

Titre du projet : Rôle de l'épithélium bronchique dans la fibrogenèse tissulaire dans l'asthme sévère

Coordonnateur: Dr. Marina Pretolani, Directeur de Recherche à l'Inserm, Directeur de l'Inserm U700

Participants au projet :

Inserm U700: A. Druilhe (CR1 Inserm), C. Dill (Chercheur post-doctorant), S. Pégrier (Doctorant), M. Maret (IE Inserm), M. Grandsaigne (TS Inserm)

Service de Pneumologie A, CHU Bichat-Claude Bernard, Paris : Michel Aubier (PU-PH) et Marie-Christine Dombret (PH)

Laboratoire de Rattachement du Coordonnateur:

Inserm U700
Physiopathologie et Epidémiologie
de l'Insuffisance Respiratoire
Université Denis Diderot, Paris 7
Faculté de Médecine - Site Xavier Bichat

16, rue Henri Huchard
75018 Paris
Tél. 01-57-27-75-86
Fax. 01-57-27-75-51
e-mail : marina.pretolani@inserm.fr

Introduction. L'asthme est l'une des affections chroniques les plus fréquentes et représente un problème de santé publique mondial. Il s'agit d'un syndrome multifactoriel à déterminisme génétique, mais de nombreuses autres composantes contribuent à sa pathogenèse, et notamment les facteurs de l'environnement, dont l'exposition aux allergènes et aux polluants atmosphériques. L'analyse des prélèvements tissulaires de patients atteints d'asthme a permis d'attribuer une place prépondérante à la réaction inflammatoire dans la pathogénie de cette maladie et, de ce fait, une large majorité de patients voient leurs symptômes s'améliorer suite à la prise d'anti-inflammatoires stéroïdiens. Cependant, une sous-population d'environ 10% d'asthmatiques présente un trouble ventilatoire obstructif sévère et irréversible, et ce, malgré un traitement optimal avec des corticoïdes. Ces patients sont responsables de la plus grande partie des coûts liés à l'asthme, qu'ils soient directs en rapport avec l'hospitalisation et le traitement médical, ou indirects et, dans ce cas, liés pour l'essentiel aux périodes d'absentéisme scolaire, ou professionnel. La survenue de cette dégradation fonctionnelle respiratoire serait la conséquence d'un épaississement progressif de la paroi bronchique attribuable à un processus de remodelage tissulaire, dont certains déterminants cellulaires et moléculaires sont peu ou pas sensibles par les traitements actuellement disponibles, notamment à base de corticoïdes. Ce remodelage inclut une fibrose sous-épithéliale, caractérisée par un épaississement de la membrane basale, un dépôt de protéines de la matrice extracellulaire et une augmentation du nombre de (myo)fibroblastes. Ces phénomènes s'accompagnent d'une hypertrophie et hyperplasie du muscle lisse, d'une hypertrophie des glandes muqueuses, associée à une hypersécrétion de mucus et une fragmentation des fibres d'élastine du tissu conjonctif. Enfin, des remaniements importants de l'épithélium respiratoire en réponse aux agressions répétées par les aérocontaminants inhalés, notamment les allergènes, sont observés. Ces remaniements se traduisent par des perturbations du processus de réparation de l'épithélium lésé et ils aboutissent à la libération de médiateurs profibrosants qui favorisent la prolifération et l'activation des cellules mésenchymateuses, contribuant ainsi à l'installation d'un processus de fibrose.

Peu d'études ont été consacrées à l'identification de facteurs intervenant spécifiquement dans la réparation de l'épithélium respiratoire et dont des anomalies d'expression et/ou de fonction

pouvaient jouer un rôle dans la survenue d'une fibrose tissulaire dans l'asthme sévère. Ces considérations nous ont incités à centrer nos recherches sur l'aspect fibrosant associé au remodelage bronchique et au rôle pathogénique éventuel joué par l'épithélium respiratoire dans ce processus.

Objectif. Notre objectif a été de déterminer si l'épithélium respiratoire pouvait être source ou cible de molécules impliquées dans le processus fibrosant de la paroi bronchique dans l'asthme sévère et d'en identifier la nature.

Méthodes.

