

UNIVERSITÉ VICTOR SEGALÉN BORDEAUX 2

Année 2010

Thèse n°1778

**Thèse pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2**

*Mention : Sciences, Technologie, Santé
Option : Biologie cellulaire et physiopathologie*

Présentée et soutenue publiquement

Le 3 décembre 2010

Par

Imane BARA

Née le 1^{er} février 1982 à Rabat

**Le rôle de la cellule musculaire lisse bronchique
humaine dans le remodelage des voies aériennes dans
l'asthme.**

Membres du jury

Philippe DEVILLIER	PU-PH, Université Versailles Saint Quentin, <i>Président</i>
Antoine MAGNAN	PU-PH, Université de Nantes, <i>Rapporteur</i>
Marina PRETOLANI	DR INSERM, Université Paris 7, <i>Rapporteur</i>
Patrick BERGER	PU-PH, Université Bordeaux 2, <i>Examineur</i>
J. Manuel TUNON DE LARA	PU-PH, Université Bordeaux 2, <i>Directeur de thèse</i>

À ma famille, à mes proches

*"I have assign'd the immediate Cause of the Asthma, to the straitness, Compression, or
Constriction of the Bronchia..."*

*"Sadness stops the Motion of humours and makes them more viscid. 'Tis observed that
all Asthmatics, being angry or sad, do fall into Fits oftner than when they are cheerful."*

Sir John Floyer (1698)

Remerciements

Au terme de cette aventure humaine passionnante, je tiens à remercier les nombreuses personnes qui l'ont partagée avec moi.

Je remercie très sincèrement **Monsieur Manuel Tunon de Lara** d'avoir assuré la direction de ce travail. Merci pour votre disponibilité malgré vos fonctions prenantes. Ce fut toujours un plaisir de discuter avec vous.

Je remercie très affectueusement **Patrick Berger** sans qui ce travail n'aurait pas eu lieu. Merci de m'avoir donné ta confiance. Ta rigueur, tes qualités scientifiques, ta patience et tes conseils m'ont aidée et m'ont apporté énormément. Merci pour ces conversations enrichissantes et passionnantes qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Je resterai toujours impressionnée par ta capacité à relire ma thèse avec concentration même après un banquet. Et encore désolée pour ton : "j'allais partir mais j'ai été coincé", " tes petits papiers de 2001 " ou pour les cent mails par mois que tu as reçus. Enfin, j'espère que la Dream Team a été à la hauteur de tes espoirs.

Je tiens à remercier très chaleureusement **Monsieur Roger Marthan** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire Inserm U885, nouvellement CRCTB U1045. Je vous suis particulièrement reconnaissante de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions possibles. Merci pour votre soutien et vos conseils avisés.

Je remercie très sincèrement **Monsieur Philippe Devillier** d'avoir bien voulu accepter la présidence du jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier vivement **Madame Marina Pretolani** et **Monsieur Antoine Magnan** pour tout le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce mémoire et à la rédaction de leur rapport.

J'adresse mes remerciements et une pensée amicale à **tous les membres du laboratoire de physiologie cellulaire respiratoire.**

- Merci au Docteur Arnaud Courtois de m'avoir donné envie de poursuivre la recherche. Ce fut un plaisir de travailler avec toi.

- Merci à toutes les lofteuses et tous les lofteurs, par ordre d'apparition: Marie Billaud, Thomas Trian, Diana Dahan, Annaïg Ozier, Pierre-Olivier Girodet, Jennifer Cattiaux, Emilie Shipley, Annick Andrieux, Guillaume Simon, Mélanie Willème et enfin à la dernière recrue Benoît Allard. Merci à tous pour votre bonne humeur et pour ces moments inoubliables passés ensemble. Tout cela va me manquer.

- Je tiens à remercier également un ex lofteur, Marc Chevalier pour son aide précieuse, pour toutes ces discussions enrichissantes et tous ses conseils. Merci aussi pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

- Je remercie Olga Oussova pour son aide précieuse en biologie moléculaire, Vincent Pitard pour ses conseils en cytométrie en flux et Huguette Crevel pour sa bonne humeur et ses sourires tous les matins.

- J'adresse mes sincères remerciements à Armelle Desveaux, (alias marmelle) pour son soutien, sa disponibilité et son aide précieuse. Merci pour toutes ces belles expressions et pour ce beau français académique avec l'air qui va avec! J'adore.

- Un grand merci à Pierre Techouyeres, (alias petech), pour son aide, sa disponibilité et sa bonne humeur. Merci pour toutes ces conversations sur tout et n'importe quoi. C'était toujours très intéressant et très instructif.

- Également un énorme merci à Claude (alias Bernard Pivot), d'avoir relu ma thèse et corrigé les coquilles. Merci pour ta gentillesse et tes encouragements.

- Merci à tous les membres du laboratoire, Michael Fayon, Yannick Crémilleux, Monsieur Jean-Pierre Savineau, Jean-François Quignard, Thomas Ducret, Christelle Guibert, Etienne Roux (alias google : merci pour toutes ces conversations très instructives), Bernard Muller, Veronique Freund, Mathilde et Martine. Et une pensée émue pour Estelle Delannoy.

- Merci à toutes les personnes que j'ai cotoyées au cours de cette thèse : Guillaume Calmettes et Gilles Gouspillou (merci Dr Gillou pour tes encouragements et ta bonne humeur), Jalila El Arrouchi, Séverine Verdon, Yoshitaka Morimatsu, Olga Illina, Prisca Mbikou...

Merci à tous mes amis.

A Mehdi, Irène, Greg et Gabi pour votre sympathie, et pour tous ces moments passés ensemble.

A ma "best romanian team ever": un merci spécial à Andrei qui m'a soutenue lors de la rédaction de la revue. Merci également à Alina, Roxana, Paul, Benjamin et Thomas.

A tous mes amis coréens : Chanme, Eun-Junga, Giri, Ju-yeon, na-yeon, Jongwon, Min-Young et Carmen.

Merci à Mohamed, Milou, Ricco... La liste est longue.

A ma super famille.

Merci à mes parents pour leur sacrifice et leur soutien sur tous les plans. Cette thèse n'aurait jamais pu se faire sans vous. Merci pour tout ce que vous avez su nous apprendre. Merci à mes p'tits frères adorés qui ont été toujours présents et qui m'ont supportée tout au long de cette thèse. J'espère m'être montrée digne de vous tous.

J'ai également une pensée émue pour tous ceux qui ne sont plus des nôtres, et tout particulièrement pour mon grand-père.

A ma deuxième famille à Bordeaux. Merci à Hyang-Ah, à Fred et à Benoît pour votre gentillesse et votre amabilité. A Moriiii, Rem's et Clainchounette pour tous ces moments INOUBLIABLES passés ensemble.

Enfin, je tiens à remercier l'ERS pour m'avoir permis de rencontrer Mister Barnes!

Table des matières

Table des matières	5
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Liste des publications et communications	16
Préface	20
Chapitre I Généralités	22
1. Généralités sur l'asthme	23
1.1) Description de la pathologie	23
1.1.a) Données épidémiologiques	23
1.1.b) Symptômes et diagnostic	25
1.1.c) Traitements et classification	29
1.1.d) L'asthme sévère.....	32
1.1.e) Sévérité, gravité et contrôle	33
1.2) Les caractéristiques de l'asthme.....	34
1.2.a) Hyperréactivité bronchique	34
1.2.b) Inflammation bronchique.....	38
1.2.c) Remodelage bronchique	46
2. Le rôle central de la cellule musculaire lisse dans la physiopathologie de l'asthme	50
2.1) Rôle de la CML bronchique dans l'HRB	51
2.1.a) Médiateurs	52
2.1.b) Neurotransmetteurs.....	55
2.1.c) Le couplage excitation-contraction.....	57
2.1.d) Les protéines contractiles	59
2.2) Rôle de la CML bronchique dans l'inflammation (mastocyte / PAR-2).....	60
2.2.a) Synthèse de médiateurs inflammatoires par la CML.....	60
2.2.b) Interaction CML / Mastocyte.....	62
2.2.c) Le récepteur activé par les protéases de type 2 (PAR-2).....	63
2.3) Rôle de la CML bronchique dans le remodelage lié à l'asthme : Article n°1 : Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma	68
3. Les chitinases	71
3.1) Généralités	71
3.1.a) YKL-40.....	76
3.2) Les chitinases dans l'asthme	78
3.2.a) YKL-40	79

Chapitre II Matériel et méthodes	81
1. Culture des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CML)	82
1.1) Obtention des CML	82
1.2) Analyse des CML	84
1.3) Congélation des CML	87
2. Prolifération cellulaire.....	88
2.1) Courbes de croissance.....	88
2.2) Incorporation de BrdU	88
3. Hypertrophie	89
4. Expression protéique et transcriptionnelle.....	90
4.1) Cytométrie en flux	90
4.2) Immunomarquage par Western Blot.....	91
4.2.a) Extraction des protéines.....	92
4.2.b) Western Blot	92
4.2.c) Analyse des résultats.....	93
4.3) ELISA	93
4.4) RT-PCR quantitative	94
4.4.a) Extraction d'ARN.....	94
4.4.b) Reverse Transcription (RT)	95
4.4.c) Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel	95
4.4.d) Analyse des résultats.....	97
5. Migration	97
6. Apoptose	99
7. Interférence ARN lentivirale	100
7.1) Généralités	100
7.2) Structure des lentivirus	104
7.3) Le "design" des séquences shRNA.....	105
7.4) Production des particules lentivirales	108
7.5) Infection des CML	110
7.6) Interférence ARN conditionnelle.....	111
7.7) Tri cellulaire.....	111
8. Immunohistochimie ex vivo	113
8.1) Inclusion	113
8.2) Technique de coloration immunohistochimique	113
8.3) Analyse des résultats.....	114

Chapitre III Résultats et discussion	115
1. Étude du rôle de la chitinase YKL-40 dans la physiopathologie de l'asthme : Article n°2 : Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma	116
2. Effets de la stimulation chronique du récepteur PAR-2 sur les CML bronchiques humaines.....	120
2.1) Expression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques	121
2.2) Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur l'expression du PAR-2	123
2.3) Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur la prolifération des CML	126
3. Effets de l'inhibition du PAR-2 par interférence ARN lentivirale sur les CML	129
Chapitre IV Conclusions et perspectives.....	142
Chapitre V Références bibliographiques.....	145

Liste des figures

Figure 1 : Mortalité par asthme en France de 1980 à 2005.....	24
Figure 2 : Critères de sévérité de l'hyperréactivité bronchique.....	28
Figure 3 : Schéma représentant une bronche saine et une bronche en crise d'asthme.	34
Figure 4 : Schématisation du concept en trois dimensions de l'inflammation bronchique.....	44
Figure 5 : Les trois principales caractéristiques du remodelage musculaire lisse dans l'asthme.....	49
Figure 6 : Contrôle de la contraction des cellules musculaires lisses.	52
Figure 7 : Système nerveux autonome du muscle lisse bronchique.....	55
Figure 8 : Couplage excitation-contraction.....	58
Figure 9 : Mécanisme de la myosite mastocytaire.	62
Figure 10 : Mécanismes d'activation protéolytique du récepteur PAR-2.	65
Figure 11 : Désensibilisation, resensibilisation et trafic vésiculaire du PAR-2.....	66
Figure 12 : Voies de signalisation cellulaire du PAR-2.....	68
Figure 13 : Structure de la chitine.	72
Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la chitotriosidase mettant en évidence l'activité catalytique.....	74
Figure 15 : Structure cristallographique d'YKL-40.	76
Figure 16 : L'AMCase et l'inflammation dans l'asthme.	79
Figure 17 : Phénotypage des CML en cytométrie en flux.	85
Figure 18 : Phénotypage des CML par immunocytochimie.	86
Figure 19 : Mécanismes d'interférence ARN par transfection de siRNA ou production lentivirale de shRNA.....	102

Figure 20 : Constructions plasmidiques des 3 vecteurs utilisés pour la production des particules lentivirales.....	104
Figure 21 : Production de particules lentivirales dans les cellules 293T.	109
Figure 22 : Modes d'action du contrôle du pLVTHM par le pLVtTRKRAB via la doxycycline.	112
Figure 23 : Expression du PAR-2 dans les CML bronchiques.	122
Figure 24 : Effet de la stimulation aiguë du PAR-2 sur son expression en cytométrie en flux.....	124
Figure 25 : Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur son expression.....	125
Figure 26 : Effet de la stimulation chronique à l'histamine sur l'expression du PAR-2.	126
Figure 27 : Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur la prolifération des CML.....	127
Figure 28 : Evolution du % de cellules positives pour la GFP en fonction du temps.....	130
Figure 29 : Evaluation de l'efficacité de l'interférence ARN au niveau transcriptionnel.....	131
Figure 30 : Evaluation de l'efficacité de l'interférence ARN au niveau protéique.....	132
Figure 31 : Effets de la doxycycline sur la prolifération des CML en BrdU.....	133
Figure 32 : Interférence ARN lentivirale conditionnelle.	134
Figure 33 : Tri cellulaire après infection lentivirale.....	135
Figure 34 : Efficacité de l'interférence ARN lentivirale au niveau transcriptionnel.....	136
Figure 35 : Efficacité de l'infection lentivirale à différentes MOI.	137
Figure 36 : Nombre de copies d'ADN viral.	138
Figure 37 : Interférence ARN lentivirale dans la lignée Capan.	139
Figure 38 : Efficacité de l'interférence ARN lentivirale en cytométrie en flux.	140
Figure 39 : Récapitulatif de l'implication du PAR-2 dans le remodelage et l'inflammation des voies aériennes.....	141

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de l'asthme en fonction des paramètres cliniques et fonctionnels ventilatoires.	30
Tableau 2 : Classification de l'asthme en fonction de la charge thérapeutique et des paramètres cliniques et fonctionnels.	31
Tableau 3 : Classification de l'asthme en fonction du contrôle de la maladie.	32
Tableau 4 : Liste des principaux stimuli utilisés pour rechercher une hyperréactivité bronchique non spécifique.	36
Tableau 5 : Récapitulatif des principales chimiokines et de leurs récepteurs.....	39
Tableau 6 : Les chitinases de la famille GH18, chez l'homme et la souris.....	75
Tableau 7 : Récapitulatif des anticorps utilisés en Western Blot.....	91
Tableau 8 : Récapitulatif des paires d'amorces utilisées en RT-PCR.	95
Tableau 9 : Les séquences shRNA anti-PAR-2 utilisées.	107

Liste des abréviations

ABS : Albumine bovine sérique

AKT : PKB : "Serine threonine protein kinase B"

AMCase : Acidic mammalian chitinase

APC : Allophycoérythrine

BLAST : B Locked A Synchronous

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive

BrdU : BromodéoxyUridine

BRP : breast regression protein

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CI : Corticostéroïdes inhalés

CML : cellule musculaire lisse

cPPT : "central Polypurine track"

CVF : Capacité vitale forcée

CysLT : Cystéinyl leucotriènes

DAPI : Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate

DEP : Débit expiratoire de pointe

Der p : *Dermatophagoides pteronyssinus*

DMEM : Milieu de Dulbecco modifié par Eagle

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DO : Densité optique

Dox : Doxycycline

Ds-Red : Red Fluorescent Protein

dsRNA : Double stranded RNA

ECP : Eosinophil cationic protein

EDTA : Acide éthylènediaminetétracétique

EFR : Exploration fonctionnelle respiratoire

EF1 α : "Elongation Factor-1 α "

ELISA : Enzyme-linked immunosorbant assay

EMT : Epithelial mesenchymal transition

ET : Endothéline

Fc ϵ RI : Fragment crystallizable epsilon receptor I

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FoxP3 : Forkhead box P3

FSC : Forward scatter

F2RL1 : coagulation factor II (thrombin) like 1

GFP : "Green Fluorescent Protein"

GH18 : Glycosides hydrolases 18

GINA : Global initiative for asthma

GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GRK : G protein-coupled receptor kinase

H1 : Histamine / Histone 1

HPRT : Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

HRB : Hyperréactivité bronchique

IFN : Interferon- γ

IgE : Immunoglobuline E

IL : Interleukine

IP : Iodure de Propidium

IP-10 : Interferon- γ inducible protein-10

IRES : "Internal Ribosomal Entry Site"

LABA : Long action β_2 agonist

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LTR : "Long terminal repeat"

LXA : Lipoxine A

MAP : "Mitogen-Activated-Protein"

MCP : Monocyte chemotactic protein

MC_{TC} : Mastocyte à tryptase et chymase

MC_T : Mastocyte à tryptase

MFI : Median fluorescence intensity

MLCK : Myosin light chain kinase

MLCP : Myosin light chain phosphatase

MOI : "Multiplicity Of Infection"

mtTFA : Mitochondrial transcription factor A

NA / NKA : Neurokinine A

NANC : Non adrénérgique non cholinérgique

NO : Monoxyde d'azote

NRF-1 : Nuclear respiratory factor

PAR: "Protease-activated receptor"

PBS : Phosphate buffered saline

PC20 : Provocative concentration

PGC1- α : Peroxisome-proliférateur activé récepteur gamma coactivateur

Pi3K: Phosphatidyl Inositol 3-Kinase

PO : Ribosomal Phosphoprotéine

RANTES : Régulé à l'activation, cellules T normales exprimées et sécrétées

RISC: "RNA inducing silencing complex"

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SCF : Facteur de cellule souche

SEM : Erreur standard de la moyenne

shRNA : "Small hairpin RNA"

SIN : "Self inactivated"

siRNA: "Small interfering RNA"

SLIGKV : Sérine-leucine-isoleucine-glycine-lysine-valine.

SP : Substance P

SVF : sérum de veau fœtal

TetO : Tet-Operateur

Th2 : T helper 2

TIM : Triose phosphate isomérase

TGF : Transforming growth factor

TNF : Tumor necrosis factor

Treg : T régulateur

tTR : Tetracycline represseur

TXA₂ : Thromboxane A₂

VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience humaine-1

VIP : Vasoactive intestinal peptide

VR : Volume résiduel

VSV-G : Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

WPRES : Woodchuck Post-transcriptional -Regulatory Element

YWHAZ : Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

Ψ : Signal d'encapsulation ou de packaging

Liste des publications et communications

- **Revue didactiques**

- **Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma.**

Bara I., Ozier A., Tunon de Lara JM., Marthan R., Berger P.

Eur Respir J. 2010, 36 : 1174-84

- **Physiopathologie de l'asthme.**

Ozier A., Bara I., Girodet PO., Marthan R., Berger P.

Revue du Praticien 2010, sous presse

- **Bronchial remodelling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention.**

Girodet P, Ozier A, Bara I, Tunon de Lara JM, Marthan R and Berger P

Sous presse à Pharmacology & Therapeutics 2011

- **Articles originaux**

- **Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma.**

Bara I., Ozier A., Girodet PO., Begueret H., Kolbeck R., Coyle A., Tunon de Lara JM., Marthan R., Berger P. (En révision dans l'AJRCCM)

- **Control maintenance can be predicted by exhaled NO monitoring asthmatic patients.**

Ozier A., Girodet PO., Bara I., Tunon de Lara JM., Marthan R., Berger P.

Sous presse à Respir Res 2011

- **Greater proliferative response of Infant human airway smooth muscle cells to growth factors is mitochondria-dependent.**

Fayon M., Andrieux A., Rebola M., Bara I., Labbé A., Marthan R., Berger P. (*soumis*)

Communications

1. Internationales

- Mechanisms of enhanced proliferation of cultured infant airway smooth muscle

Andrieux A., Rebola M., Bara I., Berger P., Marthan R., Fayon M.

Congrès international de pneumologie pédiatrique 2010, Vienne (Poster)

- Effect of chronic stimulation of protease activating receptor-2 in human bronchial smooth muscle cells.

Bara I., Cattiaux J., Ozier A., Marthan R., Tunon de Lara JM, Berger P.

Eur respir 2010, 36 : Suppl. 54, P1374 (poster, European respiratory society, Barcelone)

- The chitinase YKL-40 increases bronchial smooth muscle cell proliferation and size.

Bara I., Ozier A., Cattiaux J., Marthan R., Tunon de Lara JM, Berger P.

Eur Respir J 2010, 36 : Suppl. 54, P2363 (poster, European respiratory society, Barcelone)

2. Nationales

- Effets de l'inhibition du récepteur PAR-2 par interférence ARN lentivirale sur la prolifération et l'apoptose des cellules musculaires lisses bronchiques humaines.

Bara I., Tunon de Lara JM. Berger P.

Lung storming 2008, Lille (communication orale)

- Inhibition du PAR-2 par interférence lentivirale dans la cellule musculaire lisse bronchique humaine.

Bara I., Tunon de Lara JM. Berger P.

Journée de l'IFR. Cœur poumon vaisseau 2009, Bordeaux (Poster)

- Role of protease activated receptor-2 (PAR-2) in the pathophysiology of human bronchial smooth muscle cells.

Bara I., Cattiaux J., Ozier A., Marthan R., Tunon de Lara JM., Berger P.

Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutiques, 2010, Bordeaux
(*communication orale*)

- Effect of liquid nitrogen cryopreservation on phenotype, proliferation and apoptosis of human asthmatic bronchial smooth muscle cells.

Ozier A., Bara I., Girodet PO., Cattiaux J., Marthan R., Berger P.

Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, 2010, Bordeaux (*poster*)

- Role of YKL-40 on human bronchial smooth muscle cells.

Bara I., Ozier A., Cattiaux J., Marthan R., Tunon de Lara JM., Berger P.

Congrès de physiologie, Pharmacologie et Thérapeutiques, 2010, Bordeaux
(*communication orale*)

- Effect of chronic stimulation of protease activating receptor-2 in human bronchial smooth muscle cells

Bara I., Ozier A., Cattiaux J., Girodet PO., Marthan R., Tunon de Lara JM., Berger P.

Journées de Recherche Respiratoire, 2010, Nantes (*poster*)

3. Locales

- Rôle du récepteur activé par les protéases de type 2 dans la physiopathologie de la cellule musculaire lisse bronchique humaine.

Bara I., Cattiaux J., Ozier A., Marthan R., Berger P.

9^{ème} journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 2009, Arcachon (*poster*).

- Role of YKL-40 on human smooth muscle cells.

Bara I., Cattiaux J., Ozier A., Marthan R., Berger P.

10^{ème} journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 2010, Arcachon (*communication orale*).

- Decreased susceptibility of human asthmatic smooth muscle cells to apoptosis.

Ozier A, Bara I, Girodet PO, Cattiaux J, Marthan R, Berger P.

10ème journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 2010, Arcachon (*poster*).

Préface

L'asthme, du latin *asthma* signifiant respiration difficile, est défini par ses caractéristiques cliniques (sifflement, difficulté à respirer), physiologiques (obstruction bronchique épisodique et hyperréactivité bronchique (HRB)) et histologiques (inflammation et remodelage des voies aériennes). Néanmoins, sa pathogénie n'étant pas clairement identifiée, sa définition reste descriptive. Ainsi, basé sur les conséquences fonctionnelles de l'inflammation bronchique, l'asthme a été défini par le "Global Initiative for Asthma " (GINA), comme une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes dans laquelle de nombreuses cellules et facteurs cellulaires jouent un rôle majeur. L'inflammation chronique est associée à une HRB responsable d'épisodes récurrents de sifflements, de dyspnée et de toux, particulièrement pendant la nuit. Ces épisodes symptomatiques peuvent être associés à une obstruction bronchique le plus souvent réversible de manière spontanée ou avec des agents pharmacologiques (1).

La physiopathologie de l'asthme est complexe et encore controversée. Classiquement, trois processus la caractérisent : l'hyperréactivité, l'inflammation et le remodelage bronchique. La connaissance des mécanismes impliqués dans ces trois phénomènes est essentielle à la compréhension de la pathogénie de l'asthme et aux modalités de sa prise en charge thérapeutique. La cellule musculaire lisse (CML) bronchique joue un rôle central dans la physiopathologie de l'asthme. En effet, elle est responsable de la contraction bronchique, elle participe à l'inflammation et constitue une composante importante du remodelage bronchique. Récemment, le rôle de la chitinase YKL-40 comme bio marqueur de ce remodelage dans l'asthme a été évoqué. Dans ce contexte, la question centrale ayant motivé

une partie de ce travail de thèse, a été d'étudier les effets d'YKL-40 sur les différentes propriétés des CML impliquées dans le remodelage bronchique de l'asthme. Nous nous sommes intéressés au récepteur activé par les protéases, de type 2 (PAR-2), potentiel récepteur de l'YKL-40, mais aussi acteur principal dans l'interaction entre le mastocyte et la cellule musculaire lisse.

Ainsi ce manuscrit de thèse se compose de quatre grandes parties :

➤ Chapitre I *Généralités*. Après quelques brefs rappels sur les caractéristiques de l'asthme, le rôle de la CML sera envisagé sur les différentes caractéristiques physiopathologiques de l'asthme. Une attention particulière sera portée au mastocyte et au récepteur PAR-2 impliqué dans l'interaction avec le muscle lisse. Enfin, un dernier paragraphe sera consacré aux chitinases et à leurs rôles potentiels dans l'asthme.

➤ Chapitre II *Matériel et méthodes*. Les méthodes utilisées ou développées durant ces travaux de thèse seront présentées.

➤ Chapitre III *Résultats et discussions*. Le travail sur les effets d'YKL-40 sur la CML sera présenté sous forme d'un article soumis à l'Am J Respir Crit Care Med. Les effets de la stimulation chronique du PAR-2 et de l'interférence lentivirale anti-PAR-2 des CML seront présentés sous forme de résultats expérimentaux et discutés.

➤ Chapitre IV *Conclusions et perspectives*. L'ensemble des éléments précédents nous permettra de conclure ce travail de thèse et d'envisager des perspectives à moyen terme.

Chapitre I

Généralités

1. Généralités sur l'asthme

Cette première partie n'a pas pour ambition de faire une description exhaustive et médicale de l'asthme, mais de décrire les principales caractéristiques et les enjeux cliniques de cette pathologie. Elle s'adresse plus particulièrement à un lecteur scientifique.

1.1) Description de la pathologie

1.1.a) Données épidémiologiques

L'asthme affecte actuellement 300 millions d'individus de par le monde, dont 30 millions en Europe, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et on estime que d'ici à 2025, ce taux atteindra 400 millions de personnes (1). En France, l'asthme touche environ 3,5 millions d'individus dont un tiers est âgé de moins de 15 ans. C'est la maladie chronique la plus courante chez l'enfant. La prévalence de l'asthme a été estimée à travers les années par différentes études épidémiologiques, notamment par l' "International Study of Asthma and Allergies in Childhood" (ISAAC) et l' "European Community Respiratory Health Survey" (ECRHS) (2). La prévalence de l'asthme a augmenté ces dernières années en Afrique, en Amérique latine et en Asie. Après avoir beaucoup augmenté dans les dernières décennies, elle tend à se stabiliser dans les pays anglophones et en Europe (3). Cependant, les causes de ces variations de prévalence dans les différentes populations restent discutées.

L'asthme est un enjeu majeur de santé publique de par sa mortalité et sa morbidité. L'asthme est la cause d'environ 250 000 décès par an dans le monde, dont

la plupart seraient évitables grâce à un diagnostic plus précoce, une meilleure prise en charge et le développement d'une éducation thérapeutique (1,4). Ainsi, la mortalité a diminué au cours des dernières décennies dans plusieurs pays notamment en Europe (4). En France, l'analyse des tendances de mortalité avait montré une augmentation dans les années 80 (2000 décès par an) et une baisse depuis 1990. Au cours des années 2000, 1000 personnes par an sont décédées de leur asthme en France (4) (Figure 1).

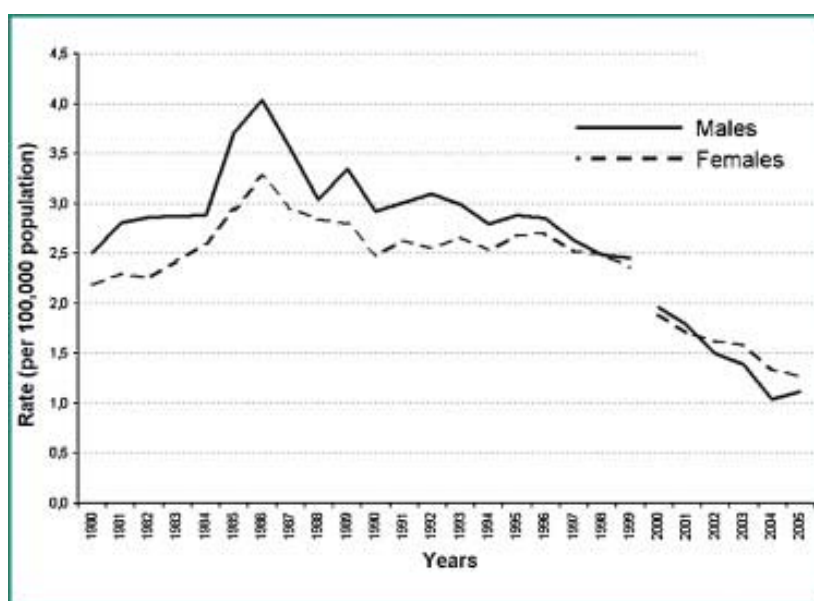


Figure 1 : Mortalité par asthme en France de 1980 à 2005

(Reproduit de Tual et al., 2008) (4).

Le coût économique de l'asthme est considérable que ce soit en terme de coût médical direct (hospitalisation, médicaments) ou indirect (absentéisme professionnel ou scolaire, mort précoce). L'altération de la qualité de vie des asthmatiques est notée quels que soient l'âge et le sexe. Ainsi, l'asthme est associé à une fréquence accrue des limitations fonctionnelles lors d'activités quotidiennes.

Plusieurs facteurs de risque au développement de l'asthme et à la manifestation des

symptômes ont été identifiés et peuvent être divisés en : facteurs hôtes (facteurs génétiques, sexe, obésité), et facteurs environnementaux (allergènes, infections, tabac, pollution). Cependant, les mécanismes par lesquels ils influencent le développement et l'expression de la maladie sont complexes et interactifs.

1.1.b) Symptômes et diagnostic

Les symptômes liés à l'asthme sont nombreux et de degrés variables. Ils peuvent être intermittents et leur importance négligée par le patient et le praticien, ou alors non spécifiques et donc sous diagnostiqués. C'est ce que l'on observe souvent chez les enfants quand un sous diagnostic inclue des formes variées de bronchites dont les bronchites infectieuses, et résulte en un traitement inapproprié (5,6). Les signes cliniques de l'asthme sont principalement la toux sèche, les sifflements et l'essoufflement spontané ou à l'exercice, associé à une gêne respiratoire à l'expiration. Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques de la pathologie. L'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) reste ainsi le seul examen permettant un diagnostic précis de la maladie et est indispensable dans la prise en charge d'un asthmatique.

Exploration fonctionnelle respiratoire

L'EFR réunit l'ensemble des explorations permettant de mesurer les variables quantifiables de la fonction respiratoire comme la mesure des volumes pulmonaires et des débits bronchiques. Chez l'asthmatique, elle comporte principalement la spirométrie, que l'on pourra compléter par une pléthysmographie, un test de réversibilité ou un test de provocation.

Lors d'une expiration forcée, la spirométrie permet de mesurer les volumes mobilisables et d'obtenir une courbe débit/volume (7). L'allure de cette courbe et la mesure

des paramètres suivants permettent en général de poser le diagnostic d'obstruction et d'apprécier sa sévérité :

- VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde ; il reflète la sévérité du déficit fonctionnel ventilatoire
- CVF : Capacité vitale forcée
- Rapport VEMS/CVF (Normal > 0.7)
- DEMM₂₅₋₇₅ : Débit expiratoire maximal moyen entre 25 et 75 % de la CVF ; il reflète l'obstruction distale quand le VEMS est normal
- DEP : Débit expiratoire de pointe

La réversibilité de l'obstruction bronchique est définie par une augmentation du VEMS supérieure à 12 % de sa valeur théorique et supérieure à 200 ml en valeur absolue, après administration d'un bronchodilatateur d'action rapide. Chez l'asthmatique, l'obstruction est classiquement réversible mais l'absence de réversibilité peut être objectivée en cas de remodelage bronchique chez certains asthmatiques sévères (8). Les autres paramètres de la courbe débit-volume peuvent également être pris en compte.

L'une des caractéristiques de l'asthme étant le caractère variable des symptômes en fonction du temps chez un même individu, ces mesures doivent être répétées (9). La mesure du DEP peut être faite par le malade lui-même grâce à un débitmètre de pointe. Elle permet de suivre le débit bronchique dans le temps et de mettre en évidence une variabilité supérieure à 20 %, caractéristique de l'asthme. De plus, l'évaluation du DEP peut aider à confirmer le

diagnostic d'asthme ainsi qu'à contrôler la maladie, notamment chez les personnes qui ont une faible perception des symptômes (1).

La pléthysmographie corporelle totale permet de plus, de mesurer les volumes pulmonaires non mobilisables, notamment le VR (volume résiduel) ainsi que les résistances des voies aériennes à l'écoulement de l'air. Une augmentation du VR au détriment de la capacité vitale indique l'existence d'une distension pulmonaire relative pouvant être liée à l'existence d'une obstruction des voies aériennes distales, et dont la réversibilité doit être également recherchée. L'augmentation des résistances des voies aériennes est un indice d'obstruction proximale et, là aussi, sa réversibilité doit être évaluée.

Cependant, en dehors des crises d'asthme, l'EFR au repos est souvent normale. Il est alors possible de faire un test de provocation, afin de rechercher l'existence d'une HRB. En pratique clinique, les tests de provocation pharmacologiques sont préférentiellement utilisés, le plus souvent avec la métacholine (10). L'inhalation de concentrations doublantes et cumulées de métacholine, permet alors de quantifier la réactivité bronchique. Ainsi, chez le sujet normal, la concentration nécessaire et suffisante pour engendrer une chute de 20% du VEMS, ou PC20 (provocative Concentration), est supérieure ou égale à 16 mg/ml, alors qu'elle est inférieure à 4 mg/ml chez un sujet avec une HRB modérée et inférieure à 1 mg/ml dans les HRB sévères (10,11) (figure2). Cet examen a une valeur prédictive négative de 100%, car il n'y a pas d'asthme sans HRB.

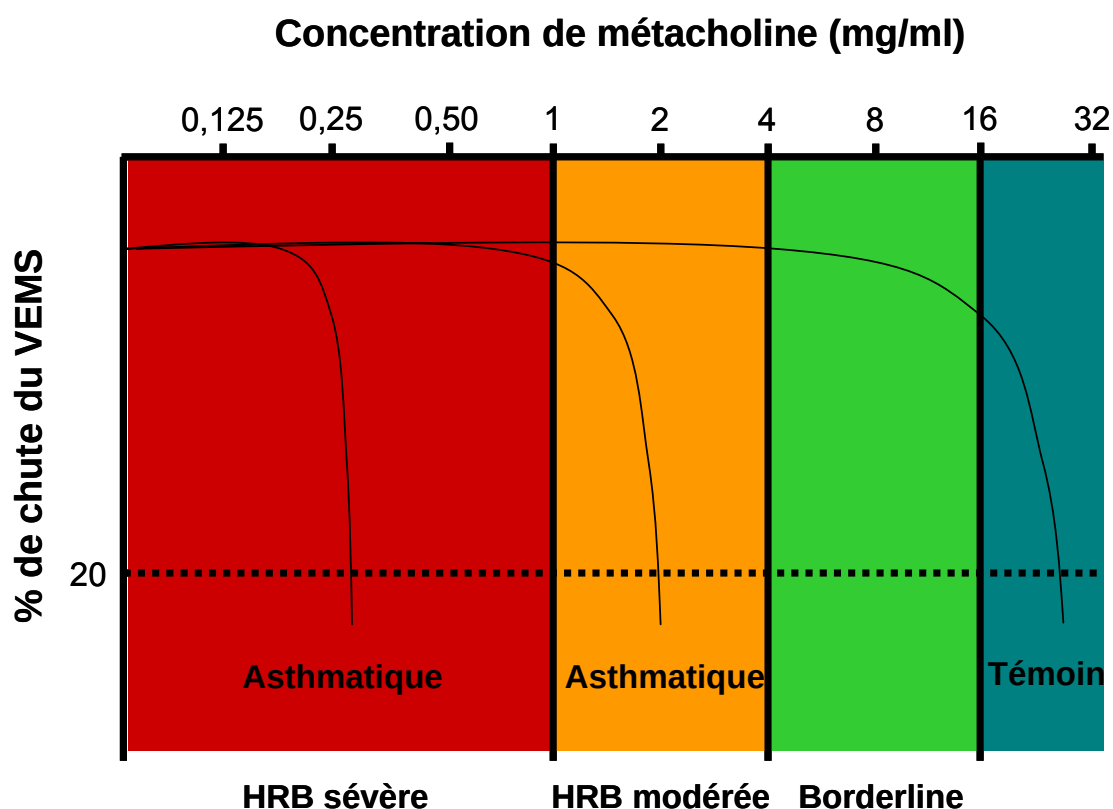


Figure 2 : Critères de sévérité de l'hyperréactivité bronchique

Evaluation de l'inflammation

La mesure de la composante inflammatoire n'est pas obligatoire pour le diagnostic de la maladie, mais permet dans certains cas de confirmer ce diagnostic et de suivre l'effet des traitements (1). Il existe aujourd'hui deux techniques validées qui permettent d'évaluer de manière non invasive et répétée, le degré d'inflammation. Il s'agit d'une part, de l'analyse cytologique, en particulier des éosinophiles, dans les expectorations induites (12) et, d'autre part, de la mesure du monoxyde d'azote (NO) dans l'air exhalé (13). Cette dernière a attiré l'attention de plusieurs équipes dans le monde et différentes études ont montré la pertinence clinique de sa mesure dans l'asthme. En effet, le NO est une molécule endogène régulatrice et ubiquitaire de l'organisme. Il est produit par différentes cellules dans l'arbre

bronchique, notamment les macrophages et les cellules épithéliales et est détectable dans l'air exhalé de sujets normaux. D'une part, des niveaux élevés de NO exhalé chez des patients asthmatiques ont été largement démontrés (14,15) et, d'autre part, il est corrélé avec l'inflammation éosinophile (16). L'analyse de la fraction de NO dans l'air exhalé représente ainsi une autre possibilité pour apprécier le niveau d'inflammation des voies aériennes (17). L'utilisation de biopsies et/ou du lavage broncho-alvéolaire (LBA), obtenus lors d'une fibroscopie bronchique se limite à la recherche clinique

1.1.c) Traitements et classification

L'asthme est une maladie qui ne bénéficie actuellement d'aucun traitement curatif et peut être dans certains cas particulièrement invalidante. Les médicaments actuellement utilisés ont pour but de maintenir le contrôle de la maladie et de soulager les symptômes. Les deux principaux types de traitement de l'asthme sont les bronchodilatateurs et les anti-inflammatoires. Les bronchodilatateurs comme les β_2 -agonistes, vont permettre une relaxation du muscle lisse bronchique et ainsi diminuer l'obstruction bronchique. Parmi les anti-inflammatoires, les glucocorticoïdes sont largement utilisés pour diminuer l'inflammation des voies aériennes (18). D'autres traitements sont également utilisés. Selon le GINA, les médicaments utilisés pour le traitement de l'asthme peuvent être classés en deux groupes. D'une part, les médicaments de contrôle, qui incluent les corticostéroïdes inhalés, les anti-leucotriènes, les β_2 -agonistes de longue durée d'action et les anti-IgE. D'autre part, les médicaments dits "de la crise", notamment les β_2 -agonistes de courte durée d'action et les anti-cholinergiques. Par ailleurs, le traitement administré aux patients asthmatiques peut également être pris en compte dans la classification de l'asthme.

En effet, selon le GINA, la classification des patients asthmatiques s'est initialement basée sur leurs symptômes (Tableau 1) mais a souvent été appliquée de manière erronée, les patients étant déjà sous traitement.

	STADE 1 Intermittent	STADE 2 Persistant léger	STADE 3 Persistant modéré	STADE 4 Persistant sévère
Symptômes	< 1/sem	> 1/sem < 1/jour	Quotidiens	Quotidiens
Exacerbations	Brèves	Retentissement sur l'activité et le sommeil	Retentissement sur l'activité et le sommeil	Fréquentes
Symptômes nocturnes	< 2/mois	> 2/mois	> 1/sem	Fréquents
Autres			Utilisation quotidienne de β_2 agoniste	Limitation des activités physiques
VEMS-DEP % théorique	$\geq 80\%$	$\geq 80\%$	60-80%	$\leq 60\%$
Variabilité VEMS-DEP	< 20%	20-30%	> 30%	> 30%

Tableau 1 : Classification de l'asthme en fonction des paramètres cliniques et fonctionnels ventilatoires.

Plus tard, la classification des niveaux de sévérité de l'asthme en fonction de la charge thérapeutique nécessaire et des symptômes a été proposée (Tableau 2).

		STADE 1	STADE 2	STADE 3	STADE 4
		Pas de traitement de fond	CI (faible dose)	CI (dose faible à moyenne) + LABA	CI (forte dose) + LABA + autre
Symptômes	Charge thérapeutique				
		STADE 1	STADE 2	STADE 3	STADE 4
	STADE 1	Intermittent	Persistant léger	Persistant modéré	Persistant sévère
	STADE 2	Persistant léger	Persistant modéré	Persistant sévère	Persistant sévère
	STADE 3	Persistant modéré	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère
	STADE 4	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère

Tableau 2 : Classification de l'asthme en fonction de la charge thérapeutique et des symptômes.

Cependant, il est important de noter que la sévérité de l'asthme implique non seulement l'importance des symptômes mais également la réponse au traitement. Ainsi, l'asthme peut se manifester par des symptômes très invalidants et une obstruction bronchique, mais devenir complètement contrôlé avec un traitement à faible dose. Par conséquent, la nouvelle classification de l'asthme depuis 2006 est basée sur le contrôle de la maladie permettant une estimation optimale de la sévérité de la maladie (Tableau 3) (1).

	CONTRÔLÉ	PARTIELLEMENT CONTRÔLÉ	NON CONTRÔLÉ
Symptômes diurnes	Aucun ($\leq 2/\text{sem}$)	$> 2/\text{sem}$	≥ 3 éléments caractérisant un asthme partiellement contrôlé lors d'une même semaine
Limitation des activités	Aucune	Au moins 1	
Symptômes nocturnes	Aucun	Au moins 1	
Recours à une médication de secours	Aucun ($\leq 2/\text{sem}$)	$> 2/\text{sem}$	
DEP ou VEMS	Normal	$< 80\%$	
Exacerbations	Aucune	≥ 1 an	1/sem

Tableau 3 : Classification de l'asthme en fonction du contrôle de la maladie.

1.1.d) L'asthme sévère

La plupart des asthmatiques peuvent être plus ou moins contrôlés par de simples traitements avec des β_2 -mimétiques avec ou sans corticostéroïdes inhalés. Cependant, 10% des patients asthmatiques sont considérés comme sévères, et nécessitent une importante quantité de traitements pour contrôler leur maladie avec parfois une persistance des symptômes malgré un traitement maximal par des glucocorticoïdes systémiques (asthme réfractaire) (9). Ces patients asthmatiques sévères ont des symptômes variables, le plus souvent invalidants. Ils présentent un remodelage bronchique majeur qui met en jeu une augmentation de la masse du muscle lisse bronchique et qui, actuellement, ne répond à aucune thérapeutique, comme les β_2 -agonistes ou les glucocorticoïdes y compris par voie générale. L'efficacité des nouveaux traitements anti-IgE (Omalizumab) semble être satisfaisante chez

certaines patients, néanmoins, leur efficacité sur le remodelage bronchique et notamment sur le remodelage musculaire lisse bronchique doit encore être évaluée. En plus d'être invalidant pour le patient, l'asthme sévère génère ainsi la moitié des coûts de l'asthme en terme de santé publique. Le coût moyen d'un asthmatique sévère est multiplié par 6 par rapport aux asthmatiques non sévères (1).

1.1.e) Sévérité, gravité et contrôle

La terminologie autour de la sévérité de l'asthme est imprécise car elle est souvent utilisée pour décrire l'amplitude de l'obstruction bronchique ou l'intensité des symptômes. Ainsi, les mots sévérité et gravité peuvent être confondus. En effet, la sévérité est définie à travers le temps, après des mois voire des années. En revanche, la gravité de la maladie est, quant à elle, appréciée à un instant t donné, lors d'une crise d'asthme lorsque le pronostic vital est menacé à court terme. C'est le cas par exemple des attaques récurrentes observées dans le "Brittle asthma" (asthme qui devient difficile à contrôler en peu de temps). En outre, le terme contrôle peut être utilisé dans différents contextes. Ainsi, le contrôle de l'asthme renvoie au contrôle des manifestations des symptômes. Cette définition prend en considération les effets du traitement sur les symptômes et la fonction respiratoire sur une durée intermédiaire de une à plusieurs semaines. Toutefois, l'estimation du contrôle de la maladie devrait également tenir compte des futurs risques attendus comme, notamment, la survenue d'exacerbations. Dans cette optique, plusieurs mesures standardisées ont été développées et validées, notamment l'"Asthma Control Questionnaire" (ACQ) (www.qoltech.co.uk/acq.htm) et le questionnaire de Juniper (19,20) qui permettent de contrôler l'asthme de façon reproductible.

1.2) Les caractéristiques de l'asthme

La physiopathologie de l'asthme est complexe et encore controversée. Classiquement, trois processus la caractérisent : l'hyperréactivité, l'inflammation et le remodelage bronchique. La connaissance des mécanismes impliqués dans ces trois phénomènes est essentielle à la compréhension de la pathogénie de l'asthme et aux modalités de sa prise en charge thérapeutique (Figure 3).

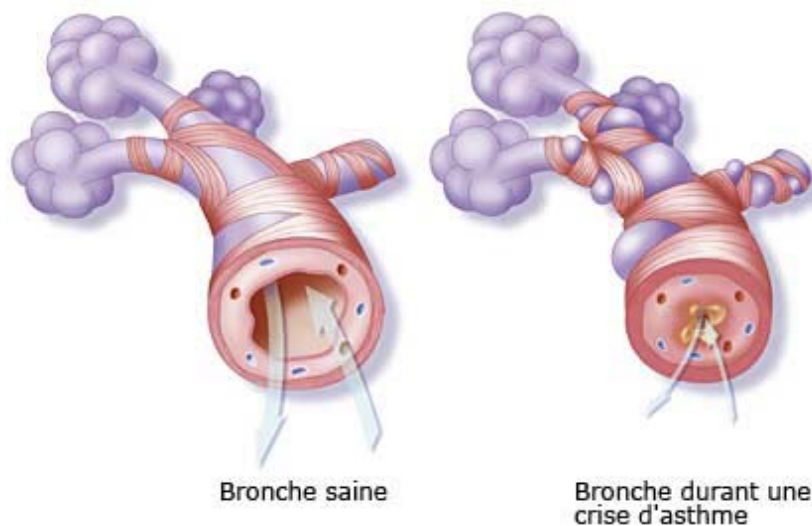


Figure 3 : Schéma représentant une bronche saine et une bronche en crise d'asthme.

Cette dernière présente une obstruction liée à un excès de contraction du muscle lisse ainsi qu'une inflammation et un remodelage du mur bronchique (d'après <http://www.passeportsante.net/DocumentsProteus/images/asthme>).

1.2.a) Hyperréactivité bronchique

Définition

La réactivité bronchique physiologique traduit l'aptitude des voies aériennes de sujets sains à développer une obstruction bronchique limitée en réponse à une forte

stimulation. L'HRB se définit donc comme une réponse « excessive » ou « démesurée » des voies aériennes à une grande variété de stimuli, qu'ils soient physiques, chimiques ou pharmacologiques, par rapport à la réponse des sujets sains. Il est habituel de faire la distinction entre, d'une part, l'HRB non spécifique, anomalie constamment retrouvée dans l'asthme et, d'autre part, l'HRB spécifique d'un allergène, présente uniquement chez les asthmatiques allergiques.

HRB non spécifique

Les stimuli susceptibles d'induire une HRB non spécifique peuvent être directs ou indirects (21) (Tableau 4). Les stimuli directs agissent sans intermédiaire sur l'effecteur principal de la réponse bronchique (*i.e.* le muscle lisse), par la stimulation d'un récepteur membranaire de la CML (cf chapitre I.1.2.a). Ainsi, la métacholine et l'histamine activent respectivement les récepteurs de type M3 et H1. Les stimuli indirects impliquent, quant à eux, une ou plusieurs voies intermédiaires aboutissant, généralement, à la libération de médiateurs bronchoconstricteurs par les cellules inflammatoires, telles que le mastocyte. Ainsi, l'exercice physique abrupt générant une hyperventilation à l'origine d'une déshydratation et une hypothermie du gaz ventilé, va permettre la contraction indirecte du muscle lisse bronchique par la sécrétion de médiateurs inflammatoires mastocytaires comme l'histamine ou les leucotriènes (11,22).

Stimulus		Mécanisme d'action
Pharmacologique	Métacholine	Direct
	Histamine	Direct
Physique	Exercice abrupt	Indirect
	Air froid	Indirect
	Hyperventilation	Indirect
	Solution hypo-osmolaire	Indirect
Chimique	Adénosine	Indirect
	Mannitol	Indirect

Tableau 4 : Liste des principaux stimuli utilisés pour rechercher une hyperréactivité bronchique non spécifique.

Quel que soit le mécanisme impliqué, la réponse bronchique peut être mesurée et quantifiée, comme cela a été décrit dans le chapitre I.1.A. En revanche, si tous les asthmatiques ont une HRB non spécifique, elle se retrouve également chez certains patients rhinitiques ou atteints de bronchopneumopathie obstructive (BPCO) (23). La mesure répétée de l'HRB a été proposée comme outil de suivi des patients asthmatiques, car elle serait corrélée à la sévérité de l'asthme et à son contrôle. Toutefois, les données actuelles, basées sur des études longitudinales, ne recommandent pas son utilisation dans le suivi des patients asthmatiques. Les critères de sévérité de l'HRB (borderline, modérée ou sévère) sont présentés dans la figure 2 (cf chapitre I.1.1.b) et sont calculés en fonction de normes prédéfinies (9).

HRB spécifique

L'HRB spécifique est induite par l'inhalation de l'allergène contre lequel le patient est spécifiquement sensibilisé. Sa mesure n'est toutefois réservée qu'aux essais cliniques ou à la recherche de pathologie professionnelle, car la stimulation spécifique par un allergène peut

potentialiser l'HRB non spécifique, et donc majorer la sévérité de la maladie. Cette réponse spécifique comporte deux phases : une phase précoce et une phase retardée.

Phase précoce

Elle survient dans les minutes suivant la stimulation et résulte de la dégranulation IgE-dépendante des mastocytes. Ceux-ci libèrent des médiateurs bronchoconstricteurs tels que l'histamine, les prostaglandines ou les leucotriènes. L'amplitude de cette phase précoce est corrélée avec la masse musculaire lisse bronchique et, par conséquent, à l'intensité du remodelage bronchique (24). En effet, le remodelage bronchique conduit à une réduction du calibre bronchique qui va alors mécaniquement provoquer une augmentation des résistances à l'écoulement de l'air dans la bronche (25). De plus, la réponse contractile sera plus importante dans une bronche remodelée dont la masse musculaire lisse est augmentée (26).

Phase tardive

Elle survient 3 à 8h après la stimulation allergénique, chez environ 50% des patients, et semble davantage liée à l'inflammation qu'au remodelage bronchique (27-29). En effet, une corrélation positive a été retrouvée entre la concentration de cellules inflammatoires (éosinophiles et mastocytes) dans le LBA de patients asthmatiques et l'intensité de cette réponse obstructive bronchique tardive (30). L'implication de l'inflammation dans la phase tardive de l'HRB spécifique est également confortée par des arguments d'ordre pharmacologique. En effet, différents traitements à visée anti-inflammatoire diminuent cette phase retardée (31). C'est le cas des corticoïdes, des bloqueurs de CD11a, ou d'anticorps anti-IL-4 bloquants, ces deux dernières molécules étant impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires (32,33).

1.2.b) Inflammation bronchique

L'inflammation bronchique se caractérise par une infiltration de l'ensemble de la paroi bronchique chez l'asthmatique par différentes cellules inflammatoires, en particulier les mastocytes, les lymphocytes T et les polynucléaires éosinophiles. On notera également un rôle important des polynucléaires neutrophiles dans l'asthme sévère.

Mastocytes

Des mastocytes infiltrent la muqueuse bronchique dans l'asthme. Les mastocytes sont originaires de la moelle osseuse à partir d'un précurseur CD34+, CD117+ et CD90+. La forme sanguine circulante est immature. En effet, comme toute cellule inflammatoire, les mastocytes sont attirés sur le site de l'inflammation par des facteurs chimiotactiques sécrétés localement par les cellules résidentes ou d'autres cellules inflammatoires déjà sur place. Le recrutement des précurseurs mastocytaires dans la muqueuse bronchique se fait grâce à plusieurs chimiokines comme : CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL1 et CX₃CL1 qui se fixent sur les récepteurs aux chimiokines : CCR3, CXCR1, CXCR3, CXCR4 et CX3CR1 respectivement (Tableau 5) (34-36).

Ligands		XCR1	Récepteurs CCR										Récepteur CXCR						CX3CR1
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	
XCL1	Lptn	X																	
XCL2	SCM-1 β	X																	
CCL1	I-309									X									
CCL2	MCP-1			X															
CCL3	MIP-1 β		X				X												
CCL4	MIP-1 β						X			X									
CCL5	RANTES		X		X		X												
CCL7	MCP-3		X	X	X														
CCL8	MCP-2		X	X	X		X												
CCL11	Eotaxine				X														
CCL13	MCP-4		X	X	X														
CCL14	HCC-1		X				X												
CCL15	MIP-1 δ		X		X														
CCL16	HCC-4		X																
CCL17	TARC					X				X									
CCL18	PARC																		
CCL19	MIP-3 β								X										
CCL20	MIP-3 α							X											
CCL21	6Ckine								X										
CCL22	MDC					X													
CCL23	MPIF		X																
CCL24	Eotaxine-2				X														
CCL25	TECK										X								
CCL26	Eotaxine-3				X							X							
CCL27	CTACK											X							
CCL28	CCL28				X							X							
CXCL1	GRO α												X						
CXCL2	GRO β												X						
CXCL3	GRO γ												X						
CXCL4	PF4																		
CXCL5	ENA-78														X				
CXCL6	GCP-2														X				
CXCL7	NAP-2														X				
CXCL8	IL-8												X	X					
CXCL9	MIG														X				
CXCL10	IP-10														X				
CXCL11	I-TAC														X				
CXCL12	SDF-1 α/β															X			
CXCL13	BCA-1																X		
CXCL16	CXCL16																	X	
CX3CL1	Fractalkine																		X

Tableau 5 : Récapitulatif des principales chimiokines et de leurs récepteurs

Dans les colonnes ligands figurent la dénomination commune internationale et l'ancienne nomenclature des chimiokines. Les croix (X) indiquent la possibilité pour un ligand de se fixer sur un récepteur donné.

