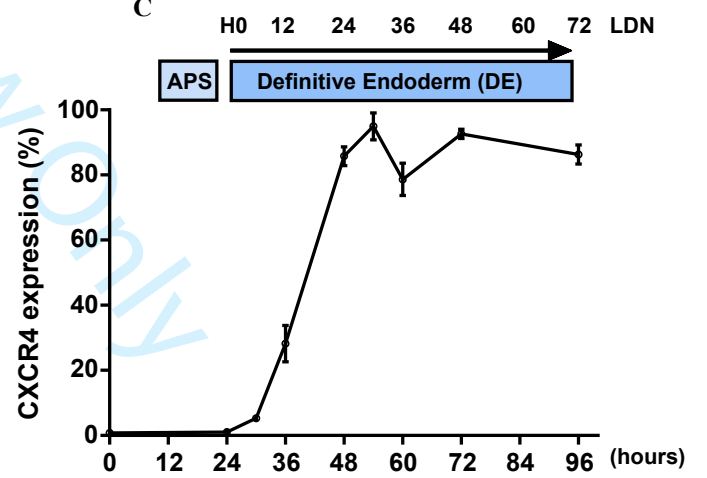
A



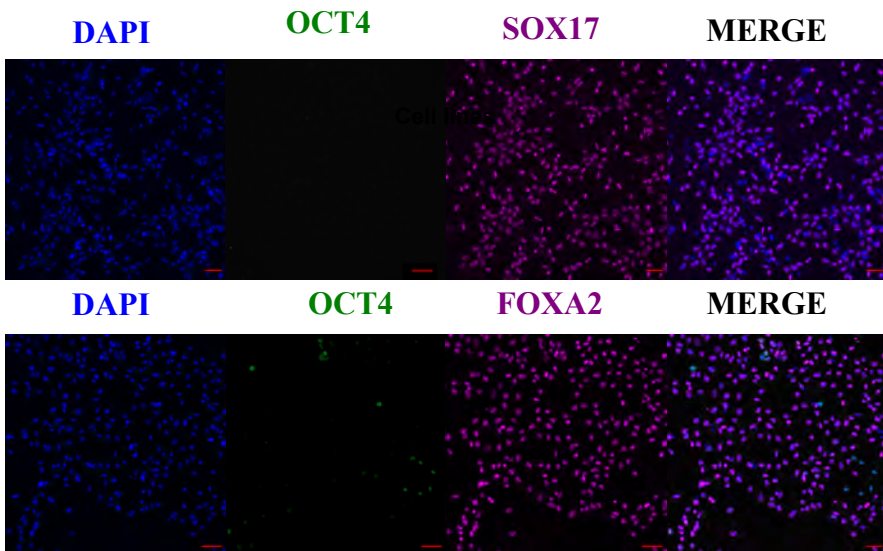
B



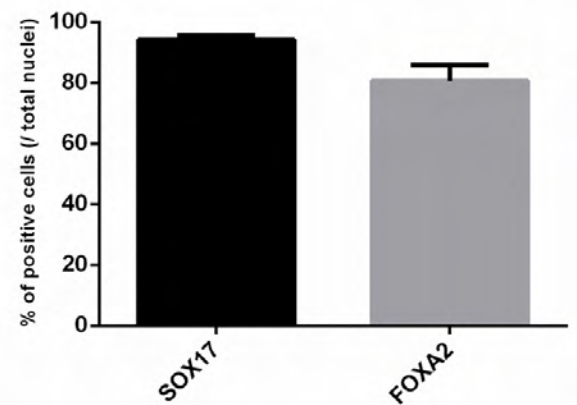
C

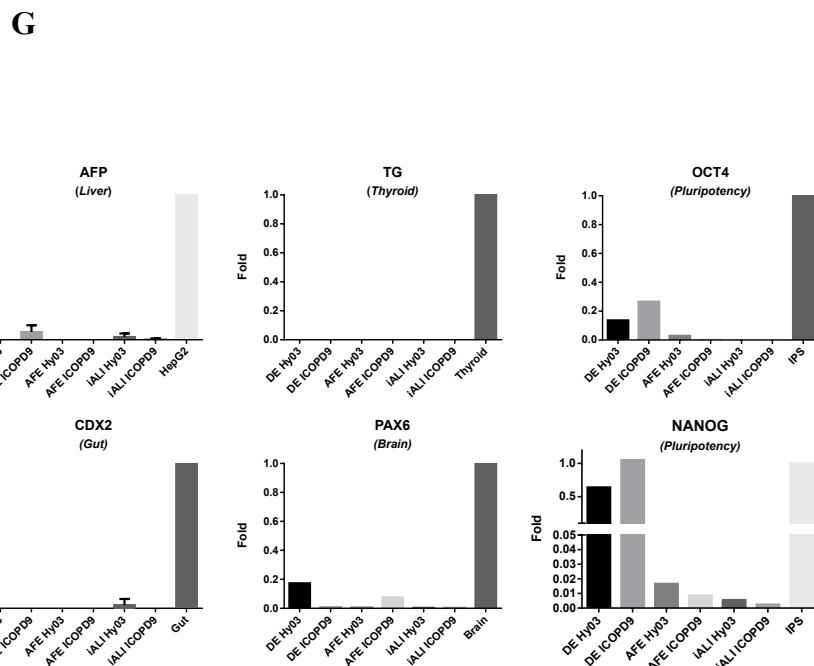
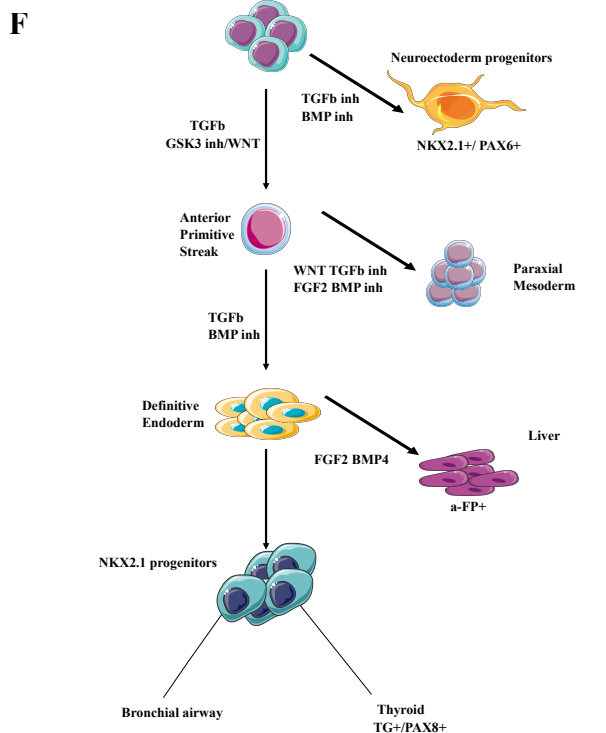
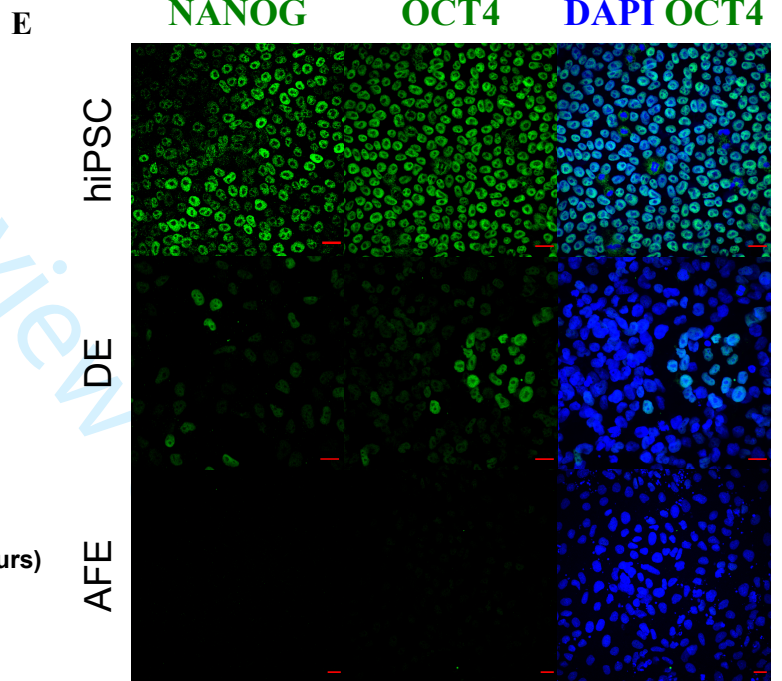
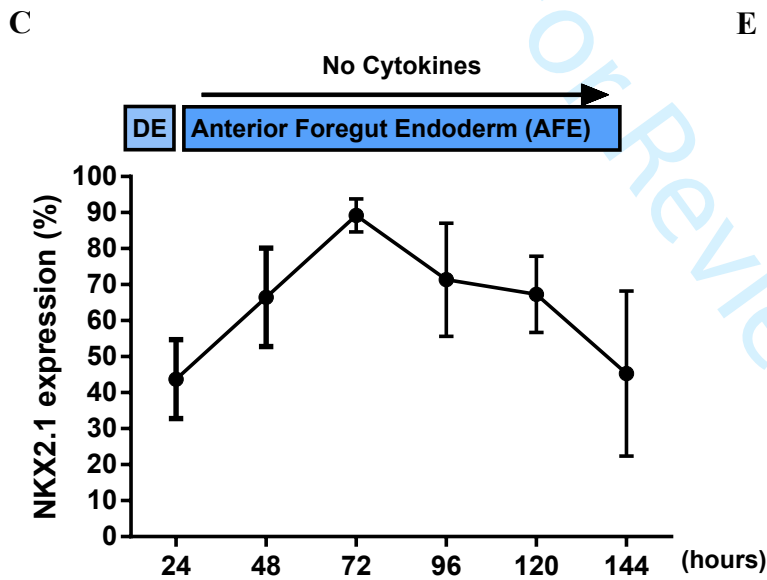
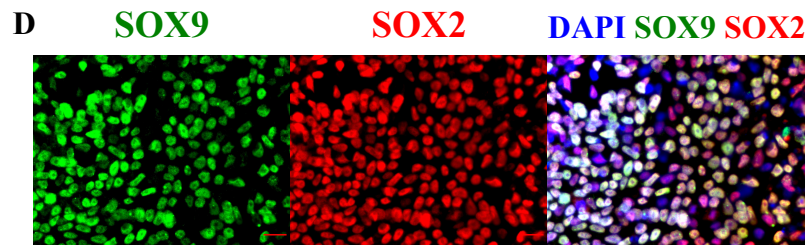
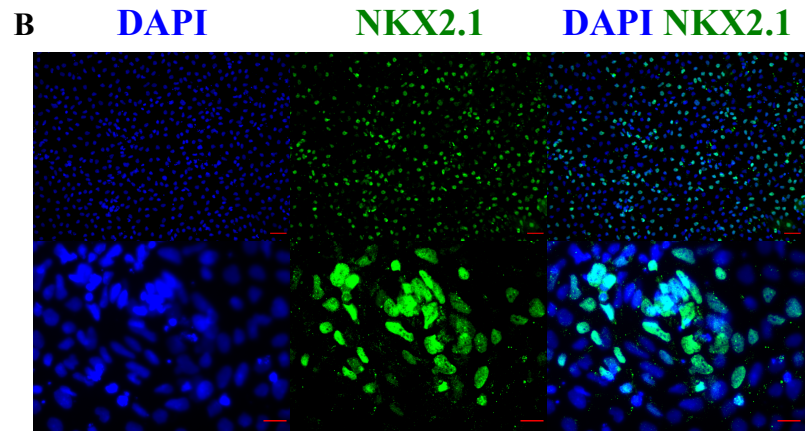
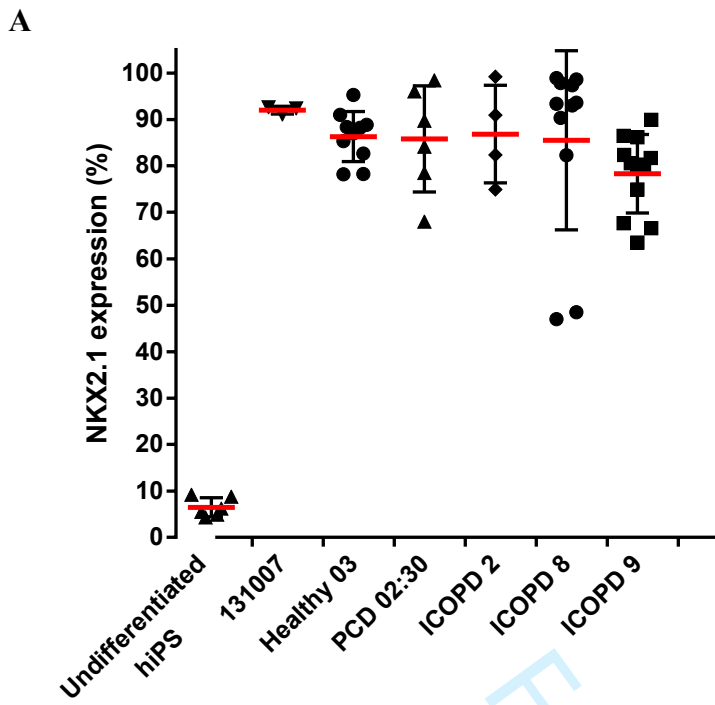


