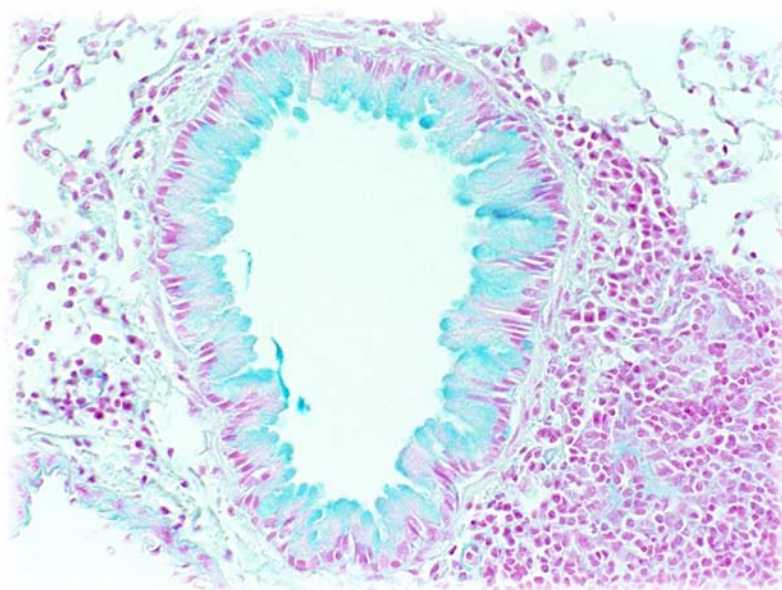


**Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement
Laboratoire de Pneumologie**

**Etude du rôle de la métalloprotéase MMP-12
dans l'asthme**



Promoteurs : D. CATALDO; J-M. FOIDART

Céline CRAHAY
**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

Année 2010-2011

Remerciements

En préambule de ce travail, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse de doctorat.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Michel Foidart ainsi que le Professeur Agnès Noel pour m'avoir accueillie au sein de leur Laboratoire de renom.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Didier Cataldo, tout d'abord pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche en pneumologie. Je le remercie également en tant que promoteur de cette thèse de doctorat, pour s'être montré à l'écoute tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi que pour son dynamisme, ses encouragements, son enthousiasme, son inspiration, ses avis compétents, son aide et le temps qu'il a accepté de me consacrer malgré son emploi du temps très chargé. Enfin, je voudrais le remercier pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à mes collègues, Jonathan, Gene, Sandrine, Christine, Fabienne, Eléonore, Gilles, Ludovic et Natacha qui m'ont aidée quotidiennement tout au long de ces années de recherche.

Je remercie plus particulièrement Maud qui a toujours été présente pour répondre à mes questions, pour ses conseils et avis compétents et pour avoir eu la gentillesse de relire ce travail.

Je remercie également Lorin qui a toujours été à l'écoute et qui a su me faire rire chaque fois que j'en avais besoin. Merci pour tes encouragements et ton soutien ainsi que pour les « poses-coca » qui m'ont bien souvent remonté le moral.

Enfin, un énorme merci à Flo pour son soutien, ses conseils, ses encouragements, son écoute et tout ce qu'elle a fait pour moi tout au long de ce doctorat. Tu as toujours été extrêmement disponible pour m'aider tant au niveau professionnel que personnel. Tu es pour moi un exemple à suivre dans le travail, ta persévérance, ton assiduité et ta volonté ainsi que ton enthousiasme ont toujours su me motiver. Merci pour ton amitié vraie et sincère.

Je voudrais également remercier les Docteurs Emmanuel Di Valentin et Nancy Garbacky pour leurs conseils avisés durant la réalisation de ce travail. Merci pour leur aide considérable, leur compétence et pour avoir eu la gentillesse de relire ce travail.

Merci à Hélène Brisys, Carine Van de Walle et Guy Roland pour leur précieuse aide au niveau administratif.

Merci au Professeur Louis pour m'avoir facilité les interactions avec les autres membres du service de Pneumologie.

Je n'oublie pas mes parents ainsi qu'Alexandra et Thomas qui, tout au long de mes études, ont toujours su m'offrir leur soutien, leur écoute, leur compréhension, leurs encouragements, leur patience et leur affection. Merci de m'avoir incitée à aller au bout des choses, merci pour l'éducation que vous m'avez transmise.

Mes derniers remerciements qui sont, à mes yeux, les plus importants, iront à Steve et à ma fille, Lisa. Je tiens à les remercier pour leur tendresse, leur amour, leurs rires et leur bonne humeur qui m'ont permis de faire face dans les moments difficiles. Je les remercie également pour le soutien sans condition qu'ils m'ont apporté !

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, **MERCI !!***

Liste des publications personnelles

1. New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma.
Crahay C, Di Valentin E, Garbacki N, Hennuy B, Guéders M, Noël A, Foidart JM, Grooten J, Colige A, Piette J, Cataldo D.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Feb;296(2):L185-97. Epub 2008 Nov 21
2. Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling?
Garbacki N, Di Valentin E, Piette J, Cataldo D, **Crahay C**, Colige A.
Pulm Pharmacol Ther. 2009 Aug;22(4):267-78. Epub 2009 Mar 25. Review.
3. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production.
Gueders MM, Paulissen G, **Crahay C**, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart JM, Noël A, Cataldo DD.
Inflamm Res. 2009 Dec;58(12):845-54. Epub 2009 Jun 9.
4. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer.
Rocks N, Paulissen G, El Hour M, Quesada F, **Crahay C**, Gueders M, Foidart JM, Noel A, Cataldo D.
Biochimie. 2008 Feb;90(2):369-79. Epub 2007 Sep 2. Review.
5. The metalloproteinase ADAM-12 regulates bronchial epithelial cell proliferation and apoptosis.
Rocks N, Estrella C, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Gilles C, Guéders MM, **Crahay C**, Foidart JM, Gosset P, Noel A, Cataldo DD.
Cell Prolif. 2008 Dec;41(6):988-1001.
6. Biomarker discovery in asthma-related inflammation and remodeling.
Calvo FQ, Fillet M, de Seny D, Meuwis MA, Maree R, **Crahay C**, Paulissen G, Rocks N, Gueders M, Wehenkel L, Merville MP, Louis R, Foidart JM, Noël A, Cataldo D.
Proteomics. 2009 Apr;9(8):2163-70.

7. Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases.

Paulissen G, Rocks N, Gueders MM, **Crahay C**, Quesada-Calvo F, Bekaert S, Hacha J, El Hour M, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD.

Respir Res. 2009 Dec 24;10:127. Review.

8. MMP-12 inhibition reduces airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in mouse model of allergic asthma

Crahay C, Garbacki N, Quesada-Calvo F, Di Valentin E, Gueders M, Hacha J, Paulissen G, Noel A, Foidart J-M, Piette J, Colige A, Cataldo D.