Cependant, le TGF (Transforming growth factor)- β semble être le facteur chimiotactique dont la sensibilité est la plus grande (37). Une fois présents dans les tissus, les progéniteurs mastocytaires n'expriment plus le CD34 mais expriment le récepteur au SCF et le Fc ϵ RI. Les IgE, par leur fragment Fc, peuvent se fixer avec une très haute affinité sur ce dernier, entraînant la sensibilisation du mastocyte. Lorsqu'un mastocyte préalablement sensibilisé est mis en présence d'un allergène, la fixation des IgE sur l'allergène entraîne une dimérisation du récepteur Fc ϵ RI, et son activation via une cascade de réactions intracellulaires qui va conduire à la dégranulation du mastocyte. À l'inverse, la dégranulation mastocytaire peut être indépendante des IgE. Cette activation mastocytaire peut se faire grâce à de nombreux stimuli comme certains facteurs de croissance, des cytokines ou même des stimuli physiques comme le froid. La dégranulation de ces mastocytes entraîne la libération de nombreux médiateurs inflammatoires qui contractent le muscle lisse, majorent l'HRB, augmentent la masse musculaire lisse, mais stimulent également la production de mucus par les cellules épithéliales.

Le mastocyte est en effet capable de produire et sécréter de nombreux médiateurs, comme l'histamine, ou des dérivés de l'acide arachidonique comme la prostaglandine D₂ et des leukotriènes C₄, D₄ et E₄ (38,39). De plus, le mastocyte va également sécréter de nombreuses cytokines comme l'IL-4, 5, et 13, mais également du TNF- α , du SCF, du TGF- β et du FGF₂. Enfin, le mastocyte est capable de libérer de grandes quantités de sérines protéases dans le milieu extracellulaire comme la tryptase, et pour certains mastocytes la chymase, la carboxypeptidase et la cathepsine G.

On observe la présence de mastocytes dans l'épithélium et le chorion muqueux bronchique. Au niveau des glandes muqueuses, on retrouve une importante

dégranulation de mastocytes qui semble contribuer à l'augmentation de sécrétion de mucus chez les patients asthmatiques (40). En effet, les mastocytes sécrètent l'amphiréguline et la chymase qui sont capables d'induire la production de mucus par les cellules épithéliales (41). Cependant, outre leur présence au niveau de l'épithélium ou du chorion muqueux, que l'on retrouve également dans d'autres maladies, les mastocytes infiltrant spécifiquement la couche musculaire lisse chez l'asthmatique et on a même parlé de myosite mastocytaire (42). La plus grande partie des effets physiopathologiques du mastocyte dans l'asthme s'exerce sur le muscle lisse et sera présenté dans le chapitre I.2.B des généralités.

Il est habituel de classer les mastocytes en deux catégories : le type T (MC_T) ne contient qu'une seule protéase, la tryptase, et le type TC (MC_{TC}) qui contient en plus de la tryptase, la chymase, la carboxypeptidase et la cathepsine G (43). La concentration de tryptase dans les MC_{TC} est cependant plus importante. Très récemment, une augmentation des MC_T a été retrouvée dans la muqueuse bronchique des asthmatiques modérés alors que, dans l'asthme sévère, on retrouve une augmentation des MC_{TC} (44). En effet, la tryptase, produit majoritaire des mastocytes, est impliquée dans de nombreux processus tels que l'HRB, l'inflammation et le remodelage des voies aériennes.

La tryptase

La tryptase humaine est une protéine enzymatique de 135 kDa de type sérine protéase décrite initialement comme similaire à la trypsine et synthétisée par les mastocytes puis libérée lors de la dégranulation mastocytaire (45). Les substrats de la tryptase sont peu nombreux. Il s'agit par exemple de peptides tels que le VIP, le CGRP, la vasopressine. Au niveau de la CML, la cible potentielle de la tryptase semble être le récepteur activé par les

protéases de type 2 (PAR-2) (cf chapitre I.1.2.b).

Des concentrations élevées de tryptase ont été mesurées dans le liquide de LBA de malades asthmatiques (46,47). La tryptase participe au contrôle du tonus et de la réactivité du muscle lisse des voies aériennes. En effet, la tryptase potentialise la contraction induite par l'histamine par le biais de mécanismes liés au calcium extra-cellulaire, sur les bronches canines (48) et humaines (49). De plus, la tryptase induit un signal calcique transitoire (50). La tryptase peut aussi agir de manière indirecte sur le muscle lisse via le système non adrénergique non cholinergique : elle clive et inactive le VIP, un neurotransmetteur bronchodilatateur et n'inactive pas les tachykinines, substances impliquées dans la bronchoconstriction (51). *In vivo*, l'inhalation de tryptase humaine provoque une bronchoconstriction et une HRB chez le mouton allergique (52). De plus, le traitement par des inhibiteurs de la tryptase avant une stimulation allergénique diminue la réponse précoce et retardée, puis l'HRB non spécifique et l'inflammation éosinophile (53). Le rôle pro-inflammatoire de la tryptase consiste à induire *in vitro* et *in vivo* la formation d'œdème et le recrutement de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (52,54,55). La tryptase stimule également la prolifération des fibroblastes et induit un chimiotactisme pour ce type cellulaire (56). En outre, la tryptase augmente la synthèse et la sécrétion de collagène de type I (57,58), participant ainsi aux lésions de fibrose chronique. La tryptase contribue également au remodelage des voies aériennes en stimulant la prolifération des cellules épithéliales (59), des cellules endothéliales (60,61) et des CML bronchiques humaines (62,63).

Lymphocytes T

Un important infiltrat de lymphocytes T est retrouvé dans la muqueuse bronchique des

asthmatiques, mais également dans le muscle lisse. L'adhérence des lymphocytes T aux CML augmente leur prolifération et contribuerait au remodelage (64). Le paradigme Th1/Th2 a longtemps été considéré comme déterminant dans l'immunopathologie de l'asthme. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ sont majoritaires dans l'asthme et notamment le sous-type T helper 2 (Th2) est prédominant. Le recrutement des lymphocytes Th2 dans la paroi bronchique implique principalement les récepteurs CCR3 et CCR4 (65). La production de chimiokines CCL22 et CCL17, deux ligands de CCR4 est en effet augmentée chez l'asthmatique (Tableau 5). L'infiltrat Th2 est responsable de la production de nombreuses cytokines comme l'IL-4, 5, 9 et 13 qui orchestrent l'inflammation éosinophilique et la production des IgE. De plus, la réponse inflammatoire Th2-dépendante va participer au développement de l'HRB (cf chapitre I.1.2.a). A l'inverse, les lymphocytes Th1, producteurs d'IFN- γ (Interferon- γ), sont connus pour inhiber la prolifération des lymphocytes Th2 (66). La réponse Th1 spécifique des infections virales ou bactériennes semble avoir un rôle protecteur dans l'asthme. En effet, les patients sensibles aux infections bactériennes de type *Mycobacterium tuberculosis* et donc chez qui une augmentation de la production de Th1 est retrouvée, développent moins d'asthme (67). De la même manière, chez les patients atteints de sclérose en plaque ou d'autres maladies auto-immunes avec surexpression de Th1 et de leurs cytokines, on observe une plus faible incidence de l'asthme (68,69). Par ailleurs, il a été montré qu'il existe chez l'asthmatique, qu'il soit ou non atopique, une population de lymphocyte T CD8⁺, producteurs d'IFN- γ (70). Cette population est liée à l'HRB et à la sévérité de l'asthme. De plus, il a été montré une augmentation des lymphocytes T producteurs d'IFN- γ chez les asthmatiques symptomatiques notamment (71). Il a ainsi été suggéré que la présence de cette population de lymphocytes Th1 semblait nécessaire au développement de l'asthme (72). Une autre catégorie de lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T régulateurs (Treg), est également très

étudiée dans l'asthme et vient compliquer un peu plus les mécanismes de l'inflammation Th2-dépendante dans l'asthme (73,74). Parmi ceux-ci, les Treg caractérisés par l'expression à leur surface du CD4, CD25, sont capables de diminuer la réponse Th2 (75). De plus, dans un modèle aigu d'asthme chez le rat, le rôle protecteur des Treg CD4+, CD25+, FoxP3+ (Forkhead box P3) dans l'HRB a été démontré (76). Chez l'homme, le traitement des asthmatiques aux glucocorticoïdes augmente l'expression des Treg par un mécanisme FoxP3 dépendant (77). Dans ce contexte, il a été montré récemment une diminution d'expression de FoxP3 chez les patients asthmatiques (78). Ainsi, il semblerait que les mécanismes de l'inflammation se dirigent vers une conception en trois dimensions (Figure 4) (72).

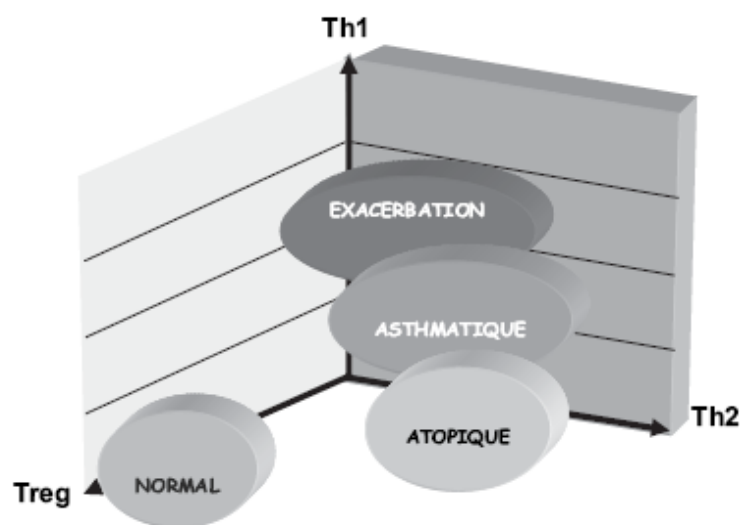


Figure 4 : Schématisation du concept en trois dimensions de l'inflammation bronchique.

L'état normal est caractérisé par l'activation maximale des Treg. Chez l'atopique, cette activation est déficitaire et donne libre cours à l'activation Th2. Chez l'asthmatique s'y associe une activation Th1 maximale en cas d'exacerbations. (Reproduit de Mamessier et al., 2005 (72)).

Cependant, l'immunopathologie de l'asthme semble être plus complexe encore avec le rôle plus récemment évoqué d'une autre sous-population de lymphocytes T : les

TH17 (79,80).

Polynucléaires éosinophiles

La très grande majorité des asthmatiques présente une infiltration bronchique à polynucléaires éosinophiles. Cependant, contrairement aux mastocytes et aux lymphocytes T, ces éosinophiles n'infiltrant pas la couche musculaire lisse. En effet, la tryptase mastocytaire empêche le recrutement des éosinophiles par la CML en clivant de manière sélective les chimiokines éotaxine et RANTES (81). Les polynucléaires éosinophiles sont originaires de la moelle osseuse à partir de précurseurs CD34+. Leur maturation a lieu dans la moelle osseuse sous l'effet de l'IL-5 notamment (82,83). L'essentiel de leur recrutement dans la muqueuse est dû à la production d'IL-5 par les lymphocytes Th2 et les mastocytes. L'IL-5 joue un rôle important dans la maturation, la différenciation et la survie des éosinophiles qui vont libérer, en retour, de nombreuses cytokines comme l'IL-4 et l'IL-13 qui entretiennent la réponse inflammatoire Th2 (84). Les éosinophiles libèrent également des médiateurs impliqués dans la contraction musculaire lisse, comme les prostaglandines ou les leucotriènes, mais également dans l'HRB, comme la MBP (Major Basic protein). Ils produisent également du TGF- β et de l'ECP (eosinophil cationic protein) et participent ainsi au remodelage bronchique (85). Il a été montré notamment un rôle important des éosinophiles dans la destruction de l'épithélium. En effet, l'ECP contribue à l'abrasion de l'épithélium bronchique humain (86). L'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-5 est controversée et a fait l'objet de plusieurs études dans les dernières années (87,88). Probablement, l'absence d'effet chez certains asthmatiques est en rapport avec des phénotypes différents. Très récemment, une étude a montré que le mepolizumab entraînait une diminution des exacerbations chez des asthmatiques sévères (88).

Polynucléaires neutrophiles

L'infiltration de la paroi bronchique par des neutrophiles semble être une caractéristique de l'asthme sévère. Les polynucléaires neutrophiles proviennent eux aussi de la moelle osseuse où se fait leur maturation. Ils sont recrutés dans la bronche à partir de leur forme sanguine déjà mature (89). Ce recrutement nécessite la production locale de CXCL8 (90) qui se fixe sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 exprimés à la surface des neutrophiles (Tableau 5) (91). Les neutrophiles sécrètent des protéases comme les métalloprotéinases 9 et l'élastase qui vont dégrader la matrice extracellulaire (92). Le neutrophile est également à l'origine de la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS), et de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que le TNF (Tumor necrosis factor)- α et le TGF- β qui peuvent agir sur la CML notamment (93,94). Plusieurs études montrent une corrélation entre l'infiltration de neutrophiles et la diminution du VEMS et font de l'infiltrat neutrophilique, un signe pronostic de l'asthme sévère (95,96). Récemment, l'implication des lymphocytes Th17 dans la régulation de l'inflammation neutrophilique dans l'asthme sévère a été évoquée (80).

1.2.c) Remodelage bronchique

Il s'agit d'un processus anormal de réparation de l'inflammation bronchique. Il se caractérise par un ensemble de modifications anatomiques affectant, à des degrés divers, toutes les composantes de la paroi bronchique des voies aériennes proximales et distales, *i.e.* l'épithélium, la membrane basale, la matrice extra-cellulaire, les glandes séro-muqueuses, les vaisseaux et le muscle lisse bronchique (97). Ces altérations structurales peuvent apparaître précocement dans l'histoire naturelle de la maladie. Elles contribuent à l'installation d'une

obstruction bronchique fixée, moins réversible et correspondent donc à une évolution défavorable de la maladie.

Epithélium bronchique

L'asthme se caractérise, classiquement, par une desquamation de l'épithélium bronchique et un renouvellement cellulaire plus important. L'importance des altérations épithéliales est corrélée à l'HRB. Dans l'asthme sévère, en revanche, l'épithélium est hyperplasique, avec une augmentation du nombre de cellules à mucus (98-100). De plus, la concentration de lipoxine A4 (LXA4) est diminuée dans le surnageant issu d'expectorations induites de patients asthmatiques sévères (101). La LXA4 est un médiateur lipidique dérivé de l'acide arachidonique aux propriétés anti-inflammatoires qui pourraient résulter de sa fixation sur son récepteur spécifique, le FPRL-1, dont l'expression dans l'épithélium de l'asthmatique sévère reste à préciser.

Membrane basale et matrice extra-cellulaire

Une fibrose sous-épithéliale intéressant la lamina reticularis est observée dans l'asthme, et est à l'origine d'un pseudo-épaississement de la membrane basale (102,103). Elle résulte de la combinaison de 2 mécanismes. D'une part, le dépôt de protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène I, III, V, fibronectine, tenascine, protéoglycanes) par les fibroblastes, myofibroblastes et CML, est augmenté. D'autre part, il existe un déséquilibre entre l'expression des métalloprotéinases qui dégradent ces protéines et celle de leurs inhibiteurs endogènes, les TIMP.

Glandes séro-muqueuses

Une hypertrophie des glandes séro-muqueuses est retrouvée dans l'asthme et conduit à une hypersécrétion de mucus qui renforce l'obstruction bronchique (1). Les mécanismes responsables de cette hypertrophie sont inconnus à l'heure actuelle. Cependant, l'implication de gènes responsables de la production de mucus comme MUC2, MUC5AC par différentes cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 a été démontrée (104,105). L'IL-1 β et le TNF- α semblent être également mis en jeu dans l'activation des gènes MUC (106).

L'angiogenèse

Le nombre des vaisseaux sanguins bronchiques est augmenté dans l'asthme (97,107). Les mécanismes responsables de cette angiogenèse demeurent mal connus, mais plusieurs travaux suggèrent l'implication d'un facteur de croissance de l'endothélium, le VEGF. En effet, le VEGF est augmenté dans l'asthme et semble colocalisé avec les marqueurs des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes Th2, suggérant le rôle de l'inflammation dans ce mécanisme (108,109). Dans un modèle de souris asthmatique, le niveau de VEGF est retrouvé augmenté et son inhibition conduit à une diminution de l'inflammation ainsi que de l'HRB (110,111). Enfin, dans un modèle de souris surexprimant le VEGF au niveau épithélial, on observe une augmentation de l'angiogenèse (111). Ces souris sont plus sensibles à la stimulation par un allergène avec une HRB et une inflammation bronchique plus fortes (111). Ainsi, l'angiogenèse, bien qu'encore peu étudiée, semble être une composante importante de la maladie asthmatique.

Muscle lisse bronchique

L'augmentation de la masse du muscle lisse bronchique représente une composante essentielle du remodelage bronchique dans l'asthme (112). Elle est en effet corrélée à une dégradation non réversible de la fonction ventilatoire chez les asthmatiques (113). Elle implique à la fois une augmentation de l'hypertrophie et de l'hyperplasie des CML (Figure 5). Cette partie sera développée dans le chapitre I.2.3.

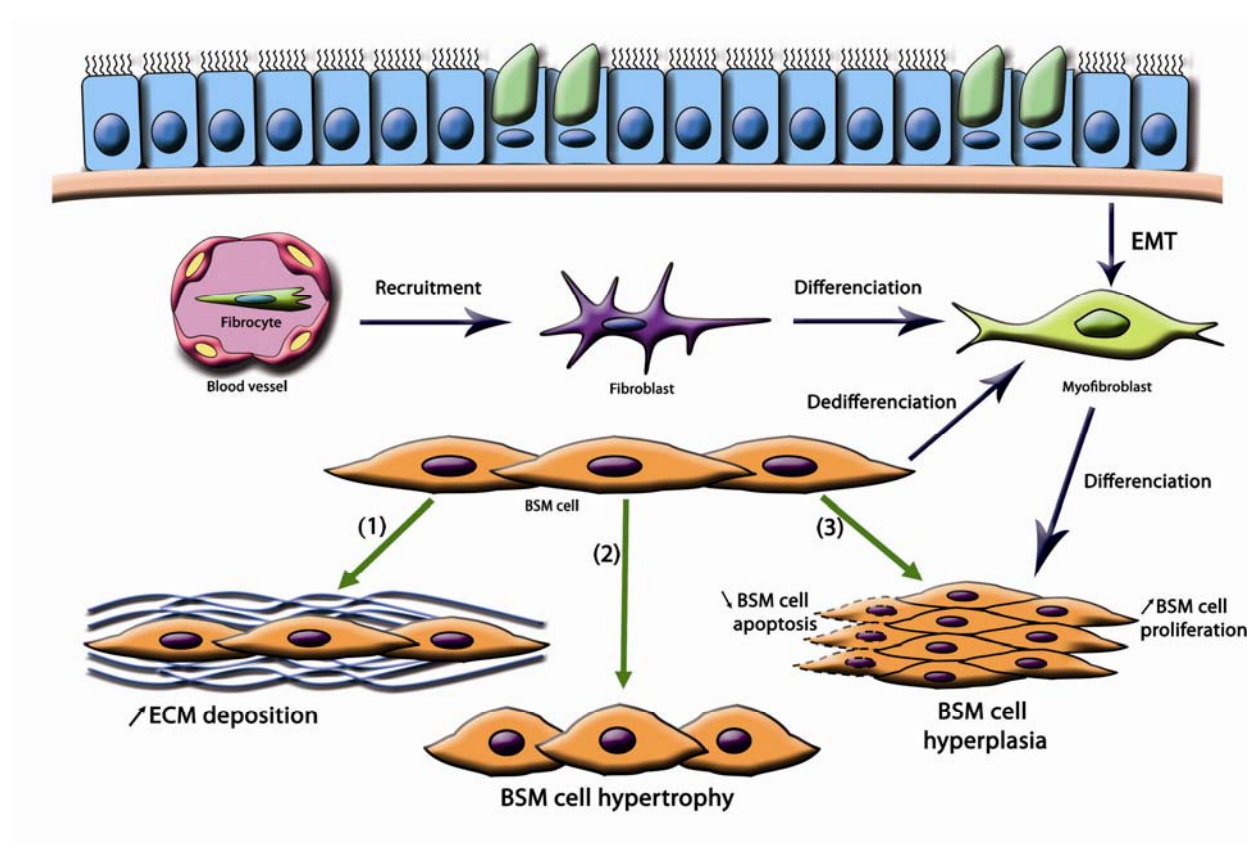


Figure 5 : Les trois principales caractéristiques du remodelage musculaire lisse dans l'asthme.

L'hyperplasie peut être due à une augmentation de la prolifération, une diminution de l'apoptose ou le recrutement de cellules mésenchymateuses. (D'après Bara et al., 2010 (114)).

2. Le rôle central de la cellule musculaire lisse dans la physiopathologie de l'asthme

Le muscle lisse bronchique est présent dès le 53^{ème} jour de gestation, avec des bandes musculaires bien visibles au niveau des voies aériennes proximales et des CML plus éparses dans les bronches distales. Le muscle lisse bronchique est mature à la naissance (115). Il est réparti le long de l'arbre trachéo-bronchique depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales (116). Au niveau de la trachée, le muscle lisse est organisé en faisceaux transversaux à la partie postérieure. Au fur et à mesure des subdivisions dans l'arbre bronchique, et plus le diamètre bronchique diminue, le tissu musculaire prédomine par rapport aux autres structures de la paroi bronchique et les faisceaux musculaires deviennent organisés en hélice.

D'un point de vue morphologique, les CML des voies aériennes ont une forme allongée et sont orientées parallèlement les unes aux autres, formant des faisceaux. Au niveau cellulaire, autour d'un noyau unique, central, sont présents des organites divers, tels que des mitochondries, des lysosomes et un appareil de Golgi. Le réticulum sarcoplasmique est peu développé mais joue un rôle fonctionnel important. Le cytosol est caractérisé par la présence de filaments d'actine de 4 à 7 nm de diamètre, de myosine de 12 à 20 nm, et de filaments intermédiaires de 8 à 12 nm. Les protéines qui les régulent sont également présentes, caldesmone et calponine principalement. Les filaments contractiles sont arrimés à la membrane plasmique ou plasmalemma au niveau de régions denses aux électrons.

Au niveau physiologique, le rôle du muscle lisse est controversé. Le muscle lisse interviendrait dans la distribution de la ventilation dans les bronches ou encore dans la propulsion du mucus (117,118). Cependant, ces rôles potentiels n'ont pas été expérimentalement validés. Paradoxalement, le rôle physiopathologique du muscle lisse dans l'asthme est mieux connu. En effet, les CML sont des cellules clés dans la physiopathologie de l'asthme en tant que cellules effectrices de la contraction et de la réactivité bronchique. Les mécanismes de contraction et de relaxation des CML ont été largement étudiés dans la littérature et plusieurs médiateurs broncho-constricteurs et broncho-dilatateurs ont été identifiés. Plus récemment, il a été établi que les CML bronchiques jouaient un rôle dans l'inflammation et le remodelage des voies aériennes, notamment par leurs propriétés d'hyperplasie, d'hypertrophie et de synthèse de cytokines (37,112,114,119,120).

2.1) Rôle de la CML bronchique dans l'HRB

La réactivité bronchique traduit l'aptitude des voies aériennes de sujets sains à diminuer leur diamètre en réponse à une forte stimulation physique, chimique ou pharmacologique (121). Le muscle lisse des voies aériennes est l'effecteur principal de la réactivité bronchique. Physiologiquement, la contraction du muscle lisse des voies aériennes est sous le contrôle de nombreux messagers extracellulaires qui agissent grâce à une interaction avec des récepteurs spécifiques présents sur la membrane plasmique de la CML. Ces messagers extracellulaires peuvent être classés en deux grandes catégories : les médiateurs, essentiellement produits par les cellules inflammatoires et épithéliales et les neurotransmetteurs du système nerveux autonome (Figure 6).

2.1.a) Médiateurs

Les médiateurs représentent un groupe de substances ubiquitaires, produites principalement par les cellules inflammatoires, comme les mastocytes, les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, les macrophages ainsi que par les cellules épithéliales et endothéliales des voies aériennes.

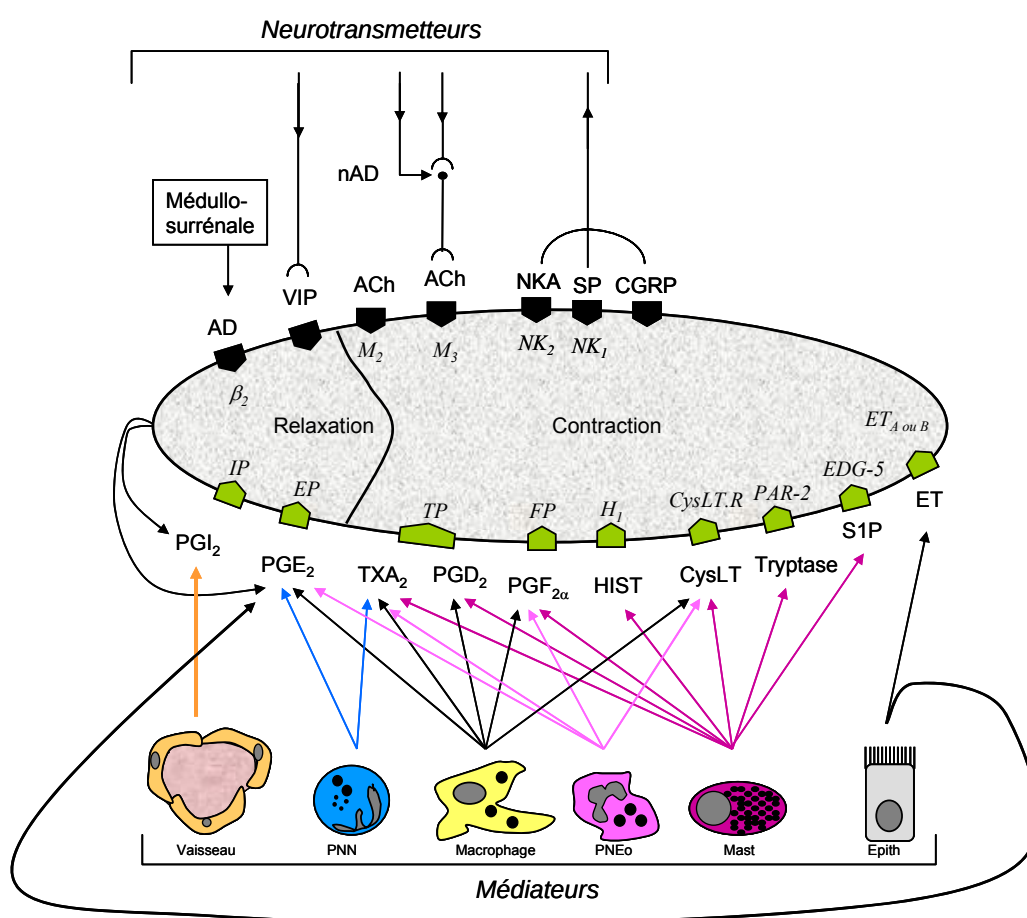


Figure 6 : Contrôle de la contraction des cellules musculaires lisses.

Histamine

L'histamine est un médiateur chimique présent dans les mastocytes et libéré lors de la dégranulation mastocytaire mais qui peut également être produit en faible quantité par les polynucléaires basophiles (122). Elle agit directement sur le muscle lisse par interaction avec le récepteur à l'histamine prédominant, le récepteur H_1 , puis entraîne une contraction (123).

Éicosanoïdes

Issus du métabolisme de l'acide arachidonique, les éicosanoïdes sont des lipides qui incluent deux familles principales *ie* les prostanoïdes et les leucotriènes. Les prostanoïdes, métabolisés par la cyclooxygénase, comprennent les thromboxanes, les prostaglandines et la prostacycline. Les leucotriènes sont métabolisés par la 5-lipooxygénase. Les leucotriènes cystéinés, *ie* les leucotriènes C₄, D₄ et E₄, sont de puissants constricteurs du muscle lisse bronchique humain *in vitro* et *in vivo* (124), en se fixant sur trois types de récepteurs : cysLT₁, cysLT₂ et cysLT₃.

En outre, les leucotriènes jouent un rôle dans les phases précoce et tardive de l'obstruction bronchique induite par un allergène en association avec l'histamine (125). Le thromboxane A₂, les prostaglandines D₂ et F_{2 α} agissent sur la contraction du muscle lisse bronchique principalement par l'intermédiaire du récepteur TP (126). De manière plus récente, il a été montré que les isoprostanes, une nouvelle classe de prostaglandines, peuvent être synthétisées par un mécanisme indépendant de la cyclooxygénase (127). Le représentant majeur de ce groupe chez l'homme, le 8-épi-PGF_{2 α} contracte les bronches humaines *in vitro* (128). Par ailleurs, les prostaglandines E₂ et I₂ dilatent la bronche en relaxant le muscle lisse (129,130). Toutefois, la spécificité de certaines prostaglandines pour leur récepteur n'est pas

totale ce qui explique par exemple, qu'à fortes doses, la prostaglandine E₂ contracte la bronche via le récepteur TP (131).

Cytokines

Les cytokines sont des substances de communication agissant à distance pour réguler l'activité et la fonction des cellules. Certaines cytokines participent au contrôle de la réactivité musculaire lisse bronchique. À titre d'exemple, l'incubation d'anneaux bronchiques humains avec des cytokines de type TH2 telles que l'IL-5, ou avec le GM-CSF, augmente la contraction induite par l'acétylcholine (132). La réactivité β -adrénergique de CML bronchiques humaines en culture est diminuée par l'IL-13 (133). Si les données concernant les cytokines de type TH1, et notamment l'IFN- γ , sont controversées (134,135), le rôle de cytokines pro-inflammatoires dans la genèse d'une HRB a été établi. Chez l'homme, l'inhalation de TNF- α recombinant augmente la réactivité à la métacholine des voies aériennes de sujets normaux (94). De même, l'administration intra-trachéale d'IL-1 β chez le rat se traduit par une augmentation de la réactivité à la bradykinine (136).

Autres médiateurs

Outre la tryptase (cf. Chapitre I.2.B : Interaction CML / Mastocyte), d'autres médiateurs peuvent moduler directement la réactivité musculaire lisse bronchique. *In vitro* et *in vivo*, l'endothéline 1, sécrétée par les cellules endothéliales et épithéliales bronchiques, est un constricteur puissant des bronches humaines (137). Cette réponse contractile dépend de l'activation spécifique d'un récepteur ET_B (138). Enfin, la bradykinine contracte le muscle lisse des bronches humaines mais uniquement distales (139).

2.1.b) Neurotransmetteurs

Le muscle lisse des voies aériennes est innervé par des fibres afférentes et efférentes du système nerveux autonome. Trois types de voies efférentes sont mis en jeu : les systèmes cholinergique et adrénergique, mais également un système non adrénergique non cholinergique (NANC) (Figure 7).

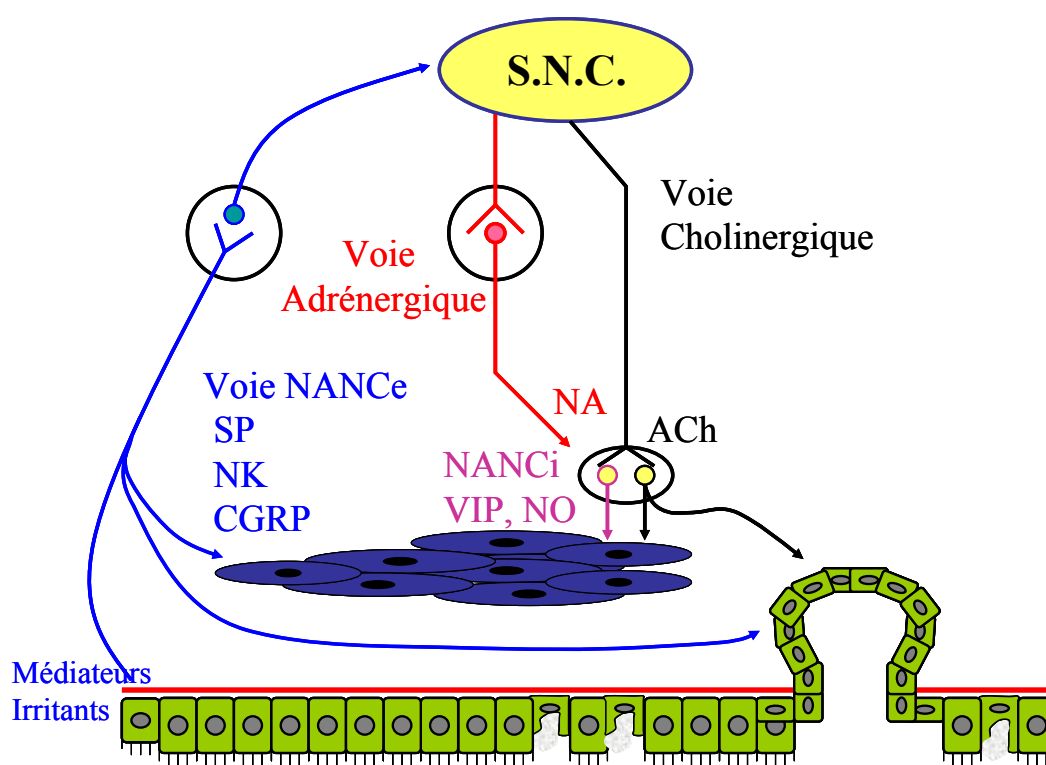


Figure 7 : Système nerveux autonome du muscle lisse bronchique.

NANC : Non exciteur non inhibiteur, SP : Substance P, NK : Neurokinine, CGRP : Calcitonin gene-related peptide, NA : Neurokinine A, VIP : Peptide vasointestinal, NO : Monoxyde d'azote.

Système cholinergique

Les fibres empruntent le nerf vague. Ce système peut être considéré comme la commande bronchoconstrictrice principale chez l'homme (140) et l'acétylcholine comme le

neurotransmetteur prédominant des voies aériennes humaines. Son mécanisme d'action au niveau du muscle lisse bronchique passe par une interaction spécifique avec les récepteurs muscariniques M3. Cependant, l'acétylcholine agit aussi par l'intermédiaire de récepteurs de type M2, couplés à une protéine G_i , dont la stimulation inhibe la production d'AMP cyclique, qui relâche le muscle lisse (141).

Système adrénergique

Le rôle fonctionnel du système adrénergique est modeste au niveau des voies aériennes. D'une part, l'innervation adrénergique directe du muscle lisse bronchique est pauvre (142), ce qui contraste avec la densité des récepteurs β -adrénergiques présents sur les CML bronchiques. En effet, la stimulation de ces récepteurs déclenche une bronchodilatation, ainsi, des médicaments β_2 adrénergiques stimulants ont été synthétisés et sont largement utilisés dans le traitement de l'asthme. D'autre part, la stimulation des fibres nerveuses adrénergiques provoque une bronchodilatation faible, via l'inhibition de la voie cholinergique.

Système NANC

Le système non adrénergique non cholinergique est constitué de deux composantes : le système NANC inhibiteur (NANCI) et le système NANC excitateur (NANCe). Le système NANCI n'a pas de structure nerveuse propre et chemine avec la voie cholinergique. Il met en jeu la libération de monoxyde d'azote (NO) et de peptide vasointestinal (VIP). Ces deux médiateurs ont des propriétés broncho-dilatatrices *in vitro*. Chez l'homme, où l'innervation adrénergique joue un rôle relaxant mineur, le NANCI est considéré comme la seule commande nerveuse bronchodilatatrice (143). Le NANCe possède des fibres nerveuses propres. Il s'agit du cheminement antidromique via les fibres sensibles de type C. Les effets

du système NANCe sont liés à la libération de médiateurs appelés tachykinines. Il existe trois types de tachykinines, la substance P, les neurokinines A et B et le « calcitonin gene-related peptide » (CGRP), agissant sur 3 types de récepteurs : NK1, NK2 et NK3 (144). Lorsque des bronches humaines sont passivement sensibilisées avec du sérum de patient allergique, une hyperréactivité à la neurokinine A et à la substance P est observée (145). Le récepteur NK2 est essentiellement impliqué dans la broncho-constriction alors que les effets inflammatoires neurogènes sont liés à une stimulation du récepteur NK1 (146).

2.1.c) Le couplage excitation-contraction

A la différence du muscle squelettique dont la contraction dépend essentiellement d'une stimulation nerveuse et de la genèse d'un potentiel d'action, la contraction du muscle lisse bronchique est contrôlée par de nombreux messagers extracellulaires décrits dans le chapitre précédent. La transduction membranaire du message extracellulaire responsable de la contraction aboutit à l'augmentation de la concentration cytosolique en ions calcium. En effet, dans les CML bronchiques humaines, l'ion calcium joue le rôle de second messenger : la variation de concentration en calcium libre cytoplasmique contrôle le mécanisme de contraction. L'augmentation de la concentration calcique cytosolique depuis 10^{-7} M jusqu'à 10^{-5} M provoque la contraction de fibres musculaires lisses de manière concentration dépendante (147). Il est couramment admis de distinguer deux types de couplage excitation-contraction (Figure 8).

Le couplage électro-mécanique implique l'ouverture de canaux calciques membranaires lors de l'augmentation du potentiel de membrane entraînant la contraction musculaire. À l'opposé, le couplage pharmaco ou chimio-mécanique implique des messagers

extracellulaires pouvant entraîner une contraction indépendamment d'une variation de potentiel de membrane. L'entrée de calcium extracellulaire est liée pour l'essentiel à la dépolarisation de la membrane plasmique. Cette dépolarisation, dans des conditions physiologiques, ne déclenche pas un potentiel d'action dans le muscle lisse des voies aériennes mais entraîne l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel (VOC), induisant un influx de calcium extracellulaire.

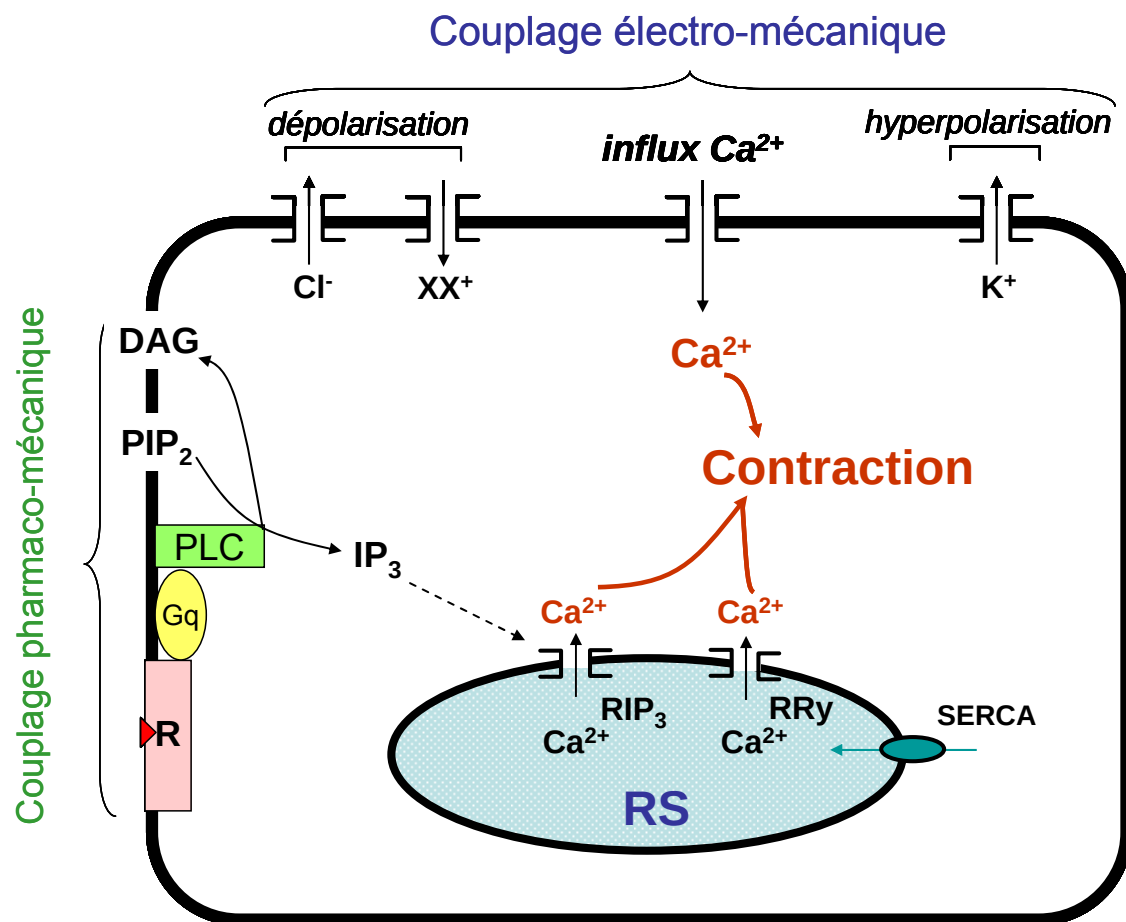


Figure 8 : Couplage excitation-contraction.

R : Récepteur membranaire, PLC : Phospholipase C, PIP₂ : Phosphatidyl-inositol-diphosphate, DAG : Diacylglycérol, IP₃ : Inositol triphosphate, RIP₃ : Récepteur à l'IP₃, RRY : Récepteur à la ryanodine, RS : Réticulum sarcoplasmique.

Le couplage pharmaco-mécanique (148) comporte plusieurs étapes : la fixation de l'agoniste à son récepteur spécifique couplé à une protéine G induit la dissociation de la protéine G et l'activation d'une enzyme, la phospholipase C. La phospholipase C catabolise les phosphoinositides membranaires, ce qui induit la production d'inositol triphosphate. L'inositol triphosphate joue un rôle central dans ce couplage en se fixant sur son récepteur spécifique, récepteur canal calcique situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, induisant la libération des stocks de calcium et l'augmentation de la concentration calcique cytosolique (149).

2.1.d) Les protéines contractiles

L'augmentation de la concentration calcique cytosolique entraîne la formation cyclique de ponts d'acto-myosine concourant au développement de la force contractile. Elle permet la liaison du calcium à une protéine cytosolique de faible poids moléculaire (16 kDa), la calmoduline, ce qui provoque l'activation de la kinase des chaînes légères de la myosine MLCK (150) : la phosphorylation de la myosine permet ainsi l'établissement de ponts d'acto-myosine, d'où le raccourcissement du muscle. La diminution de la concentration calcique s'accompagne d'une déphosphorylation de la myosine, assurée par une autre enzyme spécifique, la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP). La balance MLCK/MLCP est une particularité de la contraction du muscle lisse et un élément de sensibilisation de l'appareil contractile au calcium. Une autre particularité du muscle lisse est la présence de protéines associées aux protéines contractiles, comme la calponine et la caldesmone. Ces deux protéines, lorsqu'elles sont phosphorylées, augmentent la sensibilisation de l'appareil contractile au calcium (151,152).

2.2) Rôle de la CML bronchique dans l'inflammation (mastocyte / PAR-2)

La CML a longtemps été considérée comme un effecteur uniquement responsable de la contraction bronchique. Depuis plusieurs années, son statut a changé et elle est désormais considérée comme une cellule inflammatoire à part entière. En effet, la CML est capable de proliférer, d'adopter un profil sécrétant ou d'interagir directement avec des cellules inflammatoires. Les études les plus récentes font même de la CML l'un des types cellulaires les plus importants dans la physiopathologie de l'asthme (153,154), et une cible de choix pour les nouvelles thérapeutiques (114,155).

2.2.a) Synthèse de médiateurs inflammatoires par la CML

La CML synthétise et sécrète une panoplie de médiateurs. À titre d'exemple, les CML en culture sont capables de produire des cytokines comme l'IL-5, l'IL-6 (132,156), des facteurs de croissance comme le GM-CSF, le TGF- β 1 et le SCF (157,158). Il a également été montré que les CML en culture pouvaient produire des chimiokines comme le RANTES, l'IL-8, la MCP-1 (Monocyte chemotactic protein) ou l'éotaxine (159,160). Il faut remarquer que cette production de cytokines peut être constitutive ou induite par l'effet de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou le TNF- α (161). Certaines de ces cytokines ainsi synthétisées ont une action d'attraction vis-à-vis de différents types cellulaires : le SCF, le TGF- β 1, le RANTES (Regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted) et l'IP-10 (Interféron- γ (IFN- γ) inducible protein-10) ont un pouvoir chimiotactique prononcé pour les mastocytes tandis que l'IL-8, l'éotaxine et MCP-1 induisent un chimiotactisme pour

les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les monocytes, respectivement.

Les CML bronchiques humaines sécrètent donc des cytokines de type TH1 (IL-2, IL-12 et IFN- γ) et TH2 (IL-5) (162). Or, la sensibilisation passive de CML avec du sérum de malade asthmatique entraîne une augmentation précoce et importante de l'expression d'ARNm de cytokines TH2, suivi d'une augmentation moindre de l'expression de cytokines TH1 (132). De plus, l'activité de synthèse de cytokines par les CML peut être modifiée par l'effet d'agents anti-inflammatoires. Par exemple, la sécrétion d'IL-8 par des CML bronchiques humaines en culture stimulées par le TNF- α est inhibée par un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone (159). La production de GM-CSF par des CML est également diminuée en présence de dexaméthasone (163). Enfin, il a été montré que la dexaméthasone inhibait fortement la libération de prostaglandine E₂ par les CML stimulées par l'IL-1 β mais aussi l'expression de cyclooxygénase de type 2 induite par l'IL-1 β (164). Cependant, cette inhibition de la synthèse de cytokines par les glucocorticoïdes n'est probablement pas efficace dans l'asthme. En effet, l'absence du C/EBP α (165), dans les CML d'asthmatiques rend leur administration inefficace sur la synthèse de cytokines par la CML.

La production de facteurs chimiotactiques permet à la CML d'initier et d'entretenir la migration d'autres cellules inflammatoires, contribuant ainsi à l'entretien de la réaction inflammatoire (166). L'ensemble de ces travaux suggère que les CML bronchiques jouent un rôle clé dans la synthèse de cytokines, conférant ainsi à ce type cellulaire un statut de cellule inflammatoire à part entière.

2.2.b) Interaction CML / Mastocyte

La production de cytokines par la CML permet ainsi l'attraction de nombreuses cellules inflammatoires. Cependant, l'infiltrat mastocytaire du muscle lisse semble spécifique et caractéristique de l'asthme (167). Il existe, de plus, une dégranulation mastocytaire objectivée *ex vivo* en microscopie électronique (154). Le lien étroit qui semble exister entre ces deux types cellulaires a été étudié, notamment au sein du laboratoire. Il a ainsi été montré que la CML entraînait un chimiotactisme des mastocytes via une boucle d'auto-activation positive (37) (Figure 9).

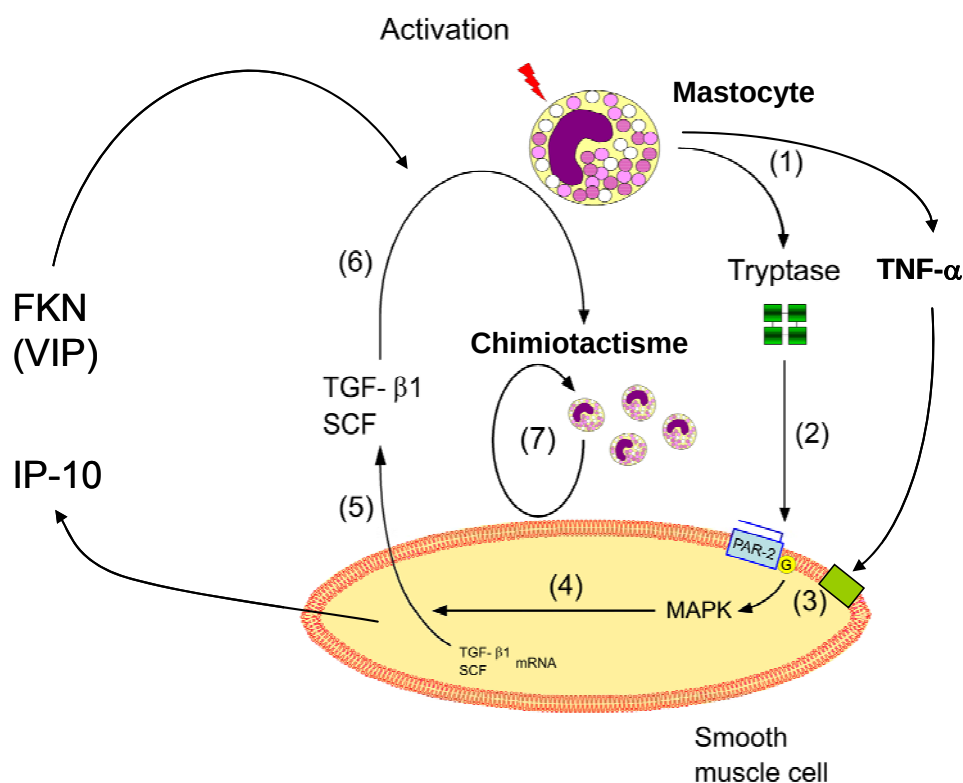


Figure 9 : Mécanisme de la myosite mastocytaire.

FKN : Fraktalkine, VIP : Vasoactive intestinal peptide, IP-10 : Interferon inducible protein-10, SCF : Stem cell factor, TGF : Transforming growth factor, TNF : Tumor necrosis factor. (D'après Berger et al., 2003 (37))

Lors de la dégranulation mastocytaire, la tryptase et le TNF- α notamment, sont libérés et stimulent la CML. Ainsi stimulée, la CML synthétise du TGF- β 1 et du SCF qui vont attirer de nouveaux mastocytes et amplifier cette interaction (37,42). D'autres travaux sont venus compléter ces premiers résultats. En effet, cette boucle fait intervenir d'autres facteurs comme l'IP-10 ou CXCL10 (35) et la Fractalkine ou CX₃CL1 (36). En effet, la CML synthétise aussi ces chimiokines et le mastocyte exprime leur récepteur, CXCR3 et CX₃CR1 respectivement. Cependant, pour la Fractalkine, la présence de VIP (peptide vasointestinal) est nécessaire pour que le muscle lisse exerce son pouvoir chimiotactique (36) (Figure 9). En aval de ce chimiotactisme, les mastocytes peuvent adhérer à la couche musculaire lisse par des interactions cellules-cellules (168) ou plus majoritairement par des interactions cellules-matrice-cellules (169). Cette adhérence est augmentée avec des CML d'asthmatiques et lors de stimulations inflammatoires (169).

Le récepteur activé par les protéases (PAR) de type 2, présent à la surface des CML bronchiques humaines (170), est une cible particulièrement intéressante dans cette boucle d'auto-activation (37). En effet, la tryptase est le produit de sécrétion majoritaire du mastocyte et elle active le PAR-2. De plus, la stimulation directe du PAR-2 musculaire lisse entraîne la même migration mastocytaire (cf chapitre I.1.2.b).

2.2.c) Le récepteur activé par les protéases de type 2 (PAR-2)

Le PAR-2 appartient à une famille de quatre récepteurs : PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4. Les PAR ont été initialement identifiés dans les mécanismes de coagulation et d'activation plaquettaire. Plus récemment, leur rôle dans l'inflammation a été démontré et a attiré l'attention de plusieurs équipes (171). Les PAR sont des récepteurs à 7

domaines transmembranaires couplés aux protéines G, pourvus d'une partie NH₂-terminale extracellulaire et d'une séquence COOH-terminale intracellulaire. Ils sont largement exprimés dans les cellules vasculaires et bronchiques.

Le PAR-2 a été cloné en 1994 chez la souris (172), puis en 1995 chez l'homme (173). Son gène appelé F2RL1 (coagulation factor II (thrombin) like 1) est présent sur le chromosome 5. Son ARNm de 1,2 Kb code pour une protéine de 397 acides aminés. Le PAR-2 est exprimé à la surface de nombreuses cellules, notamment les CML des voies aériennes (170,174,175).

Le PAR-2 des voies aériennes est activé par des sérines protéases, comme la tryptase mastocytaire (176,177), l'élastase neutrophile (178) ou la trypsine (179) par un mécanisme singulier de clivage protéolytique. Dans d'autres types cellulaires, le PAR-2 peut également être activé par les kallikréines, sérines protéases scindant les kallinogènes en kinines (180), ou encore le "Tissu Factor" TF-VIIa, activateur physiologique de la cascade de coagulation (181). Par ailleurs, l'activation du PAR-2 par des protéases exogènes a été démontrée. En effet, de nombreux allergènes comme les acariens de la poussière de maison : *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), présentent une activité protéasique impliquée dans l'activation des cellules musculaires lisses bronchiques mais aussi des cellules épithéliales, des lymphocytes T ou encore des éosinophiles (182-186).

Contrairement aux récepteurs classiques, pour lesquels le ligand n'appartient pas au récepteur, le PAR-2 possède son propre ligand spécifique. Après fixation de l'enzyme sur le PAR-2, le clivage de la partie NH₂-terminale au niveau d'un site spécifique permet la liaison du nouveau segment NH₂-terminal, le ligand lié, sur la deuxième boucle extracellulaire

(187,188) (Figure 10). Cette interaction va induire un changement de conformation du récepteur et permettre son activation et le recrutement des protéines G (189).