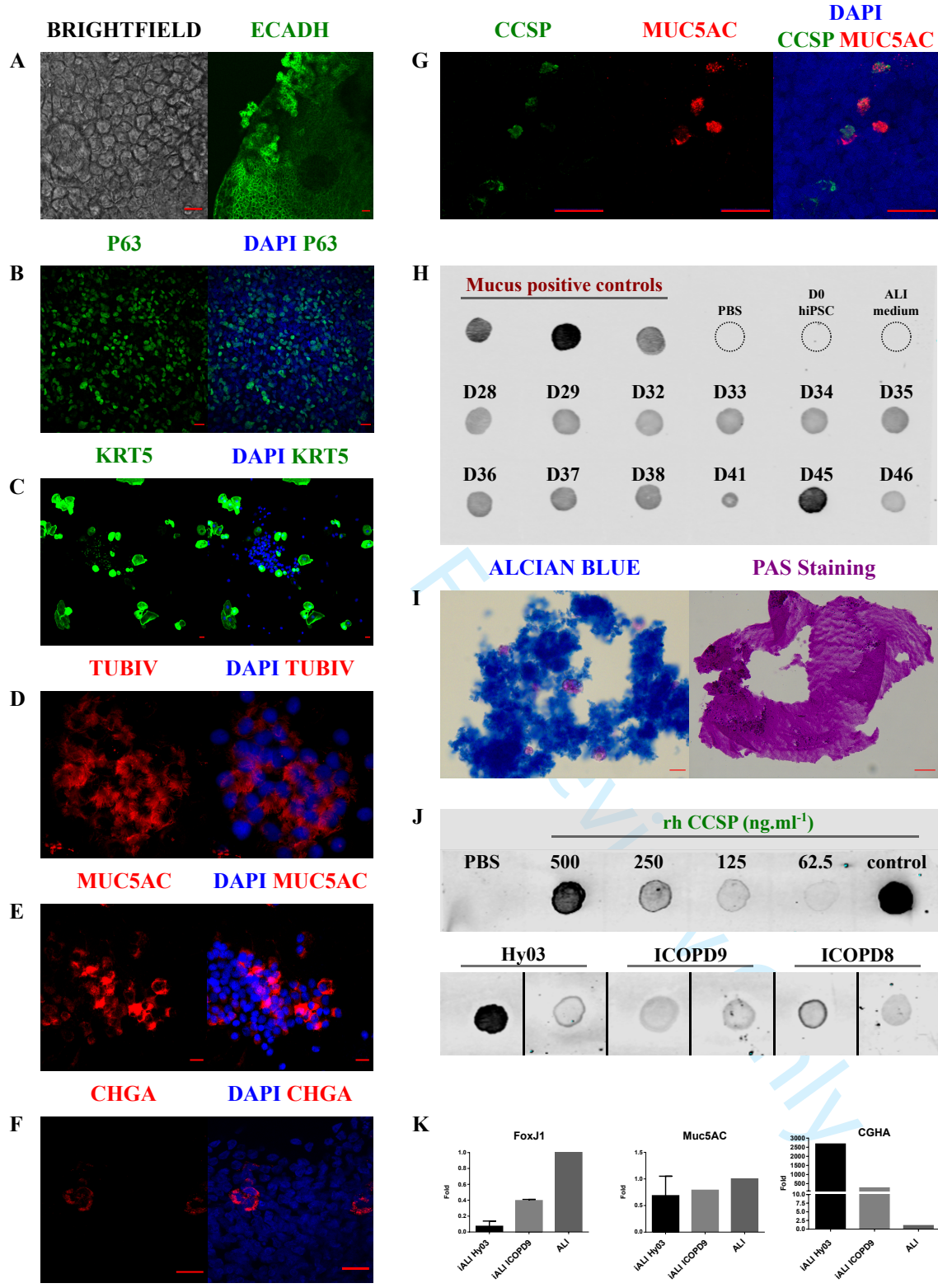
D

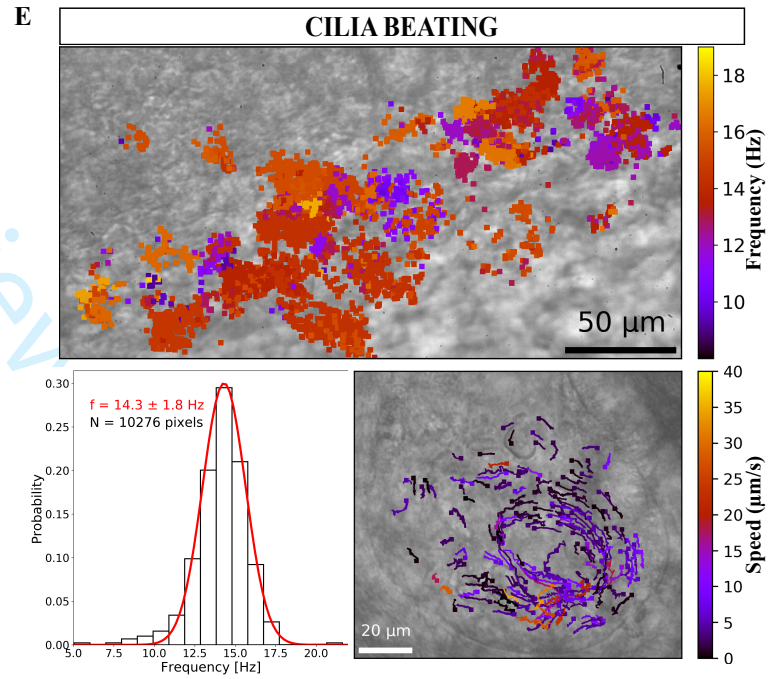
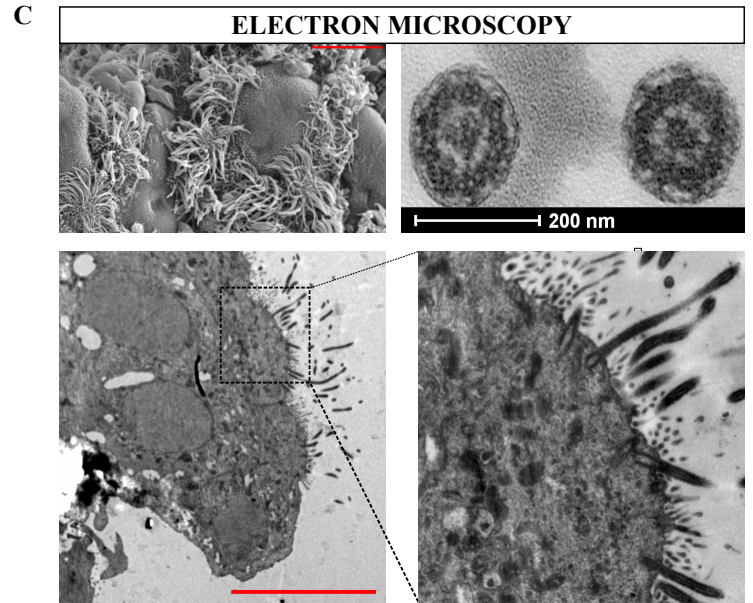
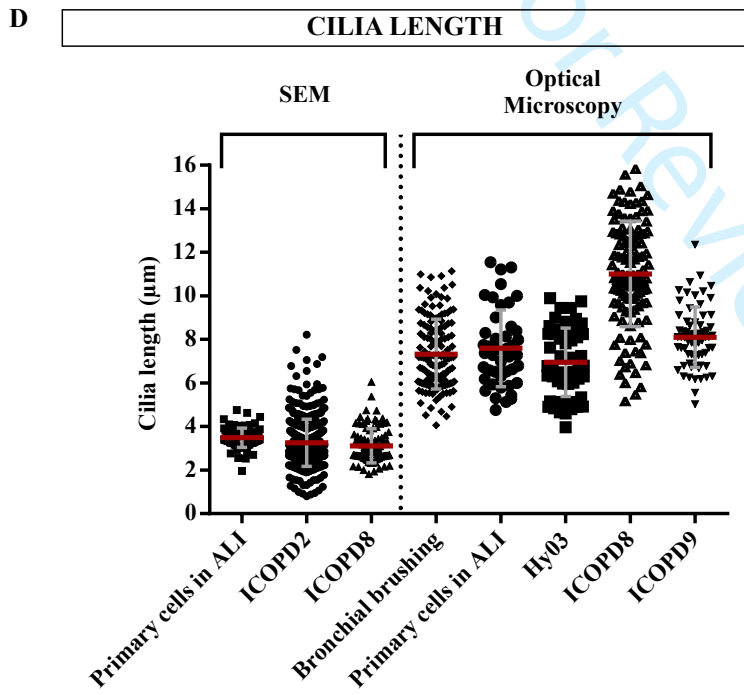
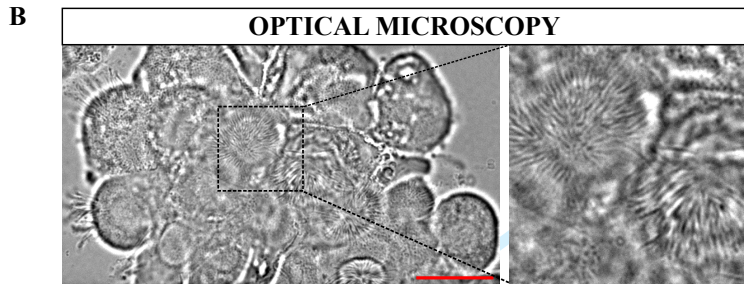
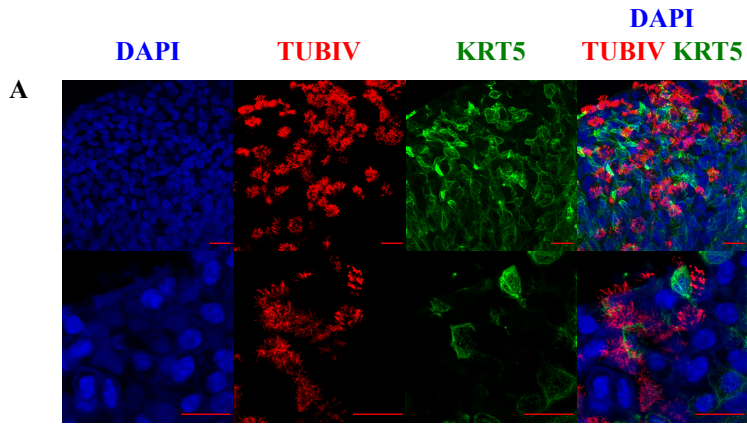


E









Supplemental Information

Includes supplemental clinical data and supplemental methods.

Supplemental Clinical Data

Supplemental information of PCD and COPD history

COPD patient's characteristics and history

Patients with severe COPD were recruited in the framework of the INVECCO project. Patients exhibited normal blood level of α -1 anti-trypsin and none of them carried any TERT mutations, to avoid any monogenic form of COPD.

Early onset of disease was suggested by early onset of symptoms, at an average age of 35 years.

Disease was revealed by dyspnea, pneumothorax or acute exacerbation. The average time between COPD diagnosis and first symptoms was 12 years. Familial history of COPD at first degree was found in 2 out of the 3 patients. All of them were at least GOLD stage 3. Environmental exposures were characterized by early and heavy active tobacco exposure, and all of them had in utero exposure to tobacco and second-hand smoke in early childhood. The average smoking history was 50 pack-years (range, 30–75). Others toxic consumption such as cannabis and parenteral heroin were also reported, in agreement with the literature that already reported an association with severe emphysema¹⁶. The dyspnea was severe, requiring long term home supplemental oxygen support for 2 patients. No cardiovascular, diabetes, cancer or pulmonary hypertension comorbidities was described, but they usually had severe osteoporosis despite their young age. 2 of 3 COPD patients had spontaneous pneumothorax, recurrent for both. Notably, 2 of 3 individuals suffered of three or more exacerbations per year requiring hospitalization. All three patients received at baseline long-acting beta2-agonist (LABA) and anti-cholinergic (LAMA) drugs but not inhaled corticosteroid (ICS). Clinical course is detailed in Supplemental information for the three patients. Chest CT scans showed severe apical centrilobular emphysema destruction, basal bronchiectasis and increased wall thickness (figure 1A, left panel). Lung function fast declined in these COPD patients. Mean level of change in FEV1 (ml/yr.) was -25.3 (SD, 43.3) ml/year (figure 1A, right panel).