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Photo représentative d'une coupe histologique de bronche normale	17
<u>Figure 2</u> : Représentation d'une bronche saine et d'une bronche de sujet asthmatique	19
<u>Figure 3</u> : Conséquences de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'asthme	19
<u>Figure 4</u> : Taux de prévalence de l'asthme dans le monde	21
<u>Figure 5</u> : Les différents types d'allergènes présents dans l'environnement	25
<u>Figure 6</u> : Rôle des cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme	28
<u>Figure 7</u> : Rôle de l'arginase dans l'asthme	30
<u>Figure 8</u> : Effets de la chitinase acide du mammifère sur l'expression de chimiokines et sur l'inflammation dans l'asthme	32
<u>Figure 9</u> : Rôle de CCL-11 dans la physiopathologie de l'asthme	33
<u>Figure 10</u> : Le remodelage bronchique	34
<u>Figure 11</u> : Structure générale des MMPs	44
<u>Figure 12</u> : Structure de la MMP-12	54

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Classification de la sévérité de l'asthme	22
<u>Tableau 2</u> : Classification des MMPs	48

Liste des abréviations

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>
ADAM-TS	<i>A Distintegrin and Metalloprotease with Thombospondin domain</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGR2	<i>Anterior Gradient 2</i>
AMCase	Chitinase Acide du Mammifère
ARG1	Arginase 1
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CLCA-1	<i>Calcium Activated Chloride Channel-1</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
Der p 1	Dermatophogoides Pteronyssinus
ECP	<i>Eosinophil Cationic Protein</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ENA-78	<i>Epithelial-derived Neutrophil-Activating protein-78</i>
FCGR2B	<i>Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GM-CSF	<i>Granulocytes Macrophage colony-stimulating Factor</i>
GRE	<i>Glucocorticoid responsive Element</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukine
kDa	kilo Dalton
LBA	Lavage Bronchoalvéolaire
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>

MI	Millilitre
MMP	<i>Matrix Metalloprotease</i>
MT-MMP	MMP transmembranaire
MUC	Mucine
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
OVA	Ovalbumine
PAR	<i>Proteinase Activated Receptor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PKC	Protéine Kinase C
PON 1	Paraoxonase 1
PUM	<i>Putative Metalloprotease</i>
RT-PCR	<i>Real Time- Polymerase cyclic Reaction</i>
αSMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
SLC26A4	<i>solute carrier family 26, member 4</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloprotease</i>
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde

Table des matières

I. INTRODUCTION	13
1. L'ASTHME	14
A. Généralités à propos de l'asthme	15
a. Définition de l'asthme	15
b. Histologie pulmonaire normale	15
- L'arbre bronchique	15
- Les bronches	16
- Les bronchioles	17
- Les alvéoles	18
c. Symptômes de l'asthme	18
d. Prévalence de l'asthme	20
e. Classification des différents types d'asthme	22
f. Causes et facteurs de risque de l'asthme	23
B. Physiopathologie de l'asthme	26
a. La réponse Th2	26
b. Les cytokines impliquées dans la réponse asthmatique	28
c. Rôle de l'arginase I dans l'asthme	29
d. Rôle des chitinases et chitinases-like dans l'asthme	30
e. Rôle de CCL-11 dans l'asthme	31
C. Le remodelage bronchique	34
a. Desquamation épithéliale	35
b. Fibrose sous-épithéliale	35
c. Augmentation de la masse du muscle lisse	36
d. Hyperplasie glandulaire	37

e. Angiogenèse	38
f. Modifications du cartilage bronchique	38
D. Traitements de l'asthme	39
a. Traitements étiologiques	39
b. Traitements de la crise d'asthme	40
c. Traitements de fond	40
- Les anti-inflammatoires	40
- Traitements de l'obstruction bronchique	41
2. Les métalloprotéases matricielles	42
A. Introduction	43
B. Structure des MMPs	43
C. Classification des MMPs	44
a. Les collagénases interstitielles	44
b. Les gélatinases	45
c. Les stromélysines	46
d. Les métalloprotéases membranaires	46
e. Les matrilysines	47
f. Les autres MMPs	47
D. Régulation de l'activité des MMPs	49
E. Rôles des MMPs dans l'asthme	50
3. La métalloprotéase matricielle-12 (MMP-12)	52
A. Introduction	53

B. Structure de la MMP-12	53
C. Régulation de l'expression et de l'activation de la MMP-12	54
a. Régulation transcriptionnelle	54
b. Régulation post-transcriptionnelle	54
D. Implications physiologiques de la MMP-12	55
E. Implication de la MMP-12 dans différentes pathologies	55
4. Les modèles murins d'asthme	70
II. BUTS ET PLAN DU TRAVAIL	84
<hr/>	
III. RESULTATS	87
<hr/>	
A. Découverte de nouveaux biomarqueurs de l'asthme dans un modèle murin d'inflammation allergique aiguë et dans un modèle murin de remodelage bronchique chronique	88
B. Design du siRNA ciblant la MMP-12 dans le but d'une nouvelle approche thérapeutique de l'inflammation et du remodelage pulmonaire	
C. Effets de l'inhibition de la MMP-12 dans un modèle murin d'asthme	
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION	135
<hr/>	
V. PERSPECTIVES	143
<hr/>	
VI. BIBLIOGRAPHIE	145
<hr/>	

I. INTRODUCTION

1. L'asthme

A. Généralités à propos de l'asthme

a. Définition de l'asthme

L'asthme du grec *asthmaïnein* signifiant « être essoufflé » a longtemps été synonyme d'étouffements. En réalité, il s'agit d'une maladie chronique des voies aériennes caractérisée par une inflammation bronchique et apparaissant, le plus souvent, au cours des premières années de la vie mais pouvant également apparaître à l'âge adulte. La gravité et la fréquence de la maladie varient d'une personne à l'autre (Définition selon l'OMS).

Plusieurs formes d'asthme sont répertoriées :

- **L'asthme allergique ou extrinsèque** qui est dû à l'inhalation d'allergènes provoquant la formation d'anticorps de type IgE chez les individus prédisposés. La réaction allergique peut se manifester toute l'année ou de manière saisonnière, comme au printemps avec le rhume des foins lié à l'exposition aux pollens (*l'asthme saisonnier* dont les crises sont rapprochées à certaines périodes de l'année). Elle se traduit par une rhinite, c'est-à-dire un écoulement et une obstruction nasale, des éternuements souvent associés à une conjonctivite ou une toux annonciatrice de l'asthme.

- **L'asthme intrinsèque** qui n'est pas lié à une allergie déterminée mais qui est déclenchée par d'autres stimuli (infections,...).