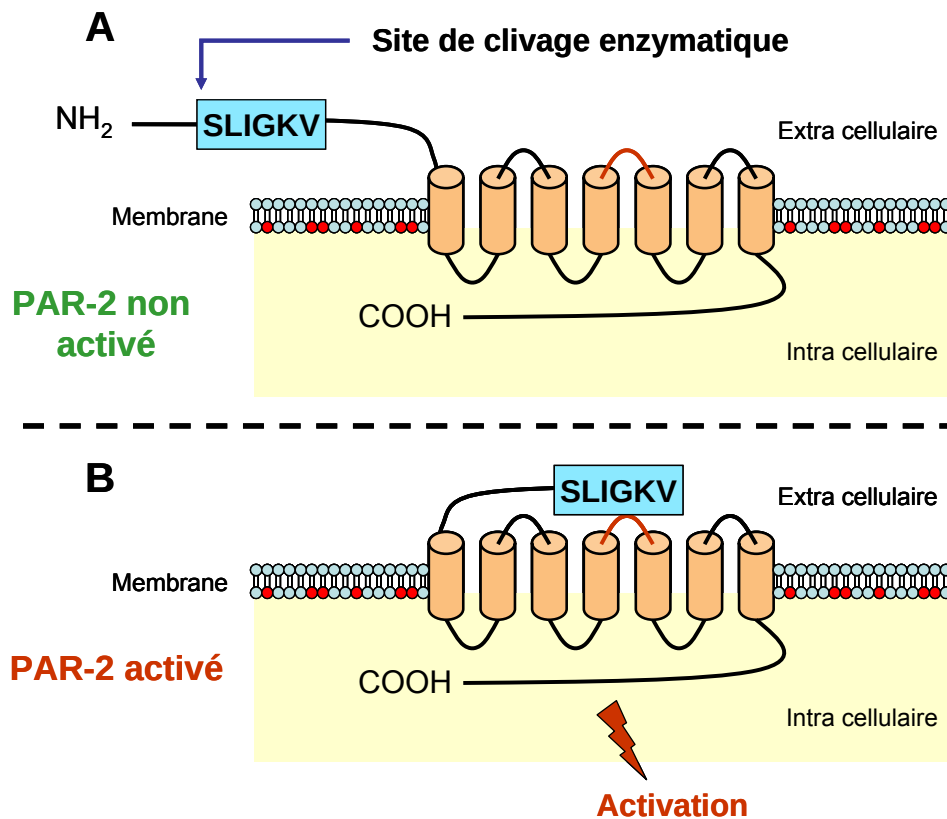


Figure 10 : Mécanismes d'activation protéolytique du récepteur PAR-2.

A : PAR-2 non activé. B : Le PAR-2 est activé par clivage protéolytique. La nouvelle séquence N-terminale SLIGKV se fixe sur la deuxième boucle extracellulaire.

Cette activation va entraîner la translocation à la membrane de protéines G kinases (GRK, G protein-coupled receptor kinase) qui vont phosphoryler le récepteur, favoriser sa liaison à la β -arrestine et ainsi sa désensibilisation (Figure 11). Une réponse prolongée implique alors la translocation des récepteurs jusqu'à la surface cellulaire. En effet, la resensibilisation du PAR-2 implique la mobilisation d'un pool de récepteurs préformés au niveau de l'appareil de Golgi, ainsi qu'une synthèse *de novo* de récepteurs, activée par des médiateurs inflammatoires (190). Suite au clivage de tous les récepteurs

membranaires, on retrouve un taux quasi identique de leur nombre après un peu plus de 3 heures témoignant d'un turn-over rapide du récepteur, comme cela a été démontré sur des artères porcines (191).

Par ailleurs, l'activation du PAR-2 s'accompagne très rapidement d'une internalisation du récepteur dans des endosomes précoces et d'un adressage de la majorité des vésicules vers les complexes de dégradation protéique. On note également un possible recyclage des récepteurs clivés, et donc non fonctionnels, à la membrane plasmique. L'activation du PAR-2 est donc irréversible, le récepteur étant dégradé par ubiquitination dans les lysosomes (192) (Figure 11).

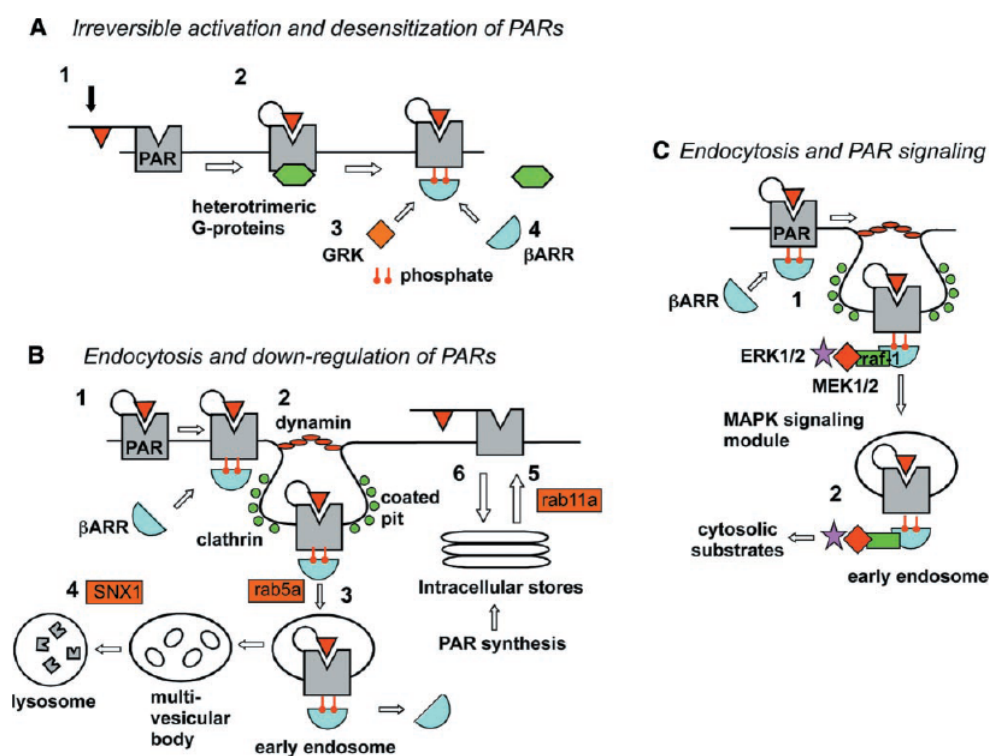


Figure 11 : Désensibilisation, resensibilisation et trafic vésiculaire du PAR-2.

(Reproduit de ossovskaya et al., 2004 (189)).

Au niveau fonctionnel, la liaison du PAR-2 à la β -arrestine facilite la signalisation ERK

et la médiation des effets cellulaires (193-195). Le PAR-2 peut aussi être activé expérimentalement, sans clivage enzymatique préalable, par l'administration exogène d'un peptide dont la séquence, SLIGKV, correspond à celle du ligand lié chez l'homme (173,196). Au niveau cellulaire, le changement de conformation du récepteur active deux types de protéines G : G α q et/ou G α i. L'activation de G α q va entraîner une augmentation du calcium intracellulaire, via la voie des phospholipides membranaires (197). La protéine G α i, quant à elle, active la Phosphatidyl inositol 3 kinase, la voie ERK des MAPs kinases, et la transcription de gènes spécifiques impliqués dans la synthèse protéique ou la prolifération cellulaire (198). Ces deux voies de transduction du PAR-2 ont été objectivées dans les CML bronchiques humaines (37,50,62,171) (Figure 12). Une autre voie impliquant les protéines G α _{12/13} et activant la voie RhoA a été décrite dans la contraction des CML (199).

En plus des effets du PAR-2 sur l'HRB et la prolifération des CML, il est probable que le PAR-2 représente le lien entre le mastocyte et l'inflammation neurogène. En effet, la tryptase stimule la libération de neuropeptides par certains nerfs sensitifs par un mécanisme dépendant du PAR-2 (200). L'invalidation du gène PAR-2 ou sa surexpression dans un modèle d'asthme murin, a montré le rôle de ce récepteur dans l'inflammation et ses conséquences sur l'hyperréactivité bronchique (201-204). D'autre part, le PAR-2 est également présent au niveau épithélial et son activation entraîne la libération de cytokines comme l'éotaxine et le GM-CSF (184) ou de métalloprotéases comme la MMP-9 (205). Le PAR-2 épithélial entraîne, de plus, la relaxation des CML via la libération de PGE₂ (206,207). Dans ce contexte, le PAR-2 exprime une dualité fonctionnelle avec une relaxation musculaire lisse induite par l'épithélium bronchique et une contraction induite par le PAR-2 du muscle lisse lui-même.

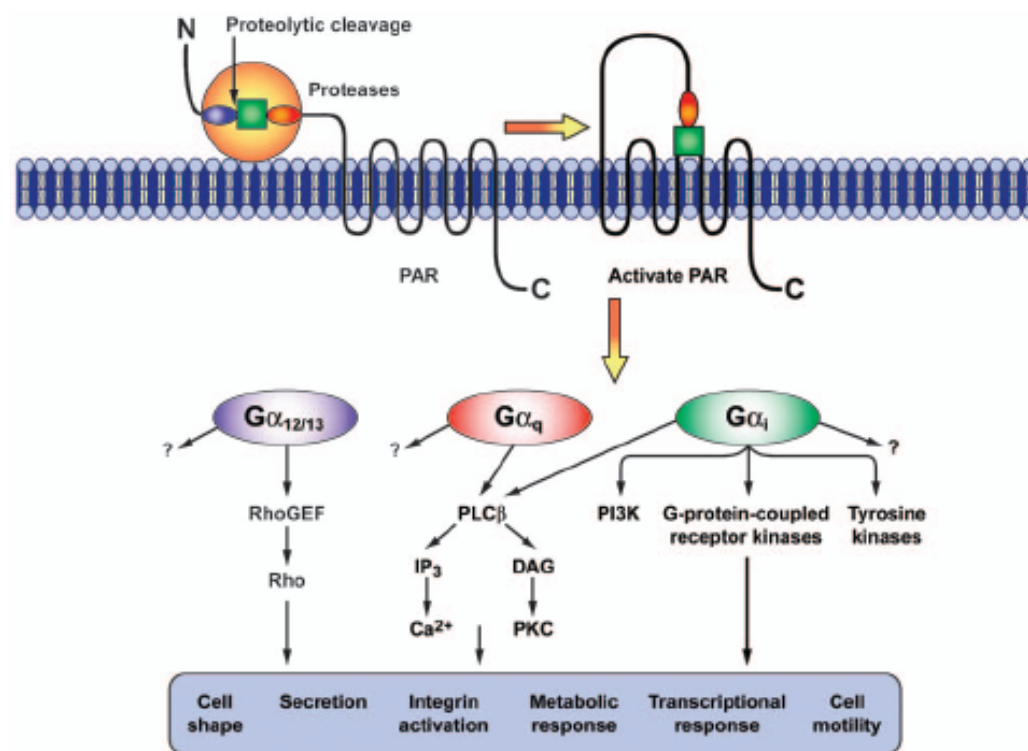


Figure 12 : Voies de signalisation cellulaire du PAR-2.

RhoGEF : Rho guanine nucleotide exchange factor, PLC : Phospholipase C, Pi3K : Phosphoinositol 3 kinase, IP₃ : Inositol triphosphate, DAG : Diacylglycérol, PKC : Protein kinase C. (Reproduit de Reed et Kita, 2004 (171)).

2.3) Rôle de la CML bronchique dans le remodelage lié à l'asthme

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue publiée dans l'« European Respiratory Journal ». Depuis la rédaction de cette revue, deux articles viennent très récemment confirmer la présence d'un excès de prolifération *ex vivo* en fonction de la sévérité de l'asthme (208,209).

Article n°1:

**Pathophysiology of bronchial smooth muscle
remodelling in asthma**

(European Respiratory Journal, 2010 ; 36 : 1174-1184)

Imane Bara, Annaig Ozier, José-Manuel Tunon de Lara, Roger Marthan
and Patrick berger



REVIEW

Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma

I. Bara^{*,#}, A. Ozier^{*,#,¶}, J-M. Tunon de Lara^{*,#,¶}, R. Marthan^{*,#,¶} and P. Berger^{*,#,¶}

ABSTRACT: Whereas the role of bronchial smooth muscle remains controversial in healthy subjects its role is well established in asthmatics. Bronchial smooth muscle contraction induces airway narrowing. The smooth muscle also contributes to bronchial inflammation by secreting a range of inflammatory mediators, recruiting and activating inflammatory cells, such as mast cells or T-lymphocytes. In addition, bronchial smooth muscle mass is significantly increased in asthma. Such an increase has been related to a deposition of extracellular matrix proteins, and an increase in both cell size and number. However, the mechanisms of this smooth muscle remodelling are complex and not completely understood. The article will review recent data regarding the pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma.

KEYWORDS: Asthma, bronchi, proliferation, remodelling, smooth muscle

Asthma is a chronic inflammatory disease, characterised by the association of bronchial hyperresponsiveness, inflammation and remodelling [1–3]. Current medications are effective in treating acute airway narrowing and decreasing inflammation but are relatively less effective in preventing chronic structural changes [4]. Bronchial remodelling is described as an increased thickening of the bronchial wall due to various structural alterations including: abnormal epithelium; sub-epithelial membrane thickening; alteration in extracellular matrix (ECM) deposition; neoangiogenesis; mucus gland hypertrophy; and an increased bronchial smooth muscle (BSM) mass (fig. 1). The latter appears to be the most important feature of bronchial remodelling since increased BSM mass is associated with a decrease in lung function in severe asthma [5, 6]. However, major anti-asthmatic treatments, such as corticosteroids, remain totally ineffective in decreasing BSM mass [4]. As a result, innovative treatments such as bronchial thermoplasty [7, 8] aim to target BSM.

The physiological role of BSM remains controversial. BSM is known to contribute to the normal branching of the respiratory tree during lung embryogenesis [9, 10]. In healthy subjects, BSM may play a role in co-ordinating the distribution of ventilation within the airways [11, 12], in mucus propulsion [13] or in helping exhalation [14]. However, these potential roles have not been experimentally validated. MITZNER [15]

suggested that BSM is vestigial and has no physiological function, stating that BSM is “the appendix of the lung”. Paradoxically, the pathophysiological role of BSM in asthma is well established. BSM is the main effector of bronchial contraction in response to various stimuli, including inflammatory mediators. Moreover, BSM has also been considered as an inflammatory cell *per se* [16]. It can contribute to an auto-activation loop involving mast cells and implicating the production of cytokines [17]. Upon stimulation, BSM cells produce a wide range of cytokines and chemokines including CXCL10 (IP-10) and CX₃CL1 (Fraktalkine), which participate in this auto-activation loop [18, 19]. As a result, mast cells are attracted by BSM and preferentially infiltrate the BSM layer of both fatal and nonfatal asthmatics [20, 21]. As part of this auto-activation loop, mast cells can adhere to BSM cells [2, 22, 23], promoting both survival and proliferation of mast cells [24]. Mast cell activation and degranulation can be allergen dependent or independent [25–28], and can be responsible for an important extracellular deposition of inflammatory products that may facilitate the increase in BSM mass, as well as bronchial hyperresponsiveness [16, 29, 30]. T-lymphocytes may also participate in BSM remodelling. LAZAAR *et al.* [31] demonstrated that the adhesion of T-lymphocytes to BSM cells induced BSM cell DNA synthesis. More recently, this increased BSM proliferation was related to a direct contact between activated

AFFILIATIONS

^{*}Université de Bordeaux, UB2, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, [¶]INSERM, U885, and [#]CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

CORRESPONDENCE

P. Berger
Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Hôpital du Haut-Lévêque
CHU de Bordeaux
Avenue de Magellan
F 33604 Pessac
France
E-mail: patrick.berger@chu-bordeaux.fr

Received:

Feb 04 2010

Accepted after revision:

March 13 2010

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

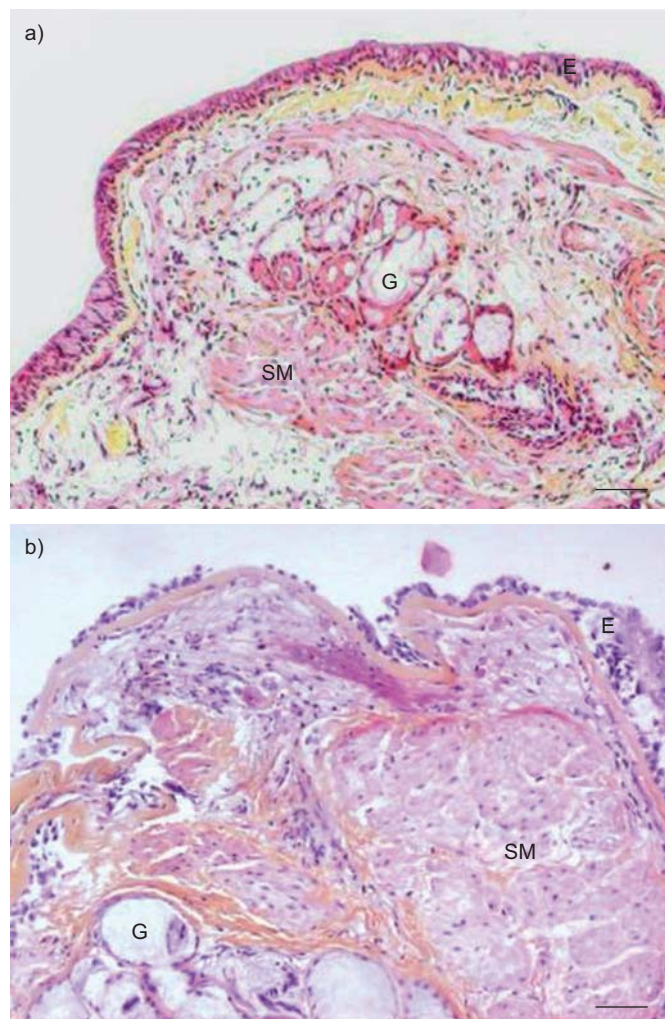


FIGURE 1. Representative optic microscopic images from bronchial sections stained with Haematoxylin, Eosin and safranin stain were obtained from a) a control subject or b) an asthmatic subject. E: epithelium; G: mucous gland; SM: smooth muscles. Scale bars=50 µm.

CD4⁺ T-cells and BSM cells using cells from a rat experimental model of asthma [32].

Bronchial chronic asthmatic inflammation causes tissue injuries leading to repetitive repair processes. Remodelling was initially thought to be the consequence of an incomplete repair process in asthma [33]. However, the early onset of this process [34, 35] sometimes before eosinophilic inflammation [36] suggests that bronchial inflammation and remodelling may occur simultaneously in asthma. BSM remodelling is characterised by an increased deposition of ECM proteins in and around the BSM bundles, an increased BSM cell size or hypertrophy, and an increased BSM cell number or hyperplasia (fig. 2). The aim of our article is to review recent data regarding these specific aspects of the pathophysiology of BSM remodelling in asthma.

ALTERED ECM WITHIN THE SMOOTH MUSCLE LAYER

There is a growing body of evidence indicating that the BSM ECM is altered in asthma [29, 37–39]. Indeed, ECM is increased

around each individual BSM cell within the muscle bundles [37], by large bland amount of protein deposits [29]. Such an increased ECM contains a higher amount of collagen [38] and both fibronectin and elastic fibres, although the latter has only been found within the BSM from fatal asthma [39]. Several of these characteristics have been described in both large and small airways [39]. Cultured human nonasthmatic BSM cells produce a wide range of matrix proteins, including fibronectin, perlecan, elastin, laminin, thrombospondin, chondroitin sulfate, collagen I, III, IV and V, versican and decorin [40]. Interestingly, asthmatic BSM cells produce an altered profile of ECM proteins *in vitro*, characterised by more collagen I and perlecan, but less laminin- α 1, collagen IV [41] and hyaluronan [42]. Such an altered ECM production by BSM cells could contribute to the altered ECM composition of the whole asthmatic bronchial wall. Indeed, asthmatic bronchial ECM is characterised by an increased amount of collagen I, collagen III and fibronectin [43–45] and a decreased amount of collagen IV [46]. However, bronchial ECM also presents higher amount of hyaluronan, versican, and laminin [43, 47], which may be produced by cells different from BSM, such as epithelial cells and/or an imbalance between matrix production and degradation.

The increased ECM deposition may also be due to decreased matrix metalloproteinases (MMP) or increased tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP). However, in biopsies from fatal asthmatics, both MMP-9 and MMP-12 were increased within the BSM, whereas no change was observed in the expression of MMP-1, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 [39]. However, these findings seem to be restricted to fatal asthma cases since no significant difference has been demonstrated in the BSM from nonfatal asthmatics [39]. MMP-9 degrades collagen IV, a major component of the airway sub-epithelial basement membrane [48], and MMP-12 is implicated in elastin, collagen IV, fibronectin and laminin digestion [49, 50]. *In vitro*, BSM cells from nonasthmatics have been shown to express only a small amount of MMP-9 but also MMP-2, MMP-3, membrane type-1-MMP [51]. Nevertheless, the overall BSM MMP activity remains low due to an excess expression of TIMP-1 and TIMP-2 [51]. Whether MMP-9 production and activity can be upregulated under inflammatory conditions remains unknown. In contrast, MMP-12, which is also expressed by BSM cells, is upregulated by interleukin (IL)-1 β or tumour necrosis factor (TNF)- α [52], although such upregulation was not observed in a single report on asthmatic BSM cells *in vitro* [52]. Nevertheless, an increased expression of both MMP-9 and MMP-3 has been found in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asthmatics [53] and could be related to other cell types. For example, eosinophils and neutrophils are also known to be a major source of MMP-9 [48, 54]. In addition, levels of TIMP-1 are higher in untreated asthmatics than in treated subjects [55] although the role of BSM cells in down regulating MMPs by upregulation of TIMPs in asthma remains to be established.

The increased and abnormal asthmatic ECM could interact with growth factors. In particular, transforming growth factor (TGF)- β is stored within the ECM as an inactive form combined with the latency-associated peptide [17]. Amongst various enzymes capable of activating TGF- β , MMP-9 releases the active form of TGF- β [56]. TGF- β is increased within asthmatic airways [57, 58] and more specifically in the BSM

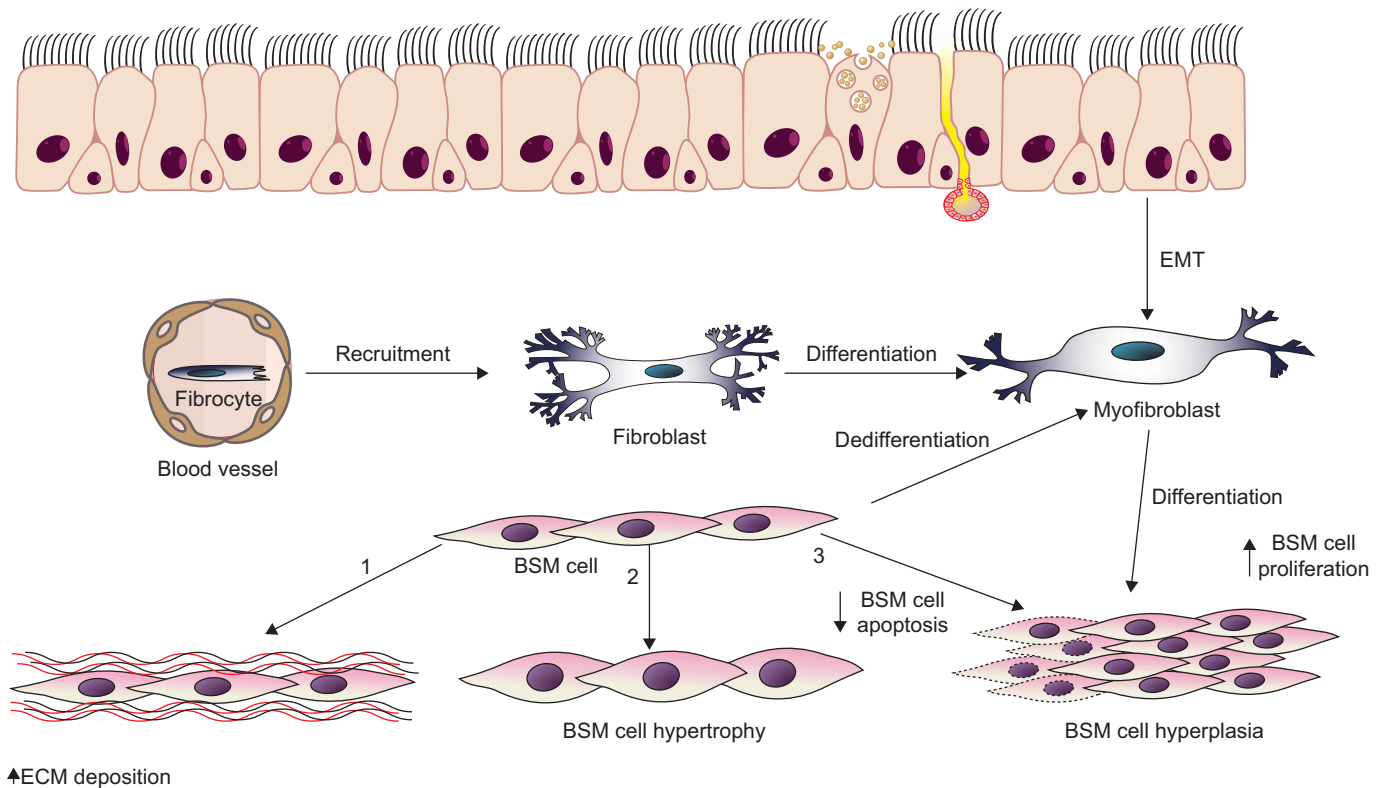


FIGURE 2. Mechanisms of asthmatic bronchial smooth muscle (BSM) remodelling. The three main characteristics of BSM remodelling in asthma are presented. BSM cell hyperplasia can be related to an increased cell proliferation, a decreased cell apoptosis or the recruitment of mesenchymal cells. EMT: epithelial mesenchymal transition; ECM: extracellular matrix.

layer [17]. TGF- β induces fibronectin and collagen I deposition from BSM cells through connective tissue growth factor (CTGF)-dependent and -independent pathways [59]. Interestingly, CTEF is increased in asthmatic BSM cells [60]. In addition, TGF- β , which is secreted by BSM cells after mast cell degranulation, induces mast cell chemotaxis and thus participates in an auto-activation loop [17].

Finally, ECM proteins may also modulate BSM phenotype, as well as its functions including contraction, migration and proliferation [61]. On the one hand, fibronectin reduces both the contractility and expression of α -actin, calponin and myosin heavy chain in bovine BSM strips [62]. On the other hand, laminin increases the contractility of bovine BSM strips [62], and induces the maturation of human BSM cells into a contractile phenotype [63]. Conversely, fibronectin enhances BSM cell proliferation in response to platelet-derived growth factor (PDGF) or thrombin, whereas laminin decreases BSM cell proliferation [64]. Thus, asthmatic BSM cells that produce an altered ECM influence their own environment, and may, as a consequence, contribute to modulate their own function.

BSM HYPERTROPHY

Whether BSM hypertrophy is present in asthma remains controversial [29, 65–67]. For some authors, there is evidence that BSM hypertrophy contributes to airway remodelling in asthma. EBINA *et al.* [67] have examined the airways of fatal asthma, and described two asthmatic subtypes. In particular, the second subtype includes an increased BSM cell size throughout

the bronchial tree. More recently, BENAYOUN *et al.* [65] studied bronchial biopsies and found that patients with asthma had larger BSM cell diameter compared to control subjects. Furthermore, severe asthmatics presented the highest BSM cell size [65]. Interestingly, it has also been shown that asthmatic BSM hypertrophy was associated with an increased expression of myosin light chain kinase (MLCK), whereas that of both α -smooth muscle actin (SMA) and myosin was unchanged [65]. In addition, using an ultrastructural approach, BEGUERET *et al.* [29] also showed an increased BSM cell size in atopic asthmatics. Conversely, using a three-dimensional approach WOODRUFF *et al.* [66] did not find any evidence of an increase in the BSM cell size in patients with mild-to-moderate asthma. Thus, BSM cell hypertrophy may be related to asthma severity.

The cellular mechanisms of such BSM cell hypertrophy have been addressed using nonasthmatic BSM cells only. *In vitro*, primary cultured BSM cells obtained from nonasthmatic donors and even from animals or immortalised human BSM cell lines have been examined [68–70]. On the one hand, BSM cell hypertrophy has been reproduced *in vitro* using serum deprivation [69] or cell stimulation with TGF- β , endothelin or cardiotrophin-1 [70–72]. On the other hand, a BSM cell line has been obtained using a temperature-sensitive simian virus-40 large T-antigen, which binds to and inactivates p53 [68]. In such a cell line there is an increase in both cell size and amount of α -SMA and MLCK in a post-transcriptional manner [68]. BSM hypertrophy involved complex transduction pathways (fig. 3), recently reviewed by BENTLEY and HERSHENSON [73]. As

a summary, two distinct pathways could activate BSM cell hypertrophy. The first pathway involves the mammalian target of rapamycin (*i.e.* mTOR). mTOR induces the phosphorylation of 4E-binding protein (4E-BP), which releases the transcription factor eIF4E leading to BSM cell hypertrophy [74]. In addition, mTOR also phosphorylates p70S6-kinase, which activates S6 kinase [75]. Such a pathway is necessary and sufficient for BSM cell hypertrophy. In addition, when TGF- β is used to induce BSM cell hypertrophy *in vitro* the phosphorylation of 4E-BP appears to be more phosphatidylinositol 3-kinase (PI3)-kinase-dependent than mTOR-dependent, whereas that of p70S6-kinase only requires mTOR activation [70]. The possible upstream inhibition of mTOR by tuberous sclerosis complex-2 has not been demonstrated in BSM cells but has been confirmed in other cell types, including HEK293 [76]. The second pathway involves the inhibition of glycogen synthase kinase (GSK)-3 β , for instance by Akt. GSK-3 β usually inhibits the translation initiation by eIF2B in many cell types [77, 78]. Inhibition of GSK3- β induces BSM cell hypertrophy through an eIF2B-dependent manner [79]. Furthermore, in a recent *in vivo* study using ovalbumin-sensitised mice, BENTLEY *et al.* [80] have demonstrated that GSK3- β is phosphorylated and thus inactivated within the hypertrophic BSM cells. Whether these transduction pathways are actually implicated in human asthmatic BSM cell hypertrophy remains to be established and further studies are needed to explore the involvement of such pathways in asthmatic BSM cells.

BSM HYPERPLASIA

In contrast to hypertrophy, hyperplasia, *i.e.* an increased number of BSM cells within the asthmatic airways, is now

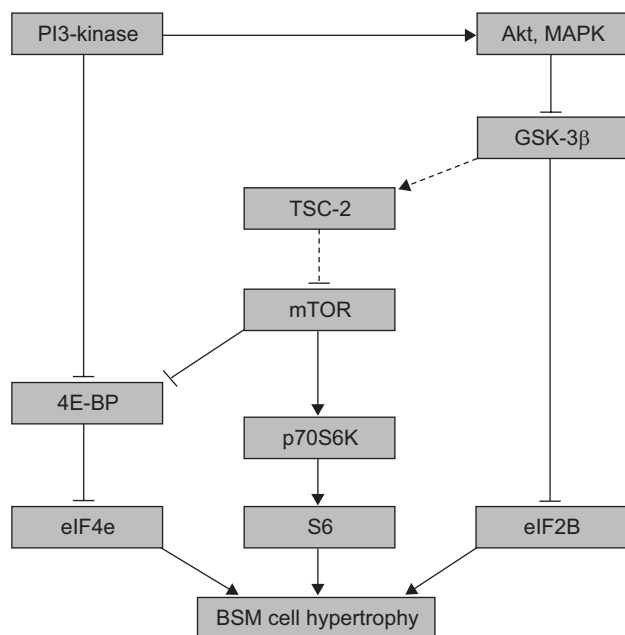


FIGURE 3. Mechanisms of bronchial smooth muscle (BSM) cell hypertrophy. Signal transduction mechanisms of BSM cell hypertrophy involve both mammalian target of rapamycin (mTOR) and glycogen synthase kinase (GSK)-3 β . Upstream and down-stream transduction cascades are presented. $\rightarrow$: activation; $\rightarrow|$: inhibition; $\cdots$: indicates that the transduction pathway has not yet been demonstrated in BSM cells.

well established [66, 67, 81, 82]. Thus, BSM hyperplasia is an important feature leading to the increased BSM mass. Nevertheless, the mechanism responsible for this increased BSM cell number is still under debate. An increased proliferation and/or a decreased apoptosis of BSM cells have been initially suggested. More recently, migration of mesenchymal cells to the BSM bundles followed by differentiation toward BSM cells has also been suggested (fig. 2).

BSM cell proliferation

BSM cell hyperplasia has been associated with an increased proliferation rate *in vitro* [83]. Indeed, a wide range of mitogens increases the proliferation of nonasthmatic BSM cells (table 1). These factors can be separated into several categories including growth factors/cytokines activating receptor tyrosine kinase (RTK), inflammatory mediators activating G protein coupled receptors (GPCR) and enzymes. In addition, reactive oxygen species (ROS) [98] and mechanical stress [99] have also been implicated (table 1). The main intracellular pathways of BSM cell proliferation have been summarised in the recent review of TLIBA *et al.* [100]. Briefly, the majority of *in vitro* studies support an important role of both PI3K and extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation for both RTK and GPCR. Indeed, activation of RTK or GPCR induces p21ras activation, which subsequently activates PI3K and/or ERK. On the one hand, PI3K activates both PDK-1/p70S6K and Rac1/reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) which increase the expression of cyclin D1 [100, 101]. It should be noticed that the GTPase protein Rac1 constitutes part of the NADPH oxidase complex that generates superoxide ion and hydrogen peroxide [102]. In this connection, serum treatment of human BSM cells increases intracellular endogenous ROS [103]. On the other hand, ERK phosphorylates and directly increases the expression of cyclin D1 [104] in the absence of endogenous ROS implication [105]. Regarding transduction pathways involved by exogenous ROS, ERK is activated upon PKC and Raf1 stimulation [106, 107]. Furthermore, KRYMSKAYA *et al.* [108] have demonstrated that GPCR activation by inflammatory or contractile agonists along with RTK activation enhances human BSM growth. WALKER *et al.* [109] have shown that even if the PI3K pathway is sufficient to stimulate proliferation, ERK parallel signalling is required to induce a full mitogenic response. Among the various enzymes able to induce BSM cell proliferation (table 1) great attention has been paid to tryptase. Indeed, upon degranulation, mast cell-released tryptase stimulates BSM cell proliferation and DNA synthesis [95, 110]. However, the mechanisms of such an effect remain controversial. BROWN *et al.* [110] did not find any effect of tryptase inactivation, suggesting a nonenzymatic effect, whereas heat inactivation or the enzyme inhibitor leupeptin abolished tryptase-induced BSM cell proliferation [95]. Thus, our data suggest an enzymatic effect of tryptase, but the involvement of protease-activated receptor (PAR)-2, a potential target of tryptase, has only been demonstrated in tryptase-induced calcium increase [111, 112]. Therefore, the role of PAR-2 in tryptase-induced BSM cell proliferation requires further investigation. Regarding the effect of mechanical stress, cyclic stretch alters BSM cell proliferation [99]. Indeed, in canine BSM cells subjected to a stretch-relaxation regimen, [3 H]-thymidine incorporation is increased [99]. More recently, mechanical strain has been shown to induce human BSM cell

TABLE 1 Mitogenic factors of human BSM cells

Factors	Cellular sources	[Ref.]
Growth factors/cytokines		
PDGF	Platelets, monocyte-macrophage, BSMC, epithelium	[84]
FGF	Extracellular matrix, monocyte-macrophage, BSMC	[85]
EGF	Epithelium, platelets	[86]
TNF- α	BSMC, epithelium, T-lymphocytes, monocyte-macrophage	[87]
TGF- β (controversial)	BSMC, T-lymphocytes, epithelium	[88, 89]
Inflammatory mediators		
Histamine	Mast cells, basophils	[90]
Endothelin-1	Epithelium, monocyte-macrophage	[91]
Thromboxane A ₂	Mast cells, monocyte-macrophage	[92]
Cysteinyl leukotriene	Monocyte-macrophage, eosinophils, mast cells, fibrocytes	[93]
Sphingosine 1-phosphate	Plasma, platelets	[94]
Enzymes		
Tryptase	Mast cells	[95]
Thrombin	Plasma	[96]
Elastase	Neutrophils	[97]
Reactive oxygen species	Monocyte-macrophage, neutrophil, eosinophils, mast cells	[98]
Mechanical stress		[99]

PDGF: platelet-derived growth factor; FGF: fibroblast growth factor; EGF: epidermal growth factor; TNF: tumour necrosis factor; TGF: transforming growth factor; BSMC: bronchial smooth muscle cells.

proliferation in a MMP-dependent manner [113]. Mechanical stress was accompanied by an increased expression and activation of several MMPs including MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MT1-MMP, suggesting that such a proliferation of human BSM cells requires the release and activation of MMPs [113]. Indeed, mechanical stress is influenced by the abundance of ECM. HIRST *et al.* [64] have shown that fibronectin and collagen I enhance BSM cell proliferation in response to PDGF or thrombin, whereas laminin causes a reduction in BSM cell proliferation. All these promoting factors are increased within the asthmatic airways and can target BSM cells. Indeed, BAL fluid obtained from asthmatic subjects induces the proliferation of human BSM cells [114].

In addition to this excess in mitogenic mediators, there is a growing body of evidence to show that asthmatic BSM cells have intrinsic properties leading to excessive proliferation. JOHNSON *et al.* [115] firstly reported an increased proliferation rate of cultured asthmatic BSM cells compared to that of nonasthmatics. Such findings have been confirmed in various cohorts of patients [4, 116–118] including in severe asthmatics [81]. Whereas, the proliferation of nonasthmatic BSM cells is decreased by steroids [119], that of asthmatic BSM cells is insensitive to steroids [4]. Indeed, glucocorticoids down-regulate the proliferation of nonasthmatic BSM cells by decreasing the expression of cyclin D1 and the phosphorylation of retinoblastoma protein, but have no effect on ERK signalling [120]. No significant difference in glucocorticoid receptor expression was found in BSM between mild asthmatic and nonasthmatic patients [121]. Several studies have pointed out the role of the transcription factor CCAAT-enhancer binding proteins (c/EBP). The c/EBPs form a family of transcription factors involved in the regulation of cellular

differentiation, cell-cycle regulation and cytokine gene expression [122]. Lack of c/EBP α has been specifically demonstrated within the asthmatic BSM cells and may explain the absence of an anti-proliferative action of glucocorticoids [4]. Indeed, the glucocorticoid receptor usually forms a complex with c/EBP α in nonasthmatic BSM cells, which then binds to the CCAAT DNA consensus sequence in the p21 promoter [123]. This complex is absent in asthmatic BSM cells after glucocorticoid treatment [4]. In addition, this transcription factor may be important in other processes, including contractility of BSM cells, since c/EBP α is a possible negative regulator of MLCK expression [124].

Although the existence of dual signalling pathways regulating proliferation of nonasthmatic BSM cells is well established, a recent study has demonstrated that PI3K is the predominant pathway leading to proliferation of BSM cells from asthmatic patients [116]. Furthermore, we have demonstrated that the mechanism leading to the increased proliferation rate observed in asthmatic BSM cells was mitochondrial dependent, since mitochondria-deficient BSM cells from severe asthmatics are unable to proliferate [81]. Indeed, asthmatic BSM express a higher number of active mitochondria and a clear aspect of intense mitochondrial biogenesis, both *in vivo* and *in vitro*. This enhanced mitochondrial biogenesis is induced by the upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator (PGC)-1 α , nuclear respiratory factor-1 and mitochondrial transcription factor A [81]. This feature appears to be responsible for asthmatic BSM cell proliferation, since depleting mitochondria from BSM cells abolishes the proliferation. Interestingly, the upstream mechanism is related to altered calcium homeostasis in severe asthmatic BSM cells leading to increased phosphorylation of CaMK-IV, which induces the

transcription of PGC-1 α [81]. Such an altered calcium homeostasis has also been observed very recently in nonsevere asthmatics [118], although the mechanism appeared to be different according to asthma severity. In severe asthmatic BSM cells, the proliferation has been related to an abnormal calcium influx [81], whereas in nonsevere asthmatic BSM cells, a diminished expression of SERCA2 has been demonstrated [118]. In addition, knocking down SERCA2 in healthy BSM cells reproduced this enhanced proliferation rate [118]. Thus, transduction pathways leading to the proliferation of asthmatic BSM cells seems to depend on the severity of the disease. However, further studies need to address whether or not the increased mitochondrial biogenesis and altered Ca²⁺ homeostasis can be related to exogenous factors such as those secreted by inflammatory cells.

Finally, to date no feature of BSM cell mitoses has been observed in human asthmatic tissues, using either Ki67 or proliferating cell nuclear antigen (PCNA), two markers of nuclear antigen expressed by proliferating cells [29, 65]. Nevertheless, the lack of Ki67 or PCNA staining within the asthmatic BSM does not formally exclude the absence of cell proliferation. Indeed, increased proliferation may have occurred before biopsy, as already suggested [125]. In addition, these markers may be poorly sensitive for BSM cell proliferation. In contrast, BSM hyperplasia may be related to a decreased apoptosis or the migration of BSM cells and/or mesenchymal cells.

BSM cell apoptosis

To date, little is known about the cellular mechanisms of apoptosis in asthmatic BSM cells. Besides, most of the current knowledge has only been established using nonasthmatic BSM cells. As for hypertrophy, either primary cultured BSM cells obtained from patients undergoing lung resection surgery [71, 126–128] or BSM cell line have been investigated [72]. In these healthy BSM cells, Fas receptor is expressed both *in vivo* and *in vitro* and its cross linking induces cell apoptosis [126], suggesting that it may participate in normal BSM cell turn over. Moreover, neutrophil elastase [127] and the ECM protein decorin [128] also induce BSM cell apoptosis *in vitro*. Interestingly, a decreased expression of decorin was demonstrated within the bronchial wall of fatal asthmatics [129]. Additionally, both cardiothrophin-1 [72] and endothelin-1 [71] inhibit BSM cell apoptosis. However, the role of these mediators in asthmatic BSM cell apoptosis requires further investigations.

Few studies have evaluated the susceptibility of BSM cells to apoptosis in asthma and their findings remain controversial. RAMOS-BARBON *et al.* [32] have demonstrated decreased BSM cell apoptosis *in vivo* in a rat model of experimental asthma. Conversely, spontaneous apoptosis was unchanged within asthmatic BSM cells *in vitro* [81, 130]. In addition, the *in vivo* expression of the TRAIL receptor, a member of the TNF- α receptor family was increased following allergen challenge in asthmatic BSM, suggesting that apoptosis may occur in asthmatic BSM [131]. Therefore, further studies are required to establish whether or not BSM cell apoptosis is actually altered in asthma.

Migration of BSM cells

Migration of BSM cells is a fundamental process in the development of the airways [132]. Thus, it has been suggested

that such a migration may participate in BSM remodelling in asthma [133]. Cellular migration is characterised by cytoskeletal reorganisation starting by actin polymerisation, as was recently reviewed by GERTHOFFER [132]. Briefly, actin filaments push the cell's leading front using focal contacts, enhancing attachment of the cell membrane to the ECM. These focal contacts include integrins, adaptor proteins such as vinculin, regulatory proteins such as Src and proteins controlling myosin activation such as MLCK. Indeed, myosin motors attached to actin filaments generate the force for advancing cells [132].

A wide range of mediators induce BSM cell migration *in vitro* [134, 135]. These mediators include growth factors such as PDGF, fibroblast growth factor, TGF- β , plasma-derived mediators such as plasminogen activators, urokinase, cytokines such as IL1- β [134, 135] and components from ECM including collagen and fibronectin [136]. In addition, chemokines also induce BSM cell migration. For example, CCR3 ligands such as eotaxin (*i.e.* CCL11) [137], CXCR1 and CXCR2 ligands such as IL-8 (*i.e.* CXCL8) [138] and CCR7 ligands such as macrophage inflammatory protein-3 β (*i.e.* CCL19) [139] all induce the migration of nonasthmatic BSM cells *in vitro*. The epithelium is a significant source of these pro-inflammatory molecules and it has been very recently shown that epithelium-derived chemokines (IL-8 and RANTES) induce human BSM cell migration [140]. In addition, BSM cell production of MMP and its modulation by pro-fibrotic growth factors PDGF and TGF- β may contribute to the migratory function of BSM cells [141]. Several studies have shown that the signalling pathways involved in BSM migration include p38, MAPK, Rho-kinase and PI3K [132, 134]. However, whether or not asthmatic BSM cells migrate more or less than nonasthmatic BSM cells remains unknown.

Migration of myofibroblasts

A feature of asthmatic bronchial remodelling is the appearance of myofibroblasts within the lamina reticularis, in particular after allergen challenge [142]. Myofibroblasts have been detected between BSM bundles from asthmatics, close to mast cells [29]. Myofibroblasts are thought to originate from resident fibroblasts [143], circulating fibrocytes [144] or from epithelial cells that have undergone transition into mesenchymal cells [145]. Another possibility is that myofibroblasts derive from migrated BSM cells, as previously demonstrated in vascular smooth muscle [146]. Moreover, TGF- β -stimulated myofibroblasts from asthmatic subjects produce many smooth muscle-related transcripts, suggesting that myofibroblasts may also differentiate into BSM cells [147]. Myofibroblasts could, therefore, be viewed as precursors of BSM cells or the result of a dedifferentiation process of the BSM cells. Furthermore, it may be suggested that BSM cells degrade surrounding ECM and migrate from their original bundles towards the epithelium to eventually form new bundles [113].

In this field of BSM hyperplasia, the role of circulating fibrocytes has recently been examined [148]. These cells derive from the bone marrow and can be quantified in the blood using flow cytometry [144, 149]. Indeed, fibrocytes co-express CD34, vimentin, CD45 and collagen Ia [149]. More recently, WANG *et al.* [150] demonstrated an increase in blood non-adherent-fibrocytes from asthmatic patients with chronic

airway obstruction compared to those with normal lung function. This increase was significantly correlated with an annual decline in forced expiratory volume in 1 s, suggesting an important role of fibrocytes in bronchial remodelling. Attraction of fibrocytes to the lung seems to implicate the coupled chemokine/receptors such as CXCL12/CXCR4, CCL19/CCR7 and CCL21/CCR7. To a lesser extent, fibrocyte migration could also involve CCL-5, CCL-7, CCL-8, CCL-11, CCL-13, CCL-15/CCR3, CCL-3, CCL-4, CCL-5/CCR5 and CCL12/CCR2, although the latter has only been implicated in mice [151]. Furthermore, fibrocytes can differentiate into myofibroblasts, as indicated by the expression of α -SMA [144, 150]. This phenomenon could be induced by TGF- β and is more marked in asthmatics with airway obstruction [150]. As a result, the presence of fibrocytes has been confirmed within the asthmatic airways [144] and more precisely within the BSM bundles [148] or close to the basement membrane [152]. In addition, allergen exposure induces accumulation of fibrocyte-like cells within the bronchial mucosa of allergic asthmatic patients [144]. Moreover, NIHLBERG *et al.* [152] showed that fibroblasts cultured from BAL fluid in patients with mild asthma express fibrocyte proteins, suggesting that fibroblasts derive from circulating fibrocytes. The co-expression of α -SMA in fibrocyte-derived cells suggests that circulating progenitor cells differentiate into myofibroblasts and then into BSM cells [148]. Finally, BSM cells themselves may promote fibrocytes migration, which is, in part, mediated by the production of PDGF [148].

Another recent concept suggests that myofibroblasts derive from epithelial cell transition to a mesenchymal phenotype [153, 154]. However, this epithelial mesenchymal transition (EMT) remains hypothetical in the genesis of BSM cells and has been mainly studied as a mechanism of fibroblast or myofibroblast generation [153, 154]. For instance, TGF- β induces EMT in a smad3-dependent manner using human bronchial epithelial cells [155]. EMT is characterised by an increased expression of mesenchymal markers such as vimentin, collagen 1 and α -SMA, with a concomitant loss of epithelial markers such as E-cadherin [155]. Furthermore, TGF- β -induced EMT is enhanced by IL-1 β in human bronchial epithelial cells [156]. Interestingly, airway epithelial cells from asthmatic donors present a similar response to TGF- β stimulation, whereas no marker of EMT is spontaneously observed in asthmatic bronchial epithelium [155]. In addition, corticosteroids do not prevent TGF- β -induced EMT but decrease it [156]. Furthermore, bronchial epithelium modulates BSM cell proliferation through an IL-6 and MMP-9-dependent mechanism [157]. Silencing of MMP-9 abrogates the epithelium-dependent increase in BSM cell proliferation. Finally, epithelial injury increases the release of MMP-9 and the expression of Ki67 levels in human BSM cells [157], suggesting that epithelium and BSM strongly interact in asthma.

BSM-EPITHELIUM INTERACTIONS

Finally, BSM remodelling must be replaced in the context of other features of asthmatic bronchial remodelling. In particular, bronchial epithelial abnormalities have been extensively studied in asthma [158]. These abnormalities include the loss of the most superficial layer of the epithelium and the destruction of ciliated cells. As a result, the physical and

functional barrier of the bronchial epithelium is defective in asthma. This may explain the susceptibility of asthmatic airways to respiratory viruses or the impact of environmental factors on asthma exacerbations [159]. For instance, within rhinovirus infections, epithelial cells induce the desensitisation of the β 2-adrenergic BSM cell receptor [160]. BSM epithelial cell co-culture models have also been developed to evaluate BSM-epithelium interactions *in vitro* [140, 157]. Bronchial epithelium in injury modulates BSM cell proliferation through an MMP-9 dependent pathway [157]. However, other epithelium-derived growth factors can also increase BSM cell proliferation (table 1). In addition, upon stimulation with TNF- α , bronchial epithelial cells produce higher amount of chemokines, such as IL-8 or RANTES, which subsequently induce BSM migration [140]. However, comprehensive relationships between bronchial epithelium and BSM remain to be investigated, particularly in asthma.

CONCLUSION

In conclusion, a better understanding of the pathophysiology of asthmatic BSM remodelling is critical to identify new therapeutic targets for BSM remodelling. For example, since mitochondrial biogenesis is implicated in BSM remodelling we have proposed a strategy directed against mitochondria to block BSM cell proliferation [81]. Along the same lines, since endothelin and TGF- β have been evoked in the mechanism of BSM cell hypertrophy, it may be interesting to investigate the effect of endothelin- or TGF- β -receptor antagonists in asthma as already assessed in pulmonary vascular diseases in human [161] or murine models of asthma [162]. More recently, simvastatin has been demonstrated to induce BSM cell apoptosis *in vitro* [163] but, results from clinical trials remain controversial in asthmatics [164]. Another strategy could focus on the migration of fibrocytes by means of chemokine receptor blockage. Finally, reducing BSM mass may also be achieved by targeting epithelial cells. These targets should now be evaluated by means of clinical trials that may take advantage of newly developed noninvasive tools to quantify BSM remodelling [165–167].

STATEMENT OF INTEREST

A statement of interest for P. Berger can be found at www.erj.ersjournals.com/site/misc/statements.xhtml

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank M. Chevalier for his support.

REFERENCES

- 1 Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344: 350–362.
- 2 Girodet PO, Ozier A, Triant T, *et al.* Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 2010; 65: 1004–1012.
- 3 Denis D, Fayon MJ, Berger P, *et al.* Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats. *Pediatr Res* 2001; 50: 515–519.
- 4 Roth M, Johnson PR, Berger P, *et al.* Dysfunctional interaction of C/EBP α and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 2004; 351: 560–574.
- 5 Pepe C, Foley S, Shannon J, *et al.* Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 544–549.

- 6 Kaminska M, Foley S, Maghni K, *et al.* Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 45–51.
- 7 Cox G, Thomson NC, Rubin AS, *et al.* Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med* 2007; 356: 1327–1337.
- 8 Castro M, Rubin AS, Laviolette M, *et al.* Effectiveness and safety of bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 181: 116–124.
- 9 Sparrow MP, Weichselbaum M, McCray PB. Development of the innervation and airway smooth muscle in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 550–560.
- 10 Schittny JC, Miserocchi G, Sparrow MP. Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 11–18.
- 11 Keith A. The mechanism of respiration in man. In: Hill L, ed. *Further Advances in Physiology*. New York, Longmans, Green, and Co, 1909; pp. 182–207.
- 12 Otis AB. A perspective of respiratory mechanics. *J Appl Physiol* 1983; 54: 1183–1187.
- 13 Bullock J, Gottlieb C. Additional experimental studies in bronchial function. *Laryngoscope* 1992; 32: 284–289.
- 14 Macklin C. The musculature of the bronchi and lungs. *Physiol Rev* 1929; 9: 1–60.
- 15 Mitzner W. Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 787–790.
- 16 Berger P, Girodet PO, Tunon De Lara JM. Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma? *Allergy* 2005; 60: 1238–1240.
- 17 Berger P, Girodet PO, Begueret H, *et al.* Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *FASEB J* 2003; 17: 2139–2141.
- 18 Brightling CE, Ammit AJ, Kaur D, *et al.* The CXCL10/CXCR3 Axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1103–1108.
- 19 El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, *et al.* Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006; 176: 1860–1868.
- 20 Brightling CE, Bradding P, Symon FA, *et al.* Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1699–1705.
- 21 Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002; 19: 879–885.
- 22 Thangam EB, Venkatesha RT, Zaidi AK, *et al.* Airway smooth muscle cells enhance C3a-induced mast cell degranulation following cell–cell contact. *FASEB J* 2005; 19: 798–800.
- 23 Yang W, Kaur D, Okayama Y, *et al.* Human lung mast cells adhere to human airway smooth muscle, in part, via tumor suppressor in lung cancer-1. *J Immunol* 2006; 176: 1238–1243.
- 24 Hollins F, Kaur D, Yang W, *et al.* Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6. *J Immunol* 2008; 181: 2772–2780.
- 25 Berger P, Walls AF, Marthan R, *et al.* Immunoglobulin E-induced passive sensitization of human airways: an immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 610–616.
- 26 Berger P, N'Guyen C, Buckley M, *et al.* Passive sensitization of human airways induces mast cell degranulation and release of tryptase. *Allergy* 2002; 57: 592–599.
- 27 Berger P, Scotto-Gomez E, Molimard M, *et al.* Omalizumab decreases nonspecific airway hyperresponsiveness *in vitro*. *Allergy* 2007; 62: 154–161.
- 28 Berger P, Lavalley J, Rouiller R, *et al.* Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 1999; 14: 1394–1402.
- 29 Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, *et al.* Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 2007; 62: 8–15.
- 30 Berger P, Compton SJ, Molimard M, *et al.* Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 804–812.
- 31 Lazaar AL, Albelda SM, Pilewski JM, *et al.* T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med* 1994; 180: 807–816.
- 32 Ramos-Barbon D, Presley JF, Hamid QA, *et al.* Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest* 2005; 115: 1580–1589.
- 33 Fixman ED, Stewart A, Martin JG. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J* 2007; 29: 379–389.
- 34 Laitinen LA, Laitinen A, Altraja A, *et al.* Bronchial biopsy findings in intermittent or “early” asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 3–6.
- 35 Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, *et al.* Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16: 43–51.
- 36 Cokugras H, Akcakaya N, Seckin, *et al.* Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 2001; 56: 25–29.
- 37 Bai TR, Cooper J, Koelmeyer T, *et al.* The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 663–669.
- 38 Thomson RJ, Schellenberg RR. Increased amount of airway smooth muscle does not account for excessive bronchoconstriction in asthma. *Can Respir J* 1998; 5: 61–62.
- 39 Araujo BB, Dolnikoff M, Silva LF, *et al.* Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008; 32: 61–69.
- 40 Johnson PR, Black JL, Carlin S, *et al.* The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2145–2151.
- 41 Johnson PR, Burgess JK, Underwood PA, *et al.* Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 690–696.
- 42 Klagas I, Goulet S, Karakioulakis G, *et al.* Decreased hyaluronan in airway smooth muscle cells from patients with asthma and COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 616–628.
- 43 Roberts CR. Is asthma a fibrotic disease? *Chest* 1995; 107: 111–117.
- 44 Roche WR, Beasley R, Williams JH, *et al.* Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1: 520–524.
- 45 Dolnikoff M, da Silva LF, de Araujo BB, *et al.* The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1090–1097.
- 46 Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 363–371.
- 47 Altraja A, Laitinen A, Virtanen I, *et al.* Expression of laminins in the airways in various types of asthmatic patients: a morphometric study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 482–488.
- 48 Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, *et al.* Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 212–219.
- 49 Chandler S, Cossins J, Lury J, *et al.* Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor- α fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 421–429.
- 50 Gronski TJ Jr, Martin RL, Kobayashi DK, *et al.* Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* 1997; 272: 12189–12194.