Diagnosis was established on respiratory symptoms, in the context of severe sibling PCD. She presented mild lung phenotype disease with normal lung function at baseline, with less than 1 exacerbation per year, rhinosinusitis,

and infertility (Table 2). Segregation analysis and clinical features in the family is detailed in figure 1B, top panel. CT scan mainly showed bronchiectasis and mucous plug impactions (figure 1B, bottom panel).

At the time of the inclusion, all the patients of the COPD group were on a lung transplantation waiting list. At the time of the manuscript submission, iCOPD2 patient was admitted in intensive care unit for a severe COPD exacerbation requiring mechanical ventilation. iCOPD8 patient declined lung transplantation. iCOPD9 patient was programmed to undergo single lung transplantation (pre-transplant pleurodesis due to iterative pneumothorax). The lung transplant project was stalled because of overweight for more than 24 months. Unfortunately, a localized lung adenocarcinoma was recently discovered. The patient will be proposed to undergo bronchoscopic lung volume reduction due the severe emphysema phenotype.

PCD patient clinical characteristics and history with disease-causing variants in CCDC40

The healthy control aged 41 at inclusion had normal lung function and suffered no respiratory symptoms from childhood and had no familial history of any chronic airway disease. PCD patient was a non-smoker female 34 years old at inclusion (Table 2). Disease was associated with bi allelic mutations in Coiled-Coil Domain Containing 40 (CCDC40) gene [c.1116_1117delCT (Exon 7) and c.3180 + 1G > A (Intron 19)] (figure 1B, top panel). Diagnosis was established on respiratory symptoms, in the context of severe sibling PCD. She presented mild lung phenotype disease with normal lung function at baseline, with less than 1 exacerbation per year, rhinosinusitis, and infertility (Table 2). Segregation analysis and clinical features in the family is detailed in figure 1B, top panel. CT scan mainly showed bronchiectasis and mucous plug impactions (figure 1B, bottom panel). Clinical course is described in Supplemental information.

Proband was included in this study at the age of 34 years old. She presented symptoms since the childhood, mainly represented by sinusitis and lung exacerbations. The annual rate of exacerbations was lower than 2/year, and no one lead to hospitalization. Decline of lung function was observed during the follow up, from normal lung volumes to a decrease of 50% of FEV1 at the time of manuscript submission. She also suffers from infertility, no ectopic pregnancy neither miscarriage occurred. Successful pregnancy was achieved by in vitro fertilization with oocyte donation.

Supplemental Methods

Live imaging

Cells were incubated in culture medium containing $1\ \mu\text{M}$ SiR-tubulin and verapamil (SiR-tubulin kit, Spirochrome) at 37°C for 60 min. Live images were acquired using a two-photon microscope LSM 7 MP OPO (Zeiss, France) with an upright Axio Examiner Z.1 optical microscope associated with a femtosecond Ti: sapphire laser (680–1080 nm, 80 MHz, 140 fs, Chameleon Ultra II, Coherent, France) pumping a tuneable OPOs (1000–1500 nm, 80 MHz, 200 fs, Chameleon Compact OPO, Coherent, France) (Software Zen Ver. 2012). A x20 water immersion objective (W Plan Apochromat DIC VIS-IR) was used for time-lapse image acquisition with the following characteristics: 300x300 pixels ($141,7 \times 141,7\ \mu\text{m}$) frame size, scan speed (Pixel Time 1.34 μs , Frame Time 0.14 s), time-lapse of 16.55 s (55 frames), OPO excitation wavelength of 1097 nm, and narrow band pass filter at 650–705 nm in front of one of the detectors to detect the fluorescence.

Determination of Cilia Beating Frequency (CBF) and flow velocity

In each experiment, more than 50 ciliated cells corresponding to more than 10 000 pixels/ movie and 100 trajectories in each hiPSC line, were analysed for calculating the CBF and flow velocity, respectively.

CBF

All the samples were observed immediately after taking out of the incubators to keep a condition of 5% CO_2 at 37°C . CBF were determined for Hy03, iCOPD2, 8 & 9 cell lines, for at least 2 independently experiments.

The mean ciliary beat frequency was determined from videos obtained with an inverted optical microscope in bright field (Leica DMI 3000 B), equipped with a x63 objective (N.A. 0.7) and with a high speed camera (Photron Fastcam PCI 1024), at 37°C and 5% CO_2 . Ciliary motions were recorded at 500 fps for 3 seconds. Analysis of CBF was processed on $280\ \mu\text{m}$ square region of interest. The periodic variation in intensity of pixels located on the path of beating cilia are used to infer the beating frequency. For each pixel, the power spectrum (squared FFT (Fast Fourier Transform) versus frequency) shows a peak (maximum occurring periodicity) which is taken as the beating frequency. For each recording, the frequencies are mapped, and their histogram is fitted by a Gaussian distribution to determine the mean beating frequency and its standard deviation.

Mucous flow velocity

Dead cells embedded in the mucus are tracked and their trajectories are used to describe the mucus flow. Movies were obtained under a Leica microscope with an objective x40 or x63, and using a high-speed camera (Photron Fastcam PCI 1024) at 60 or 125 fps for a total of 1536 frames per recordings (12 s at 125 fps or 25 s at 60 fps).

Dead cells tracking was performed using the trackpy library in Python (version 0.3.2; Allan, 2016 DOI [10.5281/zenodo.60550](https://doi.org/10.5281/zenodo.60550)). For each tracked dead cell, velocities computed on 10-frames-long portions of its trajectory are represented in a histogram. The velocity corresponding to the maximum of this histogram is taken as the estimated dead cell velocity. Fig. 7E is a map of the dead cells trajectories, the colour code corresponding to the estimated flow velocity.

Estimated flow velocity of dead cells was approximately $2.2 \pm 4.3 \mu\text{m/s}$ in iCOPD8 hiPSC derived airway epithelium and $38 \pm 28 \mu\text{m/s}$ in iCOPD9. Experiments were performed using hiPSC (iCOPD8, iCOPD9 cell lines) on 3 wells per cell line. Normal human bronchial epithelial cell (NHBE) were used as control. Normal human bronchial epithelial cell (NHBE) were used as control. Range of mucous flow velocity of HBECs was between $[0-50 \mu\text{m/s}]$.

Genomic stability

Genomic stability was assessed by detection of recurrent genetic abnormalities in hPSCs using the droplet digital PCR technology, provided as a service by Stem Genomics, as described previously¹⁸.

Cytospin preparation

Cells were dissociated to single cells to reach a density of 500 000 cells/ml. 60 μl of cell suspension was dropped on cytospin slides that were centrifuged at 500 rpm for 5 min. Then, cells were fixed in cold acetone at -20°C for 10 min. Excess acetone was removed, and dry slides were stored at 4°C .

Immunofluorescence and phosphatase alkaline activity

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature (RT) for 15 min, and then permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 for 15 min. Cells were blocked with 10% of donkey serum in PBS containing 1% BSA and 0.1% Triton X-100 at RT for 60 min. Primary and then secondary antibodies were diluted

in 1% BSA/0.1% Triton X-100/PBS. Samples were incubated with primary antibodies at 4°C overnight and with secondary antibodies at RT in the dark for 60 min. Nuclei were stained with DAPI (1:5000) for 3 min and then samples were mounted in ProLong Gold (Thermo Fisher) and stored in the dark at RT. A Zeiss microscope (LMS700) was used for image acquisition and data were analysed with ImageJ (v1.52i).

Phosphatase alkaline activity was assessed using the ScienCell Research Laboratories (#8288) kit following the manufacturer's instructions.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Transwell inserts were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer (pH 7.2) at RT for 60 min, followed by washes in PHEM buffer. Fixed inserts were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, from 30 to 100%. Samples were immersed in ethanol – hexamethyldisilazane (HMDS) solution for 10 min and then in HMDS alone. Transwell inserts were sputter coated with a 10nm-thick gold film and analysed with a scanning electron microscope (Hitachi S4000; MRI facility, INM Montpellier France) using a lens detector with an acceleration voltage of 10KV at calibrated magnifications.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transwell inserts were fixed in 2.5% glutaraldehyde/PHEM buffer (1X, pH 7.4) at 4°C overnight. Samples were rinsed with PHEM buffer and post-fixed in 0.5% osmic acid/0.8% potassium ferrocyanide in the dark at RT for 2h. Inserts were washed in PHEM buffer twice, and then dehydrated in a graded series of ethanol solutions (from 30 to 100%). Samples were embedded in EmBed 812 using an Automated Microwave Tissue Processor for Electronic Microscopy (Leica EM AMW). Thin sections (70 nm; Leica-Reichert Ultracut E) were collected at different points. Sections were then stained with 1.5% uranyl acetate/70% ethanol/lead citrate and observed using a Tecnai F20 transmission electron microscope at 120KV (MRI facility, INM Montpellier France).

Cilia length determination

Cilia length was measured using the line measurement tool in ImageJ on SEM or Optical microscopic images. To limit measurement bias, only whole flat cilia parallel to the plane of focus were analysed. Angled cilia or cilia with

incomplete visible part were excluded. Cilia length was assessed by the average of three measurements¹. At least 20 ciliated cells were measured to determine the average ciliary length.

Flow cytometry analysis

For extracellular CXCR4 staining, cells were first incubated with Zombie violet (1:1000, Biolegend) to differentiate between live and dead cells at RT in the dark for 15 min. Cell pellets were then incubated with an anti-CXCR4 conjugated to PE antibody (Mouse PE, 1:200, BD Biosciences) or its isotype control at 4°C for 30 min.

For intracellular NKX2.1 staining, after staining with Zombie violet to assess cell viability, cells were fixed in 0.5% PFA/PBS at RT for 10 min. Cells were blocked and permeabilized by incubation with 1X saponin (10X, Thermo Fisher) and 10% donkey serum (Sigma) in MilliQ water at RT for 20 min. Then, cells were incubated with unconjugated anti-NKX2.1 primary antibody (rabbit, 1:1000, Abcam) at RT for 30min followed by an AlexaFluor 488 secondary antibody (donkey anti-rabbit, 1:3000, Life technologies) at RT in the dark for 60min. Antibodies were diluted in MilliQ water/1X saponin. All acquisitions were done on a Beckman Coulter Gallios cytometer and data were analysed with the Kaluza software. The detailed cytometer gating strategy is described in Supplemental figure S3.

RT-qPCR analysis

Reverse transcription (RT) was performed using SuperScript™ First-Strand Synthesis System (ref 11904-018, Invitrogen) as recommended by the manufacturer in 20 µL reaction volume that included 1 µg RNA (extracted with RNeasy Mini Kit, ref 74106, Qiagen), Superscript II RT, oligo-dT primer, dNTP mixture, MgCl₂, 0.1 M DTT and RNase inhibitor. Quantitative PCR (qPCR) was then performed using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master (04707516001, Roche) with 2 µl of the RT reaction product (1:20 dilution) and 0.5µl of each primer diluted at 10µM (Integrated DNA Technologies IDT) in a total volume of 10 µl. PCR amplifications were carried out using a LightCycler 480 apparatus and the following programme: 1 cycle of 95°C for 10s; 40 cycles of 95°C for 10s, 60°C for 15s; 72°C for 15s, 1 cycle 95°C for 5s, 65°C for 1min, 97°C forever. Gene expression levels were normalised to the expression of the housekeeping gene *GAPDH*, using the following formula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ unknown} - \Delta Ct \text{ positive control}$. Each sample was analysed in duplicate and multiple controls were included.

Primary Human Bronchial Epithelial Cells (HBECs) cultivated in ALI culture conditions were used as lung positive control. Contamination from other layers was assessed using control samples: liver (HepG2 cells), thyroid (Thermo Fisher Scientific, cat no. QS0631), brain (Thermo Fisher Scientific, cat no. QS0611), and colon (Thermo Fisher Scientific, cat no. QS0613) total RNA. Primer sequences are shown in Supplementary table 4.

Quantification of SGB1A1 and MUC5AC secretion

Apical secretions were gently collected with a micropipette and stored at -80°C , for a maximum of one month. Typically, to collect the secretions for one culture transwell, we performed an apical wash with 200 μL of PBS warmed at room temperature. One up and down pipetting was performed to collect PBS, that also allows some mucus to detach. SGB1A1 and MUC5AC were quantified from these samples.