- Il existe encore des catégories particulières comme *l'asthme d'effort*, au cours duquel l'effort physique est susceptible de déclencher une crise d'asthme. On distingue également *l'asthme du nourrisson et du petit enfant* et *l'asthme de l'enfant et de l'adolescent* (la forme la plus fréquente).

b. Histologie pulmonaire normale

Avant d'entrer dans les détails des anomalies pulmonaires observées chez les asthmatiques, nous allons commencer par un bref rappel de l'histologie du poumon normal.

L'arbre bronchique

La trachée se divise en deux bronches souches qui pénètrent dans les poumons au niveau du hile pulmonaire. Ces bronches souches se divisent ensuite en bronches lobaires. Deux bronches lobaires peuvent être observées dans le poumon gauche tandis que trois bronches lobaires sont observées dans le poumon droit. Ces bronches lobaires se divisent alors en bronches segmentaires puis en bronchioles et enfin en alvéoles.

Les bronches

Les bronches sont tapissées d'un épithélium cylindrique pseudostratifié cilié qui est constitué de différents types cellulaires (Figure1).

- Les cellules épithéliales cylindriques ciliées ont un noyau basal et sont couvertes de cils vibratiles au pôle luminal.
- Les cellules caliciformes sont disséminées parmi les cellules ciliées et produisent du mucus.
- Les cellules basales sont plus petites et reposent sur la lame basale. Ce sont des cellules souches capables de se différencier en d'autres types cellulaires présents dans l'épithélium bronchique (cellules ciliées ou cellules caliciformes).
- Les cellules intermédiaires sont des cellules basales en train de se différencier.
- Les cellules neuro-endocrines sont de petites cellules arrondies qui sécrètent des hormones peptidiques dont la bombésine et la sérotonine.

La sous-muqueuse est un tissu de soutien lâche constitué de fibres de collagène et de fibres élastiques. Elle contient des quantités variables de muscle lisse et des glandes séro-muqueuses. Les glandes séro-muqueuses produisent du mucus, des lysozymes et des glycoprotéines. Elles déversent leurs sécrétions dans la lumière bronchique par les canaux excréteurs (Figure 1).

Les parois bronchiques contiennent également des follicules lymphoïdes. Ils sont constitués d'amas de lymphocytes et de plasmocytes. Les follicules lymphoïdes les plus importants sont présents dans la partie proximale de l'arbre bronchique.

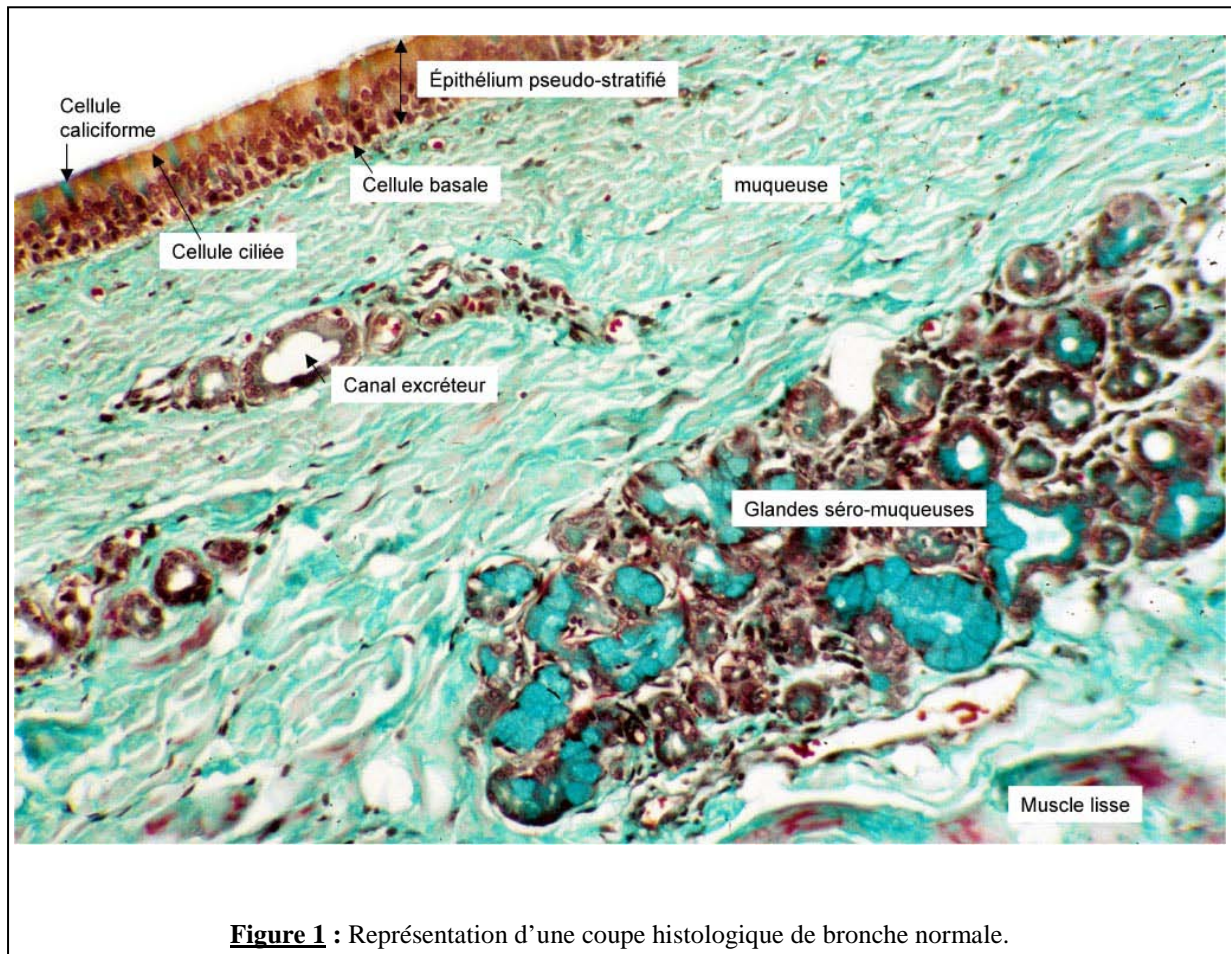


Figure 1 : Représentation d'une coupe histologique de bronche normale.

Les bronchioles

Contrairement aux bronches, les bronchioles sont tapissées d'un épithélium cylindrique cilié simple. Les cellules caliciformes et les cellules neuro-endocrines sont beaucoup plus rares que dans les bronches. Les glandes séro-muqueuses sont absentes. Par contre, un nouveau type cellulaire apparaît à ce niveau, les cellules de Clara.