- 51 Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, *et al.* Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 1318–1324.
- 52 Xie S, Issa R, Sukkar MB, *et al.* Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. *Respir Res* 2005; 6: 148.
- 53 Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, *et al.* Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1298–1307.
- 54 Dahlen B, Shute J, Howarth P. Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax* 1999; 54: 590–596.
- 55 Mautino G, Henriquet C, Jaffuel D, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 324–330.
- 56 Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, *et al.* Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β 1. *J Exp Med* 2001; 194: 809–821.
- 57 Redington AE, Madden J, Frew AJ, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 642–647.
- 58 Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, *et al.* Transforming growth factor- β expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 591–599.
- 59 Johnson PR, Burgess JK, Ge Q, *et al.* Connective tissue growth factor induces extracellular matrix in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 32–41.
- 60 Burgess JK, Johnson PR, Ge Q, *et al.* Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 71–77.
- 61 Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J* 1994; 8: 823–831.
- 62 Dekkers BG, Schaafsma D, Nelemans SA, *et al.* Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: 1405–1413.
- 63 Tran T, McNeill KD, Gerthoffer WT, *et al.* Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation. *Respir Res* 2006; 7: 117.
- 64 Hirst SJ, Twort CH, Lee TH. Differential Effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 335–344.
- 65 Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, *et al.* Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1360–1368.
- 66 Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, *et al.* Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1001–1006.
- 67 Ebina M, Takahashi T, Chiba T, *et al.* Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 720–726.
- 68 Zhou L, Li J, Goldsmith AM, *et al.* Human bronchial smooth muscle cell lines show a hypertrophic phenotype typical of severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 703–711.
- 69 Halayko AJ, Kartha S, Stelmack GL, *et al.* Phosphatidylinositol-3 kinase/mammalian target of rapamycin/p70S6K regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 266–275.
- 70 Goldsmith AM, Bentley JK, Zhou L, *et al.* Transforming growth factor- β induces airway smooth muscle hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 247–254.
- 71 McWhinnie R, Pechkovsky DV, Zhou D, *et al.* Endothelin-1 induces hypertrophy and inhibits apoptosis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: 278–286.
- 72 Zhou D, Zheng X, Wang L, *et al.* Expression and effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1237–1244.
- 73 Bentley JK, Hershenson MB. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 89–96.
- 74 Zhou L, Goldsmith AM, Bentley JK, *et al.* 4E-binding protein phosphorylation and eukaryotic initiation factor-4E release are required for airway smooth muscle hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 195–202.
- 75 Deng H, Hershenson MB, Lei J, *et al.* p70 ribosomal S6 kinase is required for airway smooth muscle cell size enlargement but not increased contractile protein expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42: 744–752.
- 76 Inoki K, Ouyang H, Zhu T, *et al.* TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 2006; 126: 955–968.
- 77 Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, *et al.* Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett* 1998; 421: 125–130.
- 78 Hardt SE, Tomita H, Katus HA, *et al.* Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2B ϵ by glycogen synthase kinase-3 β regulates beta-adrenergic cardiac myocyte hypertrophy. *Circ Res* 2004; 94: 926–935.
- 79 Deng H, Dokshin GA, Lei J, *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 2008; 283: 10198–10207.
- 80 Bentley JK, Deng H, Linn MJ, *et al.* Airway smooth muscle hyperplasia and hypertrophy correlate with glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation in a mouse model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296: 176–184.
- 81 Triant T, Benard G, Begueret H, *et al.* Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007; 204: 3173–3181.
- 82 Hossain S. Quantitative measurement of bronchial muscle in men with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1973; 107: 99–109.
- 83 Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 808–820.
- 84 Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH. PDGF isoform-induced proliferation and receptor expression in human cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996; 270: 415–428.
- 85 Hawker KM, Johnson PRA, Hughes JM, *et al.* Interleukin-4 inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells in culture. *Am J Physiol* 1998; 275: 469–477.
- 86 Panettieri RA Jr, Goldie RG, Rigby PJ, *et al.* Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 191–197.
- 87 Stewart AG, Tomlinson PR, Fernandes DJ, *et al.* Tumor necrosis factor α modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 110–119.
- 88 Cohen MD, Ciocca V, Panettieri RA Jr. TGF- β 1 modulates human airway smooth-muscle cell proliferation induced by mitogens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 85–90.
- 89 Xie S, Sukkar MB, Issa R, *et al.* Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: 245–253.
- 90 Maruno K, Absood A, Said SI. VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995; 268: 1047–1051.
- 91 Tomlinson PR, Wilson JW, Stewart AG. Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 641–647.
- 92 Capra V, Habib A, Accomazzo MR, *et al.* Thromboxane prostanoid receptor in human airway smooth muscle cells: a relevant role in proliferation. *Eur J Pharmacol* 2003; 474: 149–159.

- 93 Ravasi S, Citro S, Viviani B, *et al.* CysLT1 receptor-induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation. *Respir Res* 2006; 7: 42.
- 94 Ammit AJ, Hastie AT, Edsall LC, *et al.* Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *FASEB J* 2001; 15: 1212–1214.
- 95 Berger P, Perng DW, Thabrew H, *et al.* Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1372–1379.
- 96 Panettieri RA Jr, Hall IP, Maki CS, *et al.* alpha-Thrombin increases cytosolic calcium and induces human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 205–216.
- 97 Huang CD, Chen HH, Wang CH, *et al.* Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation. *Life Sci* 2004; 74: 2479–2492.
- 98 Pandya HC, Snetkov VA, Twort CH, *et al.* Oxygen regulates mitogen-stimulated proliferation of fetal human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: 1220–1230.
- 99 Smith PG, Janiga KE, Bruce MC. Strain increases airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 85–90.
- 100 Tliba O, Panettieri RA Jr. Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 509–535.
- 101 Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 606–619.
- 102 Abo A, Boyhan A, West I, *et al.* Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245. *J Biol Chem* 1992; 267: 16767–16770.
- 103 Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, *et al.* NADPH oxidase promotes NF- κ B activation and proliferation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: 782–795.
- 104 Ravenhall C, Guida E, Harris T, *et al.* The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 17–28.
- 105 Page K, Li J, Hodge JA, *et al.* Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 22065–22071.
- 106 Abe MK, Chao TS, Solway J, *et al.* Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 577–585.
- 107 Abe MK, Kartha S, Karpova AY, *et al.* Hydrogen peroxide activates extracellular signal-regulated kinase via protein kinase C, Raf-1, and MEK1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 562–569.
- 108 Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, *et al.* Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 546–554.
- 109 Walker TR, Moore SM, Lawson MF, *et al.* Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 1007–1015.
- 110 Brown JK, Jones CA, Rooney LA, *et al.* Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are *via* nonproteolytic actions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: 197–206.
- 111 Triantafyllidis T, Girodet PO, Ousova O, *et al.* RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 49–55.
- 112 Berger P, Tunon-de-Lara JM, Savineau JP, *et al.* Tryptase-induced PAR-2-mediated Ca^{2+} signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001; 91: 995–1003.
- 113 Hasaneen NA, Zucker S, Cao J, *et al.* Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs. *FASEB J* 2005; 19: 1507–1509.
- 114 Naureckas ET, Ndukwu IM, Halayko AJ, *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects is mitogenic for human airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2062–2066.
- 115 Johnson PR, Roth M, Tamm M, *et al.* Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 474–477.
- 116 Burgess JK, Lee JH, Ge Q, *et al.* Dual ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways control airway smooth muscle proliferation: differences in asthma. *J Cell Physiol* 2008; 216: 673–679.
- 117 Borger P, Miglino N, Baraket M, *et al.* Impaired translation of CCAAT/enhancer binding protein α mRNA in bronchial smooth muscle cells of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 639–645.
- 118 Mahn K, Hirst SJ, Ying S, *et al.* Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 10775–10780.
- 119 Stewart AG, Fernandes D, Tomlinson PR. The effect of glucocorticoids on proliferation of human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 3219–3226.
- 120 Fernandes D, Guida E, Koutsoubos V, *et al.* Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 77–88.
- 121 Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM, *et al.* Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 771–782.
- 122 Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273: 28545–28548.
- 123 Rudiger JJ, Roth M, Bihl MP, *et al.* Interaction of C/EBP α and the glucocorticoid receptor *in vivo* and in nontransformed human cells. *FASEB J* 2002; 16: 177–184.
- 124 Borger P, Tamm M, Black JL, *et al.* Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 367–372.
- 125 Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, *et al.* Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol* 1993; 74: 2771–2781.
- 126 Hamann KJ, Vieira JE, Halayko AJ, *et al.* Fas cross-linking induces apoptosis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: 618–624.
- 127 Oltmanns U, Sukkar MB, Xie S, *et al.* Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 334–341.
- 128 D'Antoni ML, Torregiani C, Ferraro P, *et al.* Effects of decorin and biglycan on human airway smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: 764–771.
- 129 de Medeiros Matsushita M, da Silva LF, dos Santos MA, *et al.* Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol* 2005; 207: 102–110.
- 130 Kaur D, Hollins F, Saunders R, *et al.* Airway smooth muscle proliferation and survival is not modulated by mast cells. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 279–288.
- 131 Robertson NM, Zangrilli JG, Steplewski A, *et al.* Differential expression of TRAIL and TRAIL receptors in allergic

- asthmatics following segmental antigen challenge: evidence for a role of TRAIL in eosinophil survival. *J Immunol* 2002; 169: 5986–5996.
- 132 Gerthoffer WT. Migration of airway smooth muscle cells. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 97–105.
 - 133 Madison JM. Migration of airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 8–11.
 - 134 Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, *et al.* Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 2–17.
 - 135 Mukhina S, Stepanova V, Traktouev D, *et al.* The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis. *J Biol Chem* 2000; 275: 16450–16458.
 - 136 Parameswaran K, Radford K, Zuo J, *et al.* Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration. *Eur Respir J* 2004; 24: 545–551.
 - 137 Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Labonte I, *et al.* CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *J Immunol* 2005; 175: 2702–2708.
 - 138 Govindaraju V, Michoud MC, Al-Chalabi M, *et al.* Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: 957–965.
 - 139 Kaur D, Saunders R, Berger P, *et al.* Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1179–1188.
 - 140 Takeda N, Sumi Y, Prefontaine D, *et al.* Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1018–1026.
 - 141 Ito I, Fixman ED, Asai K, *et al.* Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1370–1380.
 - 142 Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV, *et al.* Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 664–673.
 - 143 Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, *et al.* Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277: 1–9.
 - 144 Schmidt M, Sun G, Stacey MA, *et al.* Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 2003; 171: 380–389.
 - 145 Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 377–382.
 - 146 Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Kotliansky VE, *et al.* The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 859–873.
 - 147 Wicks J, Haitchi HM, Holgate ST, *et al.* Enhanced upregulation of smooth muscle related transcripts by TGF β 2 in asthmatic (myo) fibroblasts. *Thorax* 2006; 61: 313–319.
 - 148 Saunders R, Siddiqui S, Kaur D, *et al.* Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 376–384.
 - 149 Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, *et al.* Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1: 71–81.
 - 150 Wang CH, Huang CD, Lin HC, *et al.* Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 583–591.
 - 151 Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2007; 117: 549–556.
 - 152 Nihlberg K, Larsen K, Hultgardh-Nilsson A, *et al.* Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res* 2006; 7: 50.
 - 153 Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776–1784.
 - 154 Iwano M, Plieth D, Danoff TM, *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110: 341–350.
 - 155 Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- β 1. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 122–133.
 - 156 Doerner AM, Zuraw BL. TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* 2009; 10: 100.
 - 157 Malavia NK, Raub CB, Mahon SB, *et al.* Airway epithelium stimulates smooth muscle proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 297–304.
 - 158 Chanez P. Severe asthma is an epithelial disease. *Eur Respir J* 2005; 25: 945–946.
 - 159 Holgate ST, Roberts G, Arshad HS, *et al.* The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 655–659.
 - 160 Trian T, Ge Q, Moir LM, *et al.* Rhinovirus-induced exacerbations of asthma: how is the β 2-adrenoceptor implicated? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 43: 227–233.
 - 161 Roberts KE, Preston IR. Safety and tolerability of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des Devel Ther* 2009; 3: 111–118.
 - 162 Leung SY, Niimi A, Noble A, *et al.* Effect of transforming growth factor-beta receptor I kinase inhibitor 2,4-disubstituted pteridine (SD-208) in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 586–594.
 - 163 Ghavami S, Mutawe M, Hauff K, *et al.* Statin-triggered cell death in primary human lung mesenchymal cells involves p53-PUMA and release of Smac and Omi but not cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1803: 452–467.
 - 164 Camoretti-Mercado B Targeting the airway smooth muscle for asthma treatment. *Transl Res* 2009; 154: 165–174.
 - 165 Lederlin M, Ozier A, Montaudon M, *et al.* Airway remodeling in a mouse asthma model assessed by *in-vivo* respiratory-gated micro-computed tomography. *Eur Radiol* 2009; 20: 128–137.
 - 166 Montaudon M, Berger P, Lederlin M, *et al.* Bronchial morphometry in smokers: comparison with healthy subjects by using 3D CT. *Eur Radiol* 2009; 19: 1328–1334.
 - 167 Montaudon M, Berger P, Blachere H, *et al.* Thin-section CT of the lung: influence of 0.5-s gantry rotation and ECG triggering on image quality. *Eur Radiol* 2001; 11: 1681–1687.

Au total, nous avons décrit le rôle central de la CML dans les trois caractéristiques physiopathologiques de l'asthme : l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation et le remodelage des voies aériennes. Cependant, d'autres cellules de structure participent aussi à la physiopathologie de l'asthme. Une littérature abondante a évalué le rôle primordial de la cellule épithéliale bronchique dans l'asthme (98). Parmi les médiateurs épithéliaux susceptibles d'être impliqués dans le remodelage bronchique de l'asthme, le rôle d'YKL-40, une glycoprotéine appartenant à la famille des « chitinases », a récemment été démontré (210).

3. Les chitinases

3.1) Généralités

Les chitinases (E.C.3.2.1.1.4) sont une famille d'enzymes conservées au cours de l'évolution et caractérisées par leur capacité à catalyser l'hydrolyse de la chitine. Avec au moins 10 giga tonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (211), la chitine est le second polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1823 par M. Odier à partir de cuticules d'insectes. Absente du règne végétal, elle constitue une structure de soutien chez les champignons et les animaux. La chitine est un polysaccharide composé d'unités N-acetyl-glucosamine, liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1→4) (Figure 13). Le groupe hydroxyle de chaque D-glucose est remplacé par un groupe acetylamine pour former le N-acetyl-D-glucosamine. Cette substitution confère à la chitine des propriétés de résistance et de flexibilité (212,213), qui justifient ses diverses applications dans plusieurs domaines notamment en médecine ou en cosmétologie. Alors que la cellulose confère un support structural à la paroi des cellules végétales, la chitine est le principal composant de la paroi des champignons et de l'exosquelette des insectes et des crustacés.

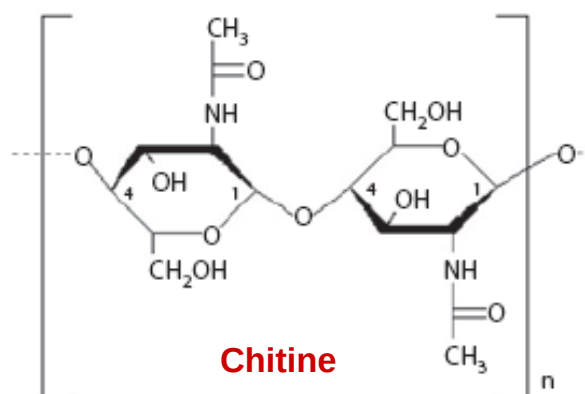


Figure 13 : Structure de la chitine.

Bien que les mammifères ne produisent pas de chitine, des études ont montré la présence de chitinases chez l'homme. Les chitinases sont des glycoprotéines qui assurent la dégradation des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidiques de la chitine. Ces enzymes se trouvent également dans de nombreux organismes comprenant les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes, les plantes et les vertébrés (214-217). Les chitinases ont été regroupées en cinq classes qui constituent deux familles distinctes, en fonction de leur localisation ou de leurs propriétés biochimiques. Les chitinases appartenant à la famille 18 des glycosides hydrolases (GH18), et qui nous intéressent dans cette partie, rassemblent plus de 180 enzymes présentes chez les mammifères. La famille 19 regroupe plus de 130 enzymes essentiellement d'origine végétale. Le rôle biologique de la chitinase peut être représenté en plusieurs scénarios. Par exemple, les bactéries produisent la chitinase pour décomposer la chitine afin de l'utiliser comme source d'énergie. La production de chitinase par les plantes est considérée comme un moyen de défense contre les organismes pathogènes contenant de la chitine comme composant structural. Les chitinases peuvent également participer au processus de croissance et de développement. Chez les mammifères, les chitinases sont impliquées dans des processus digestifs, où elles dégradent la cuticule des proies ingérées (218).

Ainsi, les chitinases animales appartenant à la famille GH18 peuvent être divisées en chitinases enzymatiquement actives : les "vraies chitinases" et "les chitinases like protein" qui n'ont pas d'activité enzymatique mais conservent leur capacité à se lier à la chitine (219,220). Comme représenté ci-dessous, le domaine N-catalytique des chitinases de la famille GH18 adopte une structure en tonneau triose phosphate isomérase (TIM) caractérisée par la présence de 8 feuillets β et 8 hélices α parallèles (Figure 14). Dans ce tonneau, le feuillet β_4 contient un motif conservé (DXXDXDXE), où D correspond à l'asparagine, E à l'acide glutamique et X à n'importe quel autre acide aminé. Ce motif forme le site actif de l'enzyme (221). En effet, l'acide glutamique constitue le résidu clé qui donne un proton nécessaire à l'hydrolyse de la liaison glycosidique $\beta(1\rightarrow4)$ de la chitine (222). Dans les chitinases like protein, la substitution de cet acide aminé essentiel en leucine, isoleucine ou glutamine, est responsable de la perte de l'activité catalytique. Néanmoins, ces dernières restent capables de se lier à la chitine avec une forte affinité. En effet, les résidus aromatiques contenus dans le tonneau TIM ne sont pas affectés (223,224).

Chez l'homme et la souris, deux chitinases enzymatiquement actives ont été identifiées : la chitotriosidase, première chitinase identifiée chez les mammifères, surexprimée dans le sérum de patients atteints de la maladie de Gaucher (225-227), et l' "Acidic mammalian chitinase" (AMCase) très exprimée dans le tractus gastro-intestinal et à moindre ampleur dans le poumon et les macrophages alvéolaires humains et murins (228,229).

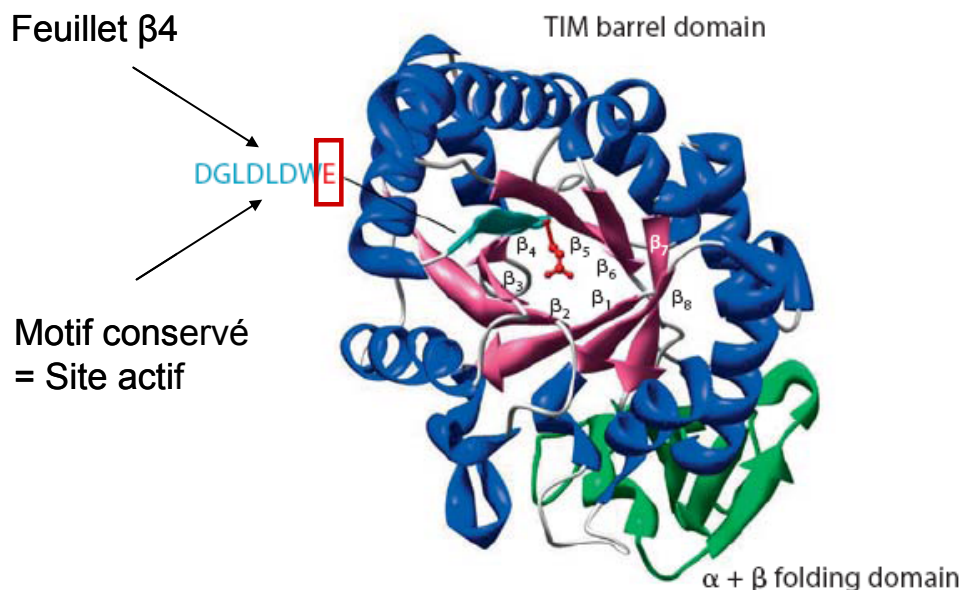


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la chitotriosidase mettant en évidence l'activité catalytique.

La séquence conservée du site actif présente dans le feuillet β_4 , contient l'acide glutamique, résidu clé de l'activité catalytique de la chitinase. TIM : Triose phosphate isomerase, D : Asparagine, G : Glycine, L : Leucine, W : Tryptophane. (D'après Shuhui et al., 2009 (230)).

On retrouve chez l'homme 3 chitinase like proteins (YKL-40, l'oviductine et YKL-39) contre 7 chez la souris, comme illustré dans le tableau 6 (219,220). Les deux chitinases qui ont été les plus étudiées sont l'AMCase et BRP-39 (breast regression protein) chez la souris (231). L'AMCase, qui a une vraie activité chitinolytique, peut également avoir des effets biologiques non reliés à la chitine. En effet, son rôle dans l'inflammation TH2 a été démontré (232). La BRP-39 a été découverte dans le cancer du sein chez la souris et plusieurs homologues ont été décrits dans différentes espèces, comme YKL-40 chez l'homme.

GH18 family	Critical AA at active site ¹	Homo sapiens	Mus musculus
True chitinases			
Chitotriosidase	E	CHIT1 (NM_003465)	Chit1 (NM_027979)
AMCase	E	CHIA (NM_621797)	Chia (NM_023186)
Chitinase-like proteins			
YKL-40	L	CHI3L1 (NM_001276)	Chi3l1 (NM_007695)
Oviductin	L	OVGP1 (NM_002557)	Ovgp1 (NM_007696)
YKL-39	I	CHI3L2 (NM_004000)	–
Ym1	Q	–	Chi3l3 (NM_009892)
Ym2	Q	–	Chi3l4 (NM_145126)
Ym3	Q	–	Chi3l5 (NM_889251)
Bclp2	Q	–	Bclp2 (NM_001080816)
BYm	Q	–	bYm (BC051070)

Tableau 6 : Les chitinases de la famille GH18, chez l'homme et la souris.

L'activité chitinolytique des membres de la famille GH18 est déterminée par le motif conservé du site actif. Les acides aminés clés sont représentés. E : Acide glutamique, L : Leucine, I : Isoleucine, Q : Glutamine. (D'après Shuhui et al., 2009 (230)).

Les chitinases de la famille GH18 sont localisées sur le chromosome 1, à proximité des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité évoquant leur rôle dans l'immunité et les réponses inflammatoires. D'une part, l'importance des chitinases dans la défense immunitaire a été démontrée. Par exemple, une déficience en chitotriosidase chez l'homme favorise les infections parasitaires (233), d'où l'importance de l'activité enzymatique dans la dégradation de la chitine, composant majeur des pathogènes. Toutefois, les chitinases non enzymatiquement actives ont également un rôle important dans la défense de l'hôte du fait de leur capacité à se lier à la chitine, ce qui implique leur rôle dans la fonction de reconnaissance du pathogène et du signal d'alarme transmis à la cellule hôte (234). D'autre part, des associations entre les niveaux de chitinase dans le sérum et l'inflammation ont été largement établies dans plusieurs pathologies inflammatoires comme par exemple l'ostéoarthrite ou la polyarthrite rhumatoïde (235-237).

3.1.a) YKL-40

YKL-40 est la chitinase like protein humaine la plus étudiée dans de nombreuses pathologies. Son nom correspond aux trois premiers acides aminés de sa séquence protéique Tyr (Y), Lys (K) et Leu (L), suivis de son poids moléculaire approximatif. Elle a été identifiée en 1991 dans une lignée humaine d'ostéosarcomes (238), puis dans les chondrocytes articulaires humains en 1993 lui conférant son autre nom : HC gp-39 (239). Le gène d'YKL-40, CHI3L1 est situé sur le chromosome 1 (q32-q31) et consiste en 10 exons. La structure cristallographique de cette chitinase like protein a été identifiée et explique l'absence de son activité enzymatique par la substitution d'un acide aminé comme détaillé dans le chapitre I.3.1 (223,240) (Figure 15).

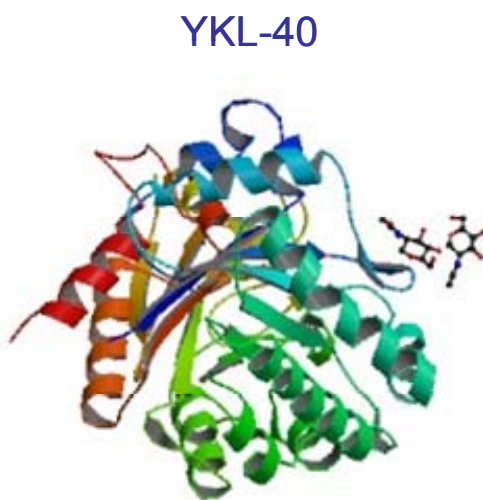


Figure 15 : Structure cristallographique d'YKL-40.

(D'après : <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1NWR>).

YKL-40 est également produite par les cellules synoviales, les ostéoblastes, les macrophages (240), les neutrophiles dans des conditions inflammatoires (241) ainsi que les

hépatocytes, les CML vasculaires et les cellules épithéliales bronchiques (210). Plusieurs hormones et cytokines régulent sa production. Par exemple, grâce au développement de souris KO, il a été montré que l'expression d'YKL-40 dépendait de l'IL-6 (242). Dans une autre étude, l'expression de l'ARNm d'YKL-40 dans les monocytes humains était fortement stimulée par l'IFN γ ou encore inhibée par l'IL-4 et la dexaméthasone (243).

La concentration d'YKL-40 circulante peut être détectée par des techniques radio- ou enzymo-immunologiques (244,245). Plusieurs études ont montré une augmentation d'YKL-40 circulante lors de différentes maladies inflammatoires caractérisées par un remodelage tissulaire. Ces maladies incluent l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la fibrose hépatique et certains cancers solides dont le cancer du sein, du côlon, de l'ovaire et les cancers pulmonaires à petites cellules (242,246-254). De plus, son taux élevé dans le sérum est un marqueur pronostic de plusieurs types de cancers solides.

YKL-40 exerce son activité biologique via la régulation de l'activation, de l'adhésion, de la prolifération et de la migration des cellules. Dans ce contexte, il a été montré que cette chitinase pouvait agir comme un facteur de croissance des chondrocytes, des cellules synoviales ou des fibroblastes via une voie dépendante des MAP kinases et AKT (255,256). D'une part, il a été montré qu'YKL-40 activait la migration des cellules endothéliales vasculaires via un pouvoir chimiotactique (257). D'autre part, son rôle dans la migration et l'adhésion des CML vasculaires (258) a été montré, suggérant l'implication d'YKL-40 dans les processus de remodelage vasculaire. Cependant, le récepteur induisant ces effets, est inconnu à ce jour.

3.2) Les chitinases dans l'asthme

Plusieurs études ont montré l'implication des chitinases dans l'asthme (230). En 2001, une surexpression de la chitinase like protein Ym2 dans les lymphocytes TH2 murins, en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 a été démontrée (224). En outre, la stimulation intra-trachéale à l'IL-13 augmente l'expression d'Ym1 et Ym2 dans le LBA dans un modèle murin d'asthme allergique. Les premières implications cliniques des chitinases dans l'asthme ont été rapportées en 2004 par Zhu et ses collègues, qui ont identifié des quantités importantes d'AMCase dans les cellules épithéliales et les macrophages de biopsies provenant de patients asthmatiques (232). Parallèlement, le niveau d'AMCase est élevé dans les poumons d'un modèle de souris asthmatiques et l'inhibition de cette chitinase par l'allosamidin diminue significativement le nombre de cellules inflammatoires dans le LBA. Cette augmentation de l'AMCase est une conséquence de l'augmentation d'IL-13 dans les conditions inflammatoires (Figure 16).

De plus, cette étude suggère que les effets bénéfiques des stéroïdes dans l'asthme peuvent être en partie reliés à leur capacité à augmenter le pH des voies aériennes et donc à diminuer les effets de l'AMCase dont l'activité optimale est à pH 2,3 (232,259). Enfin, un polymorphisme dans le gène de l'AMCase est associé à une diminution de l'HRB, ce qui supporte le rôle de cette chitinase dans l'asthme (231). Des études plus récentes ont révélé les effets des corticostéroïdes et des anti-leucotriènes dans la diminution de l'expression de l'AMCase, Ym1 et Ym2 de manière concomitante avec la diminution de l'inflammation dans un modèle de souris asthmatique (260,261).

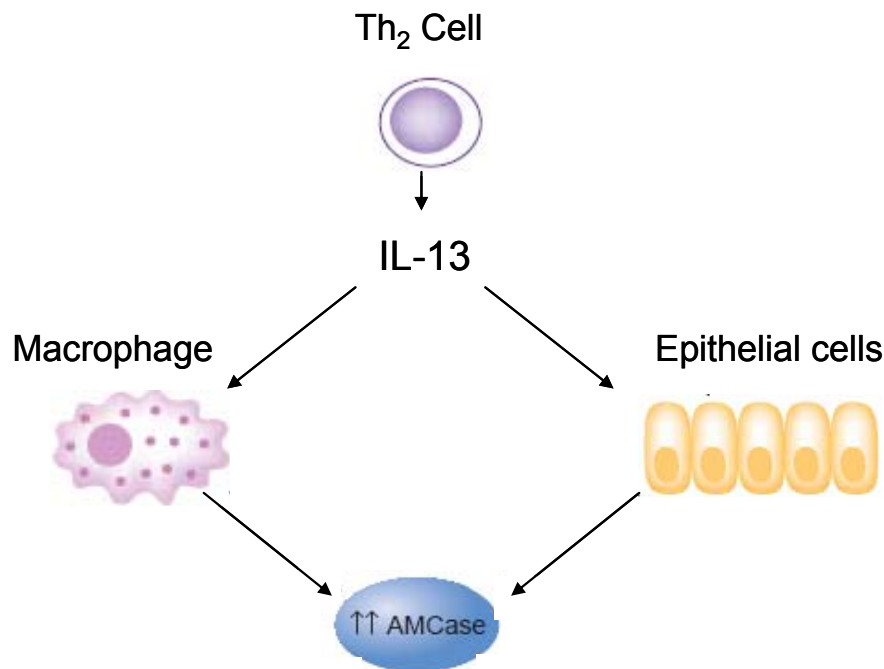


Figure 16 : L'AMCase et l'inflammation dans l'asthme.

Les cellules Th2 produisent l'IL-13 qui augmente l'expression de l'AMCase dans les macrophages et les cellules épithéliales. (D'après Donnelly et Barnes, 2004 (259)).

3.2.a) YKL-40

La concentration d'YKL-40 a été retrouvée augmentée dans le sérum de patients asthmatiques par rapport aux sujets témoins (210). De plus, la concentration d'YKL-40 circulante est positivement corrélée avec la sévérité de la maladie, l'épaississement de la membrane basale et la détérioration de la fonction pulmonaire (210). Il a ainsi été proposé qu'YKL-40 puisse être un bio marqueur sérique de l'asthme et de la présence d'un remodelage. Par ailleurs, la concentration d'YKL-40 circulante est d'autant plus élevée que les patients asthmatiques présentent des exacerbations (262). De plus, Kuepper et collaborateurs ont également démontré que les stimulations allergéniques de patients asthmatiques sensibilisés augmentaient la concentration d'YKL-40 dans le sérum et le LBA (263). Toutes

ces études confirment qu'YKL-40 est un bio marqueur de l'asthme comme initialement suggéré par Chupp et collaborateurs (210).

Le rôle causal d'YKL-40 a été de plus suggéré par l'étude de polymorphisme dans la région promotrice du gène CHI3L1, le gène codant pour YKL-40. En effet, l'allèle C du SNP (-131C→G), était fortement associé à une concentration élevée d'YKL-40 d'une part, et à la présence d'une hyperréactivité bronchique, d'une fonction ventilatoire altérée et d'un asthme d'autre part (264). Cependant, les mécanismes physiopathologiques impliquant YKL-40 et sa causalité dans l'asthme et/ou le remodelage bronchique restaient à déterminer (265) et ont fait l'objet du premier travail expérimental de cette thèse.

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Culture des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CML)

1.1) Obtention des CML

Les spécimens broncho-pulmonaires proviennent soit de biopsies bronchiques prélevées au cours d'une endoscopie bronchique pour les patients asthmatiques, soit de pièces opératoires de pneumonectomies ou de lobectomies, pratiquées le plus souvent pour carcinome bronchique pour les sujets considérés témoins (50). Pour chaque spécimen pulmonaire, une bronche de diamètre interne de 3 à 5 mm est disséquée en zone macroscopiquement saine (non tumorale) par un anatomopathologiste. Les fragments bronchiques sont placés dans un milieu de culture stérile (milieu de Dulbecco modifié par Eagle, DMEM, Invitrogen), contenant 0.5 U/ml de pénicilline, 0.5 mg/ml de streptomycine et 0.25 µg/ml d'amphotéricine B (Invitrogen), puis disséqués sous microscope binoculaire afin d'éliminer les tissus non désirés, *i.e.* épithélium, sous-muqueuse, tissus adipeux et pulmonaire. Chaque faisceau de muscle lisse est rincé avec ce même milieu et découpé en fragments de 2 à 3 mm².

Les explants musculaires lisses sont déposés dans des plaques 6 puits (BD Biosciences) et mis en culture dans 200 µl de milieu DMEM, contenant 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) et 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma), supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 1 % d'acides aminés non essentiels (Sigma) et 1 % d'antibiotiques et d'antimycotiques (appelé milieu complet). Les plaques de culture sont placées à 37

°C, dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂. Après 48h, l'adhérence de l'explant permet sa culture dans un volume de 2 ml par puits.

Le milieu de culture est changé toutes les 48 à 72 heures. La viabilité des cellules est appréciée quotidiennement sous microscope. L'aspect typique est représenté par des cellules de forme allongée («spindle shape cell»), orientées parallèlement les unes aux autres, formant des faisceaux. Après 8 à 10 semaines de culture, les cellules confluentes sont rincées avec une solution salée d'HBSS ("Hank's Balanced Salt Solution", HBSS, Invitrogen) et soumises à un premier passage grâce à une solution contenant 0.5 g/l de trypsine et 0.2 g/l d'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA, Invitrogen), et placées dans des flacons de culture de 75 cm². Le lavage en HBSS permet d'éliminer les traces de SVF qui inhibe la trypsine, responsable du décollement des cellules. En effet, la trypsine clive les protéines d'adhérence et l'EDTA chélate le calcium utilisé par ces protéines pour adhérer au support. Après une à deux semaines, les cellules de nouveau confluentes sont soumises à un deuxième passage à la trypsine et réparties sur différents supports : plaques de culture (6, 24 ou 96 puits), flacons de culture de 75 cm² ou lames de culture à 8 puits (Chamber's Slides). Seuls les passages 2 à 5 sont étudiés pour éviter la dédifférenciation des CML en myofibroblastes ou fibroblastes.

Pour la plupart des expérimentations, les cellules sont rendues quiescentes par une incubation de 24 à 72 heures avec un milieu DMEM non supplémenté en SVF appelé milieu 0 % SVF.

1.2) Analyse des CML

La pureté de la population cellulaire en culture primaire est estimée par cytométrie en flux et immunocytochimie. Concernant la cytométrie en flux, les cellules sont rendues quiescentes par privation en sérum pendant 72 h. Après passage, fixation et perméabilisation de la membrane plasmique au paraformaldéhyde 4% (PFA, sigma) et saponine 0,1%, la saturation des sites de fixation membranaire non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution d'albumine bovine sérique (ABS) à 1 % (Sigma) diluée dans un tampon phosphaté (PBS, phosphate buffered saline, Invitrogen). Les anticorps primaires, dilués dans cette même solution de PBS-ABS 1 %, sont incubés pendant une heure à température ambiante. Les anticorps primaires monoclonaux utilisés, produits chez la souris, sont un anticorps anti- α actine du muscle lisse humain, (clone 1A4, Sigma), ou un anticorps anti-calponine (clone FL-297) produit chez le lapin. Des témoins sont réalisés avec un anticorps irrelevant de même isotype (lignée MOPC-21, Sigma). Après rinçage dans la solution de PBS-ABS 1 %, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris ou de lapin, marqué par un fluorochrome vert (FITC, isothiocyanate de fluorescéine, Invitrogen), pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont par la suite analysées par un cytomètre de type FACSCanto® équipé du logiciel Diva® (Beckton Dickinson (BD) biosciences). Le phénotype musculaire lisse est confirmé si les cellules ont un % de cellules positives pour l' α -actine musculaire lisse et la calponine, supérieur à 75% (Figure 17).

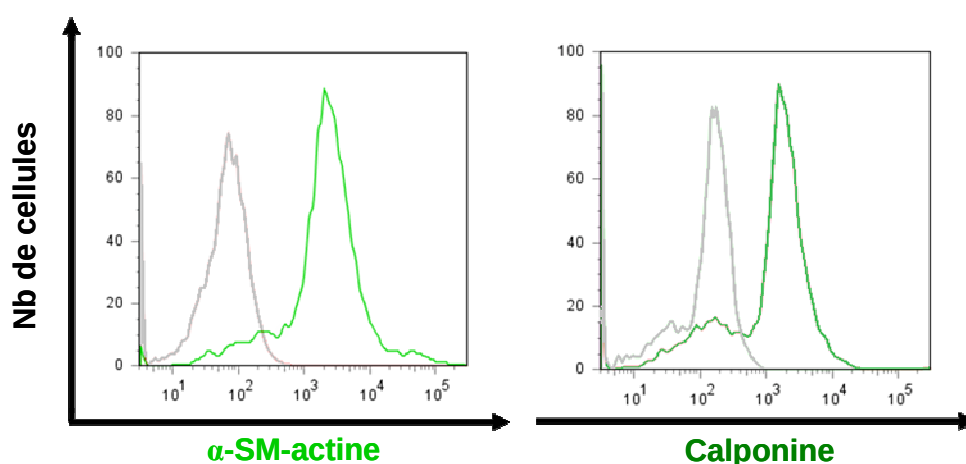


Figure 17 : Phénotypage des CML en cytométrie en flux.

Histogrammes de distribution de la fluorescence représentant en vert l'expression de l' α -actine musculaire lisse ou de la calponine. Le contrôle est représenté par la couleur opposée.

Concernant l'analyse immunocytochimique de la pureté des CML, les chamber's slides sont rincées avec du PBS, puis les cellules sont fixées avec du méthanol froid (-20°C) pendant 20 min à 4°C . La saturation des sites de fixation membranaire non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution d'ABS à 3 % diluée dans du PBS, pendant 30 min. Les cellules sont par la suite incubées avec les mêmes anticorps primaires utilisés pour la cytométrie en flux avec en plus un anticorps anti-myosine du muscle lisse humain, (clone hSM-V, Sigma) et comme contrôle négatif, un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 humaine des cellules épithéliales (clone CY-90, Sigma). Après rinçage avec une solution contenant du PBS et du polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (tween 20 à 0,05 %, Sigma), les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire de la même manière que pour la technique précédente. Après rinçage avec du PBS, une contre-coloration au Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate (DAPI, Sigma) pendant une minute permet de colorer les noyaux en bleu. Un rinçage avec du PBS-tween puis avec du PBS seul est ensuite effectué, et les lames sont ensuite montées avec du Fluorescent Mounting Medium (Dako) et observées sous un microscope à épi-fluorescence de

type (Nikon). Le phénotype des CML est validé si les cellules sont positives pour les anticorps anti- α actine du muscle lisse humain et/ou anti-myosine et anti-calponine du muscle lisse humain, mais négatives pour les anticorps anti-cytokératine 18 humaine et les anticorps irrelevant de même isotype (Figure 18).

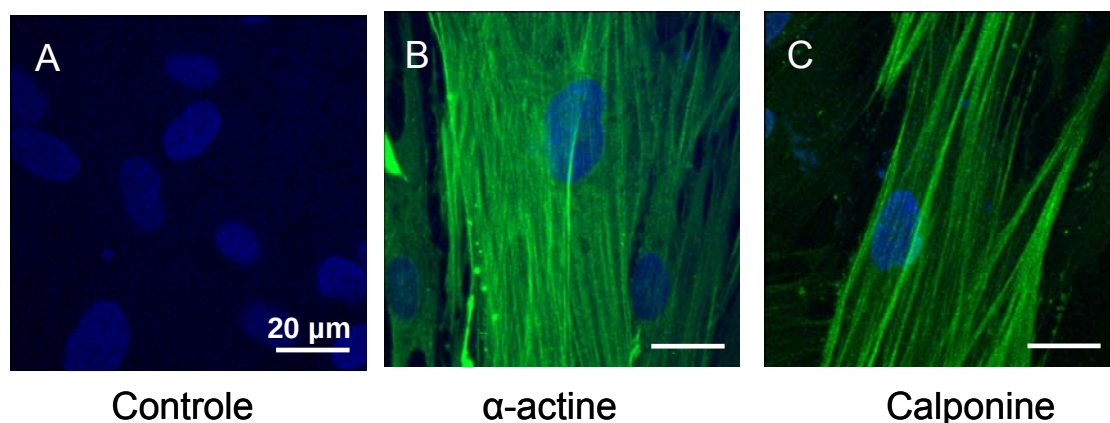


Figure 18 : Phénotypage des CML par immunocytochimie.

Photographies au microscope à fluorescence de cultures cellulaires marquées à la fluorescéine (FITC) avec un anticorps irrelevant (A), un anticorps anti- α actine (B) et anti-calponine (C).

La qualité des résultats de recherche dépend de la qualité des cultures cellulaires. En effet, outre la rigueur dans le phénotypage musculaire lisse, l'absence de contamination aux mycoplasmes est systématiquement vérifiée lors de l'analyse immunocytochimique grâce au marquage au DAPI.

Les mycoplasmes sont des bactéries largement répandues dans la nature, chez les mammifères, les insectes et les plantes. Ils sont dépourvus de paroi, de petite taille (300 nm) et de ce fait non visibles au microscope optique. Chez l'homme, on ne rencontre que les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma* qui sont isolés de deux sites principaux, l'arbre respiratoire et les voies génitales. Les mycoplasmes surnommés « cancer des cellules », ont la

capacité d'affecter la fonction, la croissance et le métabolisme des cellules. Ils peuvent provenir du sérum, du culturiste (poumon, via les mains) ou dans notre cas, des explants bronchiques. Un traitement des CML est donc effectué lors de l'amplification mais aussi lors de la décongélation des cellules par l'ajout de 0,5 µg/ml d'un agent pharmacologique ; « mycoplasma removal agent » (MRA, MP Biomedicals), antibiotique dérivé de la famille des quinolones et ayant pour but d'inhiber l'ADN gyrase des mycoplasmes, qui est une enzyme essentielle à la réplication de leur ADN.

1.3) Congélation des CML

Après confirmation du phénotype musculaire lisse et amplification des cellules, les CML sont utilisées à l'état frais ou congelées dans l'azote liquide. Pour cela, le culot cellulaire d'un flacon de culture de 75 cm², obtenu après passage et centrifugation des cellules à 1500 tours/min, pendant 5 min à 4 °C, est remis en suspension dans une solution constituée de SVF et de 10 % de dimethyl sulfoxide (DMSO), qui est un cryoprotecteur cellulaire. La congélation est effectuée selon un gradient de température pour éviter le choc thermique, avec congélation des cellules pendant 2 à 3 h à -20 °C puis toute la nuit à -80 °C avant stockage dans l'azote liquide.

La décongélation est réalisée très rapidement, en diluant les cellules congelées dans 1 ml de milieu de culture avant de les remettre dans l'incubateur dans un flacon de 75 cm².

2. Prolifération cellulaire

2.1) Courbes de croissance

Des plaques 6 puits contenant 20 000 cellules par puits sont mises en culture dans du milieu de culture DMEM complet, puis synchronisées pendant 24h dans du milieu 0 % SVF. Les cellules sont ensuite stimulées avec 0 à 300 ng/ml d'YKL-40 pendant 24 à 72h, ou du SVF, avant d'être rincées avec de l'HBSS et décollées comme décrit précédemment à l'aide de trypsine. Les cellules sont alors centrifugées à 1500 tr/min pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de milieu de culture et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer.

2.2) Incorporation de BrdU

La synthèse d'ADN est mesurée à l'aide d'un kit d'incorporation de BrdU (Roche diagnostic). Deux mille cellules par puits sont déposées sur une plaque de culture à 96 puits. Après 24h, les cellules sont synchronisées pendant 24h en remplaçant le milieu de culture par du milieu 0 % SVF. Après cette synchronisation, les CML sont stimulées par 10 % de SVF, 10^{-4} M de SLIGKV ou 0 à 300 ng/ml d'YKL-40 dilués dans du milieu DMEM seul ou laissées en milieu 0 % SVF comme condition contrôle. On ajoute alors 10 μ M de BrdU dans chaque puits pendant 24h. Les cellules sont ensuite fixées et dénaturées par une solution alcoolisée (Solution « Fix-denat » Roche diagnostic) pendant 30 minutes à température ambiante. Le BrdU incorporé est alors révélé par un anticorps anti-BrdU couplé à la peroxydase pendant 2h à température ambiante. Après 3 rincages au PBS, une solution substrat de la

peroxydase, ou tetramethyl-benzidine (TMB) permet une révélation colorimétrique de l'anti-BrdU grâce à un lecteur de microplaque à 370 nm. Toutes les conditions expérimentales sont réalisées en triplicata, et les résultats sont exprimés en ratio par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non stimulées.

3. Hypertrophie

La taille cellulaire est mesurée par cytométrie en flux (266). Ce paramètre important du remodelage musculaire lisse n'a jamais été étudié dans le laboratoire auparavant. Une optimisation de la technique a donc été nécessaire. Les CML sont synchronisées pendant 24 h puis stimulées de manière répétée avec 300 ng/ml d'YKL-40 pendant 48h, 1 ng/ml d'endothéline ou 1-10 ng/ml de TGF- β (R&D Systems) pendant 72h. Les cellules sont alors collectées, fixées et perméabilisées avec 300 μ l d'éthanol 70 % froid. Un lavage avec 3 ml de PBS suivi d'une centrifugation de 5 min à 1500 tours/min sont alors effectués. Les cellules sont par la suite marquées pendant 15 min à température ambiante à l'iodure de propidium (PI)/ RNase (BD Biosciences Pharmingen). En effet, le PI s'intercale à l'hélice double brin de la cellule et peut marquer l'ADN mais aussi l'ARN double brin. Pour éviter cela, les cellules sont traitées avec de la RNase. Les cellules en G0/G1 sont ensuite sélectionnées par un FACSCanto. La taille cellulaire de ces cellules non proliférantes est déterminée en mesurant le paramètre forward scatter (FSC) du cytomètre. La mesure de l'hypertrophie cellulaire est également appréciée par la quantification de l'expression de l' α -actine par (cf II.4.B). En effet, l'hypertrophie musculaire est associée à un phénotype contractile qui se manifeste par une augmentation du contenu en protéines contractiles.

4. Expression protéique et transcriptionnelle

4.1) Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour quantifier l'expression du PAR-2. Les CML bronchiques en culture sont soumises à un passage grâce à une solution de dissociation cellulaire non enzymatique (Sigma) afin de ne pas détruire les protéines de surface et ainsi le PAR-2 membranaire. Après une centrifugation à 1500 tours/min pendant 5 min à 4°C, la fixation des cellules est effectuée dans le paraformaldéhyde 4% (PFA, Fisher Scientific Chemicals) pendant 15 min dans la glace. L'étape de rinçage, pratiquée à 2 reprises, comprend une centrifugation à 1500 tours/min pendant 5 min à 4°C et une remise en suspension du culot cellulaire dans une solution d'ABS 0,5 % diluée dans le tampon PBS. Pour chaque condition expérimentale, les cellules sont incubées pendant 30 min dans la glace, en présence d'un anticorps monoclonal produit chez la souris à la concentration de 10 µg/ml, dirigé contre le récepteur PAR-2 humain (Santa Cruz). Dans les conditions témoins, les cellules sont incubées en présence d'un anticorps de même isotype dilué dans la même solution (ABS 0,5 %), utilisé à la même concentration (10 µg/ml). Après rinçage au PBS-ABS 0,5 %, les cellules sont incubées pendant 30 min dans la glace, à l'abri de la lumière, en présence d'un anticorps secondaire, produit chez la chèvre, anti-IgG de souris conjugué à l'Allophycocyanine (APC, Beckman Coulter). À l'issue de 2 rinçages supplémentaires, l'intensité de fluorescence des populations cellulaires (10000 cellules pour chaque condition expérimentale) est analysée par un cytomètre de type FACSCanto® équipé du logiciel Diva® (Beckton Dickinson (BD) biosciences). Les résultats sont exprimés en médiane d'intensité de

fluorescence (MFI) et/ou en pourcentage de cellules positives.

4.2) Immunomarquage par Western Blot

Au cours des différents travaux de cette thèse, plusieurs immunomarquages ont été réalisés suivant le même protocole de western blot, à l'exception de la nature et de la concentration des anticorps primaires et secondaires. Le tableau 7 résume les spécificités des différents anticorps utilisés.

Anticorps primaire	Poids moléculaire	Concentration finale	Anticorps secondaire	Dilution
PAR-2 (Santa Cruz)	55 kD	20 µg/ml	Anti IgG de souris couplé HRP (Biorad)	1/2000
α -actine (Sigma)	40 kD	2 µg/ml		
Collagen 1A (Santa Cruz)	70 kD	0,25 µg/ml		1/1000
β -actine (Sigma)	42 kD	0,3 µg/ml		1/5000

Tableau 7 : Récapitulatif des anticorps utilisés en Western Blot.

4.2.a) Extraction des protéines

Les CML sont lysées et les protéines extraites dans 150 µl d'un tampon de lyse contenant une solution composée de détergent (Triton x-100), d'anti-protéases et d'anti-phosphatase (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) 0,25 mg/ml, aprotinine 10 µg/ml, leupeptine 16 µg/ml, Sodium-orthovanadate 0,35 mg/ml, tous provenant de Sigma), et d'un réducteur des ponts disulfures, le 1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT) à 0,15 mg/ml. Les protéines sont alors diluées au 1/2 dans un tampon de charge (2 % Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 20 % Glycérol, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 80mM β-mercapto-éthanol et 1 % de bleu de Bromophénol) et dénaturées à 90°C pendant 5 min.

4.2.b) Western Blot

Les protéines (25 µg) sont ensuite déposées sur un gel d'acrylamide (10 %) dénaturant [(Acrylamide bis-Acrylamide, SDS (Sigma)], persulfate d'ammonium et N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) (Qbiogene). La migration des protéines est alors réalisée par une électrophorèse conduite à 300 mA pendant 1h30. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene Fluoride, immobilonTM -P) pendant 1h à 600 mA. Après blocage des sites de fixation non spécifiques dans une solution de PBS, Tween 0,1 % et lait en poudre 5 %, les membranes sont incubées avec un anticorps primaire (Tableau 7) pendant la nuit à 4 °C. Après trois lavages dans du PBS, Tween 0,1 %, un anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (horse radish peroxydase) est appliqué sur la membrane pendant 1h30 à température ambiante. Le signal est révélé par chimioluminescence (Uptilight HRP blot reagent) (Interchim). En parallèle, la quantité de protéine déposée est contrôlée par la mesure de la quantité de β-actine présente sur la membrane, car il

s'agit d'une protéine dont la quantité ne varie pas dans la CML. Cependant, la taille de la β -actine étant proche de celle du PAR-2 notamment, la membrane est incubée dans du Stripping Buffer (« Restore TM Western Blot Stripping Buffer », Pierce) pendant 15 minutes, ce qui permet d'éliminer le marquage du PAR-2, puis les membranes sont incubées dans l'anticorps primaire dirigé contre la β -actine pendant 1h30 et le même protocole de révélation est ensuite poursuivi.

4.2.c) Analyse des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme de ratio de l'intensité des bandes révélées par l'anticorps primaire spécifique utilisé rapportée à l'intensité révélée par l'anticorps primaire anti β -actine. L'intensité de ces bandes est calculée grâce au logiciel libre imageJ.

4.3) ELISA

La synthèse de cytokines TGF- β 1, IP-10, IL-8 ou SCF a été mesurée sur des surnageants de CML, grâce à l'utilisation de kits "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) (Quantikine ELISA Kits, R&D Systems). 20 000 cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits. Une fois le niveau de confluence atteint, les CML sont rendues quiescentes puis stimulées pendant 48h avec 300 ng/ml d'YKL-40 ou 30 ng/ml de TNF- α utilisé comme contrôle positif. Les surnageants sont ensuite stockés à -80 °C jusqu'à la réalisation du dosage. Brièvement, les surnageants sont ajoutés aux microplaques pré-coatées avec un anticorps monoclonal spécifique pour les différentes cytokines. Après lavage, un anticorps secondaire lié à une peroxydase est ensuite ajouté. Enfin, une solution substrat de l'enzyme permet une

révélation colorimétrique grâce à un lecteur de microplaques à 450 nm avec une correction à 570 nm.