SCGB1A1 and MUC5AC secretions were measured in a dot blot assay using primary antibodies (anti Muc5Ac (45M1); ThermoFisher Scientific or Club Cell Protein rabbit polyclonal antibody ; Biovondor). Apical lavages were spotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was then incubated in Odyssey blocking solution. After washing, the membrane was incubated with primary antibodies at room temperature for 2 hours. Secondary fluorescent anti-mouse and anti-rabbit antibodies was then added to the membrane. Positive signals were detected using an Odyssey imager. Optical densities were measured with Alphaview software.

For MUC5AC detection: apical lavages from Day 28 to Day 46 of one iALI bronchial epithelium culture (derived from Hy03, iCOPD8 and iCOPD9) were spotted onto a nitrocellulose membrane. Negative controls (PBS and ALI medium) and positive controls (supernatants of ALI culture bronchial epithelium from biopsies) were added to check the specificity of the experiment. Supernatant of hiPSC at Day 0 was spotted to confirm the lack of MUC5AC secretion.

For SCGB1A1 detection: supernatants of iALI bronchial epithelium cultures derived from the HY03, iCOPD9, and iCOPD8 hiPSC cell lines were spotted. Negative control (PBS) and positive control (supernatant of ALI culture bronchial epithelium from biopsies) were added to check the specificity of the experiment. 0.625 to 5ng of Recombinant human Club Cell protein (Biovondor) were used as standard range to quantify SCGB1A1 secretion.

TEER measurement

TEER: Epithelial monolayer integrity was assessed by trans-epithelial electrical resistance (TEER) using WPI EVOM2 Model with STX2 electrode. Measurements were done on transwell devices with 1ml of PneumaCult-ALI Medium in the basolateral chamber and 300 μ l of PBS calcium, magnesium (Gibco, cat no 14040083) at the top. The measurement process consists on measuring the blank TEER ($TEER_{BLANK}$) of the semipermeable membrane only coated with Geltrex and without cells. Total TEER ($TEER_{TOTAL}$) was a measure of the resistance across the cell layer on the insert semipermeable membrane. The real TEER of the epithelial cell was calculated with the following formula $TEER_{cell\ layer} (\Omega) = TEER_{TOTAL} - TEER_{BLANK}$. $TEER_{cell\ layer} (\Omega)$ was then multiplied per the area of the insert (1.12cm²) to obtain final TEER in $\Omega.cm^2$.

For Review Only

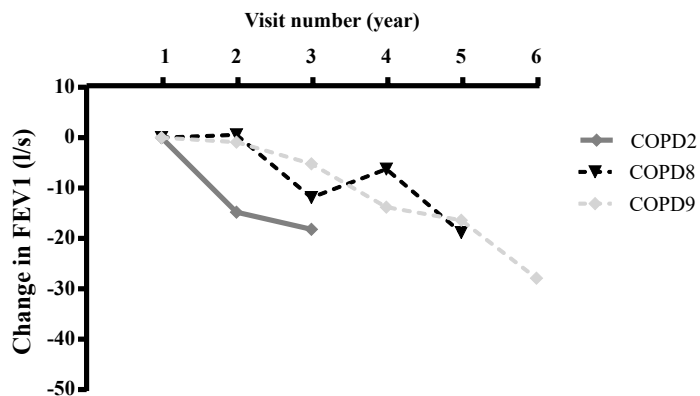
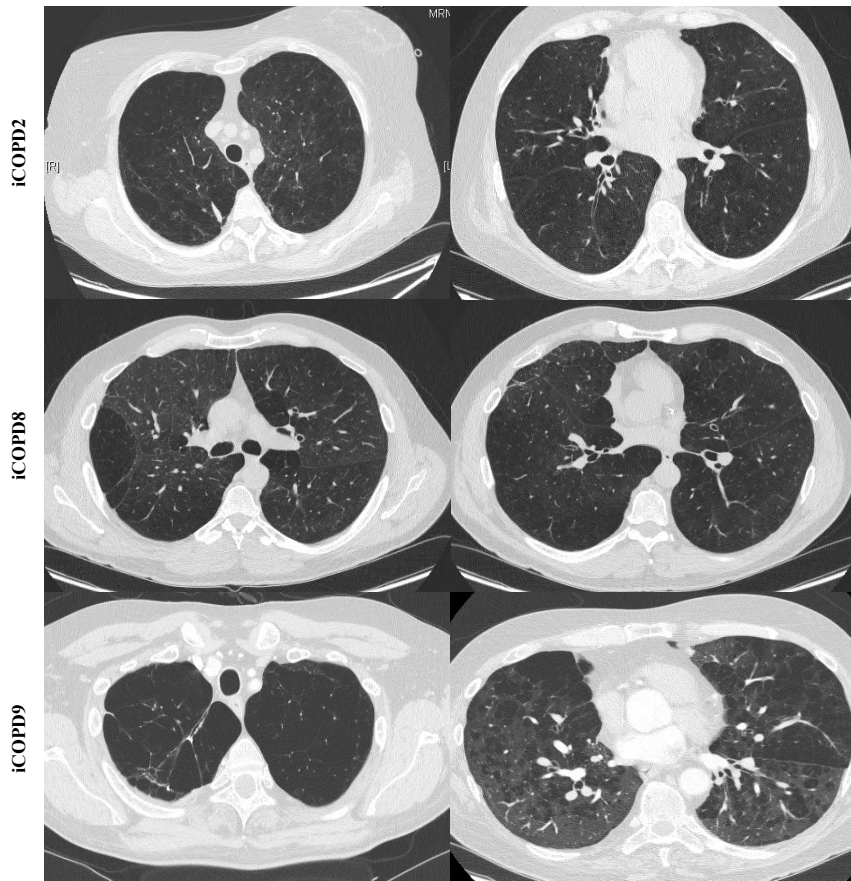
1. Dummer, A., Poelma, C., DeRuiter, M. C., Goumans, M. J. & Hierck, B. P. Measuring the primary cilium length: improved method for unbiased high-throughput analysis. *Cilia* 5, 7 (2016).

For Review Only

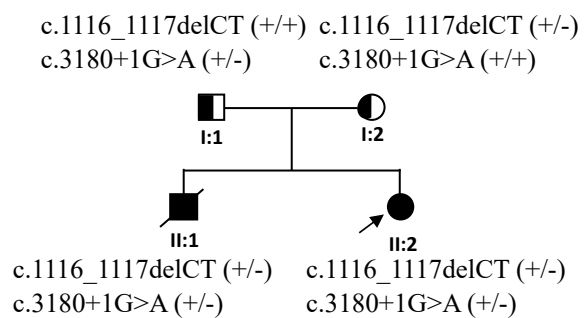
A

Apex

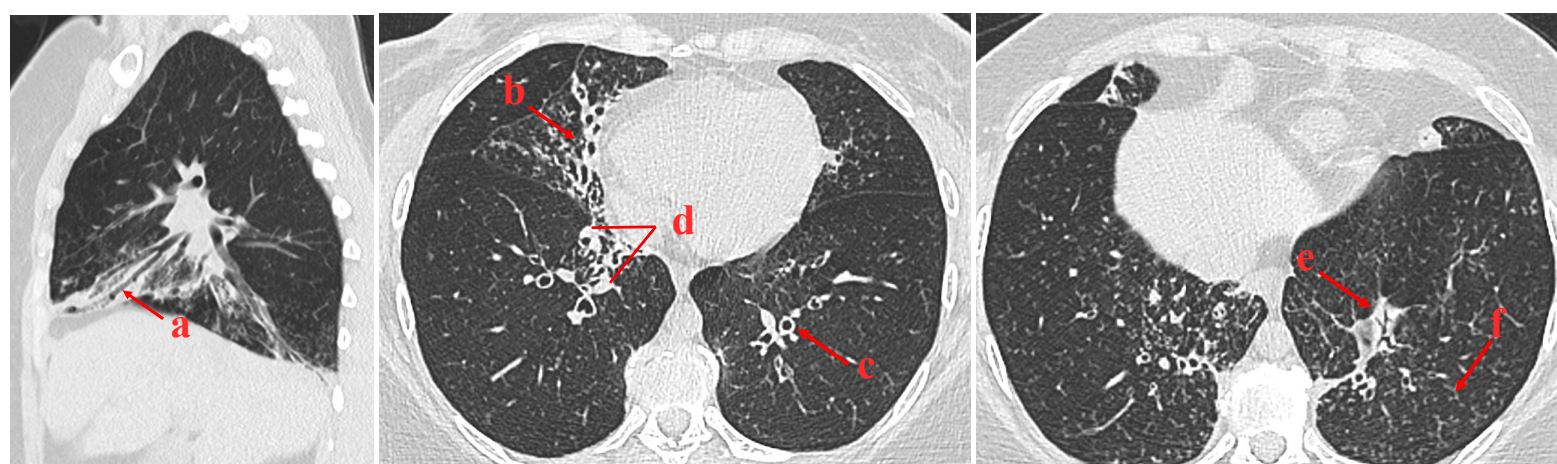
Base



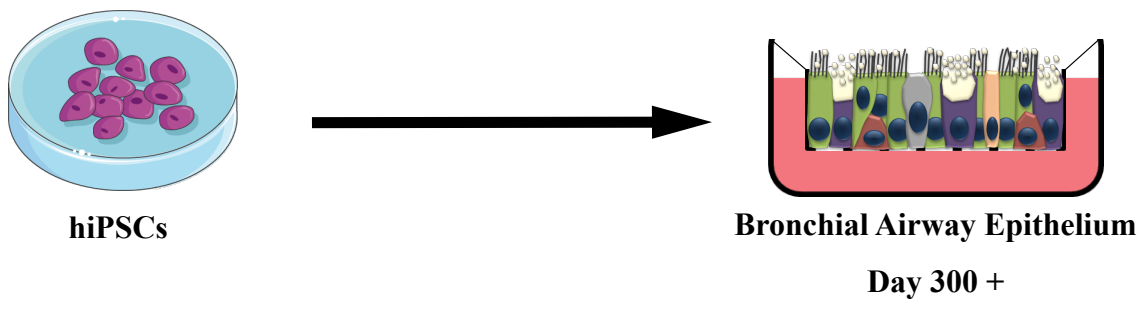
B



ID	PCD
I:1	No
I:2	No
II:1	TGA, Single Ventricle Pulmonary stenosis Dextrocardia, PCD
II:2	PCD, infertility



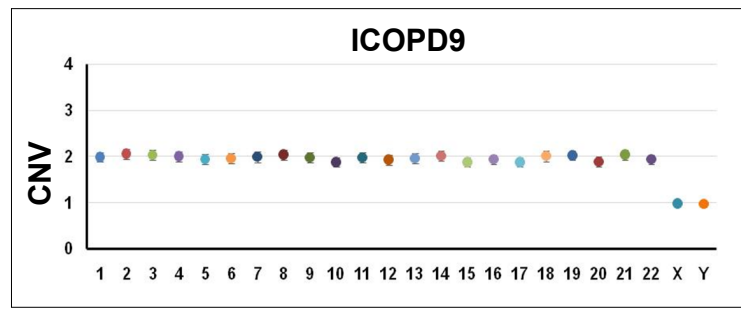
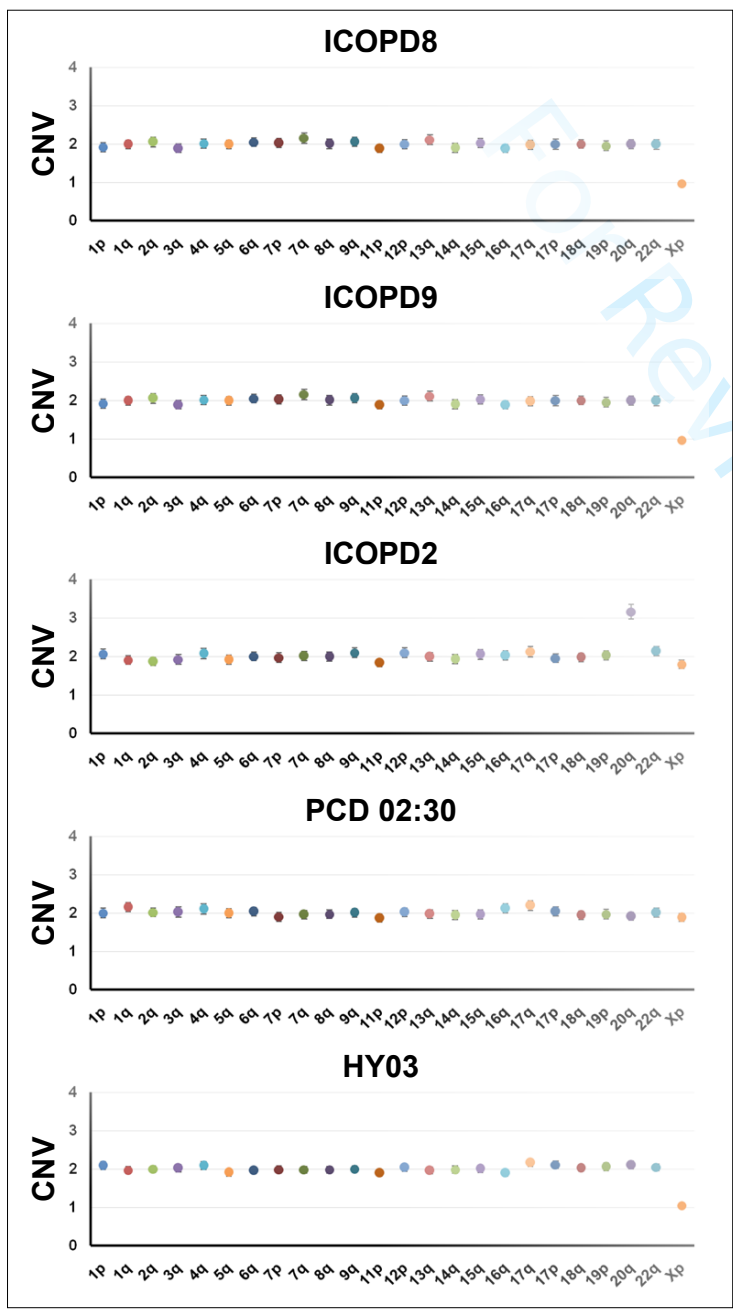
A