Obtention et utilisation des biopsies bronchiques de sujets sains et asthmatiques. Des biopsies bronchiques étagées ont été obtenues par bronchoscopie chez des sujets témoins (non-allergiques, non asthmatiques, non-fumeurs et indemnes de toute affection) et des asthmatiques de sévérité variable (intermittents, modérés et sévères avec et sans un trouble ventilatoire obstructif irréversible). La fonction respiratoire a été mesurée chez tous les sujets. Les biopsies ont été immédiatement congelées dans un bain d'azote liquide et conservées à -80°C. Des coupes sériées d'une épaisseur de 5 µm ont été effectuées à l'aide d'un cryostat, puis fixées et perméabilisées avec de l'acétone. Différents marquages ont été réalisés par immunohistochimie et le nombre de cellules positive pour chaque marqueur a été déterminé dans l'épithélium et la muqueuse bronchique. L'épaisseur de la membrane basale (témoin de l'existence d'une fibrose sous-épithéliale) a été mesurée par morphométrie.

Dans une série d'expériences, l'épithélium bronchique a été isolé par microdissection laser à partir des biopsies de ces mêmes sujets, les ARN totaux ont été extraits, amplifiés et les niveaux des transcrits codant pour 25 facteurs impliqués dans le remodelage (cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques et facteurs de croissance fibrogéniques, protéines de la matrice extracellulaire et métalloprotéinases matricielles, - MMPs) ont été mesurés par PCR en temps réel.

Culture des cellules épithéliales bronchiques humaines. Des cellules de lignée BEAS-2B, ou des cellules primaires de source commerciale ont été cultivées dans des supports (flasques, boîtes de culture, labteck) préalablement traitées avec du collagène de type I. Les cellules ont été stimulées avec des agents susceptibles d'induire leur activation, dont les rétinoïdes, le facteur de croissance fibrogénique, *transforming growth factor β1* (TGF-β1), les protéines cationiques des éosinophiles, et l'homologue des chitinases, la *cartilage glycoprotein-39* (YKL-40). A des temps différents après le début des stimulations (6 h, 24 h, 48 h, 72 h), les cellules ont été détachées, les ARN et les protéines extraits et l'expression de différentes molécules fibrogéniques a été déterminée par PCR en temps réel et immunoempreinte, respectivement. Des dosages immuno-enzymatiques ont également été réalisés pour mesurer les concentrations des formes solubles de certaines protéines dans les surnageants à l'aide de kits commerciaux. Plus récemment, une culture de cellules épithéliales selon un système dit en 'air-liquide' a été réalisée. Cette technique permet la différenciation de la monocouche de cellules épithéliales en épithélium pseudostratifié composé de cellules basales et mucociliaires, tel qu'observé au niveau bronchique. Cette régénération est complète au bout de 28 jours et elle met en jeu des étapes de migration, prolifération et différenciation squameuse transitoire, pour aboutir à une différenciation mucociliaire. Cette technique nous a permis d'approfondir l'étude des mécanismes d'action de certains facteurs fibrogéniques, en particulier YKL-40, sur les étapes clés qui régulent l'homéostasie épithéliale.

Études *in vivo* chez la souris. Un modèle d'asthme a été réalisé chez la souris par une immunisation et des provocations répétées par voie intra-nasale avec de l'ovalbumine. Ce modèle permet d'étudier, entre autres, le développement d'une fibrose tissulaire, caractérisée d'une surexpression tissulaire de facteurs fibrogéniques (TGF- β 1) et d'un dépôt de collagène dans le poumon.

Résultats.

1) Expression épithéliale et rôle fonctionnel des récepteurs des rétinoïdes dans l'asthme sévère. Les rétinoïdes sont connus pour induire la croissance et la différenciation mucociliaire de l'épithélium respiratoire et contribuer à sa réparation, comme cela a été montré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de lésions pulmonaires induites par la bléomycine ou l'élastase. Ces effets résultent de l'interaction entre les rétinoïdes et leurs récepteurs, RAR et RXR α , β et γ . Nous avons émis l'hypothèse qu'une stimulation anormale des récepteurs des rétinoïdes par leurs ligands dans l'épithélium bronchique d'asthmatiques sévères pouvait maintenir l'épithélium dans un état de réparation anarchique et faciliter ainsi la synthèse de facteurs fibrosants, comme cela a été proposé dans le cas de l'interaction entre l'*epidermal-growth factor* (EGF) et son récepteur, l'EGF-R. Nous avons démontré que, comparativement aux sujets atteints d'asthme léger et modéré, les asthmatiques sévères exprimaient, au niveau de l'épithélium bronchique, des taux plus élevés des récepteurs aux rétinoïdes, RAR γ , RXR α and RXR γ . *In vitro*, les rétinoïdes induisaient la synthèse de TGF- β 1 et de MMP-9 et favorisaient la migration et la réparation des cellules épithéliales bronchiques humaines par un mécanisme dépendant du TGF- β (Druilhe et al., Am J Respir Cell Mol Biol. 2008). En utilisant notre modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine chez la souris, nous avons également montré que la stimulation des récepteurs RAR, par l'administration de l'acide rétinoïque *all-trans* encapsulé dans des liposomes, aggravait le remodelage bronchique et induisait la synthèse locale d'une cytokine fibrogénique, l'IL-13, la sécrétion de mucus, la production de TGF- β 1 et le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire dans le poumon (Maret et al., J Nutr. 2007). L'ensemble de ces résultats nous ont permis de suggérer que l'interaction entre les rétinoïdes et leurs récepteurs, dont l'expression est majorée dans l'épithélium bronchique d'asthmatiques sévères, participe au remodelage des voies aériennes, en partie *via* la production de TGF- β 1.