4.4) RT-PCR quantitative

4.4.a) Extraction d'ARN

Les CML bronchiques sont rincées à l'HBSS puis décollées par la trypsine. Les ARN totaux sont extraits à l'aide d'un kit NucleoSpin RNase II (Marcherey-Nagel) conçu pour isoler l'ARN tout en évitant sa dégradation. Les cellules sont lysées dans un tampon qui permet d'inactiver immédiatement les RNases et auquel est ajouté du β -mercapto-éthanol pour réduire les ponts disulfures. Les lysats sont ensuite filtrés dans des colonnes spécifiques (« NucleoSpin Filter ») qui permettent de réduire la viscosité. Un traitement des cellules à l'éthanol 70 % suivi d'une centrifugation à 11 000 g pendant 30 secondes permet la fixation de l'ARN sur la membrane de la colonne (« NucleoSpin RNA column »). Les tubes sont ensuite placés pendant 15 minutes à température ambiante en présence de DNase afin d'éliminer une contamination avec de l'ADN qui a pu se fixer sur la membrane. Enfin, après quelques lavages, l'ARN pur est élué dans de l'eau RNase-free. La concentration en ARN totaux extraits est ensuite mesurée grâce au spectrophotomètre GeneQuant RNA/DNA calculator (Amersham Pharmacia). La concentration en acides nucléiques est mesurée à 260 nm et rapportée à la concentration en protéines mesurée à 280 nm. Le ratio des densités DO_{260}/DO_{280} permet d'apprécier la pureté des échantillons.

4.4.b) Reverse Transcription (RT)

Les ARN extraits sont transformés en ADN complémentaire (ADNc) par l'étape de transcription inverse. Pour cela, 1 µg d'ARN totaux est mis en présence d'amorce oligo-dT (0,5 µg ; Promega), de désoxyribonucléotides ou dNTP (1 mM ; Promega), d'un inhibiteur de la ribonucléase (RNasin ; 20 unités ; Promega) et de la transcriptase inverse provenant du virus AMV (Avian Myeloblastosis Virus ; 15 unités ; Promega). La synthèse d'ADNc s'effectue pendant 1 heure à 42 °C, puis l'enzyme est inactivée à 94 °C pendant 5 minutes.

L'amorce d'oligo d(T) utilisée permet de n'amplifier que les ARN messagers et non les ARN ribosomaux qui ne possèdent pas de queue de poly A en 3'.

4.4.c) Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

Les paires d'amorces spécifiques ont été conçues avec le logiciel Oligo 6.6 (Molecular Biology Insights) et délivrées par Sigma-Genosys. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 8.

Gène	N° d'accession	Taille du produit d'amplification (pb)	Température et temps d'hybridation	Température et temps d'élongation	Concentration d'amorce utilisée (nM)	Séquences (S : sens; AS : antisens)
YWHAZ	NM_003406	-	68°C-13sec	70°C-23sec	100	S : GGGGATGTGGAATTTTATACAAG AS : CGCCAGGACAAACCAGTATGTAG
HPRT-1	NM_000610	91	64°C-13sec	70°C-23sec	100	S : GTGAAAAGGACCCCACGAA AS : AGTCAAGGGCATATCCTACAACAA
PO	NM_002210	182	70°C-28sec	70°C-28sec	200	S : CAACGGGTACAAACGAGTC AS : CTCCTTGGCTTCAACCTTAG
PAR-2	NM_005242	161	62°C-15sec	70°C-13sec	200	S : CCGAACTAAGAAGAAGCACC AS : AGAAAAAGCCAATAAGCACACAT

Tableau 8 : Récapitulatif des paires d'amorces utilisées en RT-PCR.

La quantification des ADNc par PCR en temps réel est réalisée en mesurant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle d'amplification par comparaison à trois gènes domestiques (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase : HPRT ; Ribosomal Phosphoprotein : PO ; Tyrosine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase Activation Protein, Zeta polypeptide : YWHAZ). Pour chaque PCR, le milieu réactionnel (10 µl) contient 10 ng d'ADNc, 0,4 µl de l'enzyme Titanium™ « Taq DNA Polymerase » (50x), le tampon PCR Titanium Taq (1x), 1 mM de dNTP, (tous provenant de Clontech), ainsi que 100 à 200 nM de chaque amorce (Tableau 8) et 0,5 µl de SybR Green (10x, Molecular Probes, Interchim).

La réaction de PCR est réalisée grâce au thermocycleur Rotor Gene 2000 (Corbett Research) permettant la quantification en temps réel des transcrits, et se déroule comme suit : 60 secondes initiales à 95°C pour activer la Taq, 15 secondes de dénaturation à 95°C suivie de 30 à 40 cycles d'amplification (dénaturation / hybridation / élongation) dont la durée et la température d'élongation varient selon les amorces spécifiques (Tableau 8).

Cette technique permet de suivre la quantité d'ADNc grâce au SybR Green, un agent intercalant non spécifique de l'ADN double-brin émettant une fluorescence à 585 nm lorsqu'il est excité à 470 nm. La quantité de fluorescence est alors directement proportionnelle à la quantité d'ADNc amplifié. Le cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est défini comme le cycle où la fluorescence atteint une limite fixée arbitrairement. Cette valeur est déterminée à un moment où l'amplification est dans une phase linéaire en échelle logarithmique.

Au préalable, l'efficacité d'amplification est vérifiée en déterminant les Ct pour différentes concentrations en ADNc. On considère alors que l'efficacité maximale est de 100 % lorsqu'en divisant par 2 la concentration en ADNc, le Ct augmente d'un cycle.

Pour éliminer les signaux de fluorescence non spécifiques, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation à une température inférieure de 3,5°C à la température de fusion (T_m ; melting temperature ; entre 80 et 85°C généralement) de l'amplicon, mais supérieure à celle de l'hybridation éventuelle des amorces entre elles. Les témoins négatifs (eau stérile) sont systématiquement effectués lors des étapes de transcription inverse et de PCR. L'efficacité des réactions de PCR est toujours supérieure à 90%. La spécificité des produits de PCR est analysée avec les courbes de fusion et sur gel d'agarose 2% contenant du Syber Green, et en comparant leur taille à un marqueur de taille.

4.4.d) Analyse des résultats

Les résultats ont été analysés selon la méthode Genorm (267). Cette méthode permet, dans un premier temps, de définir les gènes domestiques les plus stables entre les différentes conditions d'étude. Les gènes domestiques les plus stables permettront alors le calcul d'un facteur de normalisation pour chaque échantillon, basé sur la moyenne géométrique de ces gènes domestiques (YWHAZ ; PO ; HPRT). Ainsi, la quantité relative d'ADNc de chaque gène d'intérêt est rapportée au facteur de normalisation propre à chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm en unité arbitraire.

5. Migration

La migration des CML a été étudiée grâce aux inserts de type Transwell (BD) (Adaptée de la chambre de Boyden). Elle consiste en une migration des cellules à travers une membrane en PET (polyethylene terephthalate) présentant des pores de 8 μm de diamètre

(268). Au préalable, les CML sont synchronisées dans du milieu 0 % SVF pendant 24h. Puis, les inserts sont recouverts de collagène à 50 µg/ml pendant 1h à température ambiante afin de favoriser l'adhérence des cellules. 20000 cellules sontensemencées dans la partie supérieure des inserts qui sont eux-mêmes déposés dans des plaques 24 puits. Les agonistes (YKL-40 à 300 ng/ml ou le PDGF à 10 ng/ml) sont placés dans la partie inférieure et/ou supérieure de l'insert afin de différencier deux phénomènes importants de la migration : le chimiotactisme (attraction des cellules selon un gradient de concentration d'un composé donné) et la chimiokinésie (déplacement non orienté sous l'action d'un composé donné). Au terme de 6 et 24h de migration, les inserts sont rincés dans des puits contenant du PBS 1X préchauffé à 37 °C. Les CML n'ayant pas migré (présentes dans la partie supérieure de l'insert) sont enlevées par grattage. Les inserts sont par la suite rincés 3 fois dans du PBS afin d'éliminer les cellules grattées, puis séchés pendant 10 min. Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 min grâce à une solution de méthanol, puis les inserts sont séchés de nouveau pendant 5min. Les noyaux sont colorés en bleu avec de l'hématoxyline pendant 20 min. Les inserts sont finalement rincés à l'eau bidistillée. L'observation au microscope optique au grossissement x10 est suivie de l'acquisition informatique des images par le logiciel QUANCOUL[®], à raison de 15 images, correspondant à 15 champs par puits, de façon à être le plus exhaustif possible. La migration cellulaire est exprimée en nombre de cellules par mm² et est présentée sous forme de moyennes ± SEM (erreur standard de la moyenne). Pour chaque condition, les expériences ont été réalisées en duplicata et les comptages ont été faits à l'insu des conditions expérimentales.

6. Apoptose

L'apoptose des CML est mesurée à l'aide d'un kit annexine V-FITC en cytométrie en flux (BD Biosciences). L'apoptose se traduit par la perte de polarité de la membrane plasmique en résidus phosphatidyl-sérine (PS). En effet, à l'état physiologique, les résidus PS sont situés uniquement à l'intérieur de la membrane plasmique. L'annexine V permet le marquage des résidus PS membranaires exprimés sur le côté extracellulaire de la cellule lors de l'apoptose. Les cellules nécrotiques, ou en phase tardive d'apoptose, sont également marquées à l'iodure de propidium (IP). En effet, ces 2 états cellulaires présentent des discontinuités membranaires qui vont permettre à l'iodure de propidium de pénétrer dans la cellule et de s'intercaler dans l'ADN. Ainsi, lors de l'apoptose précoce, les CML sont annexine V + et PI -. Lors de l'apoptose tardive, le PI peut pénétrer dans le noyau, les cellules sont annexine V + et PI +, alors que les CML nécrotiques sont annexine V - et PI +.

Le protocole utilisé est le suivant : 100000 cellules sont suspendues dans 100 µl de tampon annexine (BD bioscience) avec 2 µl d'annexineV couplée au FITC et 5 µl d'iodure de propidium pendant 15 min à l'obscurité. La révélation des cellules à l'aide d'un cytomètre en flux de type FACSCanto (BD biosciences), permet de visualiser dans le canal FL-1 les cellules positives pour l'annexineV FITC et dans le canal FL-2 les cellules positives pour l'iodure de propidium. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules annexine V positives qui reflète les cellules en apoptose et en pourcentage de cellules annexine V positives et PI négatives qui reflète les cellules en phase précoce d'apoptose.

7. Interférence ARN lentivirale

7.1) Généralités

L'étude *in vitro* des fonctions biologiques du PAR-2 était très limitée du fait de l'absence d'agent pharmacologique susceptible d'inhiber spécifiquement le PAR-2. L'inhibition de son expression par l'utilisation de petits ARN double brins interférent de 21 nucléotides (siRNA) a déjà été objectivée dans le laboratoire (269). Cependant, les effets des siRNA sur la CML bronchique sont limités à 24h et ne permettent donc pas d'étudier leur prolifération dont l'étude nécessite 2 à 3 jours. C'est pourquoi une stratégie lentivirale a été mise en place pour permettre une expression stable de siRNA au cours du temps. En effet, l'infection d'une cellule par un lentivirus conduit à l'intégration du génome viral dans la cellule infectée et donc une inhibition stable de la protéine ciblée (270,271).

L'histoire de l'interférence ARN, initialement appelée "gene silencing", a commencé au début des années 90 par la découverte chez la plante, puis dans *c.elegans*, d'un phénomène particulier de défense cellulaire (272-274). En effet, les cellules eucaryotes infectées par des virus à ARN peuvent s'en débarrasser en mettant en place un mécanisme d'interférence ARN. La cellule va répondre à l'entrée de matériel génétique ARN double brins (dsRNA) en activant une cascade de réponses qui vont entraîner la dégradation de l'ARN viral. Les premiers essais pour réactiver la voie de l'interférence ARN dans les cellules de mammifères ont été des échecs. L'introduction de dsRNA de plus de 30 nucléotides activait une réponse antivirale qui menait à la dégradation non spécifique des transcrits d'ARN et à une extinction générale de la traduction dans les cellules hôtes. Ces effets non spécifiques impliquent

l'activation de deux protéines notamment, la protéine kinase R (PKR) et l'interféron gamma (IFN- γ) entraînant des réponses cytotoxiques qui vont aboutir à l'apoptose (275). En 2001, Elbashir et collaborateurs ont démontré que des fragments de 21-23 nucléotides de duplex d'ARN (siRNA) activent efficacement l'interférence ARN *in vitro* (276). En effet, ces siRNA suppriment l'expression de gènes dans différentes lignées cellulaires humaines, comme HEK293 et les cellules HeLa. Cette technique a donc permis de détruire par coupure, les ARNm issus de la transcription d'un gène, et cela de façon spécifique (276-280). C'était le commencement du développement considérable de l'interférence ARN dans plusieurs domaines de la biologie moléculaire, de la génétique ou de la recherche sur le cancer. Ainsi, et comme illustré dans la figure 19 A, les siRNA vont être pris en charge par un complexe multi-protéique ou « RNA Induced Silencing Complex » (RISC) qui va guider le brin antisens du siRNA vers l'ARNm cible (281). Il y a alors hybridation du brin anti-sens du siRNA sur l'ARNm par complémentarité de bases. Cette hybridation va activer des nucléases contenues dans le complexe RISC qui vont alors cliver l'ARNm, rendant sa traduction impossible.

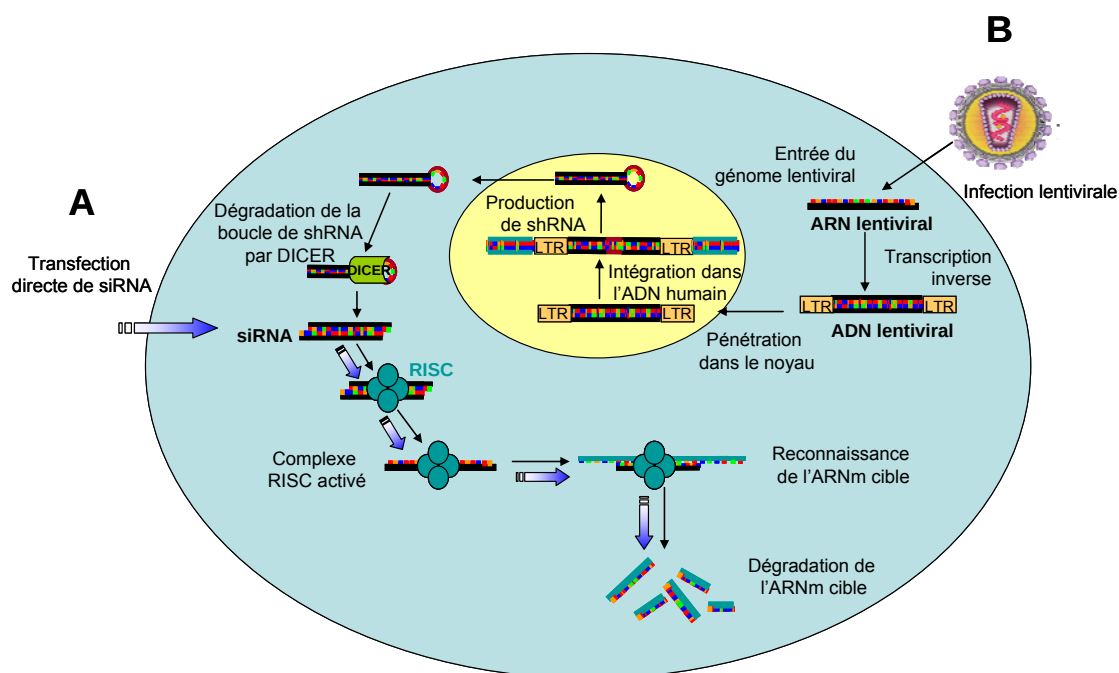


Figure 19 : Mécanismes d'interférence ARN par transfection de siRNA ou production lentivirale de shRNA.

A : Le couplage du siRNA avec le complexe RISC permet la reconnaissance de l'ARNm cible ainsi que sa dégradation par les nucléases présentes au sein de ce complexe. La transfection directe de siRNA (flèche bleue) aboutit elle aussi à une dégradation de l'ARNm cible mais de façon transitoire. B : Après l'entrée du génome lentiviral dans la cellule, la transcriptase inverse permet de convertir l'ARN en ADN en dupliquant la séquence LTR en 3' aux deux extrémités de l'ADN lentiviral (représenté en noir). Après intégration dans le génome humain (représenté en bleu), il s'ensuit la production durable de shRNA qui, dans le cytosol, sont maturés en siRNA par la Dicer. LTR: Long Terminal Repeat, RISC: RNA Induced Silencing Complex, shRNA: Small Hairpin RNA, siRNA: Small Interfering RNA

Cependant, la nature transitoire des siRNA dans la cellule de mammifère constitue un handicap majeur. Pour le contourner, l'équipe de Brummelkamp et d'Agamo a développé en 2002 le premier vecteur d'expression permettant de produire *in situ* des séquences siRNA par la cellule (282). Ainsi, des vecteurs possédant les promoteurs U6 ou H1, recrutent l'ARN polymérase III et permettent la transcription de petites séquences en forme d'épingle à cheveux ou small hairpin RNA (shRNA), des duplex de 19-21 nucléotides. En effet, la technique consiste à faire produire un ARN simple brin contenant 2 séquences

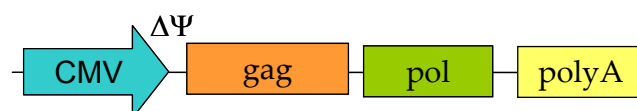
complémentaires et équivalentes à une séquence siRNA. Ces deux séquences complémentaires sont séparées par une courte séquence de 8-9 nucléotides. Lors de la transcription de cet ARN au sein de la cellule, les 2 séquences complémentaires vont s'hybrider et créer une boucle nucléotidique correspondant à la courte séquence séparant les deux séquences complémentaires (Figure 19 B). Cette boucle d'ARN s'avère être un très bon substrat pour une endonucléase nommée Dicer qui permet de cliver la boucle et ainsi de produire des siRNA au sein même de la cellule (Figure 19 B). Comme précédemment, les siRNA ainsi produits sont pris en charge par le complexe RISC entraînant la dégradation de l'ARNm cible.

En parallèle, des vecteurs viraux, essentiellement dérivés de l'adénovirus ou des lentivirus, se sont développés pour imposer une interférence ARN dans des cellules difficilement transfectables ou dans des approches chez l'animal (283). Le lentivirus est un virus de la famille des rétrovirus, à longue période d'incubation et responsable de maladies à évolution lente, notamment du système nerveux central et du système immunitaire. Les lentivirus sont dérivés le plus souvent du VIH ou de son équivalent chez le félin (VIF). La construction des particules lentivirales se fait par 3 différents plasmides afin de produire des particules virales non répliquantes capables d'infecter des cellules et d'intégrer leur matériel génétique d'intérêt, mais incapables de reformer de nouvelles particules virales. Pour cela, les particules lentivirales doivent contenir les protéines virales nécessaires à leur intégration dans la cellule mais ne pas posséder les séquences codantes de ces protéines dans leur génome. C'est le cas des protéines de structure et des protéines d'enveloppe. Des considérations de sécurité et d'éthique doivent être prises en considération pour l'utilisation de cette approche.

7.2) Structure des lentivirus

Trois types de plasmides (Trono Lab) sont utilisés pour générer des lentivirus de type « human immunodeficiency virus » ou HIV pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) (284). Il s'agit du vecteur de structure (pCMV $\Delta\Psi$), du vecteur d'enveloppe de VSV-G (pMD2G-VSVG), et d'un vecteur de transfert permettant le clonage de l'ADNc d'intérêt et/ou produisant le shRNA (pLVTHM). Les constructions plasmidiques de ces trois vecteurs sont présentées dans la figure 20.

1) Vecteur de structure :



2) Vecteur d'enveloppe $\Delta\Psi$



3) Vecteur de transfert :

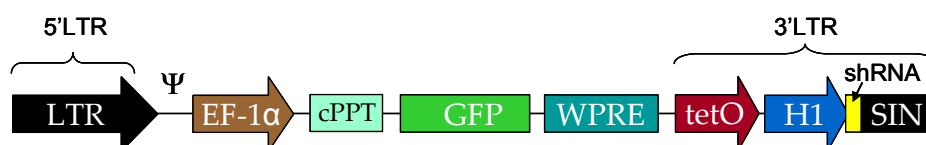


Figure 20 : Constructions plasmidiques des 3 vecteurs utilisés pour la production des particules lentivirales.

EF-1 α : Elongation factor-1 α , *GFP*: Green fluorescent protein, *LTR*: Long terminal repeat, *SIN*: Self inactivated, *TetO*: Tet-operateur, *WPRE*: Woodchuck post-transcriptional regulatory element, *pol*: polymerase, *env*: envelope, Ψ : signal d'encapsidation.

Le vecteur pCMV Δ P8.91 est un vecteur de structure issu du HIV. Il est pourvu d'un promoteur CMV, codant pour les protéines de structure gag, pol, tat et Rev. Il ne contient ni le gène d'enveloppe (Δ Env), ni le signal de packaging ($\Delta\psi$).

Le vecteur pMD2G-VSVG est un vecteur d'enveloppe codant pour l'enveloppe du « vesicular stomatitis virus G » (VSVG). Le promoteur CMV nécessite un signal de terminaison polyA en aval de la séquence codant pour l'enveloppe. Cette enveloppe permet l'entrée du lentivirus dans la plupart des cellules eucaryotes avec une efficacité supérieure à celle de l'enveloppe HIV qui nécessite l'expression d'un récepteur spécifique. Il ne contient ni gène de structure ni signal de packaging ($\Delta\psi$).

Le plasmide pLVTHM est un vecteur de transfert. Ce vecteur est dédié à l'expression de shRNA et d'un gène marqueur. Il s'agit d'un vecteur de transfert de seconde génération de type SIN pour self inactivated (Δ U3) (285). Il est pourvu d'un cPPT (central polypurine tract) qui va permettre une meilleure translocation nucléaire du génome lentiviral, d'une protéine marqueur fluorescente la E-GFP sous la dépendance du promoteur eucaryote EF1 α . À la place de la région U3 du LTR (long terminal repeat) en 3', se trouvent un promoteur spécifique de la pol II (H1) et une séquence shRNA dirigée contre l'ARNm du PAR-2. Ce vecteur ne contient ni gène de structure (Δ gag-pol) ni gène d'enveloppe (Δ env). Il contient par contre le signal de packaging (ψ), qui permettra à la particule lentivirale d'inclure cet ARN lentiviral.

7.3) Le "design" des séquences shRNA

Dans toute approche d'interférence ARN, l'un des problèmes à résoudre est le choix et la spécificité de la séquence siRNA. Le choix et le design des séquences shRNA

spécifiques de l'ARNm du PAR-2 ont été réalisés à l'aide d'outils bioinformatiques actuellement disponibles en libre accès (www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai). Ces outils bioinformatiques ont été adaptés du travail princeps d'Elbashir qui a formulé le premier design des séquences siRNA (276). En effet, pour définir des séquences complémentaires de l'ARNm d'intérêt, ces outils sont basés sur des algorithmes complexes. Ces algorithmes prennent en compte les propriétés thermodynamiques de l'ARNm cible et des siRNA, l'accessibilité des séquences de l'ARNm à inhiber, ainsi que la structure tridimensionnelle de l'ARNm cible offrant des structures linéaires facilement accessibles aux siRNA et d'autres à l'inverse, moins accessibles en forme de boucle. En compilant de nombreux résultats expérimentaux, Ui-Tei et *al.* (286) ont étoffé ces règles : (1) un A ou un U à l'extrémité 5' du brin antisens ; (2) un G ou un C à l'extrémité 5' du brin sens ; (3) une région riche en AU au niveau de l'extrémité 5' du brin antisens ; (4) l'absence de fragment riche en GC. Ces outils bioinformatiques qui ont émergé depuis quelques années, vérifient également l'absence de complémentarité de siRNA proposés avec d'autres ARNm susceptibles d'être produits par la cellule. Dans tous les cas, après le choix de la séquence, une vérification de l'absence d'homologie dans les banques d'ADNc (BLAST) est toujours réalisée (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Plusieurs séquences ont été choisies et produites pour ce travail. Les quatre premières séquences ont été identifiées grâce au logiciel GenScript. Les 9 autres séquences ont été fournies par Open Biosystems et sont déjà introduites dans le vecteur d'intérêt. Les séquences shRNA ainsi choisies sont présentées dans le tableau 9.

A

Séquence 1

5'-A^{CGCGT}CCGTCATCCATGGCAGAAGATCGCTTCAAGAGAGCGATCTTCTGCCATGGATGA/TTTTTGGAAAT^{CGAT}-3'

Séquence 2

5'-A^{CGCGT}CCATTATCACGGCACTTTGTCAA^{TTGATATCCG}TTGACAAAGTGCCGTGATAAT/TTTTTCCAAAT^{CGAT}-3'

Séquence 3

5'-A^{CGCGT}CGTTTCAGCTGAGAAGTGAGTCTTTGATATCCGAGACTCACTTCTCAGCTGAAA/TTTTTCCAAAT^{CGAT}-3'

Séquence 4

5'-A^{CGCGT}CGTTTAGAGGATCTATTGGTTC^{TTGATATCCG}GGAACCAATAGATCCTCTAAA/TTTTTCCAAAT^{CGAT}-3'

B

Séquence 1

TGCTGTTGACAGTGAGCGAAACCACTGTTAAGACCTCCTATAGTGAAGCCACAGATGTATAGGAGGCTTAAACAGTGGTGT
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 2

TGCTGTTGACAGTGAGCGATTCACTTGTTATCTAATACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTATTAGATAACAAGTGAAC
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 3

TGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGGAACCAATAGATCCTCTATAGTGAAGCCACAGATGTATAGAGGATCTATTGGTTCCTGT
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 4

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTGCCTCAGTGTGCAGAGGTAAGTGAAGCCACAGATGTATACCTCTGCACACTGAGGCAGG
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 5

TGCTGTTGACAGTGAGCGACCGAAGTGTCCGCACTGTAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTACAGTGCGGACACTTCGGCT
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 6

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGCACTGTAAAGCAGATGCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGCATCTGCTTACAGTGCGGT
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 7

TGCTGTTGACAGTGAGCGATTGAAGATTGCCTATCACATATAGTGAAGCCACAGATGTATATGTGATAGGCAATCTCAAGT
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 8

TGCTGTTGACAGTGAGCGACAGCTCTTACTCTTCAAGTTCTAGTGAAGCCACAGATGTAGAACTTGAAGAGTAAGAGCTGGT
GCCTACTGCCTCGGA

Séquence 9

TGCTGTTGACAGTGAGCGATAGGATGTGGAACCTGTTAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTAACAGGTTCCACATCCTACT
GCCTACTGCCTCGGA

Tableau 9 : Les séquences shRNA anti-PAR-2 utilisées.

A : Séquences obtenues par le logiciel GenScript, et B : Séquences fournies par Open Biosystems. Les nucléotides surlignés correspondent aux sites de coupure des enzymes de restriction MluI (5') et ClaI (3'). Ceux soulignés sont spécifiques de l'ARNm du PAR-2 humain (sens et antisens), et ceux en gras correspondent aux boucles d'ARN simple brin.

7.4) Production des particules lentivirales

Les deux brins sens et anti-sens de chaque shRNA (Sigma Genosys) ont été hybridés par chauffage à 95 °C durant 5 minutes puis la température est diminuée progressivement jusqu'à environ 30°C. Après digestion de chaque oligonucléotide double brin du plasmide pLVTHM entre les sites Mlu en 5' et ClaI en 3', la T4 DNA Ligase (Invitrogen) a permis leur insertion lors d'une incubation de 2h à température ambiante. Le plasmide vide (sans shRNA) servira de contrôle négatif pour les expériences ultérieures. Les produits de ligation ont été transfectés dans des bactéries compétentes (MAX Efficiency Stbl2, Invitrogen). Ces bactéries ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB (10 g de tryptone (BD), 5 g de Bacto Yeast (BD), 10 g de NaCl, 0,2 ml de NaOH 5M dans 1 l d'eau bidistillée) contenant 2 µl/ml d'ampicilline, pour provoquer une pression de sélection et ainsi permettre la croissance des seules bactéries transfectées. Après purification de plusieurs clones bactériens à l'aide du Kit Miniprep (Qiagen), la présence de la séquence shRNA a été contrôlée par séquençage à l'aide d'une amorce anti-sens (5'-CAGGAAGATGGCTGTGAGG-3') et du Kit Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). La transformation des bactéries hautement compétentes de la souche Stbl2 (Invitrogen) précède un nouveau contrôle de la présence de l'insert.

La production des particules virales est, à ce niveau, prise en charge par la plateforme de vectorologie (INSERM U876). Elle nécessite la transfection de cellules appartenant à la lignée 293T par les trois plasmides lentiviraux : plasmides de structure (10 µg), d'enveloppe VSV-G (4 µg) et de transfert (10 µg) (Figure 21). Après filtration et ajout de 50 µl de dichlorure de calcium (CaCl₂ à 2,5M), les plasmides ont été incubés 3 à 5 min avant d'être

transfectés dans les 293T, dans un milieu de culture sans sérum, à 37° C pendant 8h. Après lavage et incubation de 48h dans un milieu adapté riche en sérum, le surnageant de culture est prélevé, centrifugé (2500 rpm à 4°C pendant 5 min) puis ultracentrifugé (35000 rpm à 4°C pendant 4h) afin de recueillir les particules lentivirales.

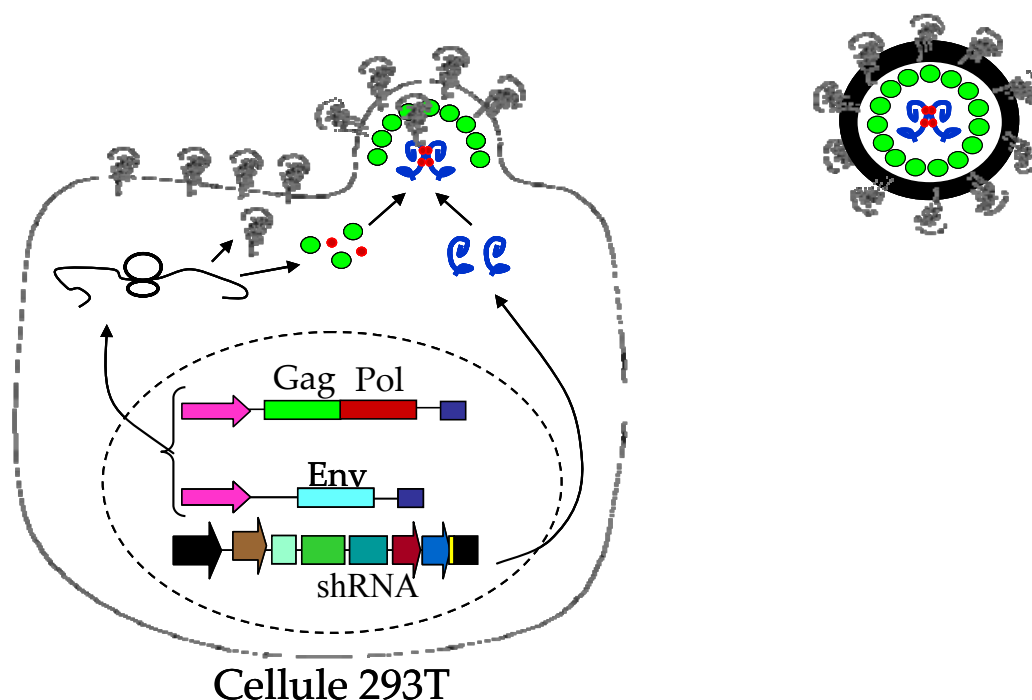


Figure 21 : Production de particules lentivirales dans les cellules 293T.

Production des protéines de structure (gag, Pol), d'enveloppe (Env), et le shRNA

Leur titration a été faite sur les cellules 293T. Pour ce faire, les particules lentivirales diluées dans une gamme de concentrations décroissantes ont permis l'infection de 10^5 cellules/ml en suspension avec du sulfate de protamine. Après 5 jours, le pourcentage de cellules positives pour la GFP en cytométrie en flux (FACS Canto, BD), a permis de déterminer la « Multiplicity of Infection » (MOI) pour chaque lot de particules virales produit. Les particules lentivirales produites ont été alors aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Par ailleurs, une stratégie de surexpression du PAR-2 par infection lentivirale à l'aide du plasmide pCMV-Sport6 contenant l'ADNc du PAR-2, a également été débutée lors de cette thèse mais son efficacité reste à démontrer.

7.5) Infection des CML

Les CML sont recueillies dans une solution de trypsine-EDTA avant d'être comptabilisées grâce à une cellule de Neubauer. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des plaques 12 puits (100 000 cellules / puits) ou 96 puits (2000 cellules / puits), pour les expériences de cytométrie en flux, RT-PCR ou de BrdU respectivement, dans du milieu DMEM complet, auquel a été ajoutée une solution contenant 8 µg/mL de sulfate de protamine (Sigma) qui permet, par son apport de charges ioniques, de rapprocher les membranes virales et cellulaires. Les infections ont été réalisées avec le pLVTHM à des MOI de 3 à 20. Afin d'augmenter les probabilités d'infection, les volumes finaux d'infection ont été adaptés à 250 µl pour les plaques 12 puits et 100 µl pour les plaques 96 puits. L'efficacité de l'infection a été étudiée en cytométrie en flux par l'analyse de la fluorescence de la GFP. Par ailleurs, le nombre de copies d'ADN viral (gène WPRE) intégré dans l'ADN de la cellule hôte a été évalué par PCR quantitative par la plateforme de vectorologie. De plus, l'efficacité de l'interférence ARN lentivirale a été évaluée par l'analyse de l'expression du PAR-2 au niveau protéique et transcriptionnel.

7.6) Interférence ARN conditionnelle

Afin de pallier aux problèmes dus au stress subi par les cellules suite à l'infection lentivirale avec le pLVTHM qui génère les séquences shRNA, la co-infection avec un autre plasmide s'est avérée nécessaire. En effet, le pLVtTRKRAB-Red produit une protéine de fusion tTR-KRAB dont le domaine tTR, se fixe sur le TetO du pLVTHM entraînant ainsi l'inhibition de l'expression des shRNA et de la GFP grâce au domaine KRAB (Figure 22) (283). En présence de doxycycline (Dox), il se produit une levée d'inhibition du KRAB et donc la transcription de la GFP et des shRNA, devient possible. On parle d'interférence lentivirale conditionnelle. Le pLVtTRKRAB exprime une protéine de fluorescence dans le rouge, la ds-Red. Ainsi, la présence de ce plasmide est vérifiée en cytométrie en flux en suivant le niveau d'expression de la ds-Red dans le canal FL-2 du FACS Canto, selon le même procédé que pour le pLVTHM.

7.7) Tri cellulaire

L'intensité de fluorescence de la GFP et de la ds-Red étant faible aux MOI citées précédemment, nous avons eu recours au tri cellulaire. Pour cela, les cellules sont recueillies par trypsinisation puis centrifugées pendant 5min à 4° C. Après remise en suspension des cellules dans 250 µl de PBS stérile, les CML sont triées sur l'expression de la GFP ou de la ds-Red, dans un tube de récolte contenant du milieu de culture, à l'aide d'un trieur FACS (Aria, BD) sur une buse de 100 µm de diamètre. Elles sont par la suite remises en culture. Après quelques semaines, l'efficacité du tri a été vérifiée par cytométrie en flux.

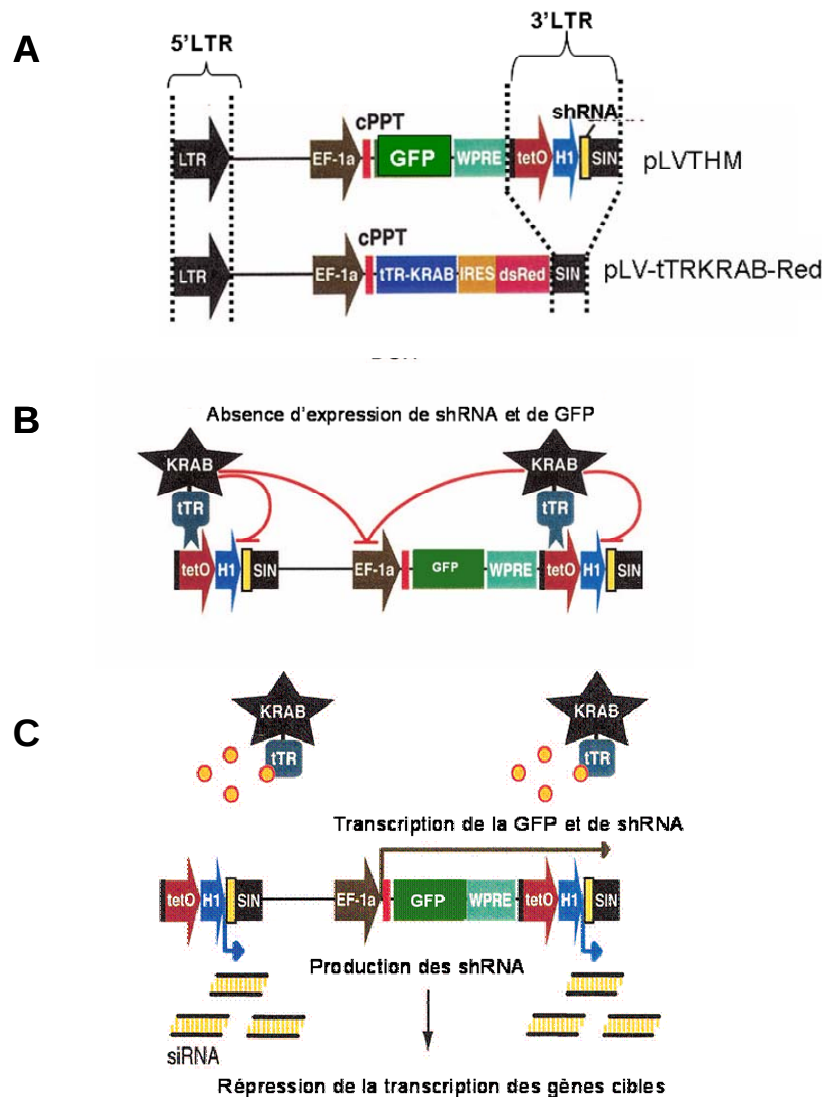


Figure 22 : Modes d'action du contrôle du pLVTHM par le pLVtTRKRAB via la doxycycline.

A : Structure des ARN lentiviraux. Ds-Red: Red Fluorescent Protein, EF-1α: Elongation Factor-1α, GFP: Green Fluorescent Protein, IRES: Internal Ribosomal Entry Site, LTR: Long Terminal Repeat, SIN: Self Inactivated, TetO: Tet-Opérateur, WPRE: Woodchuck Post-transcriptional Regulatory Element. B : En l'absence de Dox, la protéine de fusion tTR-KRAB se fixe sur l'ADN lentiviral au niveau du Tet-opérateur via tTR, inhibant ainsi l'activation des promoteurs du pLVTHM EF1α et H1. C : En présence de Dox, le domaine tTR de la protéine de fusion tTR-KRAB ne peut plus se fixer sur le Tet-opérateur, levant ainsi l'inhibition de KRAB ce qui permet l'activation des promoteurs du pLVTHM. Ainsi, la transcription de shRNA et de GFP par la cellule devient possible. (D'après wiznerowicz et al., 2003 (283)).

8. Immunohistochimie ex vivo

8.1) Inclusion

Cette première étape a été réalisée par le service d'anatomopathologie de l'hôpital Haut-Lévêque. Les échantillons biopsiques sont fixés dans du formol tamponné à 10% puis inclus en paraffine. Les coupes sont réalisées au microtome (4 μ m d'épaisseur).

8.2) Technique de coloration immunohistochimique

Une étape préalable de déparaffinage est nécessaire (3 bains de toluène de 3 min chacun) suivie d'une réhydratation des coupes par passage des sections dans des bains d'alcool décroissants (absolu, 95°, 70°) pour terminer dans l'eau. Une étape de démasquage antigénique par la chaleur est ensuite réalisée dans un tampon citrate pH 6.0 à la cocotte minute pendant 10 min. Ensuite une inhibition des peroxydases endogènes par le sodium azide (0,1%, sigma) en présence d'eau oxygénée (0,3%) pendant 30 min est effectuée. Après lavage au PBS, la saturation des sites de fixation membranaires non spécifiques est réalisée par l'ajout de 10% de BSA (Dako) pendant 30 min. On procède ensuite à la fixation des anticorps primaires de souris ou de rat dirigés contre l' α actine musculaire lisse (Sigma) et YKL-40 (MedImmune) respectivement. Les anticorps irrelevant de même isotype sont également utilisés comme témoins négatifs par une incubation de 30 min à température ambiante. Après rinçage, la méthode du complexe avidine-biotine est alors suivie par l'ajout d'un anticorps secondaire biotinylé de lapin anti-souris ou anti-rat (Dako) pendant 30 min, suivi de la streptavidine-peroxydase biotinylée (Dako) pendant 30 min également.

La réaction est révélée par l'ajout d'un chromogène (diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), Dako) se colorant en brun lors de la présence d'un donneur d'électron (peroxyde d'hydrogène), pendant 5 min. Enfin, une contre-coloration à l'Hématoxyline-Meyer permet de colorer les noyaux en bleu.

8.3) Analyse des résultats

L'intensité du marquage YKL-40 et la surface du muscle lisse ont été évalués à l'aide d'un logiciel de reconnaissance de l'image (Quancoul[®]), basé sur l'analyse des couleurs (287). La surface du muscle lisse bronchique a été normalisée à la surface totale du tissu correspondant et représentée en pourcentage de surface totale. L'intensité de coloration pour chaque anticorps a été exprimée en pourcentage de surface tissulaire positive pour l'anticorps anti-YKL-40.

Chapitre III

Résultats et

discussion

1. Étude du rôle de la chitinase YKL-40 dans la physiopathologie de l'asthme

Comme cela a été précisé en amont, l'une des caractéristiques majeures du remodelage bronchique dans l'asthme est l'augmentation de la masse du muscle lisse (cf Article N°1). De plus, le rôle de la chitinase YKL-40, a récemment été évoqué comme bio marqueur du remodelage dans l'asthme. Cependant, l'implication d'YKL-40 dans la physiopathologie du remodelage musculaire lisse bronchique restait à élucider.

Dans cette optique, l'objectif de ce travail a été d'évaluer les effets d'YKL-40 sur les CML bronchiques dans l'asthme. Pour cela, nous avons inclus dans notre étude, des patients asthmatiques modérés à sévères et des sujets témoins ayant une fonction respiratoire normale.

Dans un premier temps, l'effet d'YKL-40 sur la prolifération des CML a été étudié. À cet égard, YKL-40 augmente le nombre et la synthèse d'ADN des CML en culture. À l'inverse, elle n'a pas d'effet sur l'apoptose des CML. Puis, nous avons montré que cette chitinase entraîne une hypertrophie des CML d'autant plus importante chez l'asthmatique et qu'elle augmente l'expression d'une protéine contractile, l' α -actine musculaire lisse. Par ailleurs, YKL-40 entraîne la migration des CML en culture. Cependant, chez l'asthmatique YKL-40 entraîne uniquement un chimiotactisme alors que chez le témoin, la migration est dirigée à la fois vers le gradient de concentration et de façon aléatoire (chimiokinésie). Enfin, l'expression d'YKL-40 par l'épithélium des patients asthmatiques est positivement corrélée avec la masse du muscle lisse bronchique.

Article n°2:

**Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle
remodeling in asthma**

(En révision à l'Am J Respir Crit Care Med 2010)

Imane Bara, Annaig Ozier, Pierre-Olivier Girodet, Hugues Begueret,
Roland Kolbeck, Anthony Coyle, José-Manuel Tunon de Lara, Roger Marthan
and Patrick berger.

Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma

Imane Bara ^{*,†}, Annaig Ozier ^{*,†,‡}, Pierre-Olivier Girodet ^{*,†,‡}, Hugues Begueret ^{*,†,‡}, Roland Kolbeck [§], Anthony Coyle [§], Jose-Manuel Tunon de Lara ^{*,†,‡}, Roger Marthan ^{*,†,‡}, and Patrick Berger ^{*,†,‡}

^{*}Université de Bordeaux, UB2, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, F-33076 Bordeaux, France. [†]INSERM, U885, F-33076 Bordeaux, France. [‡]CHU de Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Service des Maladies Respiratoires, CIC- P 0005, F-33076 Bordeaux, France. [§] MedImmune, Gaithersburg, MD.

Corresponding author: Pr Patrick Berger, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, INSERM U885. Université Bordeaux 2. 146, Rue Léo-Saignat. 33076 Bordeaux Cedex, France. Telephone: +33 557 57 1694 Fax: +33 557 57 1695. E-mail: patrick.berger@u-bordeaux2.fr

Source of support: This study was supported by a grant from the “Agence Nationale de la Recherche (ANR CES)”, France and the “Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)”, France; Mrs Bara was funded by the “Société de Pneumologie de Langue Française”, France.

Running head: YKL-40 and bronchial smooth muscle remodeling

Descriptor number: 1.4

Word count: 3117

At a glance commentary:

Scientific knowledge on the subject: YKL-40 is expressed by asthmatic epithelium and its serum concentration was both increased and correlated with sub-epithelial membrane thickness in asthma. However, the role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling has not been explored so far.

What this study adds to the field: YKL-40 is more than a simple biomarker in asthma but can be considered as an active player. Indeed, YKL-40 increased bronchial smooth muscle cell proliferation, size and migration. Its epithelial expression was positively correlated with bronchial smooth muscle mass in asthma.

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

Abstract

Rationale: Bronchial remodeling, including increased bronchial smooth muscle (BSM) mass contributes to bronchial obstruction in asthma. However, its mechanisms are complex and remain controversial. Recently, a role of the chitinase 3-like 1 protein (YKL-40) has been evoked in asthma. Indeed, YKL-40 concentration was increased in asthmatic serum, and correlated with asthma severity and sub-epithelial membrane thickness. Nevertheless, the role of YKL-40 on BSM cells remains to be investigated.

Objectives: We aimed to determine whether YKL-40 altered the physiological properties of BSM cells in asthma both *in vitro* and *ex vivo*.

Methods: We enrolled 25 asthmatics and 18 healthy controls. BSM cells were derived from bronchial specimens obtained by either fiberoptic bronchoscopy or lobectomy. All *in vitro* experiments were performed on phenotypically confirmed BSM cells below passages 5. We then assessed cell proliferation using BrdU and cell count, cell size using flow cytometry, cell migration using inserts and phalloidin staining, cell synthesis using ELISA and western blot. We also determined the BSM area and the YKL-40 staining *ex vivo* using immunohistochemistry on biopsies from asthmatics and controls.

Main results: We demonstrated that YKL-40 increased BSM cell proliferation, size and migration. The increased cell size and migration was higher in asthmatic BSM cells than that of controls. Furthermore, YKL-40 epithelial expression was positively correlated with BSM mass in asthma.

Conclusion: This is the first study indicating that YKL-40 is more than a simple biomarker in asthma. YKL-40 altered the physiological properties of BSM cells particularly in asthmatic BSM cells.

Word count: 247

Keywords: Chitinase, proliferation, hypertrophy, migration.

Introduction

Asthma is a very frequent disease that is characterized by both bronchial inflammation and remodeling (1). Bronchial remodeling corresponds to an increased thickening of the bronchial wall due to various structural alterations including abnormal epithelium, sub-epithelial membrane thickening, alteration in extracellular matrix deposition, mucus gland hypertrophy and increased mass of bronchial smooth muscle (BSM) (2). This latter feature has crucial prognostic role in asthma since it correlates with the decrease in lung function (3). However, the mechanisms of the increased BSM mass are complex and remain controversial (2). For instance, increased proliferation of BSM cells (4, 5), increased BSM cell size (6, 7) and/or migration of BSM cells (8) have been proposed as potential mechanisms of BSM remodeling in asthma.

The role of the chitinase-like protein YKL-40 in bronchial remodeling has been recently evoked since its concentration in the serum of asthmatic patients is both increased and correlated with sub-epithelial membrane thickness (9). YKL-40 is secreted by epithelial cells and macrophages particularly in severe asthmatics (9). In addition, a single nucleotide polymorphism of CHI3L1, the gene encoding YKL-40 protein, also called human cartilage glycoprotein [HCgp-39] or chitinase 3-like 1, was associated with both elevated serum YKL-40 levels and asthma (10). These findings could argue for either a causative or a sentinel role of YKL-40 in asthma. However, there are some lines of evidence suggesting a causative role of YKL-40. Indeed, on the one hand, CHI3L1 gene was also associated with both bronchial hyperresponsiveness and reduced lung function in asthma (10), two characteristics which have been related to BSM remodeling (3, 11). On the other hand, YKL-40 has been shown to induce the proliferation of mesenchymal cells such as human chondrocytes, synovial cells, skin or foetal lung fibroblasts

(12) as well as the migration and adhesion of vascular smooth muscle cells (13). More recently, YKL-40 has been implicated in the initiation and effector phases of Th2 inflammation using BRP-39 (*i.e.* the murine homologue of YKL-40) knockout mice and allergen sensitization (14). Nevertheless, with respect to asthma pathophysiology, the effect of YKL-40 on BSM remains largely unknown and thus, the aim of the present study was to determine whether YKL-40 alters the physiological properties of BSM cells in asthma. For this purpose, we have investigated the effects of YKL-40 on cell proliferation, apoptosis, size, migration and synthesis using primary cultured BSM cells from asthmatic patients and control subjects. We have also correlated YKL-40 bronchial expression with BSM mass as a surrogate of bronchial remodeling in asthma.

Material and methods

A detailed description of these methods can be found in the online supplement.

Study populations

A total of 25 patients with mild to severe persistent asthma, and 18 normal controls were prospectively recruited from the “Centre Hospitalier Universitaire (CHU)” of Bordeaux according to the Global Initiative for Asthma (15). All subjects gave their written informed consent to participate to the study, after the nature of the procedure had been fully explained. The study received approval from the local ethics committee. Bronchial specimens from all subjects were obtained by either fiberoptic bronchoscopy or lobectomy, as previously described (5).

Cell culture

Human BSM cells were derived from bronchial specimens as described previously (16, 17). All experiments were performed on phenotypically confirmed BSM cells between passages 2 and 5

as described previously (5). BSM cells were seeded on 96-well plates for BrdU incorporation, on 6-well plates for cell counting, immunoblotting and flow cytometry, on chamber slides for immunocytochemistry, on 25-cm² culture flasks for migration study, or on 24-well plates for ELISA. BSM cells were serum deprived for 24 h and stimulated with YKL-40 (MedImmune) in a time- and/or concentration-dependent manner.

Cell proliferation and apoptosis

Cell proliferation was evaluated using both BrdU incorporation and cell counting as described previously (5). Cell apoptosis was assessed by flow cytometry using FITC-Annexin V kit (BD Biosciences).

Cell size

Cell size was measured by flow cytometry as described previously (18). Briefly, cells were stained with propidium iodide and treated with RNase. G₀/G₁ phase cells were then gated and cell size was determined using forward scatter measurement on FACSCanto[®] (BD Biosciences).

Cell migration

We assessed cell migration as described previously (19). Briefly, the migration of BSM cells against YKL-40 was assayed by using inserts (BD Biosciences) previously coated with collagen IA (Sigma-Aldrich). In addition, chemokinesis was differentiated from chemotaxis by placing attractants at the same concentrations in the upper and/or lower wells. Actin reorganization was assessed using phalloidin as described previously (20).

Cell synthesis

Levels of immunoreactive TGF- β 1, IP-10, IL-8 or SCF were assayed in the cell supernatant by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Immunoblotting was performed on cell protein extracts (21) using primary antibodies (Abs) directed against collagen IA (Santa Cruz), α -smooth muscle actin (α -SMA), or β -actin (both from Sigma-Aldrich).

Immunohistochemistry

Specimens were embedded in paraffin and processed for immunohistochemistry as previously described (5). Primary Abs included mouse anti- α -SMA (Sigma-Aldrich), rat anti-YKL-40 (MedImmune), or appropriate unrelated Ab. The staining intensity of anti-YKL-40 and the area of BSM (positive for anti- α -SMA Ab) were automatically assessed by Quancoul[®] software at a magnification of x400 and x100 respectively (20, 22).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with NCSS 2001[®] software. Values are presented as the mean $\pm$ the SEM. Statistical significance was analyzed by paired/unpaired Wilcoxon tests or Kruskal-Wallis analysis of variance and z test. Spearman's coefficient was used to evaluate the correlation between YKL-40 staining intensity and BSM area. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Study population

The clinical characteristics of all subjects are shown in Table 1. All of the 25 asthmatics were lifelong nonsmokers and received stable treatments, including oral or inhaled corticosteroids and β_2 agonists. None of the asthmatic patients experienced a recent (< 3 mo) exacerbation of the disease. The mean duration of the disease in asthmatic patients was 29 ± 3.7 yr. Of the 18 control subjects who received no treatment, 8 of them were lifelong nonsmokers, whereas 10 were former smokers. As compared to asthmatics, control subjects were not different in terms of age, BMI and FEV-1.

YKL-40 induced BSM cell proliferation

YKL-40 increased the number of BSM cells obtained from control individuals in a time-dependent manner (Figure 1A). This effect was not related to a decreased in cell apoptosis (See Figure E1 in the online data supplement), but to an increased DNA synthesis (Figure 1B). DNA synthesis started at 24 h and preceded the increased cell number which occurred at 48 h. YKL-40-induced BSM cell proliferation also occurred in a concentration-dependent manner with a maximal effect for the concentration of 300 ng/ml (Figure 1C). Such an effect was similar to that induced by an optimal concentration of platelet-derived growth factor (PDGF) (Figure 1C). YKL-40 also increased DNA synthesis in asthmatic BSM cells (Figure 1D) and this effect was quantitatively similar to that of non asthmatic BSM cells.

YKL-40 induced BSM cell hypertrophy

We used flow cytometry to assess the cell size of non proliferating cells (Figure 2A). YKL-40 significantly increased BSM cell size from controls after 48 h stimulation (Figure 2B-C). Such an effect was similar to that induced by both an optimal time and concentration of endothelin 1 (ET-1) (Figure 2C). Whereas ET-1-induced cell hypertrophy was similar in asthmatic and non asthmatic BSM cells, YKL-40-induced cell hypertrophy was significantly larger in asthmatic BSM cells (Figure 2C). YKL-40 also increased α -SMA content in BSM cells from both controls and asthmatics (Figure 2D-F) unlike ET-1 whose effects on α -SMA were restricted to non asthmatic BSM cells only (data not shown). However, YKL-40 did not alter collagen I production (See Figure E2). Moreover, BSM cell hypertrophy did not seem to be related to an autocrin production of TGF- β 1 (See Figure E3).