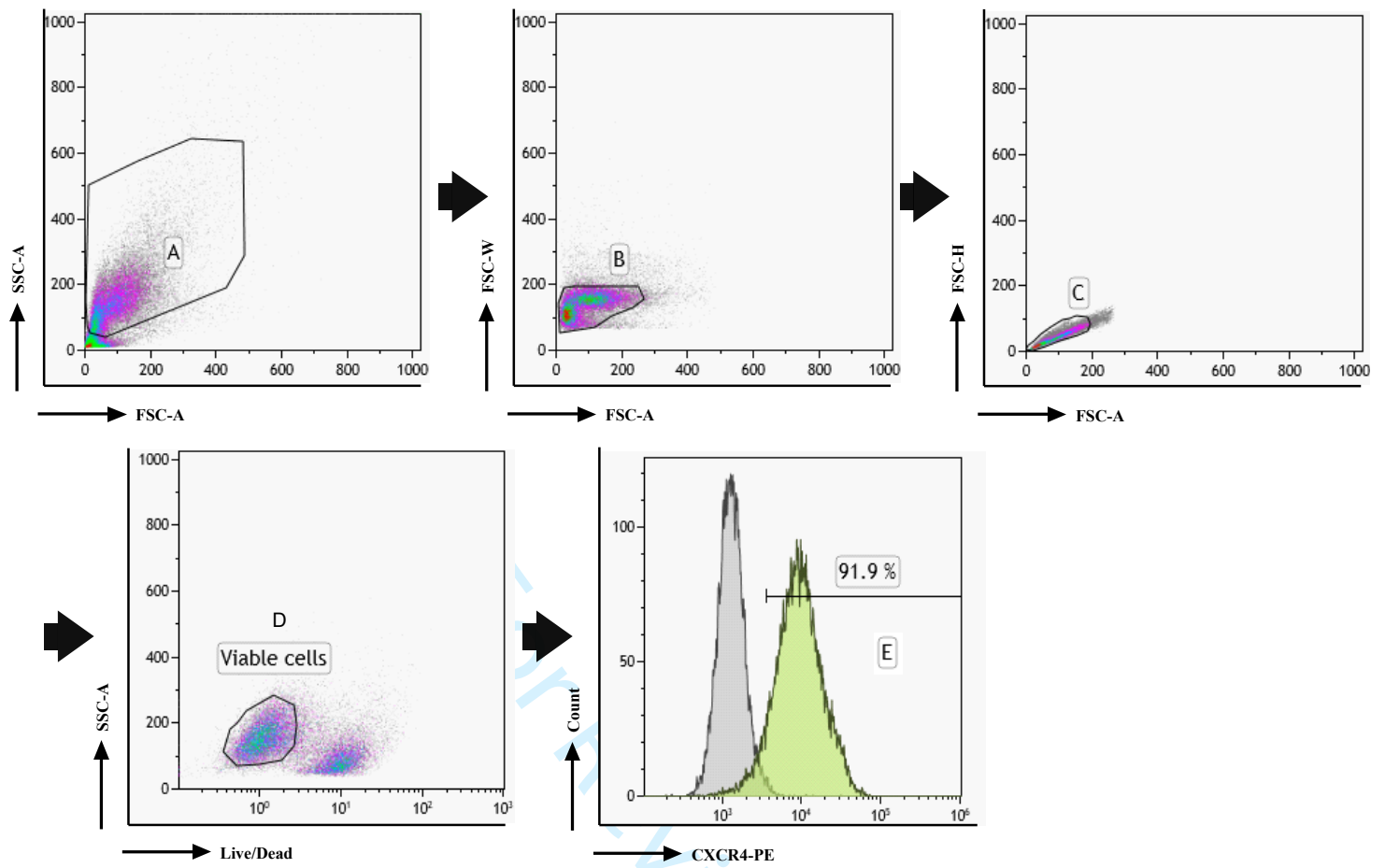
B

iCS- digital test

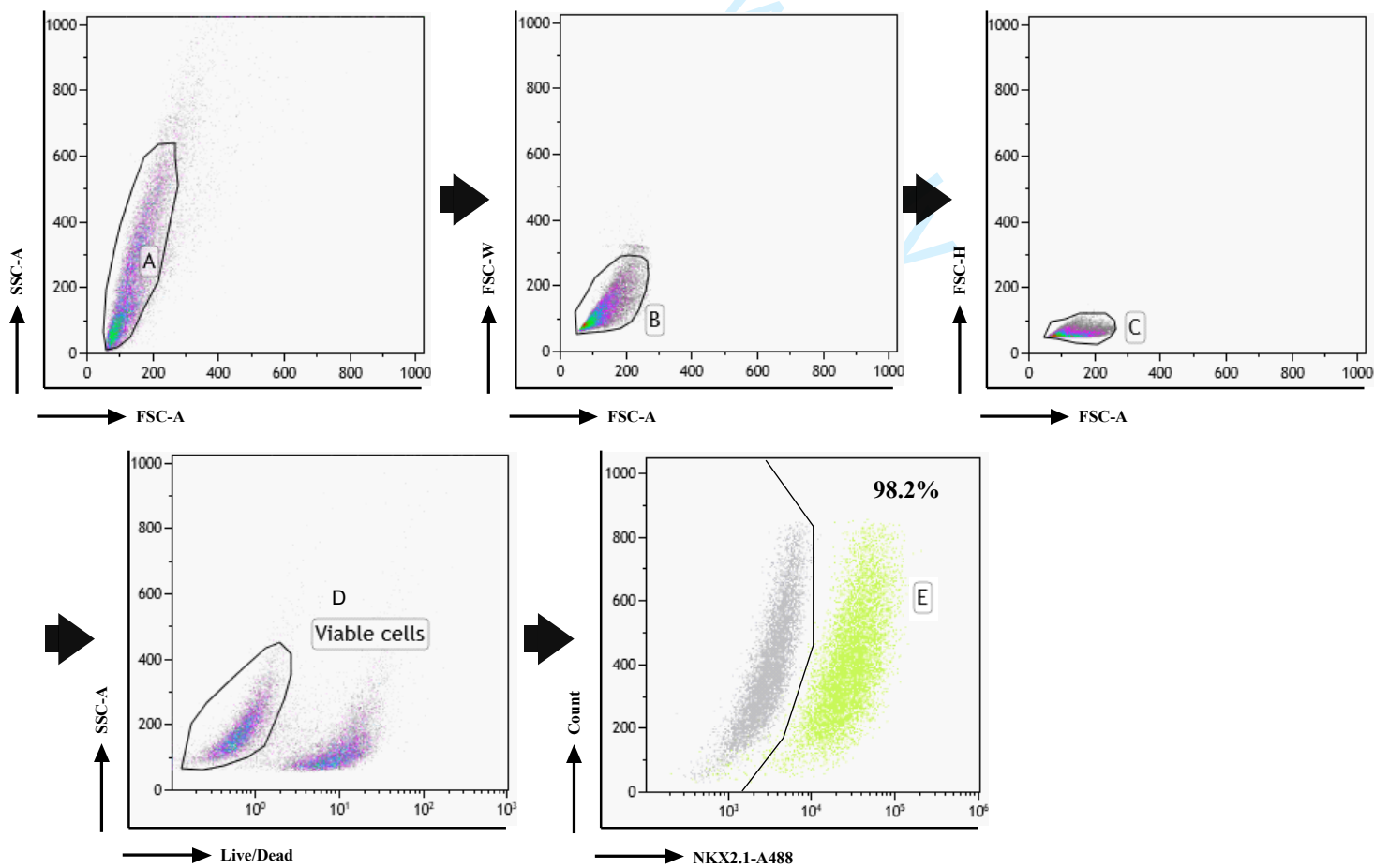
iCS-digital aneuploidy

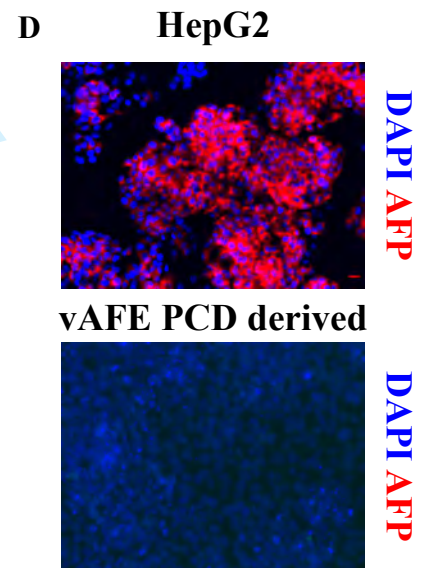
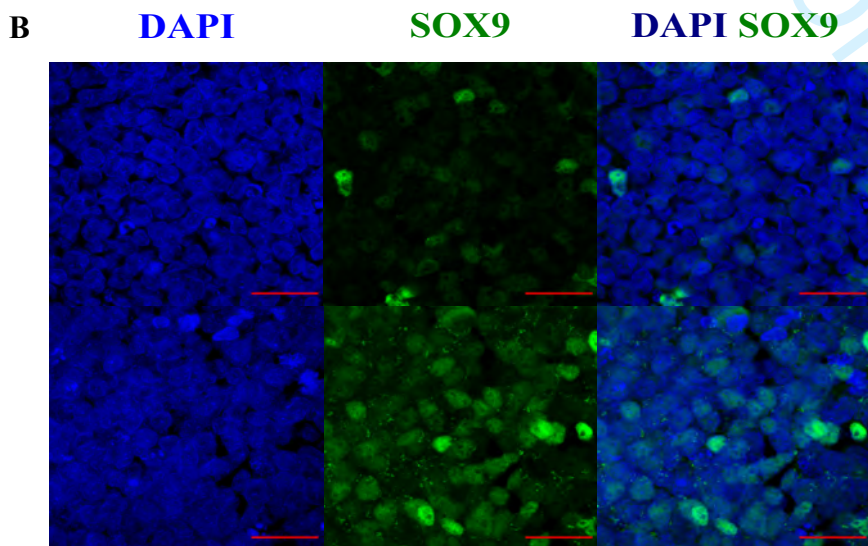
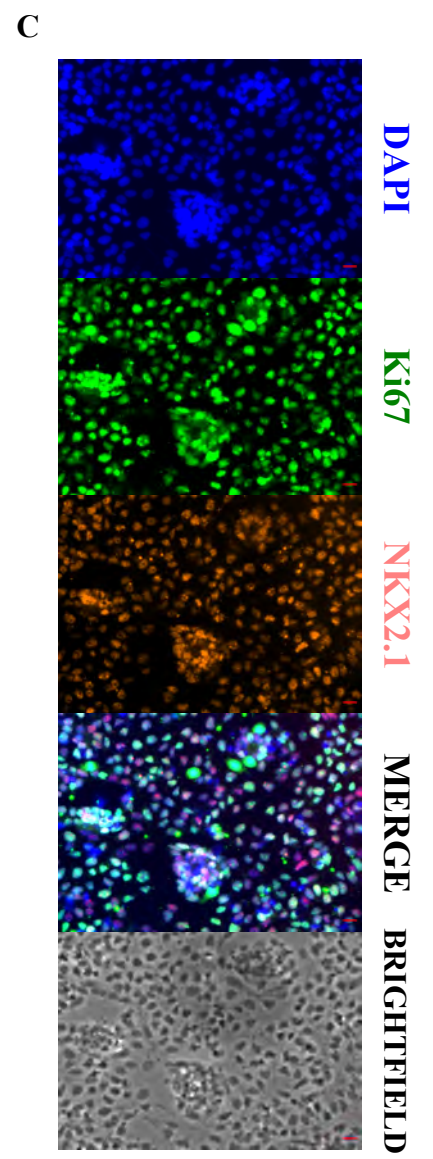
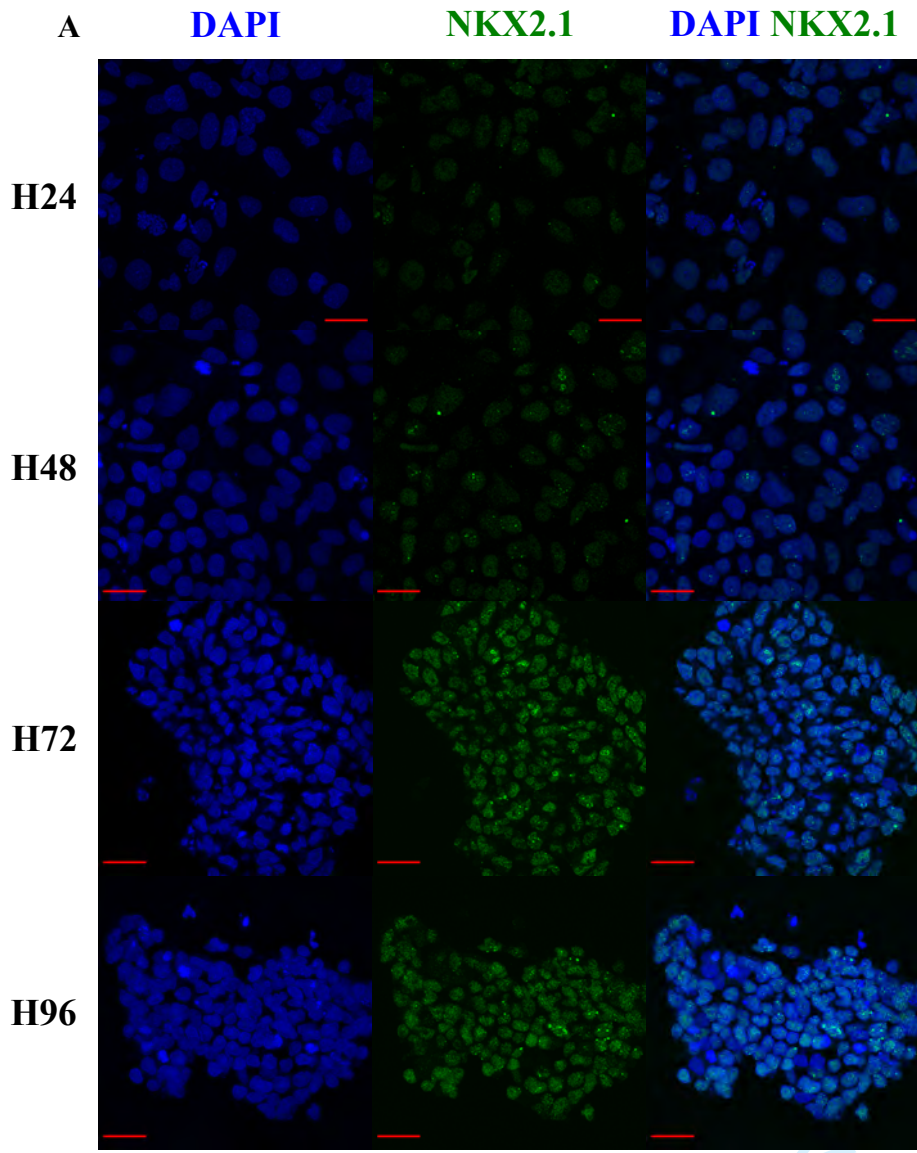


A - Flow cytometry analysis of CXCR4 at definitive endoderm stage

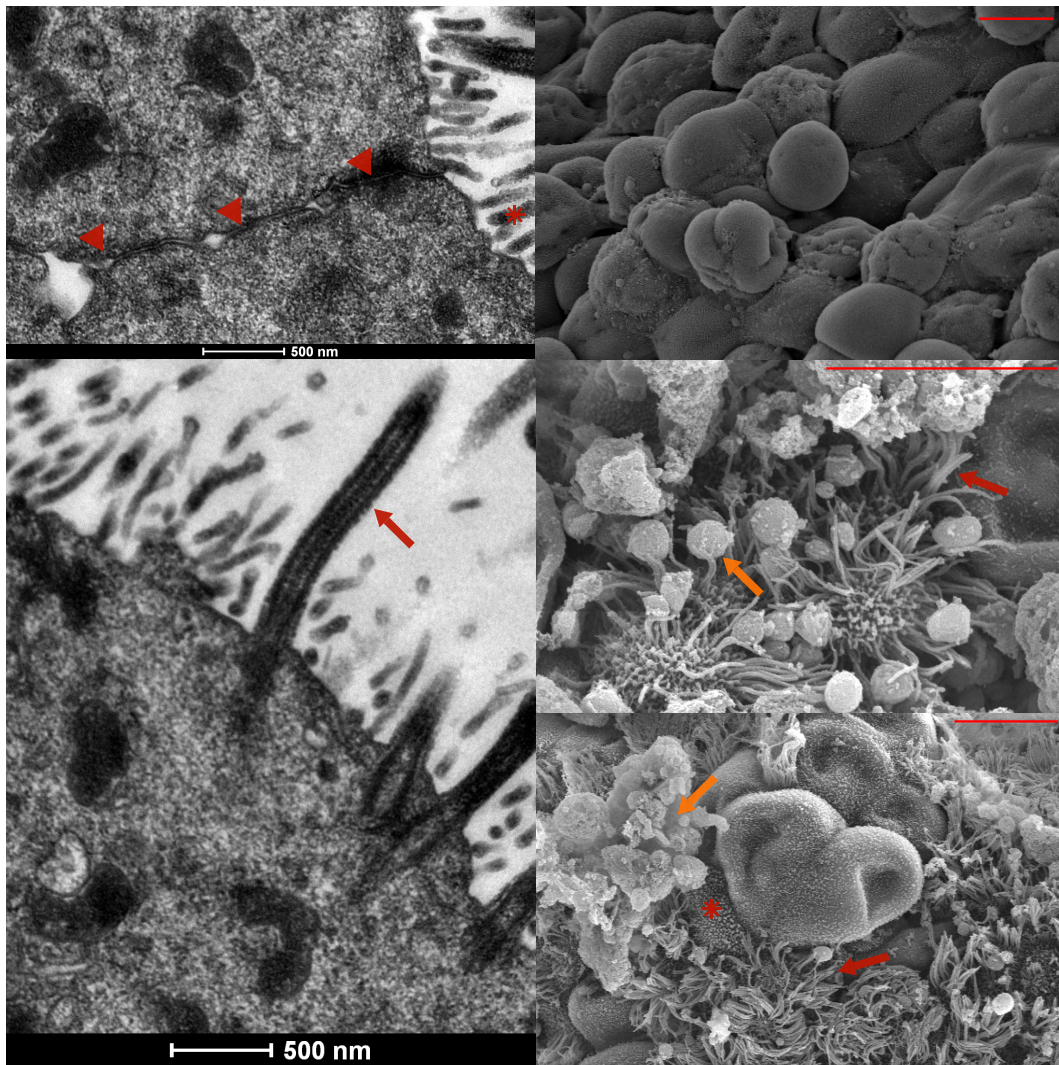


B - Flow cytometry analysis of NKX2.1 at anterior foregut endoderm stage

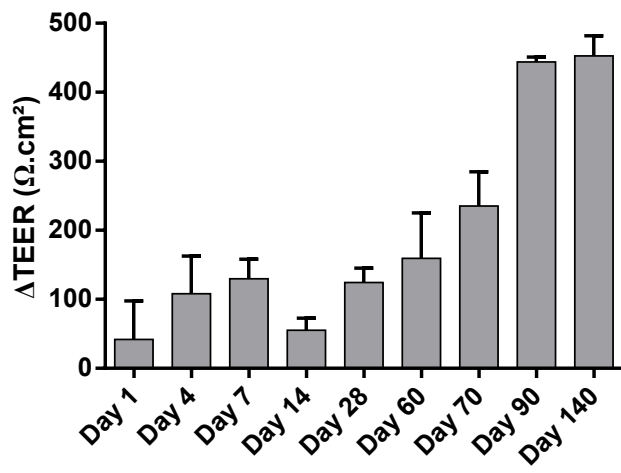




A

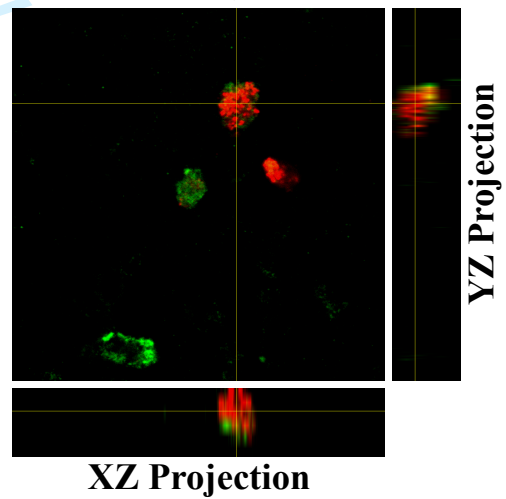


B



C

Plan Z Projection

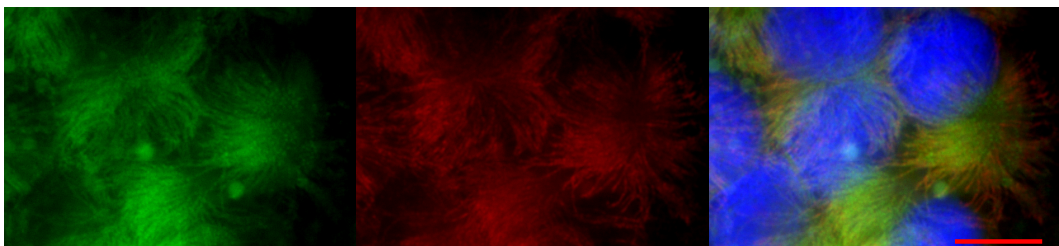


D

DNAH5

TUBIV

DAPI DNAH5 TUBIV



Supplemental Table 1: Baseline characteristics of COPD patients

	COPD2	COPD8	COPD9
Age (years)	52	46	54
Sex	F	M	M
Body-mass index (kg/m ²)	30	24	32
Smoking			
Current/ Ex-smoker	Current	Ex-smoker	Ex-smoker
Pack-year history	45	30	75
Age of beginning (years)	14	18	24
Others toxic *	Yes	Yes	No
Pulmonary function and symptoms			
Age of diagnosis	48	43	49
Age at onset of first symptoms (years)	40	30	35
In utero smoking exposure	Yes	Yes	Yes
Premature birth	No	No	Yes