Les cellules de Clara ne sont pas ciliées et ne produisent pas de mucus. Elles contiennent de nombreuses mitochondries et possèdent un réticulum endoplasmique lisse très développé. Elles semblent avoir différentes fonctions telles que la protection contre les substances toxiques inhalées et la production et l'élimination de surfactant. Ce sont également des cellules souches pouvant donner naissance à plusieurs types cellulaires.

Les alvéoles

Des macrophages peuvent être observés au niveau des alvéoles, ce sont les macrophages alvéolaires. Ils phagocytent les bactéries et les particules inhalées et constituent donc un mécanisme de défense important. Ensuite, ils pénètrent dans les bronchioles terminales où ils passent dans les vaisseaux sanguins et sont transportés vers les ganglions lymphatiques. Ils peuvent également être éliminés par l'escalator muco-ciliaire.

c. Symptômes de l'asthme

Les symptômes majeurs liés à la maladie asthmatique consistent en des épisodes d'oppression respiratoire et de dyspnée sifflante dont la fréquence et l'intensité sont variables et témoignent d'une contraction brutale des muscles lisses commandant le diamètre bronchique, un essoufflement, de la toux et des expectorations visqueuses. Ces symptômes peuvent se manifester plusieurs fois par jour ou par semaine et s'aggravent chez certains sujets lors d'un effort physique ou pendant la nuit [1]. Ils sont généralement associés à une hyperréactivité et une obstruction bronchique réversible, soit spontanément, soit sous l'effet d'un traitement adéquat fait de corticostéroïdes et de bronchodilatateurs [2]. L'asthme est associé à un déclin accéléré de la fonction respiratoire. Cette chute du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) est liée, au moins en partie, au remodelage progressif des voies aériennes influencé par l'inflammation bronchique chronique. Plusieurs études ont montré que la décroissance du VEMS est d'environ 40 à 70 ml/an en moyenne chez les asthmatiques contre environ 20 ml/an chez le sujet sain. Cette chute serait plus importante dans les formes sévères d'asthme de type intrinsèque [3-4].

Au niveau bronchique, l'asthme est caractérisé par une inflammation de type Th2 avec une augmentation du nombre d'éosinophiles dans les parois bronchiques, une augmentation de la production de mucus ainsi qu'une hyperréactivité bronchique due notamment à une fibrose sous-épithéliale et à une hypertrophie/hyperplasie des muscles lisses péribronchiques [5] (Figure2).

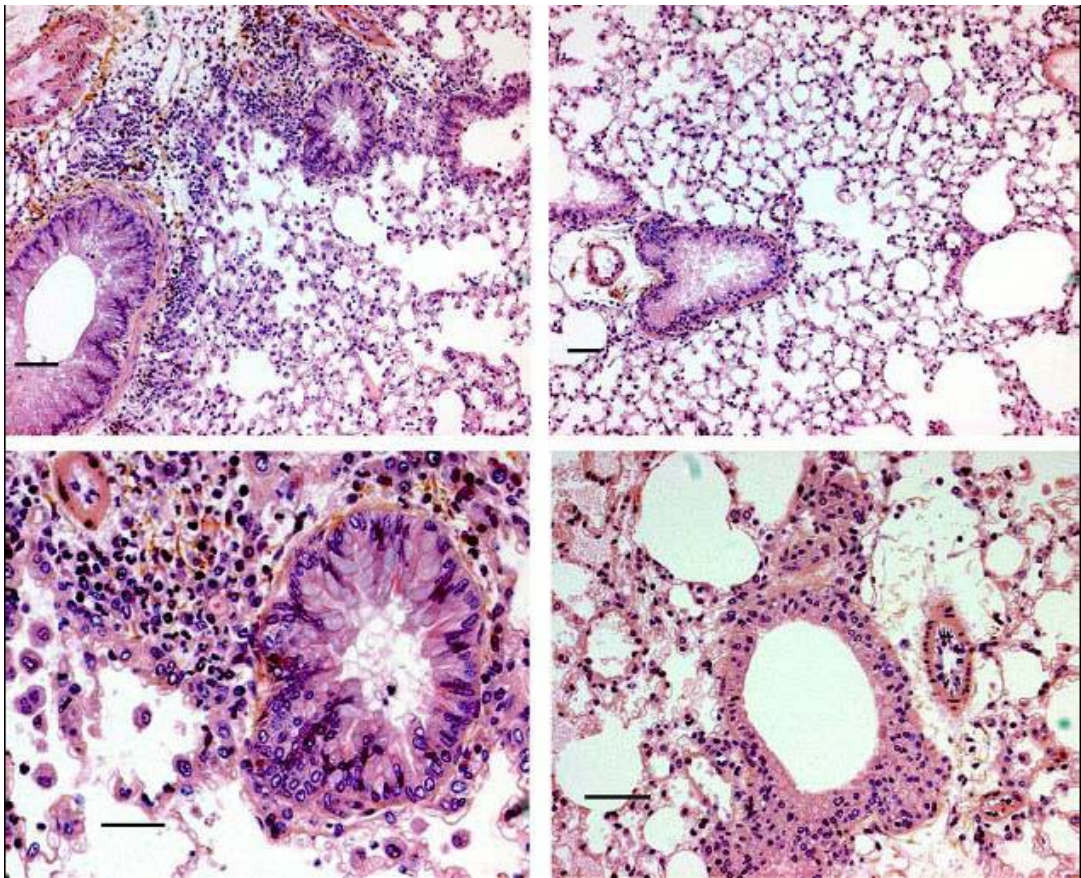
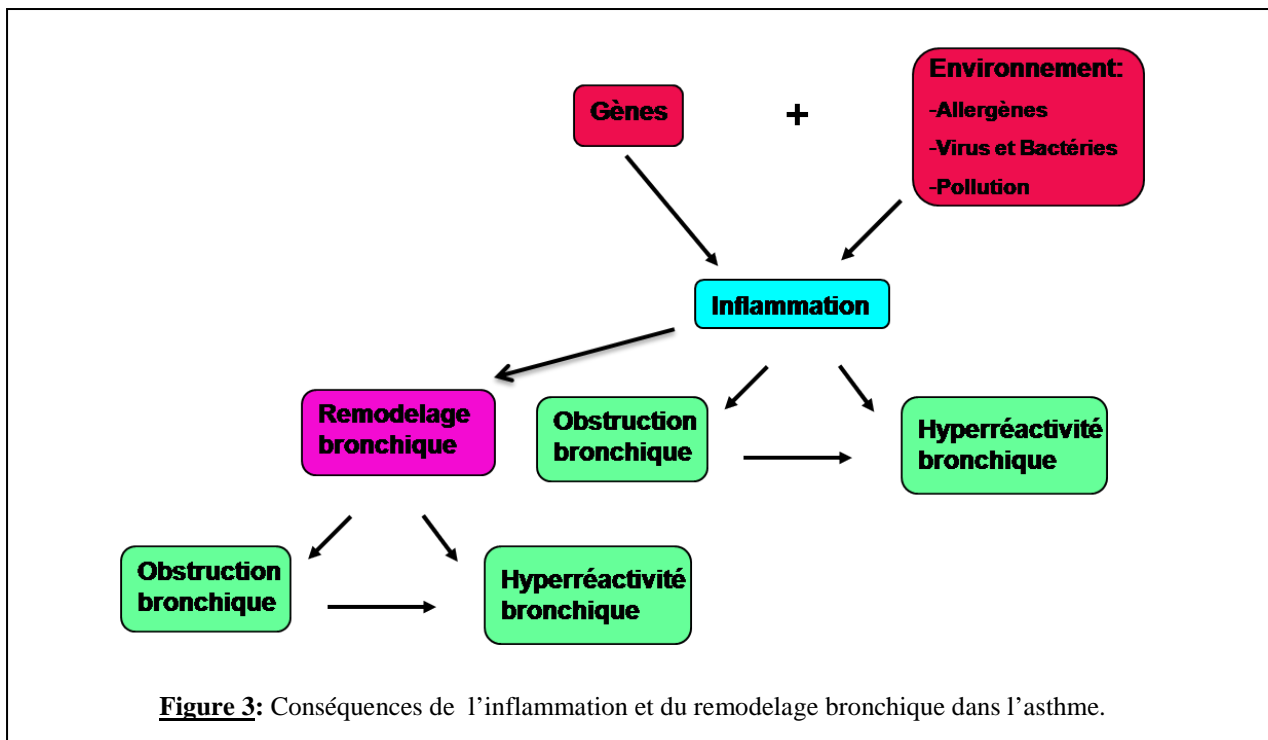