YKL-40 induced BSM cell migration

We then assessed cell migration up to 24 h incubation. YKL-40 significantly increased the migration of control BSM cells with a maximal effect occurring after 24 h (Figure 3A). This effect was similar to that induced by an optimal time and concentration of PDGF (Figure 3B). However, the effect induced by YKL-40 was significantly larger in asthmatic than in control BSM cells whereas that induced by PDGF was similar in both types of cells (Figure 3B). In addition, the migration induced by YKL-40 was indeed related to chemotaxis and not chemokinesis in asthmatic BSM cells, whereas both chemotaxis and chemokinesis were observed in control BSM cells (Figure 3C). We then analyzed the effect of YKL-40 on BSM cytoskeleton reorganization and cell shape changes using flow cytometry and confocal microscopy. YKL-40 significantly increased F-actin content in both control and asthmatic BSM cells (Figure 3D).

YKL-40 also promoted the development of pseudopods associated with an intense fluorescence (Figure 3E).

Furthermore, YKL-40 did not alter the production of various cytokines known to induce BSM chemotaxis such as IL-8, IP-10 and SCF in control as well as in asthmatic BSM cells (See Figure E4).

YKL-40 expression was correlated with BSM mass in asthma

Finally, we assessed the expression of YKL-40 in bronchial biopsies from moderate to severe asthmatics using immunohistochemistry. Whereas YKL-40 was not expressed by BSM, it was expressed by asthmatic epithelial cells, although at various intensities (Figure 4A-B). In this connection, YKL-40 epithelial expression was higher in severe asthmatics (2.47 ± 0.40 , $n = 10$) as compared to both non severe asthmatics (0.92 ± 0.14 , $n = 5$) and control subjects (0.98 ± 0.27 , $n = 10$, $p = 0.001$, Kruskal-Wallis analysis of variance and z test). More interestingly, with respect to bronchial remodeling, YKL-40 epithelial expression was significantly correlated with the BSM mass in asthmatics (Spearman $r = 0.72$, $p = 0.002$, Figure 4C).

Discussion

In this study, we have demonstrated for the first time that YKL-40 increased BSM cell proliferation, size and migration, and that its epithelial expression is positively correlated with BSM mass in asthma.

These results indicate that YKL-40 is more than a simple biomarker in asthma but can be considered as an active player, at least for BSM remodeling in asthma. In the present

experiments, the optimal concentration of YKL-40 was 300 ng/ml for whatever effect, such as increasing cell proliferation, cell size and cell migration. Such a concentration is in agreement with what has been measured in the serum of asthmatics (9), particularly during exacerbation (23). YKL-40 has been shown to be secreted by both bronchial macrophages and epithelium particularly in severe asthmatics (9) and allergen-sensitized mice (14). Whereas we confirm these findings, at least for epithelial cells we also demonstrate that YKL-40 is not secreted by the BSM *ex vivo*. Moreover, since the epithelial YKL-40 expression was correlated with the BSM mass, it may be suggested that the BSM layer is a target for YKL-40. Incidentally, the present YKL-40 epithelial staining intensity appears lower than that of the Chupp *et al.* study even in severe asthma (9). However, it is noteworthy that we used a rat primary Ab suitable for paraffin-embedded sections whereas, Chupp *et al.* performed their study using a rabbit Ab on frozen sections.

Regarding BSM cell proliferation, the effect induced by YKL-40 was quantitatively similar to that induced by PDGF which is one of the most potent proliferating growth factor (24). It is now well accepted that BSM cell proliferation in response to foetal calf serum is increased in asthma as compared to both controls and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients (4, 5, 25, 26). To the best of our knowledge, asthmatic BSM cell proliferation in response to alternative agonists had never been studied in response to other agonists. In our study, the increased proliferation of BSM cells induced by YKL-40 was similar in controls and asthmatics. Similar findings have been obtained using PDGF (data not shown).

We also analyzed the effect of YKL-40 on cell size and compared its effect to that induced by another widely studied agonist *i.e.* ET-1. We paid a special attention to limit cell size analysis to

non proliferating cells as described previously (27). Both YKL-40 and ET-1 increased BSM cell size from controls at the same level. More interestingly, the effect induced by YKL-40 was enhanced in BSM cells from asthmatic subjects, whereas that induced by ET-1 was unchanged. The mechanism of this enhanced effect of YKL-40 in asthmatic BSM cells has not been explored so far, but definitely requires further studies. Anyhow, this is the first report regarding agonist-induced alteration in BSM cell size in asthmatic samples.

To date, few studies have evaluated the migration of non asthmatic BSM cells (2). Here we demonstrate that, YKL-40 increases the migration of BSM cells, to amplitude similar to that of PDGF. It was the first time that BSM migration was compared between asthmatic and non asthmatic cells. Moreover, the YKL-40 induced effect was amplified in asthmatic BSM cells, whereas that of PDGF was unchanged. These findings suggest that YKL-40 is more potent in asthma. In addition, the mechanism appears to be different in asthmatic and non asthmatic BSM cells. Indeed, in asthmatic BSM cells, the effect of YKL-40 is likely to be restricted to chemotaxis. Thus, because of such difference it seems important to specifically use asthmatic BSM cells when evaluating new agonists or testing the efficacy of new drugs (2).

The mechanism by which YKL-40 mediates its biological effects remains largely unknown. YKL-40 binds chitin but lacks chitinase activity (28). However, mammals including human do not produce chitin (28). Chitin, a polymer of N-acetylglucosamine, is the second most abundant polysaccharide in nature. It is found in the exoskeleton of crustaceans and insects, the walls of fungi, and the microfilarial sheath of parasitic nematodes (28). Anyway, a role for YKL-40 has been suggested in inflammation and tissue remodeling particularly in asthma (9), but also in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, breast or lung cancer, and hepatic fibrosis (28). In this study,

we demonstrate that YKL-40 alters various physiological properties of BSM cells. However, the receptor of YKL-40 has not been identified. Amongst several hypothesis, exogenous chitinase, such as *S. griseus*, has been shown to activate the subtype 2 of protease activating receptor (PAR-2) within bronchial epithelial cells (29). Although PAR-2 would represent an attractive target since it has already been implicated in asthma pathophysiology, further studies are required to precisely identify cell mechanisms of YKL-40-induced effects on BSM cells.

Acknowledgements

The authors thank J. M. Vernejoux for performing the fiberoptic bronchoscopy, the staff of “Service de Chirurgie Thoracique” for the supply of human lung tissue and J. Cattiaux for technical assistance.

References

1. Tobin, M. J. 2001. Asthma, airway biology, and allergic rhinitis in AJRCCM 2000. *Am J Respir Crit Care Med* 164(9):1559-80.
2. Bara, I., A. Ozier, R. Marthan, J. M. Tunon de Lara, and P. Berger. 2010. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J* 36: *In press*.
3. Kaminska, M., S. Foley, K. Maghni, C. Storness-Bliss, H. Coxson, H. Ghezzi, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, Q. Hamid, and J. Martin. 2009. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 124(1):45-51 e1-4.
4. Johnson, P. R., M. Roth, M. Tamm, M. Hughes, Q. Ge, G. King, J. K. Burgess, and J. L. Black. 2001. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164(3):474-7.
5. Trian, T., G. Benard, H. Begueret, R. Rossignol, P. O. Girodet, D. Ghosh, O. Ousova, J. M. Vernejoux, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2007. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204(13):3173-81.
6. Benayoun, L., A. Druilhe, M. C. Dombret, M. Aubier, and M. Pretolani. 2003. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167(10):1360-8.
7. Begueret, H., P. Berger, J. M. Vernejoux, L. Dubuisson, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 2007. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 62(1):8-15.
8. Kaur, D., R. Saunders, P. Berger, S. Siddiqui, L. Woodman, A. Wardlaw, P. Bradding, and C. E. Brightling. 2006. Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand

19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174(11):1179-88.

9. Chupp, G. L., C. G. Lee, N. Jarjour, Y. M. Shim, C. T. Holm, S. He, J. D. Dziura, J. Reed, A. J. Coyle, P. Kiener, M. Cullen, M. Grandsaigne, M. C. Dombret, M. Aubier, M. Pretolani, and J. A. Elias. 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 357(20):2016-27.

10. Ober, C., Z. Tan, Y. Sun, J. D. Possick, L. Pan, R. Nicolae, S. Radford, R. R. Parry, A. Heinzmann, K. A. Deichmann, L. A. Lester, J. E. Gern, R. F. Lemanske, Jr., D. L. Nicolae, J. A. Elias, and G. L. Chupp. 2008. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 358(16):1682-91.

11. Lambert, R. K., B. R. Wiggs, K. Kuwano, J. C. Hogg, and P. D. Pare. 1993. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol* 74(6):2771-81.

12. Recklies, A. D., C. White, and H. Ling. 2002. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 365(Pt 1):119-26.

13. Nishikawa, K. C., and A. J. Millis. 2003. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 287(1):79-87.

14. Lee, C. G., D. Hartl, G. R. Lee, B. Koller, H. Matsuura, C. A. Da Silva, M. H. Sohn, L. Cohn, R. J. Homer, A. A. Kozhich, A. Humbles, J. Kearley, A. Coyle, G. Chupp, J. Reed, R. A. Flavell, and J. A. Elias. 2009. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 206(5):1149-66.

15. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). (2009). Available from: <http://www.ginasthma.org>.
16. Berger, P., J. M. Tunon-de-Lara, J. P. Savineau, and R. Marthan. 2001. Tryptase-induced PAR-2-mediated Ca^{2+} signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91(2):995-1003.
17. Trian, T., P. O. Girodet, O. Ousova, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2006. RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(1):49-55.
18. Zhou, L., J. Li, A. M. Goldsmith, D. C. Newcomb, D. M. Giannola, R. G. Vosk, E. M. Eves, M. R. Rosner, J. Solway, and M. B. Hershenon. 2004. Human bronchial smooth muscle cell lines show a hypertrophic phenotype typical of severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 169(6):703-11.
19. Marone, R., D. Hess, D. Dankort, W. J. Muller, N. E. Hynes, and A. Badache. 2004. Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* 6(6):515-22.
20. El-Shazly, A., P. Berger, P. O. Girodet, O. Ousova, M. Fayon, J. M. Vernejoux, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 2006. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176(3):1860-8.
21. Girodet, P. O., A. Ozier, T. Trian, H. Begueret, O. Ousova, J. M. Vernejoux, P. Chanez, R. Marthan, P. Berger, and J. M. Tunon de Lara. 2010. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 65(8):1004-12.
22. Berger, P., J. Lavalley, R. Rouiller, F. Laurent, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 1999. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 14(6):1394-402.

23. Tang, H., Z. Fang, Y. Sun, B. Li, Z. Shi, J. Chen, T. Zhang, and Q. Xiu. 2010. YKL-40 in asthmatic patients, and its correlations with exacerbation, eosinophils and immunoglobulin E. *Eur Respir J* 35(4):757-60.
24. Hirst, S. J. 1996. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* 9(4):808-20.
25. Roth, M., P. R. Johnson, P. Borger, M. P. Bihl, J. J. Rudiger, G. G. King, Q. Ge, K. Hostettler, J. K. Burgess, J. L. Black, and M. Tamm. 2004. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 351(6):560-74.
26. Mahn, K., S. J. Hirst, S. Ying, M. R. Holt, P. Lavender, O. O. Ojo, L. Siew, D. E. Simcock, C. G. McVicker, V. Kanabar, V. A. Snetkov, B. J. O'Connor, C. Karner, D. J. Cousins, P. Macedo, K. F. Chung, C. J. Corrigan, J. P. Ward, and T. H. Lee. 2009. Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26):10775-80.
27. Deng, H., M. B. Hershenson, J. Lei, K. N. Bitar, D. C. Fingar, J. Solway, and J. K. Bentley. 2009. p70 Ribosomal S6 Kinase is Required for Airway Smooth Muscle Cell Size Enlargement but not Increased Contractile Protein Expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
28. Elias, J. A., R. J. Homer, Q. Hamid, and C. G. Lee. 2005. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116(3):497-500.
29. Hong, J. H., J. Y. Hong, B. Park, S. I. Lee, J. T. Seo, K. E. Kim, M. H. Sohn, and D. M. Shin. 2008. Chitinase activates protease-activated receptor-2 in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(5):530-5.

Legends for illustrations

Figure 1. YKL-40 induced BSM cell proliferation

BSM cell proliferation was measured using cell counting (A), in the absence (white triangles) or in the presence (white circles) of 300 ng/ml YKL-40. DNA synthesis was measured using BrdU incorporation, (B) in a time dependent manner using YKL-40 at 300 ng/ml, or (C) in a concentration dependant manner, and (D) in BSM cells from both controls and asthmatics. BSM cells were obtained from control subjects (white symbols and columns; n = 6) or asthmatics (black columns; n = 5). PDGF at the concentration of 10 ng/ml (gray column) was used as a positive control. Data are the mean $\pm$ SEM. *, $p < 0.05$ *versus* unstimulated condition within a population using paired Wilcoxon tests.

Figure 2. YKL-40 induced BSM cell hypertrophy

BSM cell size was assessed using flow cytometry. (A) A representative dot plot of propidium iodide weight (PI-W) against propidium iodide area (PI-A) illustrates how G₀/G₁ BSM cells are gated. (B) A representative histogram illustrates the distribution of forward scatter (FSC) within unstimulated (gray line) or YKL-40-stimulated (black line) asthmatic BSM cells. (C) The mean percentage increase in FSC was calculated in the presence of YKL-40 (300 ng/ml) or ET-1 (10 nM) as compared to unstimulated cells. (D) α -smooth muscle actin (SMA) content was assessed using western blot and normalized by β -actin content in unstimulated (unS) or YKL-40 stimulated BSM cells. BSM cells were obtained from control subjects (white columns, n = 5 (C) or n = 7 (D)) or asthmatics (black columns, n = 6 (C-D)). Data are the mean $\pm$ SEM. *, $p < 0.05$ *versus* unstimulated condition within a population using paired Wilcoxon tests. #, $p < 0.05$ between asthmatic and control populations using unpaired Wilcoxon tests. (E-F) α -SMA content

was visualized (green) by confocal microscopy (nuclei stained in blue), in control (E) and asthmatic (F) representative BSM cells, either unstimulated (unS) or stimulated with YKL-40. Bars represent 40 μm .

Figure 3. YKL-40 induced BSM cell migration

Control BSM cell migration was measured using inserts, in a time-dependent manner (A), in the absence (white triangles) or in the presence (white circles) of 300 ng/ml YKL-40 ($n = 4$). BSM cell migration was also assessed after 24 h (B-C) in control subjects (white columns, $n = 6$) and in asthmatics (black columns, $n = 6$) in the absence (unS) or in the presence of YKL-40. PDGF was used as a positive control. Bars represent the average number of migrated cells per mm^2 . Chemokinesis and chemotaxis were evaluated by placing YKL-40 in the upper and/or in the lower wells, (C)). Data are the mean $\pm$ SEM. *, $p < 0.05$ *versus* unstimulated condition within a population using paired Wilcoxon tests. #, $p < 0.05$ between asthmatic and control populations using unpaired Wilcoxon tests. (D) Phalloidin-FITC content was quantified by FACS in control (white symbols) or asthmatic (black symbols) BSM cells cultured in the absence (triangles) or in the presence of 300 ng/ml YKL-40 (circles). (E-F) Phalloidin-FITC content was visualized by confocal microscopy, in asthmatic BSM cells unstimulated (E) or stimulated with YKL-40 (F). Arrows represent pseudopods. Bars represent 50 μm .

Figure 4. Epithelial YKL-40 expression is positively correlated with BSM mass

(A-B) Optic microscopic views of representative specimen, obtained from a moderate (A) and a severe (B) asthmatic. Sections were stained in brown with anti-human YKL-40 (original magnification: $\times 400$, scale bars = 50 μm). (C) Correlation between YKL-40 epithelial expression

and BSM area in asthmatic subjects ($n = 15$). The r represents the Spearman correlation coefficient.

Table 1. Clinical and functional characteristics of subjects

Characteristics	Patients with asthma	Controls
No. of patients	25	18
Age		
Year	42.5 ± 3.6	52.3 ± 4.0
Range	[20-73]	[18-72]
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 1.5	27.0 ± 1.5
Treatments		
LABA (no. of patients)	15	0
ICS (no. of patients)	20	0
OCS (no. of patients)	4	0
FEV ₁		
Liters	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.1
% of predicted value	84.0 ± 4.0	94.8 ± 4.8
FEV ₁ : FVC ratio (% FVC)	72.0 ± 2.3	76.2 ± 2.5
FEF 25-75		
Liters per second	2.3 ± 0.3	2.7 ± 0.3
% of predicted value	57.2 ± 6.0	76.2 ± 7.9

Data are mean ± SEM. BMI: body mass index. LABA: long-acting β₂ agonist. ICS: inhaled corticosteroid. OCS: oral corticosteroid. FEV₁: forced expiratory volume in one second. FVC: forced vital capacity. FEF 25-75: forced expiratory flow between 25 and 75% of FVC.

Figure 1

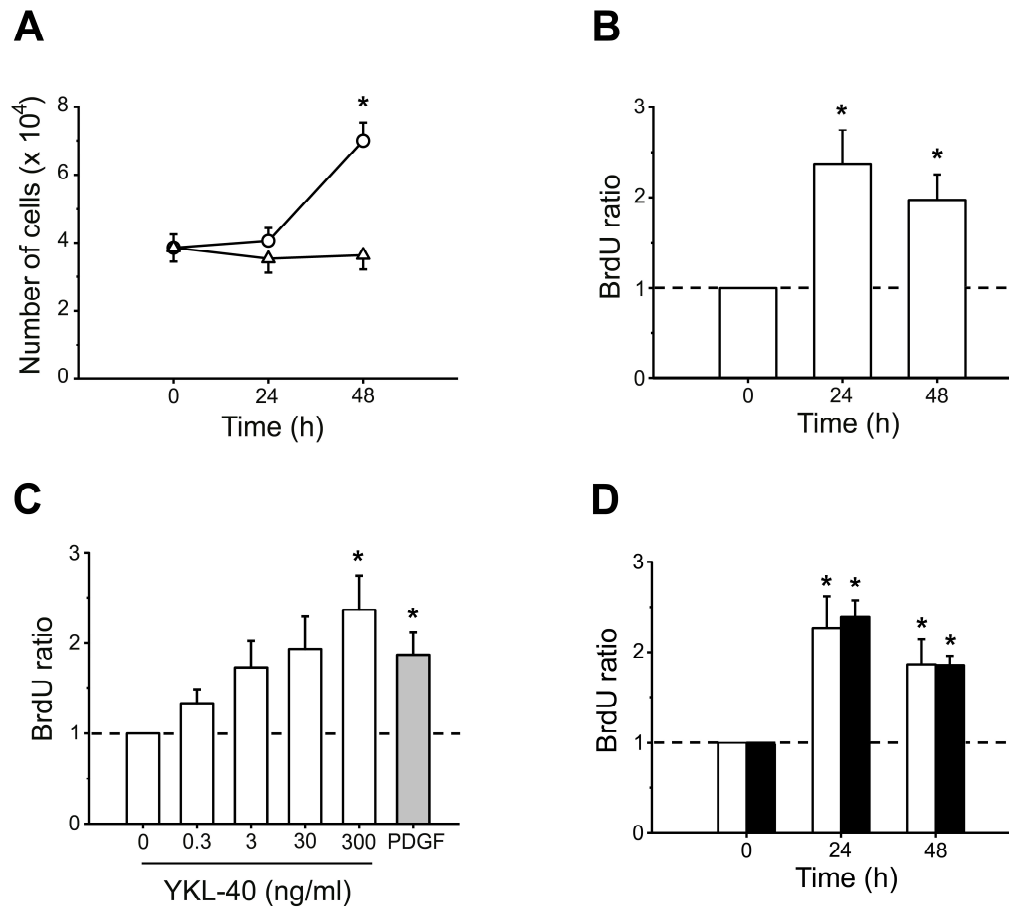


Figure 2

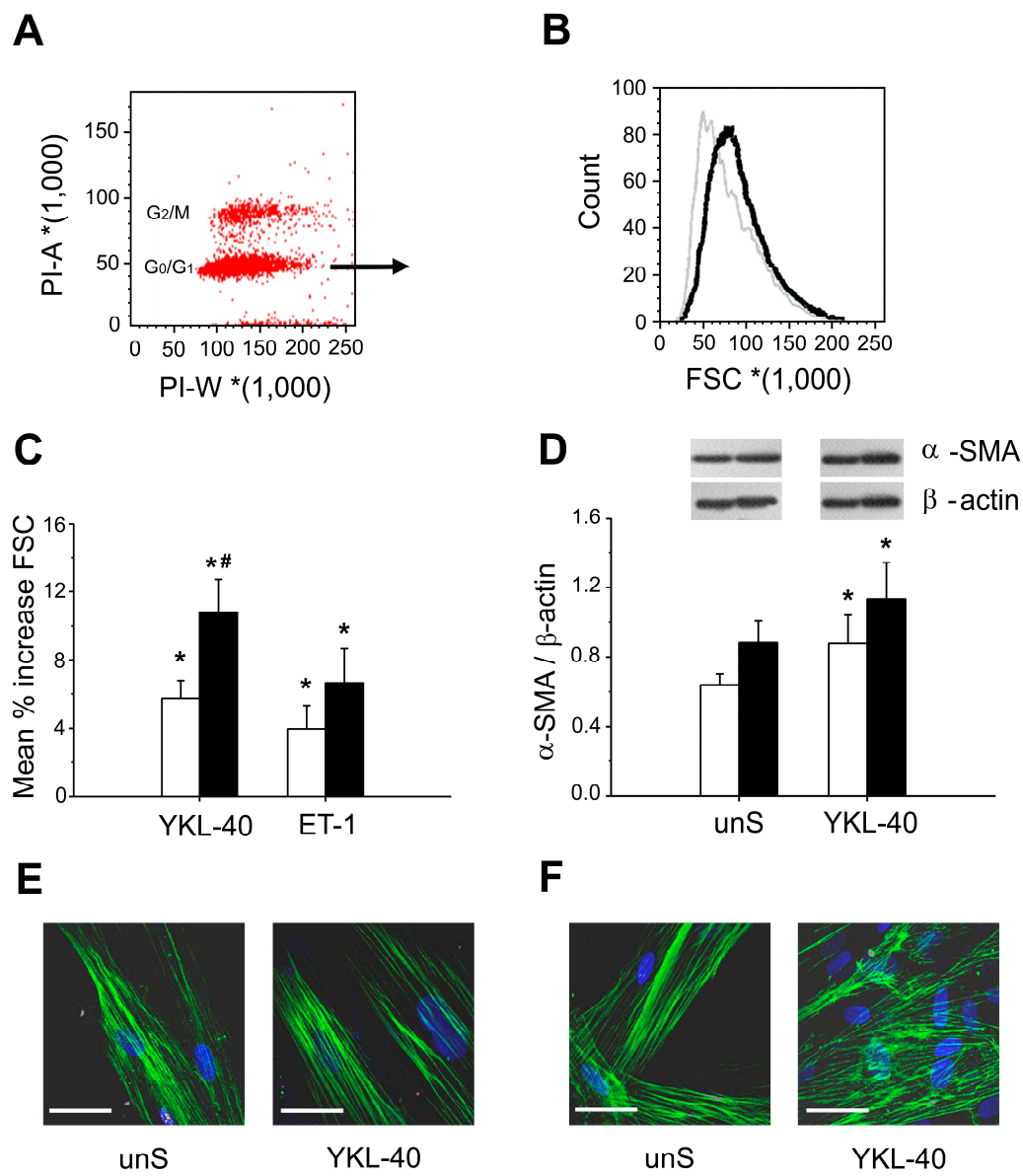


Figure 3

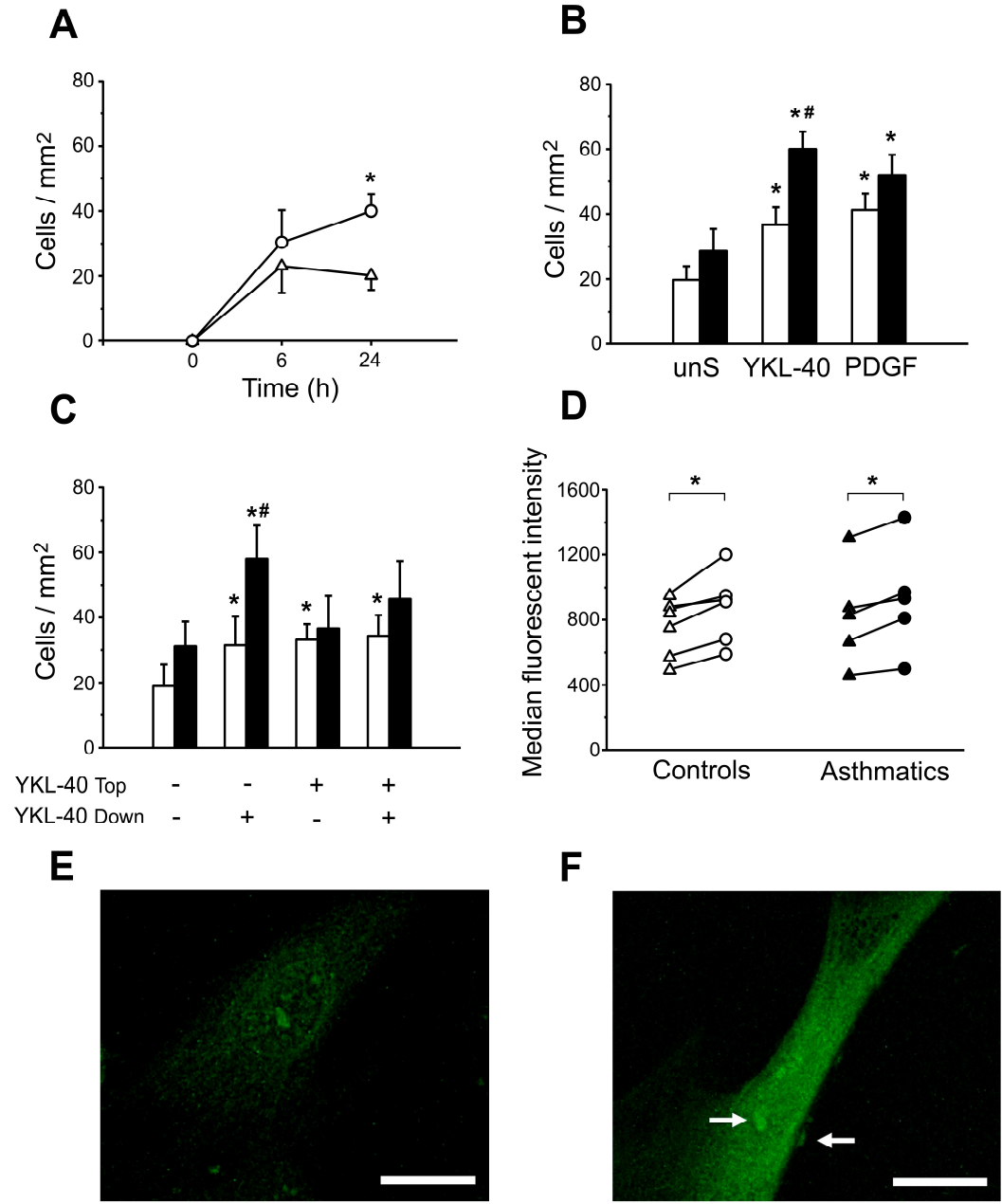
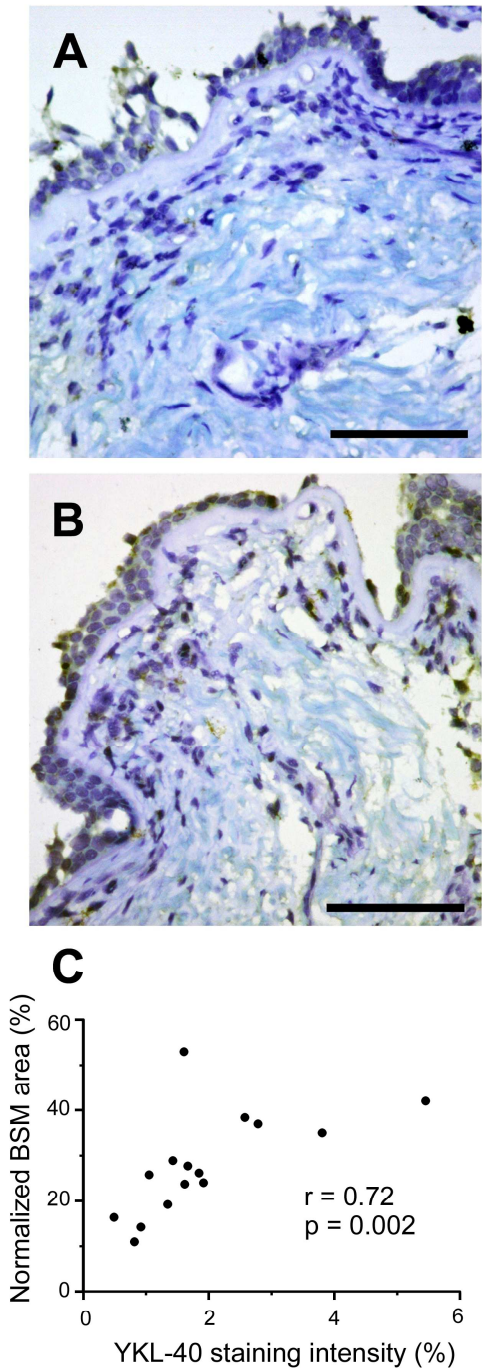


Figure 4



Online Data Supplements

Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma

Imane Bara, Annaig Ozier, Pierre-Olivier Girodet, Hugues Begueret, Roland Kolbeck, Anthony Coyle, Jose-Manuel Tunon de Lara, Roger Marthan, and Patrick Berger

Supplemental material and methods

Study populations

A total of 25 patients with mild to severe persistent asthma, and 18 normal controls were prospectively recruited from the “Centre Hospitalier Universitaire (CHU)” of Bordeaux according to the Global Initiative for Asthma (E1). All subjects gave their written informed consent to participate in the study, after the nature of the procedure had been fully explained. The study followed recommendations outlined in the Helsinki Declaration and received approval from the local ethics committee. Bronchial specimens from all subjects were obtained by either fiberoptic bronchoscopy or lobectomy, as previously described (E2).

Cell culture

Human bronchial smooth muscle (BSM) cells were derived from bronchial specimens as described previously (E3, E4). Cells were cultured and maintained in DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 10% (v/v) FCS (Invitrogen) and 4.5 g/L glucose, supplemented with 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 0.25 mg/ml amphotericine B (antimycotic/antibiotic solution; all from Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, and 1% (vol/vol) nonessential amino acid mixture (both from Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France).

The medium was changed every 48–72 h. After 6–8 wk, confluent cells were rinsed twice with HBSS and passaged with trypsin-EDTA (both from Invitrogen). To assess purity of the cells, an immunofluorescence technique was performed using both immunocytochemistry and flow cytometry. Cells of varying passage number were growth arrested by incubating the cells with serum-free DMEM for 48 h.

For immunocytochemistry, cells were rinsed twice in PBS and fixed with cold methanol for 20 min. Nonspecific staining was blocked using PBS containing 3% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 30 min. Monoclonal antibodies (Abs) diluted in PBS with 1% BSA, including anti- α -smooth muscle actin (α -SMA), anti-smooth muscle myosin and anti-cytokeratin 18 (all from Sigma-Aldrich) were incubated for 1 h. Control slides were treated similarly, using an unrelated Ab (mouse IgG; Sigma-Aldrich). After rinsing with PBS containing 0.05% Tween20 (Sigma-Aldrich), the cells were incubated for 1 h with FITC-conjugated anti-mouse IgG Ab (Dako, Trappes, France). Slides were mounted with a drop of fluorescent mounting medium (Dako) and observed under a fluorescence microscope (Nikon, Paris, France).

For flow cytometry, cells were harvested, fixed and permeabilized in 4% paraformaldehyde, 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) for 15 min on ice. Cells were then labelled with either mouse monoclonal α -SMA Ab indirectly labelled with a FITC-conjugated secondary Ab or a rabbit monoclonal anti-calponin Ab indirectly labelled with phycoerythrin-conjugated secondary Ab. Fluorescence intensity was compared with appropriate isotype control Ab. Analysis was performed using a double colour flow cytometry on a FACSCanto[®] (BD Biosciences, Pont de Claix, France).

Depending on the experiments, cells with a confirmed BSM phenotype were seeded on coverslips, chamber slides, 75-cm² culture flasks, and 6-, 12-, or 96-well plates. Only cells at passage 2 to 5 were used for this study.

Cell proliferation

Cell proliferation was evaluated using both BrdU incorporation and cell counting as described previously (E2). Regarding BrdU, BSM cells were growth-arrested as described above in 96-well plates for 24 h and stimulated with 10% FCS, platelet-derived growth factor (PDGF) or 0 to 300 ng/ml YKL-40 for 24 to 48 h. Control BSM cells remained in serum-deprived DMEM. DNA synthesis was measured using the BrdU kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). Briefly, BSM cells were incubated with 10 μ M BrdU for 24 h at 37°C. Cells were fixed and denaturized for 30 min at room temperature and incubated with the anti-BrdU Ab for 2 h at room temperature. Absorbance was measured at 370 nm in a microplate reader in triplicate. Results were expressed as a normalized ratio of BrdU incorporation, *i.e.* absorbance for test condition divided by absorbance for control serum-deprived condition. Regarding cell counting, 2.10⁴ BSM cells were seeded in 6-well plates. After 72 h, growth was arrested for 24 h as described above. BSM cells were then challenged with 300 ng/ml of YKL-40 for 0 to 48 h. BSM cells were then harvested and counted. Results were expressed as absolute cell number.

Cell apoptosis

Cell apoptosis was assessed by flow cytometry (FACSCanto[®]) using FITC-Annexin V kit (BD Biosciences). Briefly, cells were collected and stained with FITC-Annexin V and propidium

iodide for 15 min. Results were expressed as the percentage of FITC-Annexin V positive cells and Propidium iodide negative cells (early apoptotic cells) and FITC-Annexin V (apoptotic cells).

Cell size

Cell size was measured by flow cytometry as described previously (E5). Briefly, cells were stained with propidium iodide and treated with RNase. G₀/G₁ phase cells were then gated and cell size was determined using forward scatter measurement on FACSCanto[®].

Both immunoblotting and immunocytochemistry were also performed to determine if YKL-40 altered α -SMA expression. After 48 h challenge with 300 ng/ml YKL-40, BSM cells were rinsed in PBS, and immunoblotting was performed on cell protein extracts as described previously (E6). Whole lysates from BSM cells were collected using 1% Triton X-100 lysis buffer in the presence of 2 mM Na orthovanadate, 1 mM EDTA, 50 μ g/ml aprotinin, 100 μ M leupeptin, 1 mM 1,4 Dithio-DL-Treitol, and 1 mM amino-ethyl-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (all from Sigma-Aldrich). Cellular extracts were reduced with mercaptoethanol, subjected to electrophoresis on a 10% acrylamide reducing gel, and transferred to PVDF membranes (Immobilon TM-P; Millipore, Molsheim, France). The immunoblots were then developed using mouse anti-human α -actin (Sigma-Aldrich) and, after stripping, mouse anti-human β -actin (Sigma-Aldrich) for 14 h at 4°C. For amplification, biotinylated goat secondary Ab anti-mouse IgG (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) for 2 h at room temperature and a streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Dako) were used. Immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence (Uptima, Montluçon, France). Blot images were acquired using BioCaptMW (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), and band densities were quantified using ImageJ[®] software.

After 48 h challenge with 300 ng/ml YKL-40, BSM cells were rinsed in PBS, fixed in cold methanol and then processed as described above using mouse anti-human α -SMA (Sigma-Aldrich) or isotype control Ab. Confocal differential interference-contrast images were obtained using a Fluoview laser scanning microscope (Nikon) and x60 oil immersion objective. Z-series sections were recorded in successive z-axis serial sections at 0.5- μ m intervals and were composed of optical sections in the x-y optical plane. Sections were reconstituted in three-dimensional (3D) images using Imaris[®] software (Bitplane, Zurich, Switzerland).

Cell migration

We assessed cell migration as described previously (E7). Briefly, the migration of BSM cells against YKL-40 was assayed by using inserts (BD Biosciences), previously coated with collagen IA (Sigma-Aldrich). In addition, chemokinesis was differentiated from chemotaxis by placing attractants at the same concentrations in the upper and/or lower wells. Actin reorganization was assessed using phalloidin-FITC as described previously (E8). Following 15 min to 3 h incubation with YKL-40, BSM cells were harvested and then fixed in paraformaldehyde 4% for 20 min and permeabilized with 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) for another 30 min. The cells were then stained with phalloidin-FITC (Sigma-Aldrich) for 45 min at room temperature, and analyzed by FACS. Similar phalloidin-FITC experiments were performed using adherent BSM cells and confocal microscopy (E8).

Cell synthesis

Levels of immunoreactive transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), IFN-inducible protein-10 (IP-10), interleukin-8 (IL-8) or stem cell factor (SCF) were assayed in the cell supernatant by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Abingdon Oxon, UK).

As described above, immunoblotting was also performed on cell protein extracts using primary Abs directed against human collagen IA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or β -actin (Sigma-Aldrich).

Immunohistochemistry

Specimens were embedded in paraffin and processed for immunohistochemistry as previously described (E2). After deparaffinization, rehydration through graded alcohols, and heated antigen retrieval, endogenous peroxidase was inhibited using a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide for 30 min, followed by two rinses in PBS (Invitrogen). Nonspecific staining was blocked using 10% BSA (Dako) for 30 min. Primary Abs included mouse anti- α -SMA (Sigma-Aldrich), rat anti-YKL-40 (MedImmune, Gaithersburg, MD), or appropriate unrelated Ab and were incubated for 30 min. After rinsing in PBS, biotinylated rabbit anti-mouse F(ab')₂ or anti-rat IgG (Dako) was applied to the sections for 30 min, followed by the streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Dako) for an additional 30 min. After rinsing in PBS, 1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako), plus 0.02% hydrogen peroxide for 5 min, were used as substrate to develop a peroxide-dependent brown color reaction at room temperature. Finally, the sections were rinsed and counterstained with Mayer's hematoxylin.

There was assessable BSM in the bronchial specimens from 15 asthmatics, and 10 controls. The staining intensity of anti-YKL-40 and the area of BSM (positive for anti- α -SMA Ab) were automatically assessed by Quancoul[®] software at a magnification of x400 and x100 respectively (E8, E9). This BSM area was normalized by the whole area of the corresponding tissues and

presented as percentages of whole area. Staining intensity was expressed as percentage of a tissue area positive for an Ab.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with NCSS software (NCSS 2001[®]; NCSS Statistical software, Kaysville, Utah). Values are presented as the mean $\pm$ the SEM. Statistical significance was analyzed by paired/unpaired Wilcoxon tests or Kruskal-Wallis analysis of variance and z test. Spearman's coefficient was used to evaluate the correlation between YKL-40 staining intensity and BSM area. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Supplemental References

- E1. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). (2009). Available from: <http://www.ginasthma.org>.
- E2. Trian, T., G. Benard, H. Begueret, R. Rossignol, P. O. Girodet, D. Ghosh, O. Ousova, J. M. Vernejoux, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2007. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204(13):3173-81.
- E3. Berger, P., J. M. Tunon-de-Lara, J. P. Savineau, and R. Marthan. 2001. Tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91(2):995-1003.
- E4. Trian, T., P. O. Girodet, O. Ousova, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2006. RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(1):49-55.

- E5. Zhou, L., J. Li, A. M. Goldsmith, D. C. Newcomb, D. M. Giannola, R. G. Vosk, E. M. Eves, M. R. Rosner, J. Solway, and M. B. Hershenson. 2004. Human bronchial smooth muscle cell lines show a hypertrophic phenotype typical of severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 169(6):703-11.
- E6. Girodet, P. O., A. Ozier, T. Trian, H. Begueret, O. Ousova, J. M. Vernejoux, P. Chanez, R. Marthan, P. Berger, and J. M. Tunon de Lara. 2010. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 65(8):1004-12.
- E7. Marone, R., D. Hess, D. Dankort, W. J. Muller, N. E. Hynes, and A. Badache. 2004. Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* 6(6):515-22.
- E8. El-Shazly, A., P. Berger, P. O. Girodet, O. Ousova, M. Fayon, J. M. Vernejoux, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 2006. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176(3):1860-8.
- E9. Berger, P., J. Lavallee, R. Rouiller, F. Laurent, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 1999. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 14(6):1394-402.

Legends for supplemental figures

Figure E1. YKL-40 has no effect on BSM cell apoptosis

Cell apoptosis was assessed by flow cytometry using FITC-Annexin V against propidium iodide staining. BSM cells were obtained from control subjects (white columns, n = 4) or asthmatics (black columns, n = 4). (A) The early apoptosis was determined using the percentage of both Annexin V-positive and propidium iodide negative cells. (B) Total apoptosis was determined using the percentage of Annexin V-positive cells. Data are the mean $\pm$ SEM. (p values were not statistically significant).

Figure E2. YKL-40 has no effect on collagen I content

Collagen I content was assessed using western blot in unstimulated (unS) or YKL-40-stimulated BSM cells. BSM cells were obtained from control subjects (white columns; n = 5) or asthmatics (black columns; n = 5). Data are the mean $\pm$ SEM. (p values were not statistically significant).

Figure E3. YKL-40 has no effect on TGF- β 1 release

Levels of TGF- β 1 were assessed by ELISA, in unstimulated (unS) or YKL-40-stimulated BSM cells. TNF- α was used as positive control. BSM cells were obtained from control subjects (white columns; n = 5) or asthmatics (black columns; n = 5). Data are the mean $\pm$ SEM. *, p < 0.05 *versus* unstimulated condition within a population using paired Wilcoxon *t* tests.

Figure E4. YKL-40 has no effect on IL-8, IP-10 and SCF release

Levels of IL-8 (A), IP-10 (B) or SCF (C) were assessed by ELISA, in unstimulated (unS) or YKL-40-stimulated BSM cells. TNF- α was used as positive control. BSM cells were obtained from control subjects (white columns; n = 5) or asthmatics (black columns; n = 4). Data are the mean $\pm$ SEM. *, p < 0.05 *versus* unstimulated condition within a population using paired Wilcoxon tests. #, p < 0.05 between asthmatic and control populations using unpaired Wilcoxon tests.

Supplemental results

Figure E1

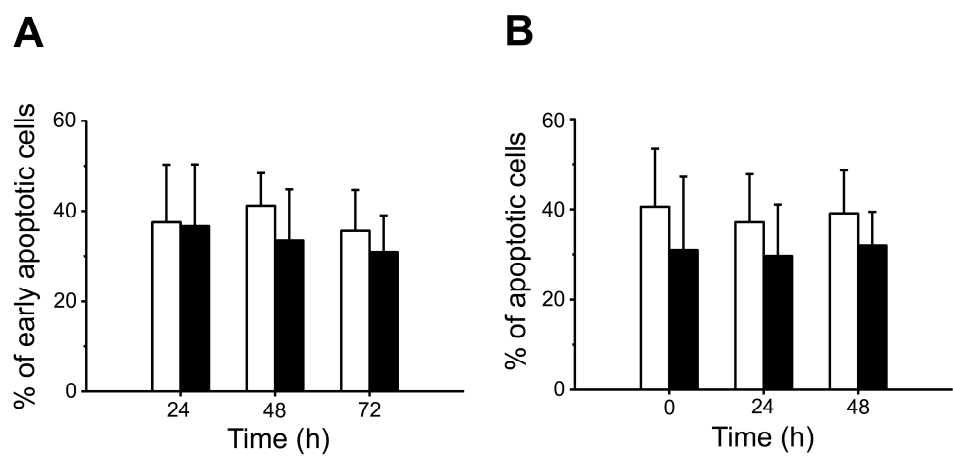


Figure E2

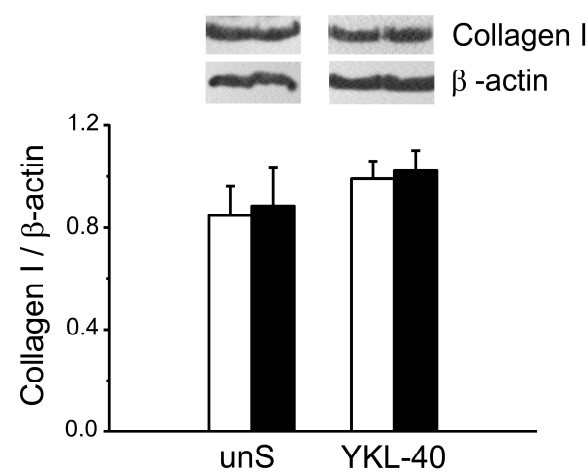


Figure E3

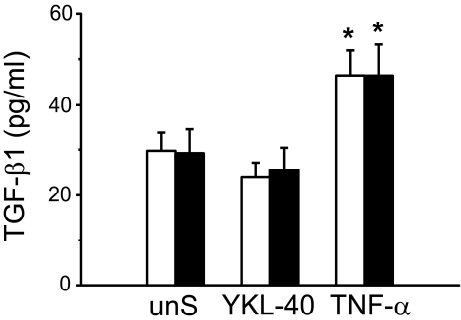
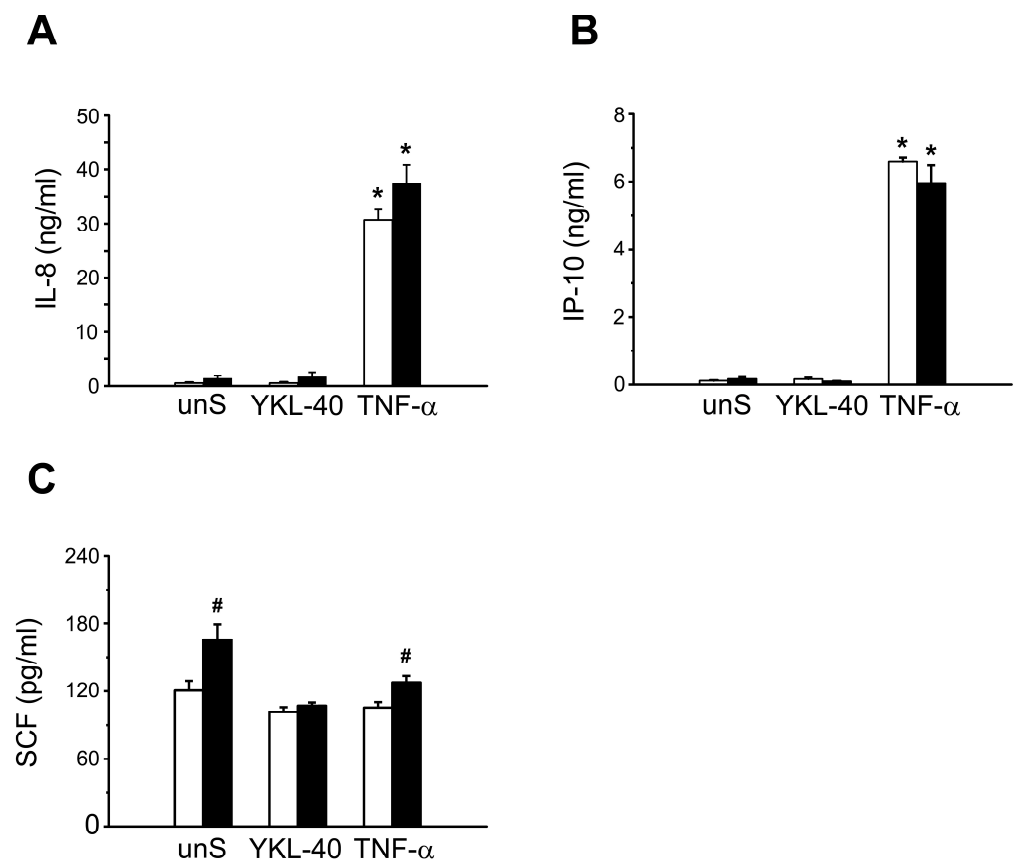


Figure E4



Au total, ce travail a permis d'établir qu'YKL-40 est plus qu'un simple bio marqueur dans l'asthme. En effet, YKL-40 altère les propriétés physiologiques de la CML et semble jouer un rôle dans le remodelage musculaire lisse bronchique. D'autre part, cette étude a permis de montrer qu'YKL-40 n'est pas sécrétée par le muscle lisse *ex vivo* mais par l'épithélium de patients sévères notamment. La surexpression d'YKL-40 au niveau de l'épithélium est corrélée avec l'excès de muscle lisse bronchique. Ces résultats suggèrent alors que le muscle lisse est une cible d'YKL-40 qui, en altérant ses propriétés physiologiques, participerait au remodelage bronchique dans l'asthme.

Cependant, le mécanisme par lequel YKL-40 entraîne ces effets sur le muscle lisse n'est pas connu à ce jour. En revanche, il a été montré qu'YKL-40 augmentait la prolifération des chondrocytes via une voie de signalisation impliquant ERK 1/2 et AKT (256). Il existe de plus dans la littérature des arguments en faveur de l'implication du récepteur PAR-2. En effet, une étude récente a démontré qu'une chitinase exogène provenant de la bactérie *Streptomyces griseus*, retrouvée dans l'air humide d'intérieur et dans la poussière, pouvait induire des signaux calciques ainsi qu'une augmentation de l'IL-8 dans les cellules épithéliales bronchiques en activant le PAR-2 (288). En fait, l'implication d'allergènes provenant d'acariens, de poussière, de bactéries ou de virus, dans l'altération de la fonction épithéliale dans l'asthme a largement été étudiée (289,290). D'une part, des chitinases exogènes comme Der *farinae* (f) 18, Der p 15 et Der p 18 provenant d'acariens ont une activité allergénique chez l'homme (291,292). D'autre part, des études ont démontré que le PAR-2 de l'épithélium bronchique pouvait être activé par des protéases dérivées d'allergènes de poussière comme Der p3 et p9 (184,185) ou par des extraits de blattes germaniques (293). Plus récemment, il a été démontré que des protéases, provenant de la blatte germanique, provoquaient une

inflammation bronchique via le PAR-2 (294). Or, des chitinases sont retrouvées dans les insectes comme les blattes (295,296), ce qui suggère que les protéases provenant des allergènes dérivés d'insectes et activant le PAR-2 pourraient être des chitinases. L'activité chitinolytique de ces protéases reste néanmoins à évaluer.

Cependant, nous ignorons à ce jour si l'effet d'YKL-40 sur la CML implique le PAR-2. La suite de mes travaux de thèse s'est donc orientée sur l'étude du récepteur PAR-2 dans les CML d'asthmatiques.

2. Effets de la stimulation chronique du récepteur PAR-2 sur les CML bronchiques humaines

Nous avons vu que l'infiltration mastocytaire du muscle lisse bronchique ou myosite mastocytaire (42) est une caractéristique majeure de l'asthme (167). Elle fait intervenir une boucle d'auto-activation positive entre la CML et le mastocyte (37,42). La présence d'une dégranulation mastocytaire au sein même du muscle lisse (154), conforte le principe d'une stimulation chronique de la CML *in vivo* par les médiateurs mastocytaires. La tryptase est le produit de sécrétion majoritairement libéré lors de la dégranulation mastocytaire (cf chapitre I.1.2.b) et le PAR-2 est sa cible prioritaire dans le muscle lisse (269) (cf chapitre I.2.2.c).

Cependant, l'implication potentielle du PAR-2 musculaire lisse dans le remodelage bronchique *in vitro* et *in vivo* n'est pas encore élucidée. D'une part, les CML d'asthmatiques sont caractérisées par un excès de prolifération (119,165) dû à un excès de biogenèse mitochondriale (297) et d'autre part, la stimulation aiguë du PAR-2 par le peptide SLIGKV, augmente la prolifération des CML provenant de sujets témoins (62). Le niveau d'expression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques n'est pas connu à ce jour. Nous ne disposons pas non plus, d'argument direct pour affirmer l'implication du PAR-2 dans l'excès de prolifération observé chez l'asthmatique. Les objectifs de ce deuxième travail ont donc été, dans un premier temps, d'évaluer l'expression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques et ensuite, d'étudier les effets d'une stimulation chronique du PAR-2, sur l'expression du PAR-2 lui-même et la

prolifération des CML.

2.1) Expression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques

Les CML provenant de patients asthmatiques modérés présentent une augmentation de l'expression protéique du PAR-2, par rapport aux CML de sujets témoins (figures 23 A et B). Cette augmentation concerne à la fois le PAR-2 total mesuré par western blot (Figure 23 A), et le PAR-2 membranaire mesuré par cytométrie en flux (Figure 23 B). De plus, il existe chez l'asthmatique une corrélation négative entre l'expression du PAR-2 membranaire et le VEMS de ces patients (Figure 23 C). Au niveau transcriptionnel, on observe également une augmentation de l'expression de l'ARNm du PAR-2 chez l'asthmatique en RT-PCR quantitative (Figure 23 D).

Une telle surexpression du PAR-2 dans le muscle lisse de l'asthmatique avait été évoquée dans des CML provenant de sujets témoins, lors de la stimulation par l'Il-1 β , une cytokine pro-inflammatoire (298). Dans notre étude, les CML sont cultivées pendant plusieurs semaines, suggérant que l'augmentation de l'expression du PAR-2 soit persiste *in vitro* et reflète une caractéristique intrinsèque de la CML dans l'asthme, soit est un artéfact de culture des CML *in vitro*. Dans un travail précédent, il a été démontré que le PAR-2 était surexprimé dans l'épithélium de patients asthmatiques non sévères mais les auteurs ne retrouvaient pas d'augmentation dans le muscle lisse (299). Ces résultats négatifs pourraient refléter des stimulations protéasiques chroniques du PAR-2 *in vivo* car d'une part, l'anticorps utilisé était dirigé contre la chaîne N-terminale extracellulaire du PAR-2 et, d'autre part, le niveau de contrôle des malades n'était pas précisé avec environ la moitié des malades sans corticoïdes

inhalés.