2) Identification de facteurs impliqués dans le remodelage bronchique dans l'épithélium microdissequé de patients asthmatiques sévères. La quantification, par immunohistochimie, de l'expression épithéliale de molécules biologiquement actives n'étant pas toujours très précise, nous avons isolé cette structure par microdissection laser chez des sujets témoins et asthmatiques de sévérité variable et présentant ou pas un trouble ventilatoire obstructif irréversible et avons analysé, par PCR en temps réel, l'expression de certains gènes codant pour des facteurs impliqués dans le processus fibrosant. Parmi les 25 transcrits examinés (cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques et facteurs de croissance fibrogéniques, protéines de la matrice extracellulaire et MMPs) nous avons identifié l'ARNm codant pour le peptide bronchoconstricteur, endothéline-1 (ET-1) comme étant le seul dont l'expression épithéliale était augmentée chez les patients asthmatiques sévères avec trouble ventilatoire obstructif irréversible. L'expression épithéliale d'ET-1 corrélait avec le degré de l'obstruction bronchique et la masse musculaire lisse, suggérant que ce médiateur participe à la genèse du remodelage tissulaire et au trouble

ventilatoire obstructif irréversible (Pégorier et al., J Allergy Clin Immunol. 2007). L'ET-1 est connue pour activer les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules épithéliales et d'autres résultats obtenus au sein de notre équipe ont montré qu'il existait une relation entre l'obstruction bronchique et le polymorphisme du gène du récepteur de type ETb à l'ET-1 sur une large cohorte d'asthmatiques et de sujets sains. Ces observations nous ont incité à initier une étude de type « preuve de concept » qui repose sur l'administration, sur une période de 12 mois, d'un antagoniste des récepteurs de l'ET-1 (Ambrisentan®, Glaxo Smith Kline) à des groupes parallèles randomisés et en aveugle (placebo et traité) d'asthmatiques sévères avec un trouble ventilatoire obstructif irréversible et recevant une corticothérapie inhalée (≥ 1000 μg d'équivalents de beclométhasone). Divers marqueurs d'inflammation et de remodelage bronchique seront analysés et mis en relation avec les paramètres cliniques. L'inclusion des patients débutera en octobre 2009. Ce projet a reçu l'appui conjoint de l'Inserm et de la Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins (DHOS), dans le cadre de l'appel à projet « Recherche Clinique Translationnelle ».

3) Rôle des protéines cationiques des éosinophiles dans la synthèse de facteurs fibrogéniques par l'épithélium bronchique. Un faisceau d'arguments suggère que les éosinophiles jouent un rôle clé dans le remodelage bronchique en synthétisant des facteurs de croissance fibrogéniques, mais également en sécrétant leurs protéines cationiques granulaires qui modulent différentes fonctions des cellules mésenchymateuses indépendamment de leurs propriétés cytotoxiques. Nous avons souhaité déterminer si les protéines cationiques des éosinophiles pouvaient activer la synthèse de facteurs fibrogéniques par l'épithélium respiratoire. Nous avons montré que la stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines avec des concentrations non-cytotoxiques de MBP, ou d'*eosinophil peroxidase* (EPO) induisait la synthèse d'ET-1, de TGF- β 1, de *platelet-derived growth factor* (PDGF)- α , de MMP-2 et MMP-9, de fibronectine et de ténascine et augmentait l'expression de l'EGF-R, par un mécanisme mettant en jeu, en partie, leur charge cationique (Pégorier et al., J Immunol. 2006). Ces travaux ont montré que les protéines cationiques des éosinophiles participent potentiellement au remodelage bronchique dans l'asthme en activant directement l'épithélium respiratoire.