Figure 2 : Représentation d'une bronche saine (à droite) et d'une bronche de sujet asthmatique (à gauche)
d'après Pelletier

L'inflammation et le remodelage bronchiques peuvent donc agir sur deux aspects physiopathologiques définis ci-dessous, l'hyperréactivité des voies aériennes et l'obstruction bronchique chronique (Figure 3).



L'obstruction bronchique. L'œdème pulmonaire, l'hypersécrétion de mucus, l'épaississement de la membrane basale et la contraction des muscles lisses contribuent au développement de l'obstruction bronchique dans l'asthme [6].

L'hyperréactivité des voies aériennes. L'hyperréactivité bronchique est une caractéristique fonctionnelle de l'asthme qui est partiellement réversible sous l'effet d'un traitement. Elle est définie comme une réponse bronchique exagérée à des stimuli le plus souvent anodins. Elle est habituellement explorée par des tests de provocation à la méthacholine ou à l'histamine. Elle est due à une augmentation du volume et, surtout, de la contractilité et de la réactivité des muscles lisses bronchiques [6].

d. Prévalence de l'asthme

La prévalence de l'asthme a dramatiquement augmenté, chez les sujets jeunes, au cours de ces dernières décennies. Le taux de prévalence de l'asthme dans le monde varie entre 3.8% et

16.1% selon les contrées (Figure 4). Cette affection touche 5% des habitants de la planète, soit environ 300 millions de personnes. Néanmoins, ce pourcentage ne cesse d'augmenter aux quatre coins du globe surtout là où les populations s'urbanisent et adoptent un mode de vie occidental. Un décès sur 250 dans le monde est attribuable à l'asthme, autant chez les enfants que chez les adultes. Les coûts qui y sont associés (traitement, médicaments, absence au travail, etc.) sont énormes et posent un réel problème de santé publique [7]. En Belgique, la prévalence de l'asthme est de 4 à 7% chez l'adulte et 9 à 14% chez l'enfant.

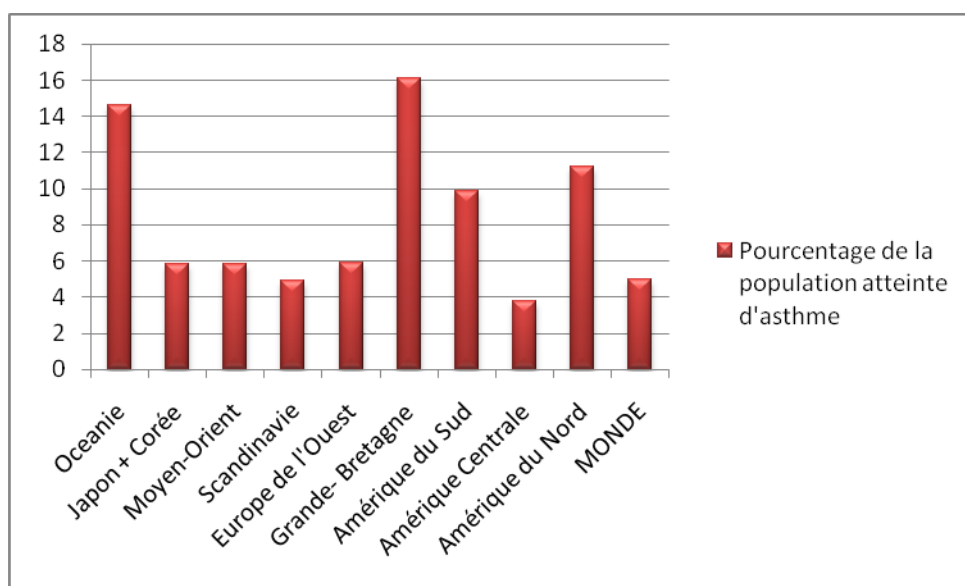


Figure 4: Taux de prévalence de l'asthme dans le monde selon le rapport Global Burden of Asthma publié par l'organisme neo-zélandais GINA (Global Initiative for Asthma). Les auteurs estiment que 5% de la population de la planète, soit 300 millions de personnes, sont atteintes de la maladie asthmatique.

Une théorie pouvant expliquer l'augmentation de la prévalence de cette maladie est appelée « l'hypothèse de l'hygiène ». *In utero*, le système immunitaire du fœtus dispose essentiellement de lymphocytes Th2 qui jouent un rôle dans le non rejet du fœtus par la mère. Dès la naissance, une stimulation des lymphocytes Th1 apparaît chez le nouveau-né afin qu'il puisse se défendre contre les infections. Petit à petit, un équilibre va s'établir entre la réponse Th1 et la réponse Th2 afin de lutter efficacement contre les infections. Selon la théorie de l'hygiène, l'excès d'hygiène, qui protège les enfants des maladies infectieuses, empêcherait la

stimulation des lymphocytes Th1 à la naissance, bloquant la balance immunitaire dans un profil Th2. Afin de valider cette théorie, plusieurs arguments ont été avancés :

- Les populations infectées à un haut degré par des parasites présentent une fréquence d'asthme très basse.
- Plusieurs études ont montré que les enfants ayant été contaminés très jeunes par des agents infectieux font moins d'allergies par la suite.
- L'allergie est plus fréquente dans les populations urbaines comparativement aux populations rurales.