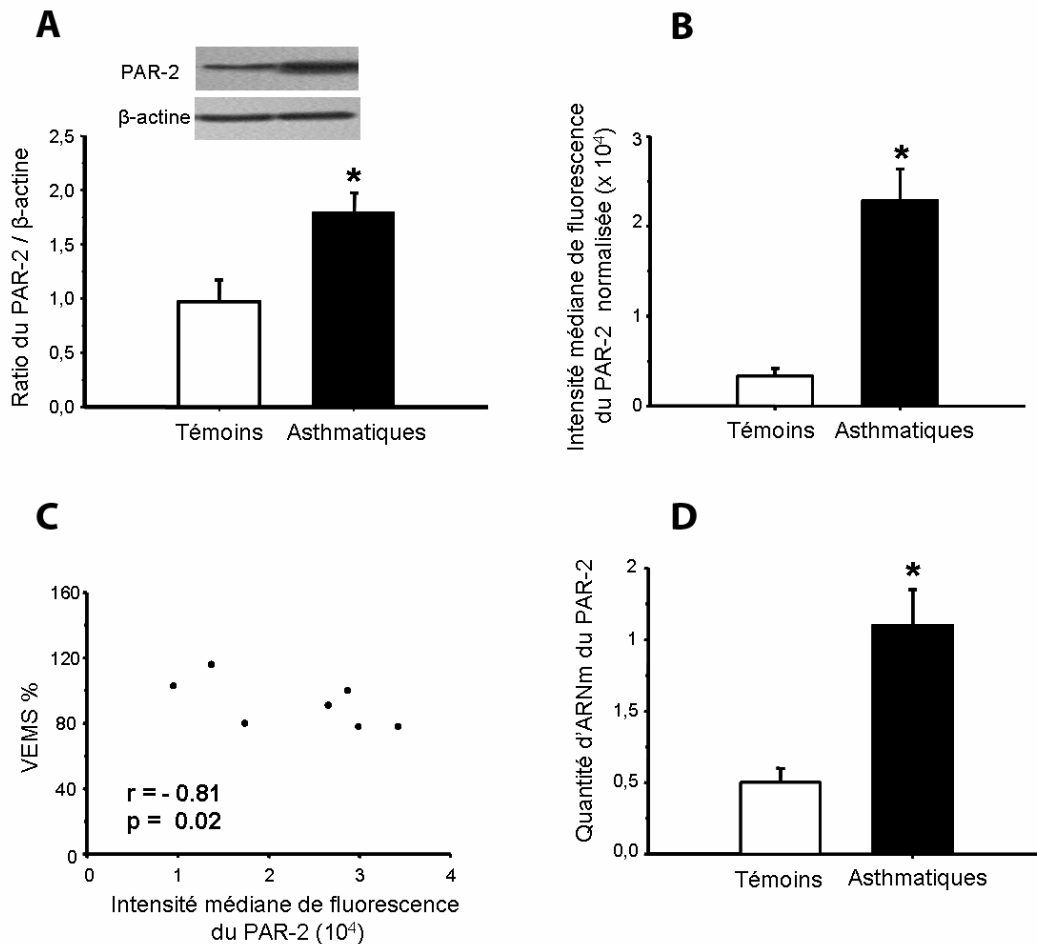


Figure 23 : Expression du PAR-2 dans les CML bronchiques.

Les CML sont issues de patients témoins (barres blanches) ou asthmatiques (barres noires). A : Quantification de l'expression du PAR-2 total par Western Blot. Les résultats sont analysés en ratio d'intensité de bande par rapport à la β-actine et exprimés en moyenne $\pm$ SEM. B : Intensité de fluorescence du PAR-2 normalisée par celle de l'irrelevant en cytométrie en flux. Les CML sont marquées avec un anticorps primaire anti-PAR-2 et révélées avec un anticorps secondaire couplé APC. C : Corrélation négative entre l'expression du PAR-2 membranaire en cytométrie en flux, et le VEMS. D : Quantification de l'ARNm du PAR-2 en fonction de trois gènes domestiques (YHAZ, PO et HPRT-1). Les résultats sont analysés par la méthode GeNorm. * représente une différence significative entre les deux populations ($n = 7$). r représente le coefficient de spearman.

Des expérimentations d'IHC seront réalisées prochainement afin de rechercher une augmentation d'expression du PAR-2 *ex vivo* dans le muscle lisse de patients asthmatiques contrôlés depuis plusieurs semaines et de sévérités différentes. L'expression du PAR-2 pourrait en effet représenter un marqueur *in vitro* de la sévérité des asthmatiques comme en témoigne la corrélation négative avec le VEMS.

La possible implication de la stimulation chronique du PAR-2 sur la surexpression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques a donc été évaluée.

2.2) Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur l'expression du PAR-2

Dans un premier temps, nous avons stimulé le PAR-2 des CML avec une seule incubation à différentes concentrations allant de 1 à 100 μ M pour le SLIGKV ou de 1 à 100 nM pour la trypsine. Puis nous avons observé l'expression du PAR-2 des CML en cytométrie en flux après 24, 48 et 72h (Figure 24).

Ces résultats montrent l'absence de modification de l'expression du PAR-2 de surface après une seule stimulation au SLIGKV quelle que soit la concentration (Figure 24 A). En revanche, la plus forte concentration de trypsine diminue l'expression du PAR-2 membranaire dès la 24^{ème} heure (Figure 24 B). Cependant, la trypsine n'est pas un activateur sélectif du PAR-2, car elle peut activer d'autres récepteurs PAR notamment le PAR-1 et PAR-4 (189). Elle constitue tout de même un activateur puissant du PAR-2 (173,300) même si, à fortes concentrations, la trypsine peut, comme la tryptase, cliver le récepteur au niveau de sites non

actifs pouvant être à l'origine d'une dégradation extracellulaire du récepteur (301,302).

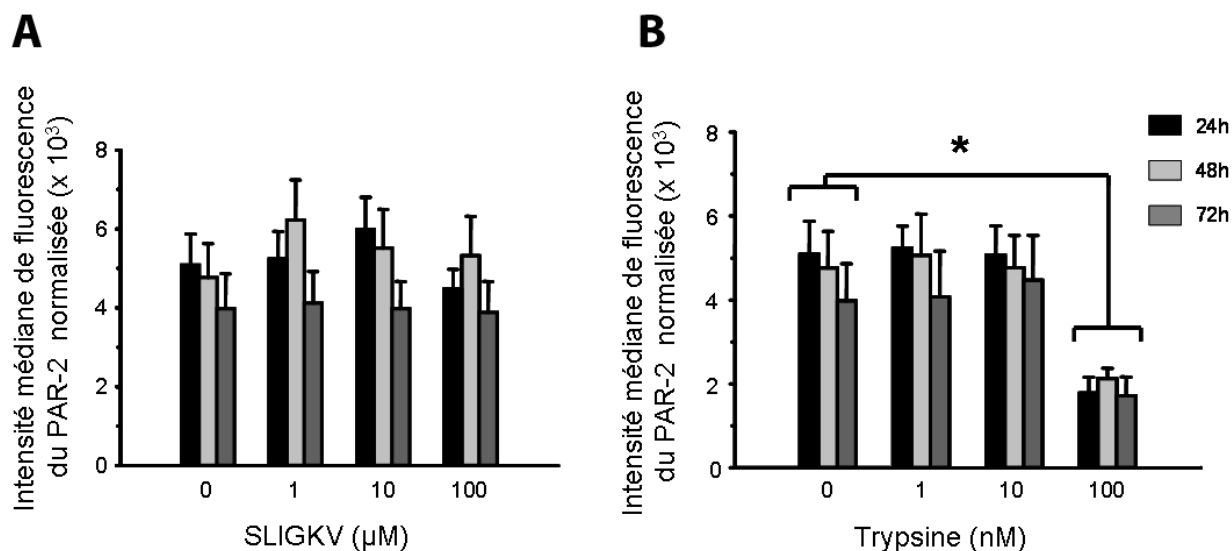


Figure 24 : Effet de la stimulation aiguë du PAR-2 sur son expression en cytométrie en flux.

*Les CML, issues de patients témoins, sont stimulées avec des concentrations croissantes de SLIGKV (A) ou de trypsine (B) à 24, 48 et 72h. L'intensité médiane de fluorescence du PAR-2 est évaluée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 4$). * représente une différence significative pour chaque durée d'incubation.*

La diminution de l'expression du PAR-2 des CML stimulées par la trypsine pourrait aussi être la conséquence d'une forte activation du récepteur et donc son internalisation. Cependant, des résultats préliminaires montrent la diminution de l'expression du PAR-2 total à 72h de stimulation aux mêmes concentrations de trypsine, suggérant une dégradation du récepteur (résultats non présentés).

Toutefois, ce protocole ne reproduit pas les stimulations itératives du PAR-2 telles qu'elles surviennent chez l'asthmatique. Pour cela, nous avons stimulé le PAR-2 des CML au SLIGKV tous les jours pendant trois jours et nous avons étudié l'expression du PAR-2 48 h après la dernière stimulation (Figure 25). Le peptide inverse, VKGILS et l'histamine ont été

utilisés comme contrôles négatifs.

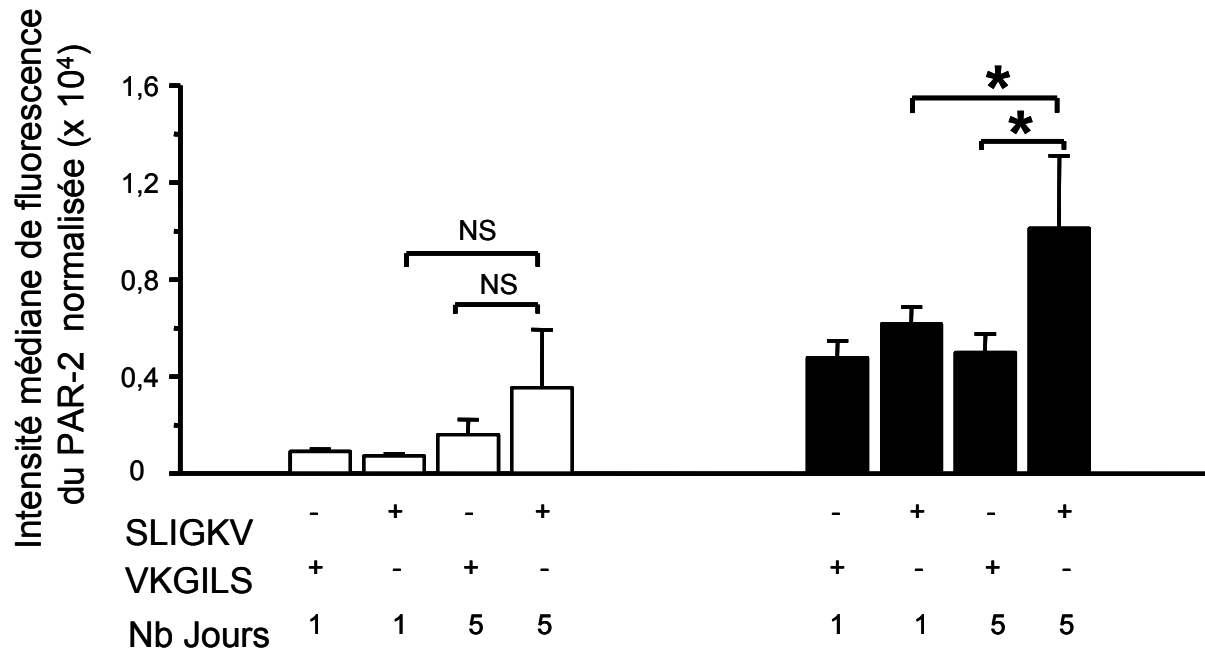


Figure 25 : Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur son expression.

*Les CML sont issues de patients témoins (barres blanches) ou asthmatiques (barres noires). L'intensité de fluorescence du PAR-2 membranaire est évaluée par cytométrie en flux après 1 à 5 jours de stimulations répétées au SLIGKV. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 5$). * représentent une différence significative entre deux conditions expérimentales.*

La stimulation du PAR-2 au SLIGKV ne modifie l'expression du PAR-2 de surface que dans les CML de sujets asthmatiques et seulement lors d'une stimulation chronique. De plus, cet effet semble spécifique du récepteur PAR-2 car la stimulation chronique à l'histamine ne modifie pas l'expression du PAR-2 dans les CML de sujets témoins et asthmatiques (Figure 26).

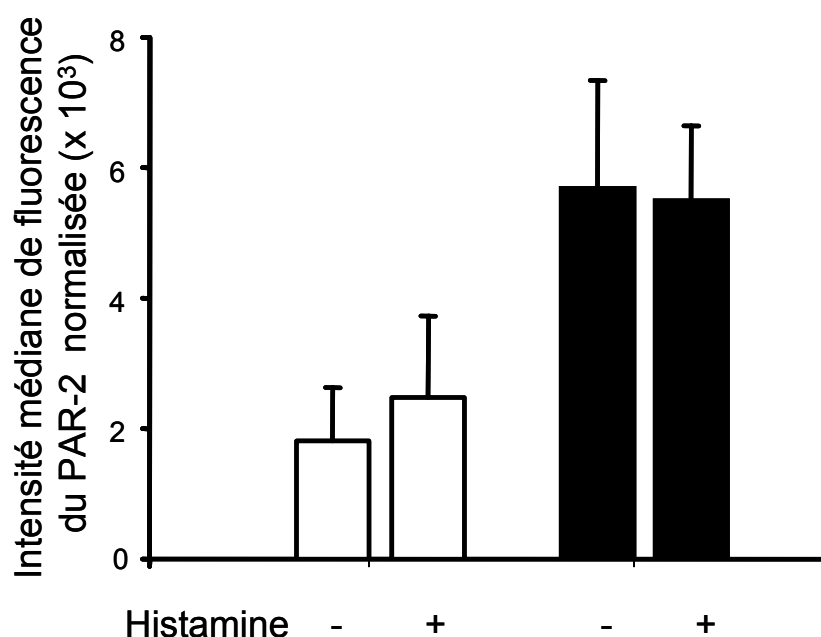


Figure 26 : Effet de la stimulation chronique à l'histamine sur l'expression du PAR-2.

Les CML sont issues de patients témoins (barres blanches) ou asthmatiques (barres noires). L'intensité de fluorescence du PAR-2 membranaire est évaluée par cytométrie en flux 5 jours après des stimulations répétées à l'histamine pendant 3 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 5$).

2.3) Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur la prolifération des CML

L'effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur la prolifération des CML a ensuite été étudié. Pour cela, des CML de sujets témoins et asthmatiques ont été stimulées en aigu sur 1 jour ou en chronique sur 3 jours avec le SLIGKV comme précédemment. Là aussi, le peptide inverse VKGILS a servi de contrôle négatif (Figure 27).

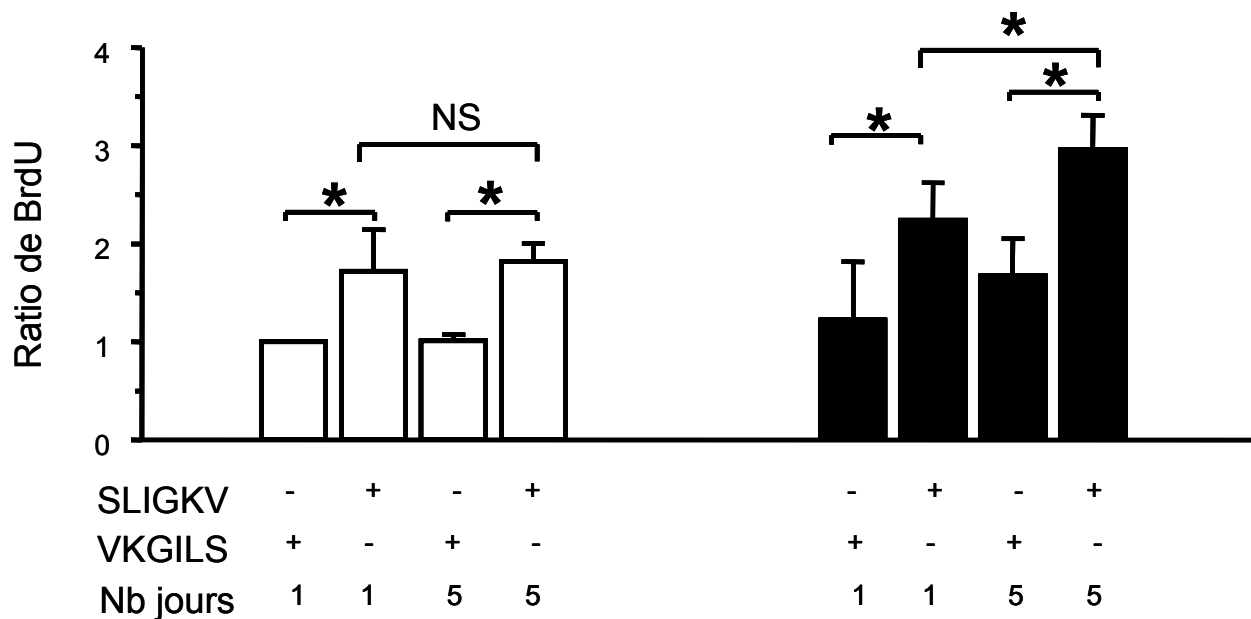


Figure 27 : Effet de la stimulation chronique du PAR-2 sur la prolifération des CML.

*Les CML sont issues de patients témoins (barres blanches) ou asthmatiques (barres noires). La prolifération est évaluée en BrdU 1 à 5 jours après des stimulations chroniques au SLIGKV. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 5$). * représente une différence significative entre deux conditions expérimentales.*

La stimulation aiguë du PAR-2 augmente la prolifération des CML de sujets témoins comme cela avait été objectivé dans un précédent travail de l'équipe (62). La stimulation aiguë augmente encore plus la prolifération des CML de patients asthmatiques. Pour mémoire, dans le premier travail expérimental, les effets de la chitinase YKL-40 ou ceux du PDGF sur la prolifération étaient similaires entre les CML de sujets témoins et celles des asthmatiques. Ceci suggère un lien entre le niveau augmenté d'expression protéique du PAR-2 et de la prolifération dépendante du PAR-2 chez l'asthmatique.

La stimulation chronique du PAR-2 induit une prolifération significativement plus importante mais uniquement avec les CML de patients asthmatiques. Ces derniers résultats doivent être mis en perspective avec les résultats précédents retrouvant une augmentation de

l'expression du PAR-2 uniquement lors de la stimulation chronique du PAR-2 des CML des seuls patients asthmatiques. Cependant, nous ne disposons que d'arguments indirects pour attribuer cet excès de prolifération à la surexpression du PAR-2 chez l'asthmatique. Afin de démontrer la présence ou l'absence d'un lien de causalité, l'objectif suivant a été d'inhiber de manière stable l'expression du PAR-2 des CML par interférence ARN lentivirale.

3. Effets de l'inhibition du PAR-2 par interférence ARN lentivirale sur les CML

L'efficacité de l'inhibition du récepteur PAR-2 par siRNA a déjà été démontrée dans le laboratoire (269). Cependant, le caractère transitoire sur 24h de cette interférence ARN ne permet pas l'étude du rôle du PAR-2 sur des mécanismes comme la prolifération. C'est pourquoi des techniques de production de siRNA *in situ* dans la cellule ont été développées, grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux générant des shRNA (cf chapitre II.7). Cette stratégie d'interférence lentivirale doit permettre l'intégration du génome lentiviral dans le génome de la cellule hôte et ainsi la dégradation de l'ARNm cible.

Les CML sont infectées à l'aide du lentivirus décrit dans le chapitre II.7.B à MOI 3 (trois particules lentivirales pour une cellule), produit à partir du plasmide pLVTHM. L'expression d'une protéine marqueur fluorescente, la GFP, par le génome lentiviral, permet de suivre l'efficacité et la stabilité de l'infection en cytométrie en flux (Figure 28).

On observe ainsi que le génome viral est exprimé faiblement au 3^{ème} jour après l'infection (10% de cellules exprimant la GFP) mais augmente considérablement au 5^{ème} jour (50% de cellules) pour rester stable dans le temps jusqu'au 9^{ème} jour. L'infection avec le lentivirus vide ou avec celui produisant l'une des 4 séquences shRNA ne semble pas modifier l'expression du génome lentiviral. En effet, on n'observe aucune différence significative du pourcentage de cellules GFP pour les différents virus (Figure 28).

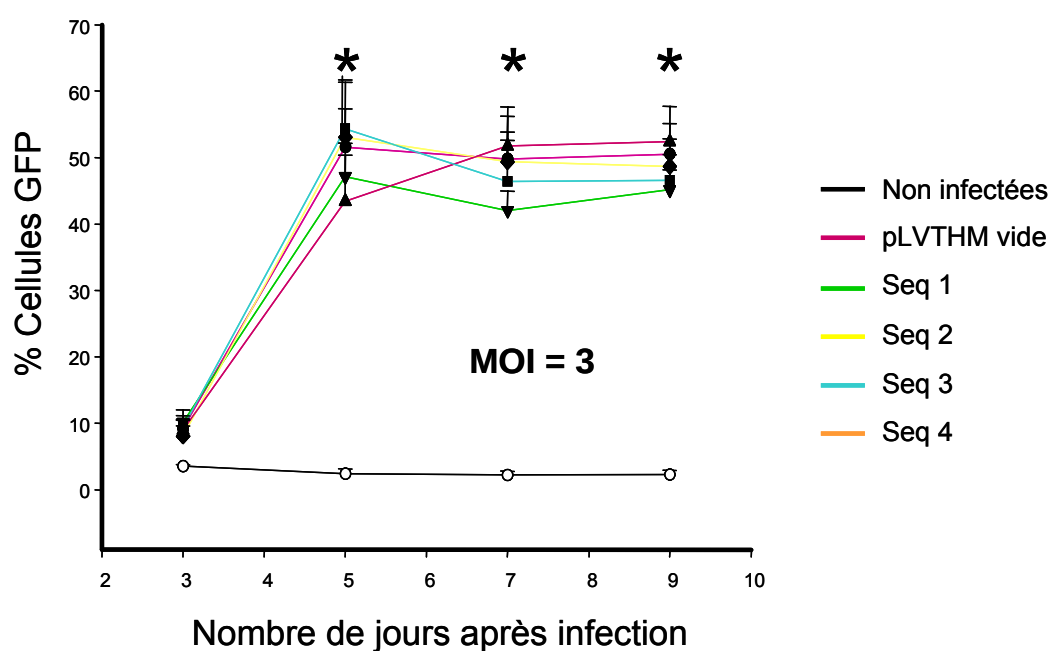


Figure 28 : Evolution du % de cellules positives pour la GFP en fonction du temps.

*La fluorescence de la GFP est mesurée en cytométrie en flux sur des cellules non infectées ou infectées avec l'une des 4 séquences shRNA anti PAR-2. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 6$). * $p < 0,05$ avec des tests t appariés.*

Ensuite, l'efficacité de l'interférence ARN est étudiée au niveau transcriptionnel par RT-PCR (Figure 29). Les premiers résultats montraient une interférence ARN efficace induite par les lentivirus produisant les shRNA n°2 et 3 par rapport aux cellules infectées par le lentivirus vide. Il existe en effet une diminution significative de l'ARNm du PAR-2 à J7 pour les séquences 2 et 3 et à J9 pour la séquence 3.

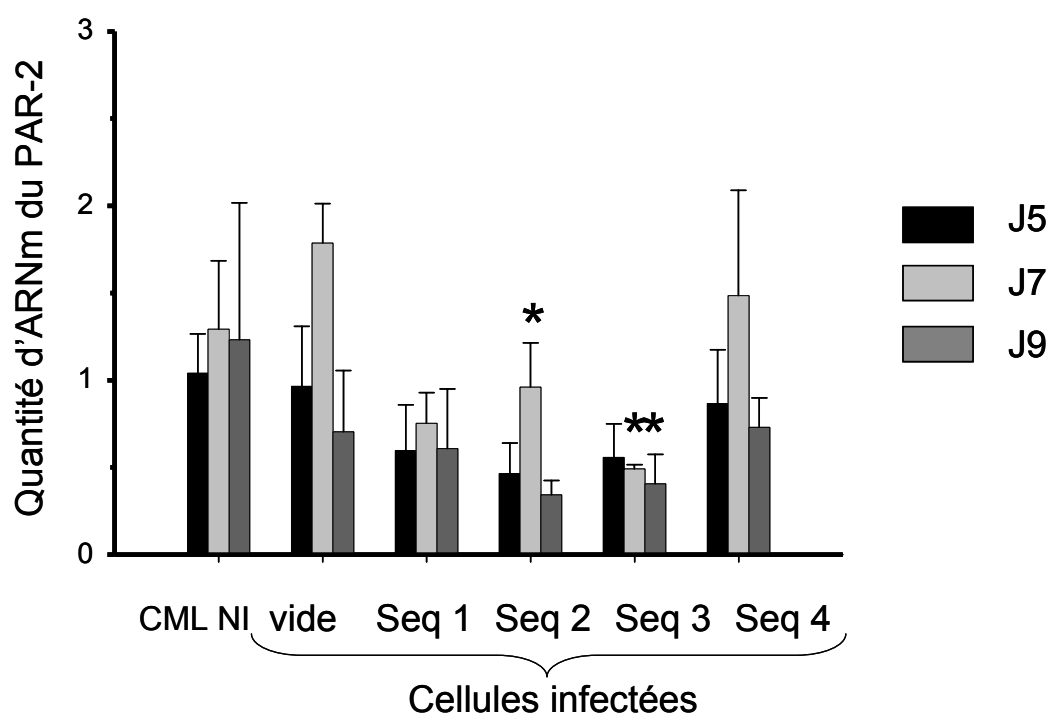


Figure 29 : Evaluation de l'efficacité de l'interférence ARN au niveau transcriptionnel.

*La quantification de l'ARNm du PAR-2 a été réalisée en fonction de 3 gènes domestiques (PO, HPRT-1 et YWHAZ). Les résultats sont analysés en geNorm et exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 4$), à J5, J7 et J9 après l'infection. * $p < 0,05$ avec des tests t appariés.*

L'efficacité de l'interférence au niveau protéique semble diminuer l'expression du PAR-2 mais n'a pas permis de retrouver de différence significative en western blot (Figure 30).

Cette absence d'effet de l'interférence ARN lentivirale sur l'expression protéique pourrait être la conséquence d'un stress lié à une infection lentivirale trop récente ou à un biais de sélection des CML infectées par les lentivirus. En effet, les CML ayant intégré le plus de particules lentivirales et donc présentant potentiellement le moins de PAR-2 peuvent présenter des propriétés prolifératives amoindries.

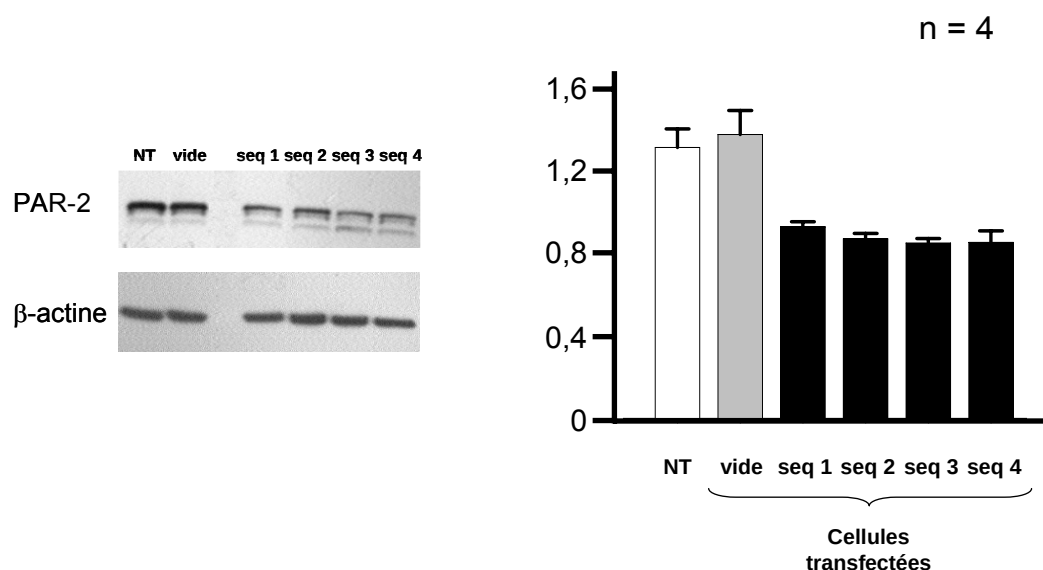


Figure 30 : Evaluation de l'efficacité de l'interférence ARN au niveau protéique.

Les résultats sont analysés en ratio d'intensité de bande par rapport à la β -actine et exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n = 4$.

Une première stratégie a consisté à rendre l'interférence ARN inducible grâce à la co-infection avec un autre lentivirus produit à partir du plasmide pLVtTRKRAB-Red (cf chapitre II.7.6). Cette stratégie permet de différer l'interférence ARN et ainsi de s'éloigner du stress dû à une infection trop récente. Avant toute co-infection, une étude préliminaire de la toxicité de la Dox sur la prolifération a été effectuée afin d'éliminer tout biais lors de l'analyse des résultats. Une concentration optimale de 0,5 μ g/ml a été choisie pour cette étude (Figure 31).

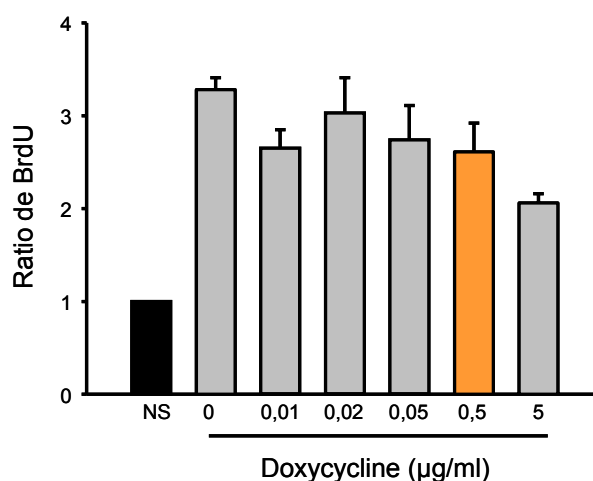


Figure 31 : Effets de la doxycycline sur la prolifération des CML en BrdU.

*Les CML sont incubées avec des concentrations croissantes de Dox. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 4$). * $p < 0,05$ avec des tests t appariés.*

Cette co-infection nous a permis de mettre au point une interférence ARN conditionnelle (Figure 32). En effet, le dot-plot montre que lors de la co-infection en absence de Dox, les cellules sont fluorescentes dans le rouge uniquement (Ds-Red). En revanche, les cellules DsRed positives expriment environ 21% de GFP après 48 h de Dox et environ 70% après 5 jours de Dox (Figure 32). Ces résultats confirment la pharmaco-dépendance de l'expression de la GFP et donc des shRNA à la Dox.

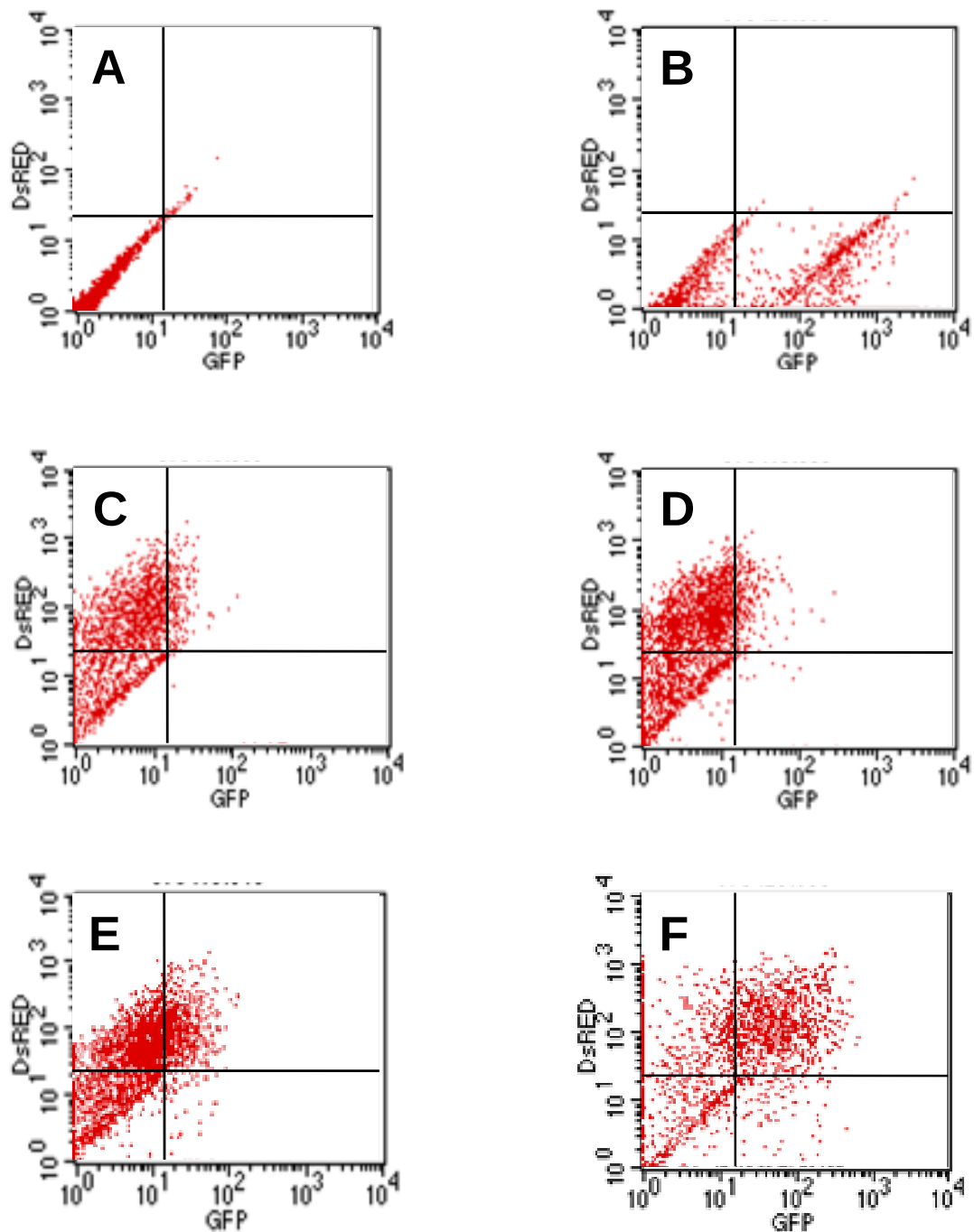


Figure 32 : Interférence ARN lentivirale conditionnelle.

Dots plots de cytométrie en flux représentant la fluorescence de la GFP en fonction de la Ds-red, de cellules non infectées (A), infectées avec le pLVTHM seul à une MOI = 3 (B), infectées avec le pLVtTRKRAB à une MOI = 20 (C), coinfectedes avec les deux lentivirus en absence de Dox (D), ou en présence de 0,5 µg/ml de Dox pendant 48h (E) ou pendant 5 jours (F).

L'absence d'effet de l'interférence ARN lentivirale sur l'expression protéique pourrait également s'expliquer par le faible niveau d'infection lentivirale (aux environ de 50%) (Figure 28). Une autre stratégie a ainsi consisté en l'optimisation de l'efficacité de l'infection par le tri cellulaire. Pour cela, les cellules infectées à MOI 3 ou 5 sont triées via une buse de 100 μ m de diamètre sur l'expression de la GFP. Cependant, cette technique s'est avérée très contraignante, dans la mesure où un ralentissement de la prolifération des CML a été observé. En effet, quatre à cinq semaines sont nécessaires pour atteindre la confluence. Toutefois, cela nous a permis d'étudier la stabilité de l'infection lentivirale à plus long terme. L'efficacité du tri a été vérifiée par cytométrie en flux et permettait d'augmenter considérablement l'expression de la GFP (plus de 90%) (Figure 33) et ce, de manière stable dans le temps pouvant atteindre deux mois.

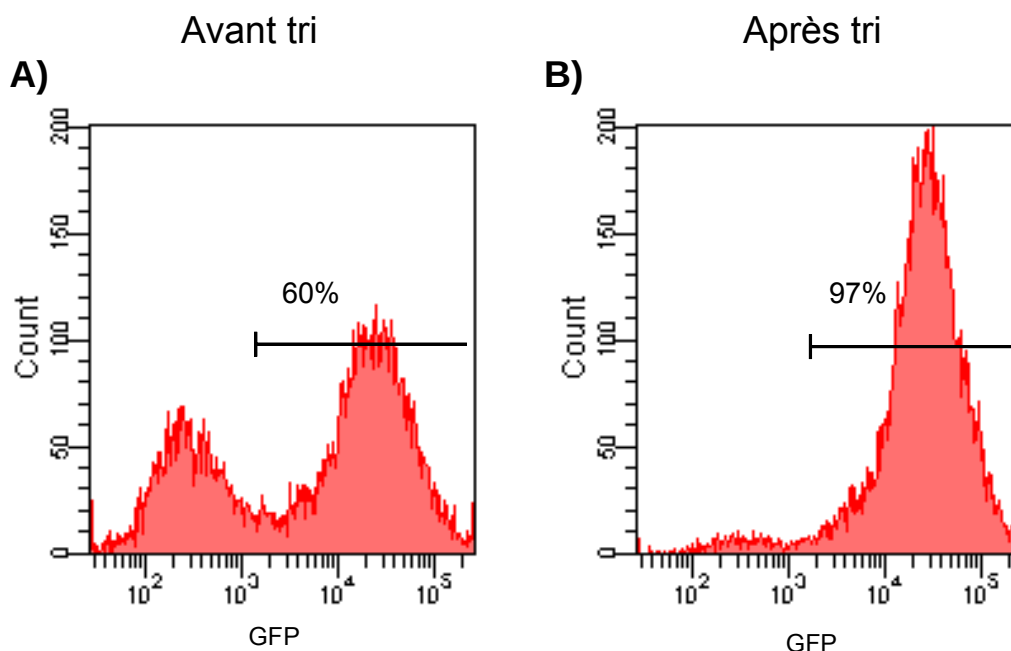


Figure 33 : Tri cellulaire après infection lentivirale.

Histogrammes de distribution de la fluorescence obtenus avant (A) et après (B) tri cellulaire. Les % de cellules positives à la GFP sont indiqués.

L'étude de l'efficacité de l'interférence sur des CML triées a permis de montrer une abolition de l'ARNm du PAR-2 pour les CML infectées avec le lentivirus produisant la séquence n°1 (Figure 34) ainsi qu'une diminution de l'expression du PAR-2 membranaire en cytométrie en flux (résultat non présenté).

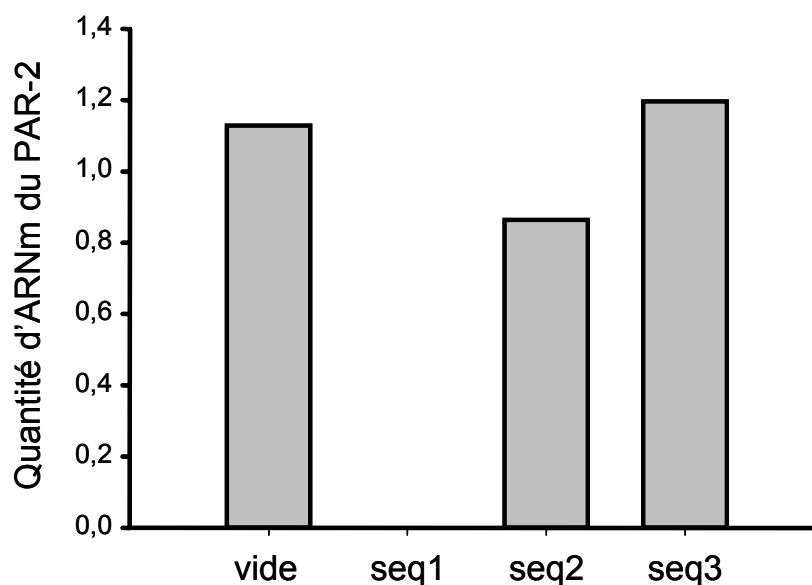


Figure 34 : Efficacité de l'interférence ARN lentivirale au niveau transcriptionnel.

Expression du PAR-2 au niveau transcriptionnel sur des CML infectées avec le lentivirus n'exprimant pas le shRNA (vide) ou produisant les différentes séquences shRNA. Les résultats sont présentés en ratio des ARNm du PAR-2 par rapport à des références endogènes (PO, HPRT-1 et YWHAZ) par une analyse GeNorme (n = 1).

Néanmoins, ce résultat n'a pas pu être reproduit sur un effectif suffisant. De plus, si la stabilité de la GFP au cours du temps est bonne, la production des shRNA peut décliner au cours du temps. Ainsi, étant donné le caractère très lourd de cette technique sur les CML et l'absence de reproductibilité, nous avons optimisé l'efficacité de l'infection lentivirale en augmentant la concentration des particules lentivirales lors de l'infection. Pour cela, plusieurs MOI allant de 3 à 20 ont été testées (Figure 35).

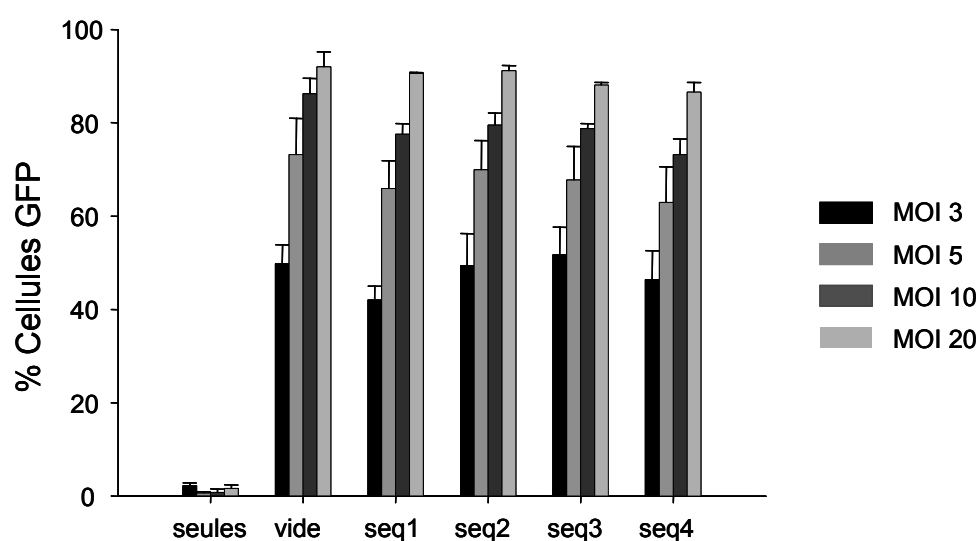


Figure 35 : Efficacité de l'infection lentivirale à différentes MOI.

Histogramme représentant l'intensité de fluorescence de la GFP des CML non infectées ou infectées avec les différentes séquences shRNA anti-PAR-2. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ($n = 5$)

L'expression de la GFP en cytométrie en flux augmente progressivement avec l'augmentation de la MOI pour atteindre une efficacité de plus de 90% avec une MOI de 20, similaire à ce qui était obtenu après le tri cellulaire pour des MOI plus faibles. De plus, cette efficacité perdure jusqu'à 14 jours après l'infection.

Afin d'éviter toute toxicité cellulaire liée à une si forte MOI d'infection, le nombre de copies d'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte a été évalué par PCR quantitative, sur le gène lentiviral WPRE (Figure 36).

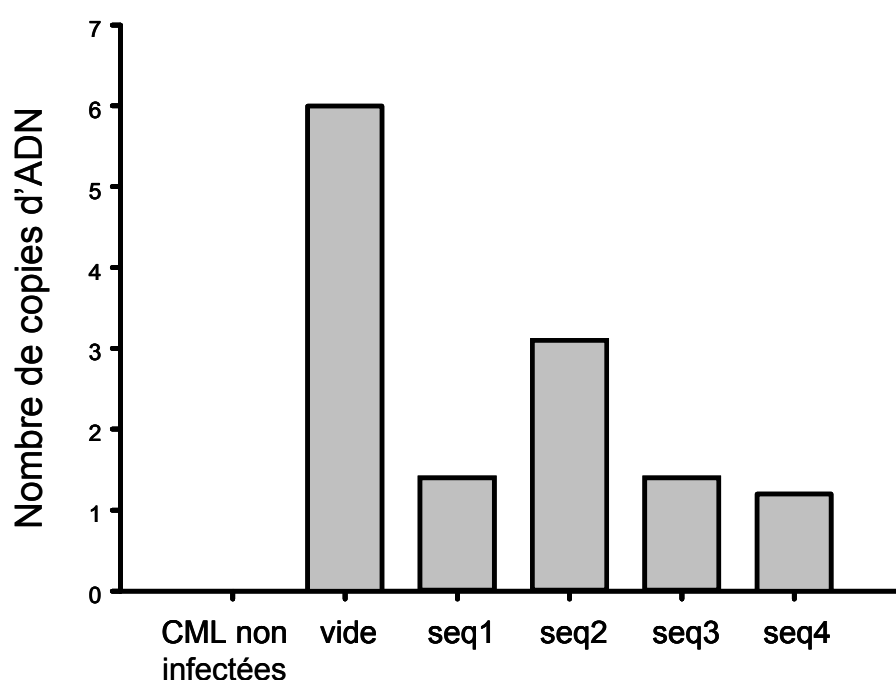


Figure 36 : Nombre de copies d'ADN viral.

Le nombre de copies d'ADN est mesuré par PCR quantitative (gène WPRE) sur des CML infectées avec le lentivirus ne produisant pas de shRNA (vide) ou produisant l'une des 4 séquences shRNA choisies.

Les CML infectées avec le lentivirus vide intègrent six copies d'ADN viral alors que les CML infectées avec le lentivirus codant pour les séquences shRNA intègrent moins de trois copies. La présence du ShRNA dans la séquence lentivirale semble donc diminuer son intégration au génome de la CML hôte. Par contre, l'infection de lignées cellulaires comme 293T avec une MOI de 20 permet en revanche l'intégration de plus de dix copies d'ADN viral (résultats non présentés).

L'efficacité de l'infection étant optimisée, nous avons par la suite évalué l'efficacité de l'interférence ARN sur l'expression du PAR-2. Les quatre séquences utilisées précédemment se sont avérées inefficaces sur l'expression du PAR-2 alors que cette fois le % de CML GFP positives était supérieur à 90% (Résultats non présentés). Pour éviter un défaut d'efficacité relié au phénotype musculaire lisse, nous avons dupliqué ces expériences avec une

lignée (Capan) pancréatique surexprimant le PAR-2. Là aussi, les 4 séquences se sont révélées inefficaces sur l'expression du PAR-2 (Figure 37).

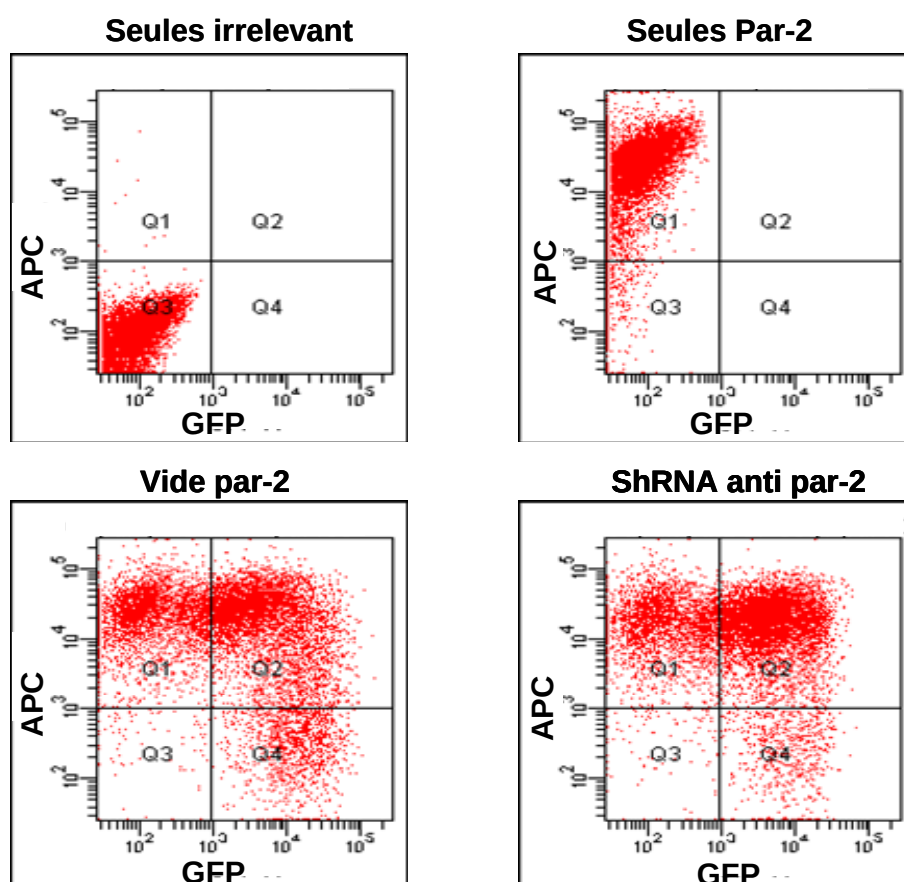


Figure 37 : Interférence ARN lentivirale dans la lignée Capan.

Représentations en dot plots de cytométrie en flux. Les cellules sont marquées à l'aide d'un anticorps irrelevant APC ou d'un anticorps anti-PAR-2 APC. Les cellules non infectées sont PAR-2 positives et GFP négatives. Celles infectées avec le lentivirus ne produisant pas de shRNA (vide) ou produisant une des séquences shRNA sont PAR-2 et GFP positives.

Le choix des séquences shRNA reposant sur des algorithmes en perpétuelles modifications, neuf autres séquences ont été choisies, produites et insérées dans des plasmides lentiviraux. L'étude de l'expression de la GFP en cytométrie en flux montre une efficacité d'infection supérieure à 90% (Figure 38 A). En outre, lors des expériences préliminaires, deux

séquences shRNA anti-PAR-2 semblent diminuer fortement l'expression du PAR-2 (Figure 38 B). Des expérimentations supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer ce résultat.

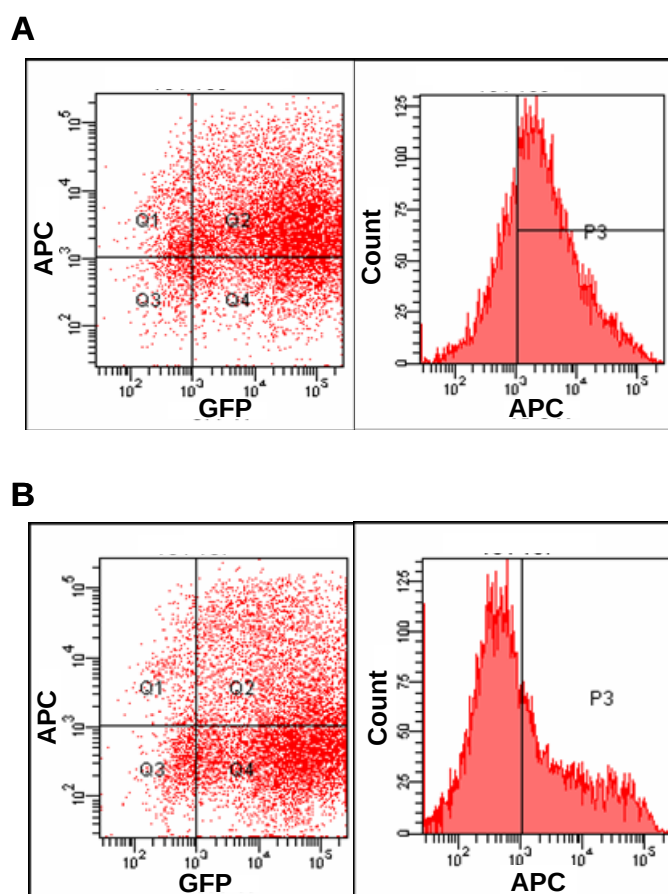


Figure 38 : Efficacité de l'interférence ARN lentivirale en cytométrie en flux.

Représentations en dot plots et histogrammes de distribution de la fluorescence dans les CML infectées avec le lentivirus ne produisant pas de shRNA (A) ou produisant une des séquences shRNA choisies. Les cellules sont marquées à l'aide d'un anticorps APC anti-PAR-2.

Au total, ce travail sur les lentivirus auquel j'ai dû consacrer une part importante de mon temps de doctorante, a permis d'optimiser l'infection ARN lentivirale des CML, pour lesquelles cette technique n'a pas été utilisée auparavant dans la littérature. De plus, après avoir testé 13 séquences shRNA anti-PAR-2 différentes, il semble que nous ayons pu obtenir une diminution de l'expression du PAR-2 dans ces cellules. La confirmation de ces résultats

devrait nous permettre d'étudier le rôle de la surexpression du PAR-2 dans l'excès de prolifération des CML d'asthmatiques induite par la stimulation chronique de ce récepteur. En outre, l'implication du PAR-2 dans l'excès de prolifération spontanée des CML d'asthmatiques au SVF sera évaluée.

Pour replacer les résultats expérimentaux de cette thèse en perspective des données connues dans la littérature, un schéma récapitule le rôle du PAR-2 dans les voies aériennes (Figure 39).

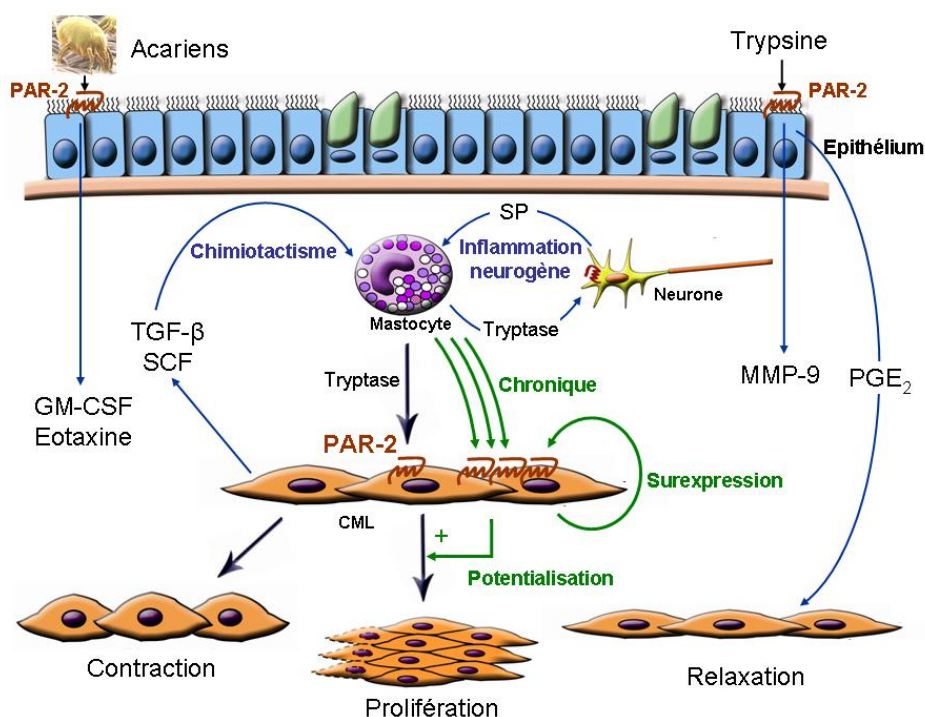


Figure 39 : Récapitulatif de l'implication du PAR-2 dans le remodelage et l'inflammation des voies aériennes.