Familial history of COPD/emphysema	Yes	No	Yes
Increased dyspnea	Yes	Yes	Yes
Increased cough	Yes	No	Yes
Medical Research Council dyspnea scale	4	1	4
Lung function			
FEV (L)	0.35	1.19	0.97
FEV (%)	14	34	30
FEV1/FVC ratio (%)	32	25	36
RV (L)	4.39	3.21	4.72
RV (%)	244	156	213
DLCO (%)	30	41	35
Medication			
Long acting β 2 agonist	Yes	Yes	Yes
Long-acting muscarinic antagonist	Yes	Yes	Yes
Inhaled corticosteroid	No	No	No
Use of benzodiazepine	Yes	Yes	Yes
Azithromycin	Yes	No	No
Clinical findings			
Oxygen supply (L/min)	1	0	3
BODE index	6	3	6
Exacerbation rate in previous 12 months	3	3	1
Pneumothorax	No	Yes	Yes
Osteoporosis	Yes	No	Yes
Pulmonary hypertension**	No	No	No
Coronary Artery Disease	No	No	No
Lung cancer	No	No	No
Type 2 diabetes	No	No	No
GORD	Yes	Yes	Yes
Anxiety/Depression	Yes/No	Yes/Yes	Yes/Yes
Blood test			
Eosinophils (10 ⁹ cells per L)	150	N.A	810
Eosinophils (% total WBC)	2.4	N.A	5.9
α 1 anti trypsin (g/l)	1.16	1.37	1.1
PaO ₂ (mmHg, ambient air)	62	82	76.6
PaCO ₂ (mmHg, ambient air)	48.8	32.6	44.4
CT scan			
Emphysema (wall lung) %	18.4	12.99	31.95
WA ratio mean (min-max)	59.75 (48.1-68.1)	57 (44.9-69)	68.2 (57.7-77.1)