Une explication plus générale est suggérée à l'heure actuelle. La disparition d'un grand nombre de bactéries dans l'environnement et dans la nourriture conduirait à une stimulation moindre du système Th1 [8].

Par ailleurs, la pollution atmosphérique pourrait aussi contribuer à l'augmentation de la prévalence de l'asthme. Ainsi, il a été suggéré que les particules des moteurs diesels pouvaient jouer un rôle dans la présentation des antigènes au système immunitaire [9].

e. Classification

Le degré de sévérité de la maladie qui dépend de la fréquence des symptômes, du VEMS et du débit expiratoire de pointe, détermine les modalités du traitement du patient. Ces traitements agissent sur la survenue des symptômes et limitent l'inflammation. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de thérapie efficace agissant sur les causes fondamentales de cette pathologie plutôt que sur ses effets [1]. La sévérité de la maladie dépend de la fréquence des symptômes, du VEMS et du débit de pointe (Tableau 1).

Sévérité	Symptômes diurnes	Symptômes nocturnes	Fonction pulmonaire	Variabilité du débit de pointe
Asthme intermittent (40 à 50%)	< 1X / semaine	< 2X / mois	< 80%	< 20%
Asthme permanent léger (30%)	> 1X / semaine mais < 1X / jour	> 2X / mois	< 80%	20 à 30%
Asthme permanent moyen (10%)	quotidien	> 1X / semaine	60 à 80%	> 30%
Asthme permanent sévère (10%)	permanent	quotidien	< 60%	> 30%

Tableau 1 : Classification de la sévérité de l'asthme d'après Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma.

f. Les causes et les facteurs de risque de l'asthme

L'asthme peut être causé par des facteurs exogènes et par des facteurs endogènes.

Facteurs endogènes

Le terrain *atopique* est le principal facteur responsable de l'asthme. L'atopie est une aptitude anormale d'un individu à synthétiser des immunoglobulines (*Ig*) E spécifiques dirigées contre les allergènes environnementaux entrant en contact avec l'organisme par des voies naturelles. Elle est en constante augmentation dans le monde et touche désormais, en Occident, entre 5 et 10% des enfants (chiffre très variable, allant de 5 à 25% selon les études). L'atopie est ainsi la première cause de l'asthme, puisqu'elle en est responsable dans environ 80% des cas [10].

L'influence de l'*hérédité* sur la maladie asthmatique est très importante chez les jeunes enfants. Il existe, en effet, une prédisposition héréditaire à la production d'IgE envers les allergènes environnementaux et à l'hyperréactivité bronchique. Plus de 100 gènes ont été associés à l'asthme dans au moins une étude de génétique [11-12]. En 2009, 43 gènes ont été confirmés grâce à des études génétiques d'association. La plupart de ces gènes sont des gènes impliqués dans l'inflammation tels que les interleukines-4, -10 et -13 (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*), l'interféron (IFN), le Tumor Necrosis Factor (TNF),...[13].

Les facteurs de risques exogènes

Les facteurs liés à l'environnement sont indispensables à l'apparition des signes cliniques (Figure 5). On retrouve certains de ces facteurs à l'intérieur de nos maisons : les poussières de maison ont été reconnues comme responsables d'un grand nombre des cas d'asthme. Ces poussières sont constituées d'acariens, de poils d'animaux, de bactéries, de moisissures, de fibres végétales et de squames de peau humaine. Les animaux domestiques sont souvent responsables de la sensibilisation des asthmatiques notamment le chat dont les poils et la salive sont très allergisantes mais également le hamster, le cochon d'inde, le cobaye, le lapin, la souris, le rat, le cheval et le chien. Les plumes présentes dans les oreillers et les édredons sont également allergisantes. Les moisissures provenant de champignons présents à l'intérieur des maisons dans les conduits d'aération et de climatisation ainsi qu'autour des conduites d'eau, peuvent également être responsables de l'apparition de la maladie.

Différents allergènes sont également présents dans l'alimentation. Par exemple, les moisissures et les levures utilisées dans la fabrication du vin, de la bière, du fromage... peuvent être responsables d'asthme même si leur rôle dans la maladie est encore mal connu. Il existe également toute une série d'aliments qui sont très allergisants : l'œuf, le lait de vache, le poisson, les crustacés, les mollusques, les carottes crues, le céleri, les cacahuètes... Ces aliments peuvent être responsables de crises d'asthme.

Parmi les allergènes présents dans l'air extérieur, les pollens sont très souvent en cause dans les allergies respiratoires.