Les flèches bleues indiquent des données de la littérature et les flèches vertes indiquent les données obtenues au cours de cette thèse. GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor, MMP : Métalloprotéinase, PGE₂ : prostaglandine E₂, SCF : Stem cell factor, SP : Substance P (neuropeptide), TGF : Transforming growth factor.

Chapitre IV

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse permet de mieux comprendre l'implication de la CML dans la physiopathologie de l'asthme, notamment en élucidant les effets d'YKL-40 et du PAR-2 dans le remodelage musculaire lisse bronchique.

Dans un premier temps, les travaux de cette thèse nous ont permis de démontrer le rôle de la chitinase YKL-40 sur l'ensemble des propriétés physiopathologiques de la CML (prolifération, hypertrophie et migration). Cependant, les mécanismes de transduction de ces effets restent encore à élucider dans la CML bronchique. Prochainement, les effets des inhibiteurs des voies MAP Kinase, Pi3K ou encore AKT, PKC, GSK3 β ou mTOR seront étudiés. De plus, l'augmentation plus importante de l'hypertrophie et de la migration dans les CML d'asthmatiques devra faire l'objet d'une investigation complémentaire. En effet, peu d'études ont été faites sur la migration des CML d'asthmatiques et à ce jour, aucune étude sur leur taille n'a fait l'objet de publications. Comprendre les mécanismes de cette augmentation de la taille et de la migration des CML dans l'asthme pourrait ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Par ailleurs, le rôle de la biogenèse mitochondriale dans l'excès de prolifération observé chez l'asthmatique a été observé. Il semblerait donc intéressant d'étudier les effets d'YKL-40 sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale notamment mtTFA (Mitochondrial transcription factor A), NRF-1 (Nuclear respiratory factor), et PGC1- α (Peroxisome-proliferator activated receptor gamma coactivator), ainsi que sur la masse mitochondriale estimée par la porine ou les complexes de la chaîne respiratoire. D'autre part, l'identification du récepteur à l'origine des effets de cette chitinase sur les CML semble nécessaire. Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier le rôle du PAR-2 dans les effets d'YKL-40 sur les CML bronchiques. Enfin, l'inhibition d'YKL-40 pourrait s'avérer une stratégie thérapeutique prometteuse et bénéfique non seulement dans

l'asthme mais aussi dans d'autres pathologies inflammatoires ou des cancers.

Ce travail de thèse a également permis de mettre en évidence la surexpression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques, et d'acquérir de nouvelles informations sur les effets de la stimulation chronique du PAR-2 sur son expression et sur la prolifération des CML. La mise en évidence de cette surexpression de PAR-2 *ex vivo* dans le muscle lisse bronchique est en cours et permettrait de consolider les résultats obtenus *in vitro*. A ce propos, l'excès de prolifération des CML lors de la stimulation chronique a été relié avec la surexpression du PAR-2 dans les seules CML d'asthmatiques. Il nous faut maintenant confirmer le lien de causalité entre surexpression du PAR-2 et excès de prolifération. Pour ce faire, l'efficacité de l'inhibition de l'expression du récepteur par interférence ARN lentivirale sera indispensable. Actuellement, nous avons identifié les conditions optimales pour l'obtention d'une infection lentivirale efficace. Enfin, si le lien de causalité est démontré, il nous faudra identifier les mécanismes de la surexpression du PAR-2 observée uniquement dans les CML des asthmatiques lors de la stimulation chronique. Le PAR-2 pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique de choix dans l'asthme.

Chapitre V

Références

bibliographiques

1. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). (2009). Available from: <http://www.ginasthma.org>.
2. Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley. 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59(5):469-78.
3. Pearce, N., N. Ait-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell, and C. Robertson. 2007. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62(9):758-66.
4. Tual, S., P. Godard, J. Bousquet, and I. Annesi-Maesano. 2008. [The decrease in asthma-related mortality in France]. *Rev Mal Respir* 25(7):814-20.
5. Helms, P. J. 2000. Issues and unmet needs in pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol* 30(2):159-65.
6. Wilson, N. M. 1989. Wheezy bronchitis revisited. *Arch Dis Child* 64(8):1194-9.
7. Garbe, B. R., and T. T. Chapman. 1989. Asthma: the beginner's guide to spirometry techniques. *Occup Health (Lond)* 41(3):76-7.
8. Kaminska, M., S. Foley, K. Maghni, C. Storness-Bliss, H. Coxson, H. Ghezzo, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, Q. Hamid, and J. Martin. 2009. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 124(1):45-51 e1-4.
9. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, r., and unanswered questions. American Thoracic Society. 2000. *Am J Respir Crit Care Med* 162(6):2341-51.
10. Crapo, R. O., R. Casaburi, A. L. Coates, P. L. Enright, J. L. Hankinson, C. G. Irvin, N. R. MacIntyre, R. T. McKay, J. S. Wanger, S. D. Anderson, D. W. Cockcroft, J. E. Fish, and P. J. Sterk. 2000. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 161(1):309-29.

11. Popa, V. 2001. ATS guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Care Med* 163(1):292-3.
12. Pizzichini, M. M., T. A. Popov, A. Efthimiadis, P. Hussack, S. Evans, E. Pizzichini, J. Dolovich, and F. E. Hargreave. 1996. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 154(4 Pt 1):866-9.
13. Magnussen, H., O. Holz, P. J. Sterk, and F. E. Hargreave. 2000. Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations. *Eur Respir J* 16(6):1175-9.
14. Kharitonov, S. A., D. Yates, R. A. Robbins, R. Logan-Sinclair, E. A. Shinebourne, and P. J. Barnes. 1994. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343(8890):133-5.
15. Kharitonov, S. A., and P. J. Barnes. 2001. Does exhaled nitric oxide reflect asthma control? Yes, it does! *Am J Respir Crit Care Med* 164(5):727-8.
16. Payne, D. N., I. M. Adcock, N. M. Wilson, T. Oates, M. Scallan, and A. Bush. 2001. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 164(8 Pt 1):1376-81.
17. Shaw, D. E., M. A. Berry, M. Thomas, R. H. Green, C. E. Brightling, A. J. Wardlaw, and I. D. Pavord. 2007. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 176(3):231-7.
18. Laitinen, L. A., A. Laitinen, and T. Haahtela. 1992. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a beta 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 90(1):32-42.
19. Juniper, E. F., P. M. O'Byrne, P. J. Ferrie, D. R. King, and J. N. Roberts. 2000. Measuring asthma control. Clinic questionnaire or daily diary? *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 1):1330-4.

20. Juniper, E. F., P. M. O'Byrne, G. H. Guyatt, P. J. Ferrie, and D. R. King. 1999. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 14(4):902-7.
21. Benson, M. K. 1975. Bronchial hyperreactivity. *Br J Dis Chest* 69(0):227-39.
22. 2003. ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med* 167(2):211-77.
23. Ramsdale, E. H., M. M. Morris, R. S. Roberts, and F. E. Hargreave. 1984. Bronchial responsiveness to methacholine in chronic bronchitis: relationship to airflow obstruction and cold air responsiveness. *Thorax* 39(12):912-8.
24. Homer, R. J., and J. A. Elias. 2000. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med* 21(2):331-43, ix.
25. Pfitzner, J. 1976. Poiseuille and his law. *Anaesthesia* 31(2):273-5.
26. Bates, J. H. 1993. Stochastic model of the pulmonary airway tree and its implications for bronchial responsiveness. *J Appl Physiol* 75(6):2493-9.
27. Cockcroft, D. W., R. E. Ruffin, J. Dolovich, and F. E. Hargreave. 1977. Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy* 7(6):503-13.
28. McCarthy, D. S., and J. Pepys. 1971. Allergic broncho-pulmonary aspergillosis. Clinical immunology. 2. Skin, nasal and bronchial tests. *Clin Allergy* 1(4):415-32.
29. De Monchy, J. G., H. F. Kauffman, P. Venge, G. H. Koeter, H. M. Jansen, H. J. Sluiter, and K. De Vries. 1985. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 131(3):373-6.
30. Pin, I., A. P. Freitag, P. M. O'Byrne, A. Girgis-Gabardo, R. M. Watson, J. Dolovich, J. A. Denburg, and F. E. Hargreave. 1992. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 145(6):1265-9.
31. Gauvreau, G. M., L. P. Boulet, D. S. Postma, T. Kawayama, R. M. Watson, M. Duong,

- F. Deschesnes, J. G. De Monchy, and P. M. O'Byrne. 2005. Effect of low-dose ciclesonide on allergen-induced responses in subjects with mild allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116(2):285-91.
32. Gauvreau, G. M., A. B. Becker, L. P. Boulet, J. Chakir, R. B. Fick, W. L. Greene, K. J. Killian, M. O'Byrne P, J. K. Reid, and D. W. Cockcroft. 2003. The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112(2):331-8.
33. Borish, L. C., H. S. Nelson, J. Corren, G. Bensch, W. W. Busse, J. B. Whitmore, and J. M. Agosti. 2001. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107(6):963-70.
34. Brightling, C. E., D. Kaur, P. Berger, A. J. Morgan, A. J. Wardlaw, and P. Bradding. 2005. Differential expression of CCR3 and CXCR3 by human lung and bone marrow-derived mast cells: implications for tissue mast cell migration. *J Leukoc Biol* 77(5):759-66.
35. Brightling, C. E., A. J. Ammit, D. Kaur, J. L. Black, A. J. Wardlaw, J. M. Hughes, and P. Bradding. 2005. The CXCL10/CXCR3 Axis Mediates Human Lung Mast Cell Migration to Asthmatic Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 171(10):1103-8.
36. El-Shazly, A., P. Berger, P. O. Girodet, O. Ousova, M. Fayon, J. M. Vernejoux, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 2006. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176(3):1860-8.
37. Berger, P., P. O. Girodet, H. Begueret, O. Ousova, D. W. Perng, R. Marthan, A. F. Walls, and J. M. Tunon De Lara. 2003. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J* 17(14):2139-41.
38. Gulliksson, M., L. Palmberg, G. Nilsson, S. Ahlstedt, and M. Kumlin. 2006. Release of prostaglandin D2 and leukotriene C4 in response to hyperosmolar stimulation of mast cells. *Allergy* 61(12):1473-9.
39. Schwartz, L. B., A. M. Irani, K. Roller, M. C. Castells, and N. M. Schechter. 1987. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J*

Immunol 138(8):2611-5.

40. Carroll, N. G., S. Mutavdzic, and A. L. James. 2002. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 57(8):677-82.
41. Okumura, S., H. Sagara, T. Fukuda, H. Saito, and Y. Okayama. 2005. FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 115(2):272-9.
42. Berger, P., P. O. Girodet, and J. M. Tunon De Lara. 2005. Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma? *Allergy* 60(10):1238-40.
43. Irani, A. A., N. M. Schechter, S. S. Craig, G. DeBlois, and L. B. Schwartz. 1986. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12):4464-8.
44. Balzar, S., M. L. Fajt, S. A. Comhair, S. C. Erzurum, E. Bleeker, W. W. Busse, M. Castro, B. Gaston, E. Israel, L. B. Schwartz, D. Curran-Everett, C. G. Moore, and S. E. Wenzel. 2010. Mast Cell Phenotype, Location and Activation in Severe Asthma. Data from The Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*.
45. Glenner, G. G., and L. A. Cohen. 1960. Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. *Nature* 185:846-7.
46. Wenzel, S. E., A. A. d. Fowler, and L. B. Schwartz. 1988. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 137(5):1002-8.
47. Jarjour, N. N., W. J. Calhoun, L. B. Schwartz, and W. W. Busse. 1991. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with increased airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 144(1):83-7.
48. Sekizawa, K., G. H. Caughey, S. C. Lazarus, W. M. Gold, and J. A. Nadel. 1989. Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest* 83(1):175-9.

49. Berger, P., S. J. Compton, M. Molimard, A. F. Walls, C. N'Guyen, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 1999. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 29(6):804-12.
50. Berger, P., J. M. Tunon-de-Lara, J. P. Savineau, and R. Marthan. 2001. Tryptase-induced PAR-2-mediated Ca^{2+} signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91(2):995-1003.
51. Tam, E. K., and G. H. Caughey. 1990. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(1):27-32.
52. Molinari, J. F., M. Scuri, W. R. Moore, J. Clark, R. Tanaka, and W. M. Abraham. 1996. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *Am J Respir Crit Care Med* 154(3 Pt 1):649-53.
53. Clark, J. M., W. M. Abraham, C. E. Fishman, R. Forteza, A. Ahmed, A. Cortes, R. L. Warne, W. R. Moore, and R. D. Tanaka. 1995. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1):2076-83.
54. He, S., and A. F. Walls. 1997. Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 328(1):89-97.
55. He, S., M. D. Gaca, and A. F. Walls. 1998. A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J Pharmacol Exp Ther* 286(1):289-97.
56. Akers, I. A., M. Parsons, M. R. Hill, M. D. Hollenberg, S. Sanjar, G. J. Laurent, and R. J. McAnulty. 2000. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(1):L193-L201.
57. Gruber, B. L., R. R. Kew, A. Jelaska, M. J. Marchese, J. Garlick, S. Ren, L. B. Schwartz, and J. H. Korn. 1997. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol* 158(5):2310-7.

58. Cairns, J. A., and A. F. Walls. 1997. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 99(6):1313-21.
59. Cairns, J. A., and A. F. Walls. 1996. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL- 8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol* 156(1):275-83.
60. Compton, S. J., J. A. Cairns, S. T. Holgate, and A. F. Walls. 1998. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 161(4):1939-46.
61. Blair, R. J., H. Meng, M. J. Marchese, S. Ren, L. B. Schwartz, M. G. Tonnesen, and B. L. Gruber. 1997. Human Mast Cells Stimulate Vascular Tube Formation Tryptase Is A Novel, Potent Angiogenic Factor. *J Clin Invest* 99(11):2691-700.
62. Berger, P., D. W. Perng, H. Thabrew, S. J. Compton, J. A. Cairns, A. R. McEuen, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and A. F. Walls. 2001. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91(3):1372-9.
63. Chambers, L. S., J. L. Black, P. Poronnik, and P. R. Johnson. 2001. Functional effects of protease-activated receptor-2 stimulation on human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(6):L1369-78.
64. Lazaar, A. L., S. M. Albelda, J. M. Pilewski, B. Brennan, E. Pure, and R. A. Panettieri, Jr. 1994. T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med* 180(3):807-16.
65. Kim, C. H., L. Rott, E. J. Kunkel, M. C. Genovese, D. P. Andrew, L. Wu, and E. C. Butcher. 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 108(9):1331-9.
66. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.

67. Shirakawa, T., T. Enomoto, S. Shimazu, and J. M. Hopkin. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275(5296):77-9.
68. Oro, A. S., T. J. Guarino, R. Driver, L. Steinman, and D. T. Umetsu. 1996. Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 97(6):1402-8.
69. Tang, L., S. Benjaponpitak, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1998. Reduced prevalence of allergic disease in patients with multiple sclerosis is associated with enhanced IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol* 102(3):428-35.
70. Magnan, A. O., L. G. Mely, C. A. Camilla, M. M. Badier, F. A. Montero-Julian, C. M. Guillot, B. B. Casano, S. J. Prato, V. Fert, P. Bongrand, and D. Vervloet. 2000. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161(6):1790-6.
71. Boniface, S., V. Koscher, E. Mamessier, M. El Biaze, P. Dupuy, A. M. Lorec, C. Guillot, M. Badier, P. Bongrand, D. Vervloet, and A. Magnan. 2003. Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study. *Clin Exp Allergy* 33(9):1238-43.
72. Mamessier, E., K. Botturi, D. Vervloet, and A. Magnan. 2005. [T regulatory lymphocytes, atopy and asthma: a new concept in three dimensions]. *Rev Mal Respir* 22(2 Pt 1):305-11.
73. Seroogy, C. M., and J. E. Gern. 2005. The role of T regulatory cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116(5):996-9.
74. Robinson, D. S. 2009. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy* 39(9):1314-23.
75. Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr, and D. S. Robinson. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363(9409):608-15.

76. Strickland, D. H., P. A. Stumbles, G. R. Zosky, L. S. Subrata, J. A. Thomas, D. J. Turner, P. D. Sly, and P. G. Holt. 2006. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 203(12):2649-60.
77. Karagiannidis, C., M. Akdis, P. Holopainen, N. J. Woolley, G. Hense, B. Ruckert, P. Y. Mantel, G. Menz, C. A. Akdis, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114(6):1425-33.
78. Provoost, S., T. Maes, Y. M. van Durme, P. Gevaert, C. Bachert, C. B. Schmidt-Weber, G. G. Brusselle, G. F. Joos, and K. G. Tournoy. 2009. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy* 64(10):1539-46.
79. Song, C., L. Luo, Z. Lei, B. Li, Z. Liang, G. Liu, D. Li, G. Zhang, B. Huang, and Z. H. Feng. 2008. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 181(9):6117-24.
80. Alcorn, J. F., C. R. Crowe, and J. K. Kolls. 2010. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* 72:495-516.
81. Pang, L., M. Nie, L. Corbett, A. Sutcliffe, and A. J. Knox. 2006. Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities. *J Immunol* 176(6):3788-95.
82. Enokihara, H., T. Koike, Y. Nakamura, K. Yamashiro, N. Tsuruoka, K. Saito, and S. Furusawa. 1996. Eosinophils negatively regulate eosinophilopoiesis by decreasing IL-5 levels. *Int Arch Allergy Immunol* 111 Suppl 1:2-4.
83. Tomaki, M., L. L. Zhao, J. Lundahl, M. Sjostrand, M. Jordana, A. Linden, P. O'Byrne, and J. Lotvall. 2000. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. *J Immunol* 165(7):4040-50.
84. Martin, L. B., H. Kita, K. M. Leiferman, and G. J. Gleich. 1996. Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 109(3):207-15.

85. Ohno, I., Y. Nitta, K. Yamauchi, H. Hoshi, M. Honma, K. Woolley, P. O'Byrne, G. Tamura, M. Jordana, and K. Shirato. 1996. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(3):404-9.
86. Takafuji, S., T. Ohtoshi, H. Takizawa, K. Tadokoro, and K. Ito. 1996. Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells. Effect of cytokines and role of adhesion. *J Immunol* 156(10):3980-5.
87. Leckie, M. J., A. ten Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B. J. O'Connor, C. M. Walls, A. K. Mathur, H. C. Cowley, K. F. Chung, R. Djukanovic, T. T. Hansel, S. T. Holgate, P. J. Sterk, and P. J. Barnes. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356(9248):2144-8.
88. Haldar, P., C. E. Brightling, B. Hargadon, S. Gupta, W. Monteiro, A. Sousa, R. P. Marshall, P. Bradding, R. H. Green, A. J. Wardlaw, and I. D. Pavord. 2009. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 360(10):973-84.
89. Nagaoka, I., M. Hirata, K. Sugimoto, Y. Tsutsumi-Ishii, A. Someya, K. Saionji, and J. Igari. 1998. Evaluation of the expression of human CAP18 gene during neutrophil maturation in the bone marrow. *J Leukoc Biol* 64(6):845-52.
90. Ordonez, C. L., T. E. Shaughnessy, M. A. Matthay, and J. V. Fahy. 2000. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 161(4 Pt 1):1185-90.
91. White, J. R., J. M. Lee, P. R. Young, R. P. Hertzberg, A. J. Jurewicz, M. A. Chaikin, K. Widdowson, J. J. Foley, L. D. Martin, D. E. Griswold, and H. M. Sarau. 1998. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem* 273(17):10095-8.
92. Gadek, J. E., G. A. Fells, D. G. Wright, and R. G. Crystal. 1980. Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase". *Biochem Biophys Res Commun* 95(4):1815-22.

93. De, S., E. T. Zelazny, J. F. Souhrada, and M. Souhrada. 1995. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 78(4):1555-63.
94. Thomas, P. S., D. H. Yates, and P. J. Barnes. 1995. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 152(1):76-80.
95. Fahy, J. V., K. W. Kim, J. Liu, and H. A. Boushey. 1995. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 95(4):843-52.
96. Sur, S., T. B. Crotty, G. M. Kephart, B. A. Hyma, T. V. Colby, C. E. Reed, L. W. Hunt, and G. J. Gleich. 1993. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 148(3):713-9.
97. Fixman, E. D., A. Stewart, and J. G. Martin. 2007. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J* 29(2):379-89.
98. Chanez, P. 2005. Severe asthma is an epithelial disease. *Eur Respir J* 25(6):945-6.
99. Benayoun, L., A. Druilhe, M. C. Dombret, M. Aubier, and M. Pretolani. 2003. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167(10):1360-8.
100. Vermeer, P. D., R. Harson, L. A. Einwalter, T. Moninger, and J. Zabner. 2003. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(3):286-95.
101. Vachier, I., C. Bonnans, C. Chavis, M. Farce, P. Godard, J. Bousquet, and P. Chanez. 2005. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol* 115(1):55-60.
102. Holgate, S. T., G. Roberts, H. S. Arshad, P. H. Howarth, and D. E. Davies. 2009. The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc* 6(8):655-9.

103. Davies, D. E. 2009. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6(8):678-82.
104. Dabbagh, K., K. Takeyama, H. M. Lee, I. F. Ueki, J. A. Lausier, and J. A. Nadel. 1999. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 162(10):6233-7.
105. Louahed, J., M. Toda, J. Jen, Q. Hamid, J. C. Renaud, R. C. Levitt, and N. C. Nicolaides. 2000. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22(6):649-56.
106. Busse, P. J., T. F. Zhang, K. Srivastava, B. P. Lin, B. Schofield, S. C. Sealfon, and X. M. Li. 2005. Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 116(6):1256-63.
107. Simcock, D. E., V. Kanabar, G. W. Clarke, K. Mahn, C. Karner, B. J. O'Connor, T. H. Lee, and S. J. Hirst. 2008. Induction of angiogenesis by airway smooth muscle from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 178(5):460-8.
108. Hoshino, M., M. Takahashi, and N. Aoike. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 107(2):295-301.
109. Hoshino, M., Y. Nakamura, and Q. A. Hamid. 2001. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107(6):1034-8.
110. Lee, Y. C., Y. G. Kwak, and C. H. Song. 2002. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol* 168(7):3595-600.
111. Lee, C. G., H. Link, P. Baluk, R. J. Homer, S. Chapoval, V. Bhandari, M. J. Kang, L. Cohn, Y. K. Kim, D. M. McDonald, and J. A. Elias. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 10(10):1095-103.

112. Ebina, M., T. Takahashi, T. Chiba, and M. Motomiya. 1993. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 148(3):720-6.
113. Pepe, C., S. Foley, J. Shannon, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, M. S. Ludwig, J. G. Martin, and Q. Hamid. 2005. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116(3):544-9.
114. Bara, I., A. Ozier, J. M. Tunon de Lara, R. Marthan, and P. Berger. 2010. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J* 36(5):1174-84.
115. Tillie-Leblond, I., R. Louis, A. Magnan, M. Humbert, J. de Blic, and P. Chanez. 2009. [Asthma: a disease of the whole bronchial tree]. *Rev Mal Respir* 26(8):851-8.
116. Ebina, M., H. Yaegashi, T. Takahashi, M. Motomiya, and M. Tanemura. 1990. Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am Rev Respir Dis* 141(5 Pt 1):1322-6.
117. Mitzner, W. 2004. Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 169(7):787-90.
118. Otis, A. B. 1983. A perspective of respiratory mechanics. *J Appl Physiol* 54(5):1183-7.
119. Johnson, P. R., M. Roth, M. Tamm, M. Hughes, Q. Ge, G. King, J. K. Burgess, and J. L. Black. 2001. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164(3):474-7.
120. Bentley, J. K., and M. B. Hershenson. 2008. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc* 5(1):89-96.
121. Boushey, H. A., M. J. Holtzman, J. R. Sheller, and J. A. Nadel. 1980. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 121(2):389-413.
122. Damsgaard, T. E., B. W. Nielsen, U. Henriques, B. Hansen, T. Herlin, and P. O. Schiotz.

1996. Histamine releasing cells of the newborn. Mast cells from the umbilical cord matrix and basophils from cord blood. *Pediatr Allergy Immunol* 7(2):83-90.
123. Marthan, R., H. Crevel, H. Guénard, and J. P. Savineau. 1992. Responsiveness to histamine in human sensitized airway smooth muscle. *Respir Physiol* 90:239-50.
124. Barnes, N. C., P. J. Piper, and J. F. Costello. 1984. Comparative effects of inhaled leukotriene C₄, leukotriene D₄, and histamine in normal human subjects. *Thorax* 39(7):500-4.
125. Roquet, A., B. Dahlen, M. Kumlin, E. Ihre, G. Anstren, S. Binks, and S. E. Dahlen. 1997. Combined antagonism of leukotrienes and histamine produces predominant inhibition of allergen-induced early and late phase airway obstruction in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 155(6):1856-63.
126. Coleman, R. A., and R. L. Sheldrick. 1989. Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br J Pharmacol* 96(3):688-92.
127. Morrow, J. D., and L. J. Roberts, 2nd. 1996. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 51(1):1-9.
128. Kawikova, I., P. J. Barnes, T. Takahashi, S. Tadjkarimi, M. H. Yacoub, and M. G. Belvisi. 1996. 8-Epi-PGF₂ alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):590-6.
129. Melillo, E., K. L. Woolley, P. J. Manning, R. M. Watson, and P. M. O'Byrne. 1994. Effect of inhaled PGE₂ on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 149(5):1138-41.
130. Wasserman, M. A., D. W. Ducharme, M. G. Wendling, R. L. Griffin, and G. L. Degraaf. 1980. Bronchodilator effects of prostacyclin (PGI₂) in dogs and guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 66(1):53-63.
131. Armour, C. L., P. R. Johnson, M. L. Alfredson, and J. L. Black. 1989. Characterization of contractile prostanoid receptors on human airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 165(2-3):215-22.

132. Hakonarson, H., N. Maskeri, C. Carter, and M. M. Grunstein. 1999. Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest* 103(7):1077-87.
133. Laporte, J. C., P. E. Moore, S. Baraldo, M. H. Jouvin, T. L. Church, I. N. Schwartzman, R. A. Panettieri, Jr., J. P. Kinet, and S. A. Shore. 2001. Direct effects of interleukin-13 on signaling pathways for physiological responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 164(1):141-8.
134. Hessel, E. M., A. J. Van Oosterhout, I. Van Ark, B. Van Esch, G. Hofman, H. Van Loveren, H. F. Savelkoul, and F. P. Nijkamp. 1997. Development of airway hyperresponsiveness is dependent on interferon-gamma and independent of eosinophil infiltration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(3):325-34.
135. Hofstra, C. L., I. Van Ark, G. Hofman, F. P. Nijkamp, P. M. Jardieu, and A. J. Van Oosterhout. 1998. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(5):826-35.
136. Tsukagoshi, H., T. Sakamoto, W. Xu, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1994. Effect of interleukin-1 beta on airway hyperresponsiveness and inflammation in sensitized and nonsensitized Brown-Norway rats. *J Allergy Clin Immunol* 93(2):464-9.
137. Advenier, C., B. Sarria, E. Naline, L. Puybasset, and V. Lagente. 1990. Contractile activity of three endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) on the human isolated bronchus. *Br J Pharmacol* 100(1):168-72.
138. Knott, P. G., A. C. D'Aprile, P. J. Henry, D. W. Hay, and R. G. Goldie. 1995. Receptors for endothelin-1 in asthmatic human peripheral lung. *Br J Pharmacol* 114(1):1-3.
139. Molimard, M., E. Naline, E. Boichot, P. Devillier, V. Lagente, B. Begaud, and C. Advenier. 1998. In vitro-induced human airway hyperresponsiveness to bradykinin. *Eur Respir J* 12(6):1301-6.
140. Barnes, P. J. 1992. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev* 72:699-729.

141. Eglen, R. M., H. Reddy, N. Watson, and R. A. Challiss. 1994. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 15(4):114-119.
142. Pack, R. J., and P. S. Richardson. 1984. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopy study. *J Anat*:493-502.
143. Richardson, J. B. 1981. Non adrenergic inhibitory innervation of the lung. *Lung* 159:315-22.
144. Regoli, D., A. Boudon, and J. L. Fauchere. 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 46(4):551-99.
145. Ben-Jebria, A., R. Marthan, M. Rossetti, and J. P. Savineau. 1993. Effect of passive sensitization on the mechanical activity of human isolated bronchial smooth muscle induced by substance P, neurokinin A and VIP. *Br J Pharmacol*. 109:131-6.
146. Advenier, C., V. Lagente, and E. Boichot. 1997. The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. *Eur Respir J* 10(8):1892-906.
147. Savineau, J. P., and R. Marthan. 1994. Activation properties of chemically skinned fibres from human isolated bronchial smooth muscle. *J Physiol (Lond)* 474(3):433-8.
148. Somlyo, A. V., and A. P. Somlyo. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372:231-6.
149. Savineau, J. P., and R. Marthan. 1997. Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathopharmacological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 11:289-99.
150. de Lanerolle, P., and R. J. Paul. 1991. Myosin phosphorylation/dephosphorylation and regulation of airway smooth muscle contractility. *Am J Physiol* 261:L1-14.
151. Rozenblum, G. T., and M. Gimona. 2008. Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40(10):1990-5.

152. Sobieszek, A., B. Sarg, H. Lindner, and C. Y. Seow. Phosphorylation of caldesmon by myosin light chain kinase increases its binding affinity for phosphorylated myosin filaments. *Biol Chem* 391(9):1091-104.
153. Cox, G., N. C. Thomson, A. S. Rubin, R. M. Niven, P. A. Corris, H. C. Siersted, R. Olivenstein, I. D. Pavord, D. McCormack, R. Chaudhuri, J. D. Miller, and M. Laviolette. 2007. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med* 356(13):1327-37.
154. Begueret, H., P. Berger, J. M. Vernejoux, L. Dubuisson, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 2007. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 62(1):8-15.
155. Solway, J., and C. G. Irvin. 2007. Airway smooth muscle as a target for asthma therapy. *N Engl J Med* 356(13):1367-9.
156. Elias, J. A., Y. Wu, T. Zheng, and R. Panettieri. 1997. Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines. *Am J Physiol* 273(3 Pt 1):L648-55.
157. McKay, S., J. C. de Jongste, P. R. Saxena, and H. S. Sharma. 1998. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor- beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(6):823-33.
158. Kassel, O., F. Schmidlin, C. Duvernelle, B. Gasser, G. Massard, and N. Frossard. 1999. Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. *Eur Respir J* 13(5):951-4.
159. John, M., B. T. Au, P. J. Jose, S. Lim, M. Saunders, P. J. Barnes, J. A. Mitchell, M. G. Belvisi, and K. F. Chung. 1998. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(1):84-90.
160. Chung, K. F., H. J. Patel, E. J. Fadlon, J. Rousell, E. B. Haddad, P. J. Jose, J. Mitchell, and M. Belvisi. 1999. Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br J Pharmacol* 127(5):1145-50.

161. John, M., S. J. Hirst, P. J. Jose, A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C. H. Twort, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1997. Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J Immunol* 158(4):1841-7.
162. Hakonarson, H., C. Carter, C. Kim, and M. M. Grunstein. 1999. Altered expression and action of the low-affinity IgE receptor FcepsilonRII (CD23) in asthmatic airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 104(3 Pt 1):575-84.
163. Saunders, M. A., J. A. Mitchell, P. M. Seldon, M. H. Yacoub, P. J. Barnes, M. A. Giembycz, and M. G. Belvisi. 1997. Release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human cultured airway smooth muscle cells: suppression by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 120(4):545-6.
164. Pang, L., and A. J. Knox. 1997. Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 121(3):579-87.
165. Roth, M., P. R. Johnson, P. Borger, M. P. Bihl, J. J. Rudiger, G. G. King, Q. Ge, K. Hostettler, J. K. Burgess, J. L. Black, and M. Tamm. 2004. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 351(6):560-74.
166. Sestini, P., L. Armetti, G. Gambaro, M. G. Pieroni, R. M. Refini, A. Sala, A. Vaghi, G. C. Folco, S. Bianco, and M. Robuschi. 1996. Inhaled PGE₂ prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE₄ excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):572-5.
167. Brightling, C. E., P. Bradding, F. A. Symon, S. T. Holgate, A. J. Wardlaw, and I. D. Pavord. 2002. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346(22):1699-705.
168. Yang, W., D. Kaur, Y. Okayama, A. Ito, A. J. Wardlaw, C. E. Brightling, and P. Bradding. 2006. Human Lung Mast Cells Adhere to Human Airway Smooth Muscle, in Part, via Tumor Suppressor in Lung Cancer-1. *J Immunol* 176(2):1238-43.

169. Girodet, P. O., A. Ozier, T. Trian, H. Begueret, O. Ousova, J. M. Vernejoux, P. Chanez, R. Marthan, P. Berger, and J. M. Tunon de Lara. 2010. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 65(8):1004-12.
170. Hauck, R. W., C. Schulz, A. Schomig, R. K. Hoffman, and R. A. Panettieri, Jr. 1999. alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):L22-9.
171. Reed, C. E., and H. Kita. 2004. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 114(5):997-1008; quiz 1009.
172. Nystedt, S., K. Emilsson, C. Wahlestedt, and J. Sundelin. 1994. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20):9208-12.
173. Nystedt, S., K. Emilsson, A. K. Larsson, B. Strombeck, and J. Sundelin. 1995. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232(1):84-9.
174. Schmidlin, F., S. Amadesi, R. Vidil, M. Trevisani, N. Martinet, G. Caughey, M. Tognetto, G. Cavallero, C. Mapp, P. Geppetti, and N. W. Bunnett. 2001. Expression and function of proteinase-activated receptor 2 in human bronchial smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 164(7):1276-81.
175. Chambers, L. S., J. L. Black, Q. Ge, S. M. Carlin, W. W. Au, M. Poniris, J. Thompson, P. R. Johnson, and J. K. Burgess. 2003. PAR-2 activation, PGE2, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3):L619-27.
176. Corvera, C. U., O. Dery, K. McConalogue, S. K. Bohm, L. M. Khitin, G. H. Caughey, D. G. Payan, and N. W. Bunnett. 1997. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase- activated receptor 2. *J Clin Invest* 100(6):1383-93.
177. Molino, M., M. J. Woolkalis, J. Reavey-Cantwell, D. Pratico, P. Andrade-Gordon, E. S. Barnathan, and L. F. Brass. 1997. Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment. *J Biol Chem* 272(17):11133-41.

178. Uehara, A., K. Muramoto, H. Takada, and S. Sugawara. 2003. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol* 170(11):5690-6.
179. Miike, S., A. S. McWilliam, and H. Kita. 2001. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167(11):6615-22.
180. Oikonomopoulou, K., K. K. Hansen, M. Saifeddine, I. Tea, M. Blaber, S. I. Blaber, I. Scarisbrick, P. Andrade-Gordon, G. S. Cottrell, N. W. Bunnett, E. P. Diamandis, and M. D. Hollenberg. 2006. Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem* 281(43):32095-112.
181. Camerer, E., W. Huang, and S. R. Coughlin. 2000. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5255-60.
182. Grunstein, M. M., H. Veler, X. Shan, J. Larson, J. S. Grunstein, and S. Chuang. 2005. Proasthmatic effects and mechanisms of action of the dust mite allergen, Der p 1, in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 116(1):94-101.
183. Chiou, Y. L., and C. Y. Lin. 2009. Der p2 activates airway smooth muscle cells in a TLR2/MyD88-dependent manner to induce an inflammatory response. *J Cell Physiol* 220(2):311-8.
184. Sun, G., M. A. Stacey, M. Schmidt, L. Mori, and S. Mattoli. 2001. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol* 167(2):1014-21.
185. King, C., S. Brennan, P. J. Thompson, and G. A. Stewart. 1998. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* 161(7):3645-51.
186. Sohn, M. H., Y. A. Lee, K. Y. Jeong, S. Sim, K. E. Kim, T. S. Yong, and M. H. Shin. 2004. German cockroach extract induces activation of human eosinophils to release cytotoxic inflammatory mediators. *Int Arch Allergy Immunol* 134(2):141-9.

187. Cocks, T. M., and J. D. Moffatt. 2000. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 21(3):103-8.
188. Coughlin, S. R. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407(6801):258-64.
189. Ossovskaya, V. S., and N. W. Bunnett. 2004. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84(2):579-621.
190. Nystedt, S., V. Ramakrishnan, and J. Sundelin. 1996. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem* 271(25):14910-5.
191. Hamilton, J. R., J. M. Chow, and T. M. Cocks. 1999. Protease-activated receptor-2 turnover stimulated independently of receptor activation in porcine coronary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 127(3):617-22.
192. Soh, U. J., M. R. Does, B. Chen, and J. Trejo. 2010. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 160(2):191-203.
193. DeFea, K. A., J. Zalevsky, M. S. Thoma, O. Dery, R. D. Mullins, and N. W. Bunnett. 2000. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148(6):1267-81.
194. Stalheim, L., Y. Ding, A. Gullapalli, M. M. Paing, B. L. Wolfe, D. R. Morris, and J. Trejo. 2005. Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Mol Pharmacol* 67(1):78-87.
195. Ricks, T. K., and J. Trejo. 2009. Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J Biol Chem* 284(49):34444-57.
196. Bohm, S. K., E. F. Grady, and N. W. Bunnett. 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322(Pt 1):1-18.
197. Hung, D. T., T. K. Vu, V. I. Wheaton, K. Ishii, and S. R. Coughlin. 1992. Cloned platelet

thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest* 89(4):1350-3.

198. Van Biesen, T., L. M. Luttrell, B. E. Hawes, and R. J. Leftkowitz. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 17:698-714.

199. Siehler, S. 2009. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 158(1):41-9.

200. Steinhoff, M., N. Vergnolle, S. H. Young, M. Tognetto, S. Amadesi, H. S. Ennes, M. Trevisani, M. D. Hollenberg, J. L. Wallace, G. H. Caughey, S. E. Mitchell, L. M. Williams, P. Geppetti, E. A. Mayer, and N. W. Bunnett. 2000. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6(2):151-158.

201. D'Andrea, M. R., C. K. Derian, D. Leturcq, S. M. Baker, A. Brunmark, P. Ling, A. L. Darrow, R. J. Santulli, L. F. Brass, and P. Andrade-Gordon. 1998. Characterization of Protease-activated Receptor-2 Immunoreactivity in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem* 46(2):157-64.

202. Lindner, J. R., M. L. Kahn, S. R. Coughlin, G. R. Sambrano, E. Schauble, D. Bernstein, D. Foy, A. Hafezi-Moghadam, and K. Ley. 2000. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol* 165(11):6504-10.

203. Schmidlin, F., S. Amadesi, K. Dabbagh, D. E. Lewis, P. Knott, N. W. Bunnett, P. R. Gater, P. Geppetti, C. Bertrand, and M. E. Stevens. 2002. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol* 169(9):5315-21.

204. St-Onge, M., S. Lagarde, C. Laflamme, E. Rollet-Labelle, L. Marois, P. H. Naccache, and M. Pouliot. Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fcγ-receptor activation in human neutrophils. *Faseb J* 24(6):2116-25.

205. Vliagoftis, H., A. Schwingshackl, C. D. Milne, M. Duszyk, M. D. Hollenberg, J. L. Wallace, A. D. Befus, and R. Moqbel. 2000. Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 106(3):537-45.

206. Cocks, T. M., B. Fong, J. M. Chow, G. P. Anderson, A. G. Frauman, R. G. Goldie, P. J. Henry, M. J. Carr, J. R. Hamilton, and J. D. Moffatt. 1999. A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature* 398(6723):156-60.
207. Lan, R. S., G. A. Stewart, and P. J. Henry. 2000. Modulation of airway smooth muscle tone by protease activated receptor-1,-2,-3 and -4 in trachea isolated from influenza A virus-infected mice. *Br J Pharmacol* 129(1):63-70.
208. Hassan, M., T. Jo, P. A. Risse, B. Tolloczko, C. Lemiere, R. Olivenstein, Q. Hamid, and J. G. Martin. 2010. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125(5):1037-1045 e3.
209. Ramos-Barbon, D., R. Fraga-Iriso, N. S. Brienza, C. Montero-Martinez, H. Vereas-Hernando, R. Olivenstein, C. Lemiere, P. Ernst, Q. A. Hamid, and J. G. Martin. 2010. T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 182(3):317-24.
210. Chupp, G. L., C. G. Lee, N. Jarjour, Y. M. Shim, C. T. Holm, S. He, J. D. Dziura, J. Reed, A. J. Coyle, P. Kiener, M. Cullen, M. Grandsaigne, M. C. Dombret, M. Aubier, M. Pretolani, and J. A. Elias. 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 357(20):2016-27.
211. Muzzarelli, R. A. 1999. Native, industrial and fossil chitins. *Exs* 87:1-6.
212. Muzzarelli, R. A., M. Mattioli-Belmonte, A. Pugnali, and G. Biagini. 1999. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing. *Exs* 87:251-64.
213. Latge, J. P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66(2):279-90.
214. Proespraiwong, P., A. Tassanakajon, and V. Rimphanitchayakit. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 156(2):86-96.

215. Andersson, M. G., and L. Cerenius. 2002. Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Dis Aquat Organ* 51(2):139-47.
216. Kramer, K. J., and S. Muthukrishnan. 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol* 27(11):887-900.
217. Beintema, J. J. 1994. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett* 350(2-3):159-63.
218. Suzuki, M., W. Fujimoto, M. Goto, M. Morimatsu, B. Syuto, and T. Iwanaga. 2002. Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *J Histochem Cytochem* 50(8):1081-9.
219. Funkhouser, J. D., and N. N. Aronson, Jr. 2007. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol* 7:96.
220. Bussink, A. P., D. Speijer, J. M. Aerts, and R. G. Boot. 2007. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* 177(2):959-70.
221. Fusetti, F., H. von Moeller, D. Houston, H. J. Rozeboom, B. W. Dijkstra, R. G. Boot, J. M. Aerts, and D. M. van Aalten. 2002. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem* 277(28):25537-44.
222. Chou, Y. T., S. Yao, R. Czerwinski, M. Fleming, R. Krykbaev, D. Xuan, H. Zhou, J. Brooks, L. Fitz, J. Strand, E. Presman, L. Lin, A. Aulabaugh, and X. Huang. 2006. Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry* 45(14):4444-54.
223. Fusetti, F., T. Pijning, K. H. Kalk, E. Bos, and B. W. Dijkstra. 2003. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J Biol Chem* 278(39):37753-60.
224. Webb, D. C., A. N. McKenzie, and P. S. Foster. 2001. Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein. *J Biol Chem* 276(45):41969-76.

225. Hollak, C. E., S. van Weely, M. H. van Oers, and J. M. Aerts. 1994. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 93(3):1288-92.
226. Boot, R. G., G. H. Renkema, M. Verhoek, A. Strijland, J. Blik, T. M. de Meulemeester, M. M. Mannens, and J. M. Aerts. 1998. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 273(40):25680-5.
227. Bussink, A. P., M. van Eijk, G. H. Renkema, J. M. Aerts, and R. G. Boot. 2006. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol* 252:71-128.
228. Boot, R. G., E. F. Blommaart, E. Swart, K. Ghauharali-van der Vlugt, N. Bijl, C. Moe, A. Place, and J. M. Aerts. 2001. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* 276(9):6770-8.
229. Boot, R. G., A. P. Bussink, M. Verhoek, P. A. de Boer, A. F. Moorman, and J. M. Aerts. 2005. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem* 53(10):1283-92.
230. Shuhui, L., Y. K. Mok, and W. S. Wong. 2009. Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 149(4):369-77.
231. Elias, J. A., R. J. Homer, Q. Hamid, and C. G. Lee. 2005. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116(3):497-500.
232. Zhu, Z., T. Zheng, R. J. Homer, Y. K. Kim, N. Y. Chen, L. Cohn, Q. Hamid, and J. A. Elias. 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304(5677):1678-82.
233. Choi, E. H., P. A. Zimmerman, C. B. Foster, S. Zhu, V. Kumaraswami, T. B. Nutman, and S. J. Chanock. 2001. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun* 2(5):248-53.
234. Dickey, B. F. 2007. Exoskeletons and exhalation. *N Engl J Med* 357(20):2082-4.

235. Kzhyshkowska, J., A. Gratchev, and S. Goerd. 2007. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights* 2:128-46.
236. Steck, E., S. Breit, S. J. Breusch, M. Axt, and W. Richter. 2002. Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 299(1):109-15.
237. Johansen, J. S., M. Stoltenberg, M. Hansen, A. Florescu, K. Horslev-Petersen, I. Lorenzen, and P. A. Price. 1999. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 38(7):618-26.
238. Johansen, J. S., M. K. Williamson, J. S. Rice, and P. A. Price. 1992. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 7(5):501-12.
239. Hakala, B. E., C. White, and A. D. Recklies. 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 268(34):25803-10.
240. Renkema, G. H., R. G. Boot, F. L. Au, W. E. Donker-Koopman, A. Strijland, A. O. Muijsers, M. Hrebicek, and J. M. Aerts. 1998. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 251(1-2):504-9.
241. Volck, B., P. A. Price, J. S. Johansen, O. Sorensen, T. L. Benfield, H. J. Nielsen, J. Calafat, and N. Borregaard. 1998. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians* 110(4):351-60.
242. Johansen, J. S., B. V. Jensen, A. Roslind, D. Nielsen, and P. A. Price. 2006. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(2):194-202.
243. Kzhyshkowska, J., S. Mamidi, A. Gratchev, E. Kremmer, C. Schmuttermayr, L. Krusell, G. Haus, J. Utikal, K. Schledzewski, J. Scholtze, and S. Goerd. 2006. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages

and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 107(8):3221-8.

244. Johansen, J. S., H. S. Jensen, and P. A. Price. 1993. A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol* 32(11):949-55.

245. Harvey, S., M. Weisman, J. O'Dell, T. Scott, M. Krusemeier, J. Visor, and C. Swindlehurst. 1998. Chondrex: new marker of joint disease. *Clin Chem* 44(3):509-16.

246. Pretolani, M. 2008. [From mollusk to man: YKL-40, a novel mediator of severe asthma]. *Med Sci (Paris)* 24(3):235-7.

247. Kucur, M., F. K. Isman, B. Karadag, V. A. Vural, and S. Tavsanoğlu. 2007. Serum YKL-40 levels in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 18(5):391-6.

248. Peltomaa, R., L. Paimela, S. Harvey, T. Helve, and M. Leirisalo-Repo. 2001. Increased level of YKL-40 in sera from patients with early rheumatoid arthritis: a new marker for disease activity. *Rheumatol Int* 20(5):192-6.

249. Erzin, Y., H. Uzun, A. Karatas, and A. F. Celik. 2008. Serum YKL-40 as a marker of disease activity and stricture formation in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 23(8 Pt 2):e357-62.

250. Vind, I., J. S. Johansen, P. A. Price, and P. Munkholm. 2003. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 38(6):599-605.

251. Boot, R. G., T. A. van Achterberg, B. E. van Aken, G. H. Renkema, M. J. Jacobs, J. M. Aerts, and C. J. de Vries. 1999. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3):687-94.

252. Johansen, J. S., P. Christoffersen, S. Møller, P. A. Price, J. H. Henriksen, C. Garbarsch, and F. Bendtsen. 2000. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 32(6):911-20.

253. Rathcke, C. N., and H. Vestergaard. 2006. YKL-40, a new inflammatory marker with relation to insulin resistance and with a role in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Inflamm Res* 55(6):221-7.
254. Johansen, J. S., N. A. Schultz, and B. V. Jensen. 2009. Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncol* 5(7):1065-82.
255. De Ceuninck, F., S. Gauffillier, A. Bonnaud, M. Sabatini, C. Lesur, and P. Pastoureau. 2001. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 285(4):926-31.
256. Recklies, A. D., C. White, and H. Ling. 2002. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 365(Pt 1):119-26.
257. Malinda, K. M., L. Ponce, H. K. Kleinman, L. M. Shackelton, and A. J. Millis. 1999. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res* 250(1):168-73.
258. Nishikawa, K. C., and A. J. Millis. 2003. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 287(1):79-87.
259. Donnelly, L. E., and P. J. Barnes. 2004. Acidic mammalian chitinase--a potential target for asthma therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25(10):509-11.
260. Zhao, J., L. H. Yeong, and W. S. Wong. 2007. Dexamethasone alters bronchoalveolar lavage fluid proteome in a mouse asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 142(3):219-29.
261. Wong, W. S., H. Zhu, and W. Liao. 2007. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist MK-571 alters bronchoalveolar lavage fluid proteome in a mouse asthma model. *Eur J Pharmacol* 575(1-3):134-41.
262. Tang, H., Z. Fang, Y. Sun, B. Li, Z. Shi, J. Chen, T. Zhang, and Q. Xiu. 2010. YKL-40 in

asthmatic patients, and its correlations with exacerbation, eosinophils and immunoglobulin E. *Eur Respir J* 35(4):757-60.

263. Kuepper, M., K. Bratke, and J. C. Virchow. 2008. Chitinase-like protein and asthma. *N Engl J Med* 358(10):1073-5; author reply 1075.

264. Ober, C., Z. Tan, Y. Sun, J. D. Possick, L. Pan, R. Nicolae, S. Radford, R. R. Parry, A. Heinzmann, K. A. Deichmann, L. A. Lester, J. E. Gern, R. F. Lemanske, Jr., D. L. Nicolae, J. A. Elias, and G. L. Chupp. 2008. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 358(16):1682-91.

265. Moffatt, M. F., and W. O. Cookson. 2008. Asthma and chitinases. *N Engl J Med* 358(16):1725-6.

266. Deng, H., G. A. Dokshin, J. Lei, A. M. Goldsmith, K. N. Bitar, D. C. Fingar, M. B. Hershenson, and J. K. Bentley. 2008. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 283(15):10198-207.

267. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):research0034.1–0034.11.

268. Marone, R., D. Hess, D. Dankort, W. J. Muller, N. E. Hynes, and A. Badache. 2004. Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* 6(6):515-22.

269. Trian, T., P. O. Girodet, O. Ousova, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2006. RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(1):49-55.

270. Tang, H., K. L. Kuhen, and F. Wong-Staal. 1999. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 33:133-70.

271. Wong, L. F., L. Goodhead, C. Prat, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman, and N. D. Mazarakis. 2006. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum Gene Ther* 17(1):1-9.

272. Dougherty, W. G., J. A. Lindbo, H. A. Smith, T. D. Parks, S. Swaney, and W. M. Proebsting. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 7(5):544-52.
273. Timmons, L., and A. Fire. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395(6705):854.
274. Montgomery, M. K., S. Xu, and A. Fire. 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15502-7.
275. Clemens, M. J. 1997. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 29(7):945-9.
276. Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494-8.
277. Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26(2):199-213.
278. Cullen, B. R. 2002. RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol* 3(7):597-9.
279. Tijsterman, M., R. F. Ketting, and R. H. Plasterk. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36:489-519.
280. Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel, and P. A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13(24):3191-7.
281. Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi, and G. J. Hannon. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293(5532):1146-50.
282. Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296(5567):550-3.

283. Wiznerowicz, M., and D. Trono. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77(16):8957-61.
284. Simmons, A., and K. Jantz. 2006. Use of a lentivirus/VSV pseudotype virus for highly efficient genetic redirection of human peripheral blood lymphocytes. *Nat Protoc* 1(6):2688-700.
285. Yasui, K., R. A. Furuta, K. Matsumoto, Y. Tani, and J. Fujisawa. 2005. HIV-1-derived self-inactivating lentivirus vector induces megakaryocyte lineage-specific gene expression. *Microbes Infect* 7(2):240-7.
286. Ui-Tei, K., Y. Naito, F. Takahashi, T. Haraguchi, H. Ohki-Hamazaki, A. Juni, R. Ueda, and K. Saigo. 2004. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32(3):936-48.
287. Berger, P., J. Lavalley, R. Rouiller, F. Laurent, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara. 1999. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 14(6):1394-402.
288. Hong, J. H., J. Y. Hong, B. Park, S. I. Lee, J. T. Seo, K. E. Kim, M. H. Sohn, and D. M. Shin. 2008. Chitinase activates protease-activated receptor-2 in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(5):530-5.
289. Kauffman, H. F., J. F. Tomee, M. A. van de Riet, A. J. Timmerman, and P. Borger. 2000. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 105(6 Pt 1):1185-93.
290. Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61(11):4569-74.
291. Weber, E., S. Hunter, K. Stedman, S. Dreitz, T. Olivry, A. Hillier, and C. McCall. 2003. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. *J Allergy Clin Immunol* 112(1):79-86.
292. O'Neil, S. E., T. K. Heinrich, B. J. Hales, L. A. Hazell, D. C. Holt, K. Fischer, and W. R. Thomas. 2006. The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 36(6):831-9.

293. Hong, J. H., S. I. Lee, K. E. Kim, T. S. Yong, J. T. Seo, M. H. Sohn, and D. M. Shin. 2004. German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 113(2):315-9.
294. Page, K., J. R. Ledford, P. Zhou, K. Dienger, and M. Wills-Karp. 2010. Mucosal sensitization to German cockroach involves protease-activated receptor-2. *Respir Res* 11:62.
295. Powning, R. F., and H. Irzykiewicz. 1963. A Chitinase from the Gut of the Cockroach *Periplaneta Americana*. *Nature* 200:1128.
296. Bernier, I., J. C. Landureau, P. Grellet, and P. Jolles. 1974. Characterization of chitinases from haemolymph and cell cultures of cockroach (*Periplaneta americana*). *Comp Biochem Physiol B* 47(1):41-4.
297. Trian, T., G. Benard, H. Begueret, R. Rossignol, P. O. Girodet, D. Ghosh, O. Ousova, J. M. Vernejoux, R. Marthan, J. M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2007. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204(13):3173-81.
298. Freund-Michel, V., and N. Frossard. 2006. Inflammatory conditions increase expression of protease-activated receptor-2 by human airway smooth muscle cells in culture. *Fundam Clin Pharmacol* 20(4):351-7.
299. Knight, D. A., S. Lim, A. K. Scaffidi, N. Roche, K. F. Chung, G. A. Stewart, and P. J. Thompson. 2001. Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108(5):797-803.
300. Cottrell, G. S., S. Amadesi, F. Schmidlin, and N. Bunnett. 2003. Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6):1191-7.
301. Molino, M., E. S. Barnathan, R. Numerof, J. Clark, M. Dreyer, A. Cumashi, J. A. Hoxie, N. Schechter, M. Woolkalis, and L. F. Brass. 1997. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272(7):4043-9.
302. Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter, and R. Plevin. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53(2):245-82.