Supplemental Table 2: Baseline characteristics of PCD patient

	PCD patient
Age (years)	30
Sex	F
Smoking	No
Baseline medical history	
Age at onset of first symptoms (years)	> 2 years
Familial history of pulmonary disease	Yes
Chronic productive cough	Yes
Medical Research Council dyspnea scale	2
Fertility problems	Yes
Situs Inversus	No
Chronic Otitis Media	No
Rate of exacerbations (per year)	1
PCD-related hospitalizations	No
Chronic nose symptoms	Yes
Retinitis pigmentosa	No
Kidney problems	No
Gastrointestinal problems	No
Surgical interventions related to PCD	No
Non-PCD-related comorbidities	No
Diagnosis	
Nasal NO	N.A
Genetic analysis	Heterozygous mutations CCD40 gene
Lung function	
FEV (L)	1,91
FEV (%)	69
FEV1/FVC ratio (%)	75
DLCO (%)	80
PaO ₂ (mmHg)	72
Medication	
Long acting β 2 agonist	Yes
Long-acting muscarinic antagonist	No
Inhaled corticosteroid	No
Azithromycin	No
Physiotherapy	Yes
Oxygen supplementation	No
Imaging findings	
Bronchiectasis	Yes
Atelectasis	No
Infiltrations	Yes
Lobar collapse	No
Mucus plugging	Yes
Location of bronchiectasis	Middle lobe
Pansinusitis	Yes
Microbiology	
	No chronic colonization

Supplemental Table 3: Media composition by culture period

Media	Induced Pluripotent Stem cells	Anterior Primitive Streak	Definitive Endoderm	Anterior Foregut Endoderm	Lung Progenitor	Lung Airway Epithelium
Days	Day 0	Day 1	Day 2-3	Day 4-8	Day 9-10	Day 11-42+
Basal media	Essential 8 Medium Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) 1%	RPMI 1640 1x B27 supplement (50x), minus vitamin A Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) 1%	RPMI 1640 1x B27 supplement (50x), minus vitamin A Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) 1%	RPMI 1640 1x B27 supplement (50x), minus vitamin A Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) 1%	PneumaCult-Ex Plus Medium* Penicillin- Streptomycin (10,000 U/mL) 1%	PneumaCult-ALI Medium** Penicillin- Streptomycin (10,000 U/mL) 1%
Add the day of use	+ 10µM Y-27632	+ 10µM Y-27632 + Activin A 100ng/ml + CHIR99021 3µM	+ 10µM Y-27632 + Activin A 100ng/ml + LDN-193189 250nM	No cytokines	No cytokines	10 µM DAPT from day 28 to day 42

Pre-Review Only

Supplemental Table 4: Molecules and used concentration

Growth Factor	Stock Concentration	Final Concentration
Activin A	50 µg/ml	100 ng/ml
Y-27632	5 mM	10 µM
CHIR99021	3 mM	3 µM
LDN-193189	450 µM	250 nM
DAPT	10 mM	10 µM

For Review Only

Supplemental Table 5: list of reagents and consumables

REAGENT	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</i>		
Geltrex LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Thermo Fisher	A1413301
StemSpan SFEM II	Stemcell	09605
StemSpan Erythroid Expansion Supplement	Stemcell	02692
Sodium Butyrate,	Stemcell	72242
CytoTune™ –iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit	Thermo Fisher	A16517
B27 supplement (50x), minus vitamin A	Thermo Fisher	12587010
Y-27632 dihydrochloride	Tocris	1254
CHIR-99021	Sigma	SML1046-5MG
LDN-193189	Miltenyi biotec	130-103-925
DAPT	Tocris	2634/10
Activin A	Peptotech	AF-120-14E
Permeabilization Buffer (10X)	Thermo Fisher	00-8333-56
Triton X-100 (laboratory grade)	Sigma	X100-5ML
Bovine Serum Albumin	Sigma	A7906-100G
ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher	P36930
Donkey serum	Sigma	D9663-10ML
Goat serum	Sigma	G9023-5ML
DAPI	Sigma	D9542-5MG
CryoStor CS10	Stemcell	07930
Zombie Violet Fixable Viability Kit	BioLegend	423113
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher	15140122
Versene Solution	Thermo Fisher	15040033
Glutaraldehyde (25%)	Deltamicroscopies	16210
Paraformaldehyde (10%)	Deltamicroscopies	15712
<i>Oligonucleotide primers</i>	Integrated DNA Technologies (IDT)	See Table S4 - List and sequences of the primers used for RT-qPCR
<i>RNA controls</i>		
Human lung	Invitrogen	QS0618
Human thyroid	Invitrogen	QS0631
Human heart	Invitrogen	QS0614
Human colon	Invitrogen	QS0613
Human liver	Invitrogen	QS0617
Human brain	Invitrogen	QS0611
<i>Antibodies (dilution)</i>		
Donkey anti-rabbit IgG AlexaFluor 488 (1:1000)	Life technologies	A21206
Donkey anti-mouse IgG AlexaFluor 555 (1:1000)	Life technologies	A31570
Donkey anti-goat IgG AlexaFluor 647 (1:1000)	Life technologies	A21447
Mouse anti-CXCR4 (PE) (1:200)	BD Biosciences	557145
Mouse IgG2a, (PE) (1:200)	BD Biosciences	556653
Mouse anti-AFP (1:200)	Sigma	A8452
Mouse anti-Mucin 5AC (1:200)	Abcam	ab3649
Mouse anti-SOX2 (1:100)	Abcam	ab79351
Rabbit anti-SOX9 (1:1000)	Abcam	ab185230
Mouse anti-β-Tubulin IV (1:200)	Sigma	T7941
Rabbit anti-DNAH5 (1:200)	Sigma	HPA037470
Rabbit anti E-cadherin (1:200)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7870
Rabbit anti-Oct 4 (1:250)	Santa Cruz Biotechnology	sc-9081
Rabbit anti-NANOG (1:200)	Abcam	ab80892
Rabbit anti-CCSP (1:1000)	BioVendor	Rd181022220
Rabbit anti-TTF1 (NKX2.1) IF: 1:200 / FCM 1:1000	Abcam	ab76013
Mouse anti-Chromogranin A (1:200)	Abcam	ab715
Rabbit anti-Ki67 (1:200)	Abcam	ab15580
Goat anti-SOX17 (1:150)	R&D Systems	af1924
Goat anti-FOXA2 (1:150)	R&D Systems	af2400
SiR-tubulin	Spirochrome AG	SC002
<i>Software and Algorithms</i>		
GraphPad	Prism	Version 6.01
ImageJ	National Institutes of Health	Version 1.52i
Inkscape	Free Software Foundation	Version 3
Alphaview software	Protein simple	Version 3.4.0.0
Zen 2.3	Carl Zeiss Microscopy	Version 4.03
Kaluza Analysis	Beckman Coulter	Version 2.1
Kaluza for Gallios Acquisition	Beckman Coulter	Version 1.0
Flow Cytometer (FCM)	Beckman Coulter	Gallios
Confocal Microscopy	Zeiss	LMS700
Odyssey imaging system	LI-COR	Odyssey 9120 Model
Scanning electron microscopy	Hitachi	S4000
Optical microscopy	Leica	DMi1 Model/MC170HD camera

Supplemental Table 5: list of reagents and consumables

Others		
Essential 8 Medium	Thermo Fisher	A1517001
DMEM/F-12, GlutaMAX Supplement	Thermo Fisher	31331093
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher	21875034
PneumaCult-Ex Plus Medium	Stemcell	05040
PneumaCult-ALI Medium	Stemcell	05001
PBS, pH 7.2	Gibco	20012019
SuperScript™ First-Strand Synthesis System	Invitrogen	11904-018
RNeasy Micro Kit	Qiagen	74004
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche	04707516001
Alkaline Phosphatase Staining Assay (Red)	ScienCell Research Laboratories	8288
Alcian blue solution	Merck Millipore	1016470500
Periodic Acid – Schiff kit	Merck Millipore	1016460001
0.4 µm Pore Polyester Membrane Insert (Ø12 mm)	Corning	3460
TEER device	WPI	EVOM2 Model/ STX2 electrode

For Review Only

Supplemental Table 6: list of PCR primers

Name	Size	Sequences
GAPDH_F	22	GAC CTG ACC TGC CGT CTA GAA A
GAPDH_R	21	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA
OCT4_F	22	GGG CTC TCC CAT GCA TTC AAA C
OCT4_R	22	CAC CTT CCC TCC AAC CAG TTG C
NANOG_F	21	TGA TTT GTG GGC CTG AAG AAA
NANOG_R	21	GAG GCA TCT CAG CAG AAG ACA
AFP_F	25	CTA CCT GCC TTT CTG GAA GAA CTT T
AFP_R	22	GAT CGA TGC TGG AGT GGG CTT T
TG_F	20	ACG GTT CCT CGC AGT TCA AT
TG_R	20	GCA GCT TGG AAC ATA GGG GT
CDX2_F	22	ACA GTC GCT ACA TCA CCA TCC G
CDX2_R	22	CCT CTC CTT TGC TCT GCG GTT C
PAX6_F	19	TCT TTG CTT GGG AAA TCC G
PAX6_R	21	CTG CCC GTT CAA CAT CCT TAG
CHGA_F	20	CGG ATC CTT TCC ATT CTG AG
CHGA_R	20	ACC GCT GTG TTT CTT CTG CT
SFTP_B_F	22	TCT GAG TGC CAC CTC TGC ATG T
SFTP_B_R	22	TGG AGC ATT GCC TGT GGT ATG G
FOXJ1_F	22	GAG ACA GGT TGT GGC GGA TTG A
FOXJ1_R	22	ACT CGT ATG CCA CGC TCA TCT G
MUC5AC_F	20	CAT CTG CCA GCT GAT TCT GA
MUC5AC_R	20	AAG ACG CAG CCC TCA TAG AA
CCSP_F	20	CAT GAA ACT CGC TGT CAC CC
CCSP_R	20	GAT GAC ACG CTG AAA GCT CG

3. Bibliographie

1. Hogg, J. C. *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2645–2653 (2004).
2. Rennard, S. I. & Vestbo, J. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet Lond. Engl.* **367**, 1216–1219 (2006).
3. Lowe, K. E. *et al.* COPDGene® 2019: Redefining the Diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chronic Obstr. Pulm. Dis. Miami Fla* **6**, 384–399 (2019).
4. GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir. Med.* **8**, 585–596 (2020).
5. Burgel, P.-R., Laurendeau, C., Raheison, C., Fuhrman, C. & Roche, N. An attempt at modeling COPD epidemiological trends in France. *Respir. Res.* **19**, 130 (2018).
6. Hagstad, S. *et al.* Passive smoking exposure is associated with increased risk of COPD in never smokers. *Chest* **145**, 1298–1304 (2014).
7. Tan, W. C. *et al.* The effects of marijuana smoking on lung function in older people. *Eur. Respir. J.* **54**, (2019).
8. Nightingale, R. *et al.* Screening Heroin Smokers Attending Community Drug Clinics for Change in Lung Function: A Cohort Study. *Chest* **157**, 558–565 (2020).
9. Sarkar, C. *et al.* Environmental correlates of chronic obstructive pulmonary disease in 96 779 participants from the UK Biobank: a cross-sectional, observational study. *Lancet Planet. Health* **3**, e478–e490 (2019).
10. Lewer, D. *et al.* Premature mortality attributable to socioeconomic inequality in England between 2003 and 2018: an observational study. *Lancet Public Health* **5**, e33–e41 (2020).