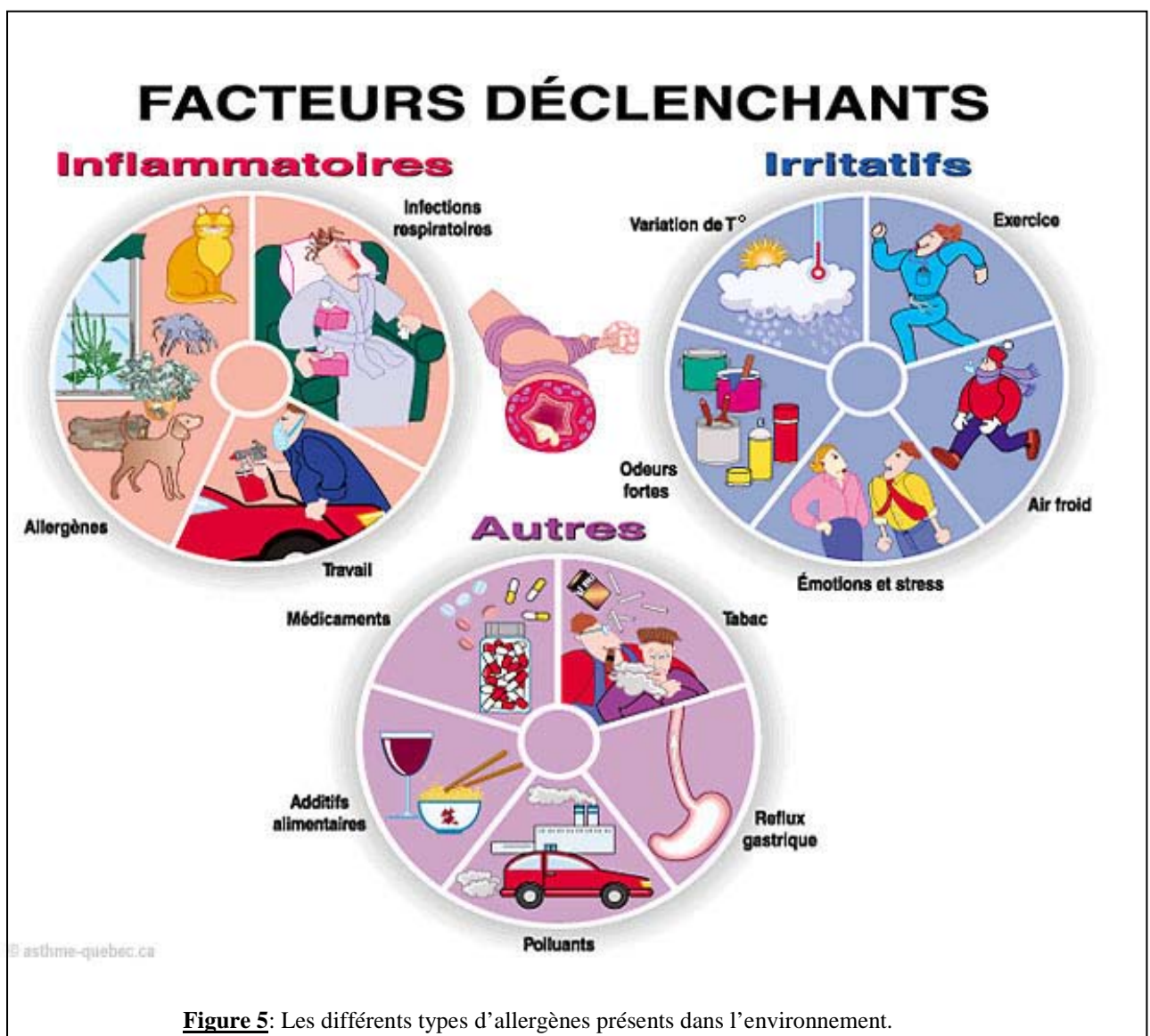
La pollution atmosphérique joue également un rôle important dans la maladie. Les gaz ou particules rencontrés dans l'atmosphère sont de deux types : la pollution acido-particulaire (dioxyde de soufre, particules en suspension et aérosols acide) et la pollution photo-oxydante (ozone et dioxyde d'azote). Les principales sources de pollution atmosphérique sont les foyers fixes de combustion, les usines d'incinération des déchets et le trafic automobile.

Le tabagisme est également un cofacteur important. Le tabac provoque une inflammation des voies aériennes avec une hypersécrétion de mucus ainsi qu'une paralysie et une destruction ciliaire. De plus, le tabagisme est responsable d'une augmentation des taux sériques d'IgE [14].

Les infections des voies aériennes par des virus ou des bactéries constituent également un facteur important. Avant l'âge de deux ans, le virus respiratoire syncytial est le plus souvent en cause.

Les allergènes présents sur le lieu travail peuvent entraîner l'apparition de **l'asthme professionnel**. Parmi cette dernière catégorie, on retrouve la farine de blé pour le boulanger, les isocyanates pour les peintres, les poussières de bois pour les ébénistes...

Enfin, l'exercice physique réalisé dans un milieu où l'air est froid et sec, peut être un facteur provoquant **l'asthme d'effort**. Il se caractérise par la survenue d'une obstruction bronchique à l'arrêt de l'effort. Il a par ailleurs été montré que l'asthme se développe davantage dans les populations d'individus soumis à des pratiques sportives intensives [15-16].



B. Physiopathologie de l'asthme

a. La réponse Th2

Dans l'asthme allergique, les processus inflammatoires semblent être le résultat d'une réponse immunitaire inappropriée à l'encontre d'allergènes inhalés. Après l'exposition à de petites doses d'allergènes, les patients asthmatiques développent des IgE spécifiques contre ces allergènes. Une seconde exposition à ces allergènes entraîne alors une réponse humorale secondaire. La réponse asthmatique peut être divisée en deux phases, une *phase précoce* durant laquelle apparaît un bronchospasme, et une *phase tardive* durant laquelle les réponses inflammatoires se développent. La phase précoce est caractérisée par l'apparition rapide d'un œdème de la muqueuse, une augmentation du tonus musculaire et une obstruction bronchique associés à la dégranulation des mastocytes. La phase tardive débute, quant à elle, trois à six heures après l'exposition à l'allergène et peut persister plusieurs jours en cas d'absence de traitement adéquat. Cette phase est caractérisée par une obstruction bronchique associée à la migration des cellules inflammatoires du sang vers le parenchyme pulmonaire [17]. La sensibilisation est le premier contact avec l'antigène. Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes du poumon et de ce fait, jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse allergique. Elles forment un réseau de cellules très dense au niveau de la muqueuse bronchique ce qui assure l'accessibilité aux antigènes inhalés. Immédiatement après avoir rencontré l'antigène inhalé, les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques pulmonaires, dégradent l'antigène et sélectionnent les fragments peptidiques qui seront liés aux protéines du système majeur d'histocompatibilité et présentés aux lymphocytes. Ceci induit la prolifération lymphocytaire et la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 (Figure 6).

Lors du second contact avec l'antigène, la phase effectrice s'enclenche. L'allergène est capté par les IgE circulants et par les IgE présents sur les cellules présentatrices d'antigènes. Les IgE peuvent également se fixer sur le récepteur FcεR présent à la surface des basophiles et des mastocytes. Les mastocytes sont présents tout au long de l'arbre respiratoire principalement au niveau de la sous-muqueuse. La différenciation des mastocytes dépend des IL-4 et -13. Ces cellules, une fois activées, synthétisent des médiateurs inflammatoires qui sont libérés soit par

exocytose du contenu de leurs granules soit par libération de médiateurs sans dégranulation. Les médiateurs libérés sont, entre autres, l'histamine, la prostaglandine D2 et les leucotriènes (C4, D4 et E4) [18]. Ces différents médiateurs sont des facteurs bronchoconstricteurs et sont donc en partie responsables de la bronchoconstriction typique de l'asthme mais aussi de l'activation de cellules inflammatoires et de l'augmentation de la production de mucus. Les mastocytes sécrètent également des cytokines telles que l'IL-4, -5 et -13 responsables du développement et du maintien de l'inflammation. Les éosinophiles, les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages provenant de la circulation sanguine sont alors recrutés et persistent sur le site inflammatoire (Figure 6).