4) Expression de YKL-40 dans l'asthme sévère et relation avec le remodelage bronchique. Plus récemment, nous nous sommes intéressés aux chitinases, des endo- β -1,4-N-acétylglucosaminidases qui dégradent la chitine, un polysaccharide présent dans la paroi de certains insectes, crustacés et nématodes et qui constitue un mécanisme de défense lors de l'invasion de l'hôte. Malgré l'absence de chitine chez les mammifères, deux chitinases, la chitotriosidase et la chitinase acide et leur homologue dépourvu d'activité chitinolytique, YKL-40, ont été clonées chez l'homme. Ces glycoprotéines sont synthétisées principalement par les neutrophiles et les macrophages différenciés et leur expression a été associée à différentes maladies inflammatoires accompagnées d'une fibrose tissulaire, dont l'athérosclérose, la fibrose hépatique et certains cancers. En particulier, YKL-40 présente un tropisme accentué vis-à-vis des cellules mésenchymateuses car elle induit la prolifération et la synthèse de collagène par les fibroblastes de différentes origines, y compris pulmonaires. Nous avons mesuré les taux de YKL-40 dans le sérum et le liquide lavage bronchoalvéolaire et son expression dans la paroi bronchique de sujets témoins et asthmatiques et avons relié ces mesures à différents paramètres cliniques reflétant la sévérité de la maladie, ainsi qu'au remodelage bronchique. Les données obtenues font

état d'une élévation significative des taux sériques et du nombre de cellules exprimant YKL-40 (principalement des neutrophiles, des macrophages et des cellules épithéliales) dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques sévères, comparativement aux patients atteints d'asthme modéré et aux sujets sains. Aucune augmentation des concentrations de YKL-40 n'a été mise en évidence dans le liquide lavage bronchoalvéolaire, suggérant que la paroi bronchique (et non pas le compartiment alvéolaire) est le siège principal de la production d'YKL-40 dans l'asthme. YKL-40 dans le sérum et les biopsies bronchiques corrèle avec l'obstruction bronchique et avec le recours, la fréquence et la dose de corticoïdes administrés par voie orale, autant d'éléments qui définissent la sévérité de l'asthme. De plus, quel que soit le compartiment étudié, la circulation périphérique ou la paroi bronchique, l'expression de YKL-40 corrèle avec l'épaisseur de la membrane basale, utilisé en tant que marqueur du remodelage bronchique. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une élévation de l'expression de YKL-40, dans la circulation ou les voies aériennes traduit la sévérité de l'asthme et le degré du remodelage bronchique (Chupp et al., N Engl J Med. 2007). Ces résultats indiquent que YKL-40 est surexprimée dans l'asthme sévère où elle pourrait jouer un rôle dans la genèse du remodelage tissulaire. De plus, la mesure des taux circulants de YKL-40 pourrait constituer un nouveau bio-marqueur pour caractériser les asthmatiques sévères et les distinguer des patients atteints des formes plus légères de la maladie.

Conclusion générale. Dans l'ensemble, les résultats que nous avons obtenus dans le cadre du projet soutenu par l'ANR-SEST suggèrent que l'épithélium contribue au remodelage bronchique chez les asthmatiques sévères en libérant des facteurs de croissance et fibrogéniques (ex. l'ET-1, TGF- β et YKL-40), des composants de la matrice extracellulaire et des MMPs en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (protéines cationiques des éosinophiles), ou qui agissent sur la différenciation épithéliale (rétinoïdes) et dont l'expression serait anormalement élevée dans la paroi bronchique de ces patients. Plus particulièrement, les travaux les plus récents ont permis de mettre en évidence YKL-40 en tant que membre d'une nouvelle classe de molécules surexprimées dans l'asthme, notamment dans l'épithélium des voies aériennes, et potentiellement impliquées dans le remodelage bronchique. Ces travaux nous permettent donc de proposer l'idée que la normalisation du processus de régénération épithéliale constituerait une stratégie intéressante pour inhiber le remodelage bronchique et améliorer la fonction respiratoire dans l'asthme sévère.

Principales publications issues de ces travaux

- 1) Pégorier S, Wagner LA, Gleich GJ, Pretolani M. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. J Immunol. 2006;177:4861-9.
- 2) Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M*, Elias JA* (co-auteurs). A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. N Engl J Med. 2007;357:2016-27.
- 3) Pégorier S, Arouche N, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Augmented epithelial endothelin-1 expression in refractory asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007;120:1301-7.
- 4) Maret M, Ruffié C, Menevret M, Phelep A, Dziewiszek J., Druilhe A, Pretolani M. Liposomal all-trans retinoic acid modulates asthma manifestations *in vivo*. J Nutr. 2007;137:2730-6.
- 5) Druilhe A, Zahm JM, Benayoun L, El Mehdi D, Grandsaigne M, Dombret MC, Mosnier I, Feger B, Depondt J, Aubier M, Pretolani M. Epithelium expression and function of retinoid receptors in asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;38:276-82.