11. Yanai, M., Sekizawa, K., Ohru, T., Sasaki, H. & Takishima, T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **72**, 1016–1023 (1992).
12. McDonough, J. E. *et al.* Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1567–1575 (2011).
13. Koo, H.-K. *et al.* Small airways disease in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Lancet Respir. Med.* **6**, 591–602 (2018).
14. Diaz, A. A., Estépar, R. S. J. & Washko, G. R. Computed Tomographic Airway Morphology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Remodeling or Innate Anatomy? *Ann. Am. Thorac. Soc.* **13**, 4–9 (2016).
15. Smith, B. M. *et al.* Human airway branch variation and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E974–E981 (2018).
16. Mitchell, R. S. *et al.* The morphologic features of the bronchi, bronchioles, and alveoli in chronic airway obstruction: a clinicopathologic study. *Am. Rev. Respir. Dis.* **114**, 137–145 (1976).
17. Aikawa, T. *et al.* Morphometric analysis of intraluminal mucus in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 477–482 (1989).
18. Hogg, J. C. *et al.* Survival after lung volume reduction in chronic obstructive pulmonary disease: insights from small airway pathology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 454–459 (2007).
19. Kesimer, M. *et al.* Airway Mucin Concentration as a Marker of Chronic Bronchitis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 911–922 (2017).
20. Hajj, R. *et al.* Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 139–148 (2007).
21. Breeze, R. G. & Wheeldon, E. B. The cells of the pulmonary airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **116**, 705–777 (1977).

22. Chen, G. *et al.* SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J. Clin. Invest.* **119**, 2914–2924 (2009).
23. Park, J.-H., Lee, J.-M., Lee, E.-J., Kim, D.-J. & Hwang, W.-B. Kynurenine promotes the goblet cell differentiation of HT-29 colon carcinoma cells by modulating Wnt, Notch and AhR signals. *Oncol. Rep.* **39**, 1930–1938 (2018).
24. Singh, G. *et al.* Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **36**, 73–80 (1988).
25. Zuo, W.-L. *et al.* Ontogeny and Biology of Human Small Airway Epithelial Club Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2018) doi:10.1164/rccm.201710-2107OC.
26. Rhodin, J. A. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am. Rev. Respir. Dis.* **93**, Suppl:1-15 (1966).
27. Linnoila, R. I. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **86**, 425–444 (2006).
28. Stevens, T. P., McBride, J. T., Peake, J. L., Pinkerton, K. E. & Stripp, B. R. Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury. *Am. J. Physiol.* **272**, L486-493 (1997).
29. Quesada, S. & Jay, P. De nouveaux types cellulaires identifiés par séquençage haut débit sur cellule unique. *Med Sci* **32**, 447–449 (2016).
30. Jaitin, D. A. *et al.* Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* **343**, 776–779 (2014).
31. Shalek, A. K. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* **510**, 363–369 (2014).
32. Patel, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**, 1396–1401 (2014).

33. Montoro, D. T. *et al.* A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* **560**, 319–324 (2018).
34. Plasschaert, L. W. *et al.* A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* **560**, 377–381 (2018).
35. Hogg, J. C. & Timens, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 435–459 (2009).
36. Gao, W. *et al.* Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirol. Carlton Vic* **20**, 722–729 (2015).
37. Eustace, A. *et al.* Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. *Chest* **139**, 1089–1100 (2011).
38. Silver, J. S. *et al.* Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat. Immunol.* **17**, 626–635 (2016).
39. Byers, D. E. *et al.* Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J. Clin. Invest.* **123**, 3967–3982 (2013).
40. Saetta, M. *et al.* CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 711–717 (1999).
41. Cosio, M. G., Saetta, M. & Agusti, A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2445–2454 (2009).
42. Cosio, M. G., Majo, J. & Cosio, M. G. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* **121**, 160S–165S (2002).
43. van der Strate, B. W. A. *et al.* Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 751–758 (2006).
44. Sopori, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 372–377 (2002).
45. Ben-Porath, I. & Weinberg, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 961–976 (2005).

46. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130**, 223–233 (2007).
47. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
48. Matsumura, T., Zerrudo, Z. & Hayflick, L. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* **34**, 328–334 (1979).
49. Kuilman, T. & Peeper, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94 (2009).
50. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, 2853–2868 (2008).
51. Coppé, J.-P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PloS One* **5**, e9188 (2010).
52. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540–2551 (1994).
53. Chilosi, M., Poletti, V. & Rossi, A. The pathogenesis of COPD and IPF: distinct horns of the same devil? *Respir. Res.* **13**, 3 (2012).
54. Kusko, R. L. *et al.* Integrated Genomics Reveals Convergent Transcriptomic Networks Underlying Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 948–960 (2016).
55. Morissette, M. C., Vachon-Beaudoin, G., Parent, J., Chakir, J. & Milot, J. Increased p53 level, Bax/Bcl-x(L) ratio, and TRAIL receptor expression in human emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 240–247 (2008).
56. Morlá, M. *et al.* Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur. Respir. J.* **27**, 525–528 (2006).

57. Amsellem, V. *et al.* Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 1358–1366 (2011).
58. Nyunoya, T. *et al.* Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 681–688 (2006).
59. Tsuji, T., Aoshiba, K. & Nagai, A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 643–649 (2004).
60. Vestbo, J. *et al.* Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1184–1192 (2011).
61. Foreman, M. G. *et al.* Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 414–420 (2011).
62. Weiss, S. T. & Ware, J. H. Overview of issues in the longitudinal analysis of respiratory data. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, S208–211 (1996).
63. Martinez, F. D. Early-Life Origins of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 871–878 (2016).
64. Stern, D. A., Morgan, W. J., Wright, A. L., Guerra, S. & Martinez, F. D. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet Lond. Engl.* **370**, 758–764 (2007).
65. Belgrave, D. C. M. *et al.* Lung function trajectories from pre-school age to adulthood and their associations with early life factors: a retrospective analysis of three population-based birth cohort studies. *Lancet Respir. Med.* **6**, 526–534 (2018).
66. Bui, D. S. *et al.* Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life. *Lancet Respir. Med.* **6**, 535–544 (2018).
67. Svanes, C. *et al.* Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **65**, 14–20 (2010).

68. Hanrahan, J. P. *et al.* The effect of maternal smoking during pregnancy on early infant lung function. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 1129–1135 (1992).
69. Stocks, J. & Dezaux, C. The effect of parental smoking on lung function and development during infancy. *Respirol. Carlton Vic* **8**, 266–285 (2003).
70. Vrijlandt, E. J. L. E., Gerritsen, J., Boezen, H. M., Grevink, R. G. & Duiverman, E. J. Lung function and exercise capacity in young adults born prematurely. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 890–896 (2006).
71. Colom, A. J., Maffey, A., Garcia Bournissen, F. & Teper, A. Pulmonary function of a paediatric cohort of patients with postinfectious bronchiolitis obliterans. A long term follow-up. *Thorax* **70**, 169–174 (2015).
72. Miyake, K. *et al.* Association between DNA methylation in cord blood and maternal smoking: The Hokkaido Study on Environment and Children’s Health. *Sci. Rep.* **8**, 5654 (2018).
73. Yu, J. & Thomson, J. A. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev.* **22**, 1987–1997 (2008).
74. Stevens, L. C. & Little, C. C. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **40**, 1080–1087 (1954).
75. Kleinsmith, L. J. & Pierce, G. B. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res.* **24**, 1544–1551 (1964).
76. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255–256 (1984).
77. Velten, L. *et al.* Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat. Cell Biol.* **19**, 271–281 (2017).
78. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 126–131 (2011).
79. Almada, A. E. & Wagers, A. J. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 267–279 (2016).

80. Amit, M. *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* **227**, 271–278 (2000).
81. Wright, A. J. & Andrews, P. W. Surface marker antigens in the characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **3**, 3–11 (2009).
82. Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947–956 (2005).
83. Gurdon, J. B. & Byrne, J. A. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8048–8052 (2003).
84. Gurdon, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**, 622–640 (1962).
85. Blau, H. M., Chiu, C. P. & Webster, C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**, 1171–1180 (1983).
86. Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**, 1369–1373 (2005).
87. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).
88. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
89. Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**, 348–362 (2009).
90. Ye, L. *et al.* Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 558–566 (2013).
91. Kim, K. *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**, 285–290 (2010).

92. Polo, J. M. *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **28**, 848–855 (2010).
93. Marchetto, M. C. N. *et al.* Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PloS One* **4**, e7076 (2009).
94. Masaki, H. *et al.* Heterogeneity of pluripotent marker gene expression in colonies generated in human iPS cell induction culture. *Stem Cell Res.* **1**, 105–115 (2007).
95. Loh, K. M. *et al.* Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. *Cell Stem Cell* **14**, 237–252 (2014).
96. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4495–4509 (2005).
97. Lawson, K. A., Meneses, J. J. & Pedersen, R. A. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* **113**, 891–911 (1991).
98. Kubo, A. *et al.* Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 1651–1662 (2004).
99. D'Amour, K. A. *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1534–1541 (2005).
100. McLean, A. B. *et al.* Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 29–38 (2007).
101. Cardoso, W. V. & Lü, J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 1611–1624 (2006).
102. Green, M. D. *et al.* Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 267–272 (2011).
103. Matsuno, K. *et al.* Redefining definitive endoderm subtypes by robust induction of human induced pluripotent stem cells. *Differ. Res. Biol. Divers.* **92**, 281–290 (2016).

104. Chambers, S. M. *et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**, 275–280 (2009).
105. Jacob, A. *et al.* Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell* **21**, 472-488.e10 (2017).
106. Hawkins, F. *et al.* Prospective isolation of NKX2-1-expressing human lung progenitors derived from pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* **127**, 2277–2294 (2017).
107. McCauley, K. B. *et al.* Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell* **20**, 844-857.e6 (2017).
108. Chen, Y.-W. *et al.* A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.* **19**, 542–549 (2017).
109. Huang, S. X. L. *et al.* Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 84–91 (2014).
110. Konishi, S. *et al.* Directed Induction of Functional Multi-ciliated Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **6**, 18–25 (2016).
111. Yamamoto, Y. *et al.* Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat. Methods* **14**, 1097–1106 (2017).

SERMENT

- En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.
- Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.
- Admis (e) dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.
- Respectueux (se) et reconnaissant (e) envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert (e) d'opprobre et méprisé (e) de mes confrères si j'y manque.

Modélisation de l'épithélium bronchique par les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs)

Rationnel

Les cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSCs) offrent une opportunité sans précédent de modéliser le développement humain normal et pathologique de l'appareil respiratoire. La production *in vitro* de manière reproductible et en large quantité d'épithélium bronchique humain à partir d'hiPSCs est un objectif clé pour le criblage de médicaments à haut débit. Cette technologie permettra d'identifier de nouvelles cibles dans les maladies pulmonaires chroniques, en particulier la bronchopathie pulmonaire chronique obstructive (BPCO). Ce projet a pour objectif de modéliser *in vitro* les trajectoires de la BPCO, en lien avec une origine développementale et/ou une susceptibilité au tabac.

Méthodes

Nous avons mis au point un protocole de différenciation bronchique des hiPSCs, reprogrammées à partir de sang de patients sains ou malades. La différenciation dirigée de ces hiPSCs a permis de récapituler le développement pulmonaire par biomimétisme : gastrulation (Anterior Primitive Streak -APS), feuillet endodermique (Definitive Endoderm -DE), intestin antérieur primitif (Anterior Foregut Endoderm) et sa spécification (Ventralized AFE) en progéniteurs bronchiques NKX2.1+. Ces derniers ont ensuite été différenciés en interface air-liquide (iALI), afin d'obtenir un épithélium bronchique (iALI). La maturité et la fonctionnalité de l'iALI ont été évaluées par la caractérisation des sous-types cellulaires, la fonction ciliaire, la synthèse de protéines issues des cellules sécrétoires.

Résultats

La reprogrammation des cellules sanguines par transduction virale (Sendai) a été obtenue pour un patient sain et trois patients atteints d'une forme précoce et sévère de BPCO. La pureté moyenne des cellules aux stades DE et v-AFE était de 80%, évaluées par cytométrie en flux de CXCR4 et NKX2.1. La maturation des progéniteurs bronchiques NKX2.1 en ALI a permis d'obtenir en 4 semaines un épithélium bronchique mature et fonctionnel (iALI), partageant les caractéristiques d'un épithélium humain respiratoire *in vivo*. L'ensemble des sous-types cellulaires étaient retrouvés, à savoir les cellules basales (KRT5+), ciliées (TubIV+), caliciformes (MUC5AC+), Club (CCSP+), ainsi que des cellules neuroendocrines (CHGA+). La vidéo microscopie et la microscopie électronique confirmaient la présence de cils motiles partageant les caractéristiques des cellules ciliées *in vivo*. Les cellules caliciformes et Club produisaient respectivement la mucine MUC5AC et la protéine CCSP.

Conclusions

La reprogrammation et la différenciation des hiPSC en épithélium bronchique iALI mature et fonctionnel est maintenant accessible à une utilisation plus large. Cet outil permettra de modéliser *in vitro* les trajectoires de la BPCO. Les outils de séquençage à haut débit (transcriptomique dans notre étude), permettront également de découvrir de nouveaux candidats, représentants de potentielles cibles en vue d'un criblage pharmacologique.

Mots clés : BPCO, épithélium bronchique, voies aériennes, modélisation, cellules souches pluripotentes induites.