Le nombre d'éosinophiles activés est augmenté dans le sang périphérique ainsi que dans les voies aériennes des patients asthmatiques. Le nombre d'éosinophiles dans le sang et dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (*LBA*) est corrélé avec le degré de sévérité de la maladie [19]. Ces cellules causent différents dommages dans les voies aériennes en libérant des facteurs comme les protéines basiques associées aux granules (eosinophilic cationic protein (*ECP*)) qui endommagent les nerfs et les cellules épithéliales et les médiateurs lipidiques (leucotriènes) qui causent une bronchoconstriction ainsi qu'une hypersécrétion de mucus. Ils sont également la source de plusieurs protéines comme la Métalloprotéase-9 (*MMP-9*), le Tissue Inhibitors of Metalloprotease-1 (*TIMP-1*), l'IL-13 et l'IL-17 ainsi que de facteurs de croissance tels que le Transforming Growth Factor- β (*TGF- β*), le Transforming Growth Factor- α (*TGF- α*), le Fibroblast Growth Factor-2 (*FGF-2*), le Vascular Endothelium Growth Factor (*VEGF*) qui amplifient encore la réponse inflammatoire conduisant à des changements cytologiques et histologiques des parois bronchiques [20]. Ces différents changements sont appelés le *remodelage bronchique* [21].

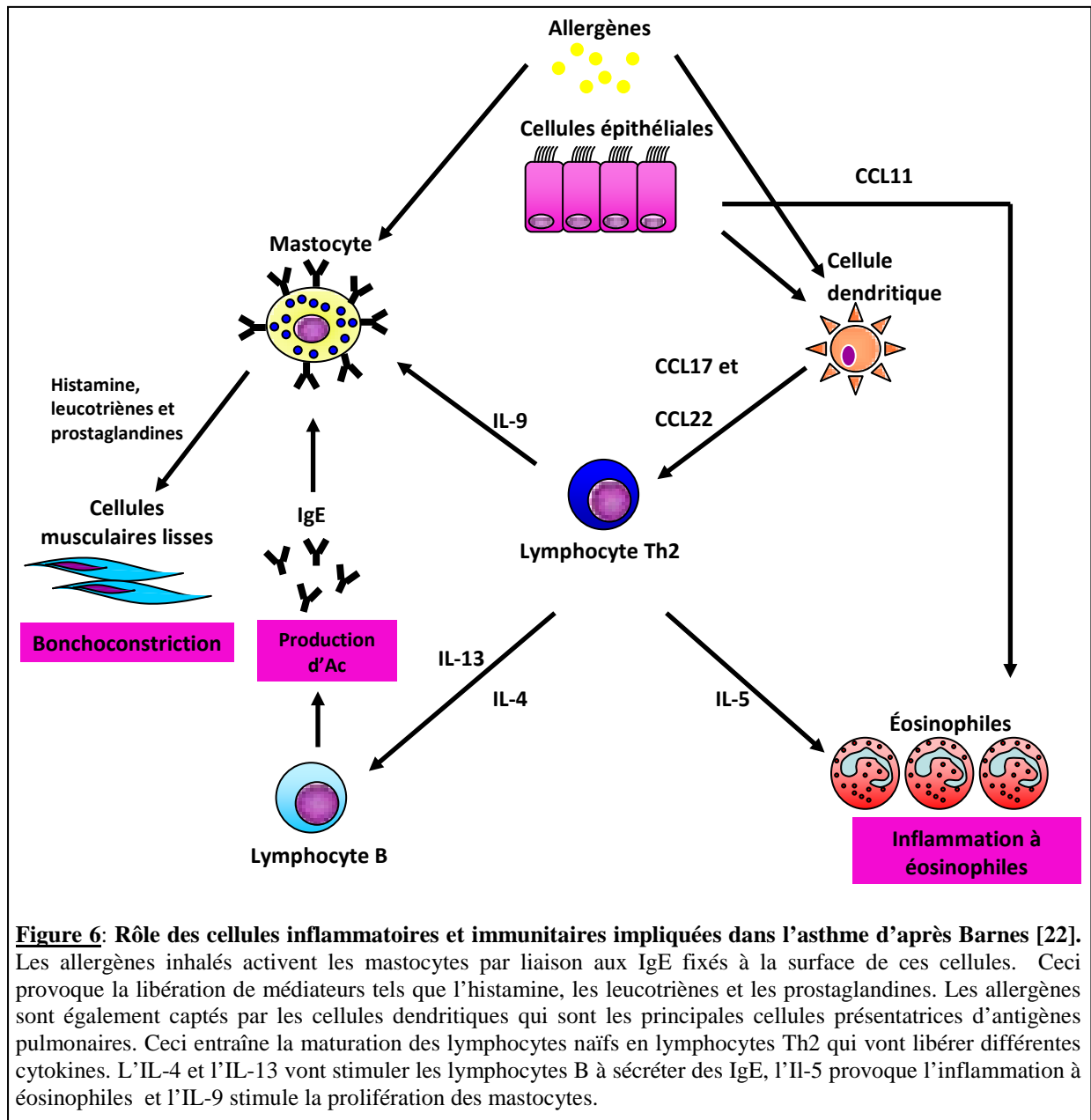


Figure 6: Rôle des cellules inflammatoires et immunitaires impliquées dans l'asthme d'après Barnes [22]. Les allergènes inhalés activent les mastocytes par liaison aux IgE fixés à la surface de ces cellules. Ceci provoque la libération de médiateurs tels que l'histamine, les leucotriènes et les prostaglandines. Les allergènes sont également captés par les cellules dendritiques qui sont les principales cellules présentatrices d'antigènes pulmonaires. Ceci entraîne la maturation des lymphocytes naïfs en lymphocytes Th2 qui vont libérer différentes cytokines. L'IL-4 et l'IL-13 vont stimuler les lymphocytes B à sécréter des IgE, l'IL-5 provoque l'inflammation à éosinophiles et l'IL-9 stimule la prolifération des mastocytes.

b. Les cytokines impliquées dans la réponse asthmatique

Suite au contact avec l'allergène, les basophiles sont recrutés et sécrètent de l'IL-4. Cette IL-4 sécrétée va permettre la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th 2. Ces derniers produisent différentes cytokines telles que l'IL-4,-5, -9 et -13.

L'IL-5 intervient dans la production, la différenciation, l'activation et la survie des éosinophiles. Dans la moelle osseuse, l'IL-5 joue un rôle important dans la stimulation de

l'éosinophilopoïèse et dans la différenciation terminale des précurseurs myéloïdes en éosinophiles. De plus, l'IL-5 peut activer les éosinophiles pulmonaires et provoquer la libération de produits cytotoxiques.

L'IL-9 joue un rôle dans l'attraction et la stimulation des mastocytes. Les mastocytes jouent un rôle important dans la pathologie asthmatique car ils sont capables de libérer de nombreux facteurs bronchoconstricteurs.

L'IL-4 induit différentes réponses cellulaires qui sont potentiellement importantes dans le développement de la maladie incluant : *a)* son rôle dans la production d'IgE par les lymphocytes B *b)* son rôle de facteur de croissance pour les mastocytes en association avec l'IL-13 et *c)* sa capacité à stimuler l'expression de Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (*VCAM-1*) qui permet une meilleure migration des éosinophiles dans le tissu.

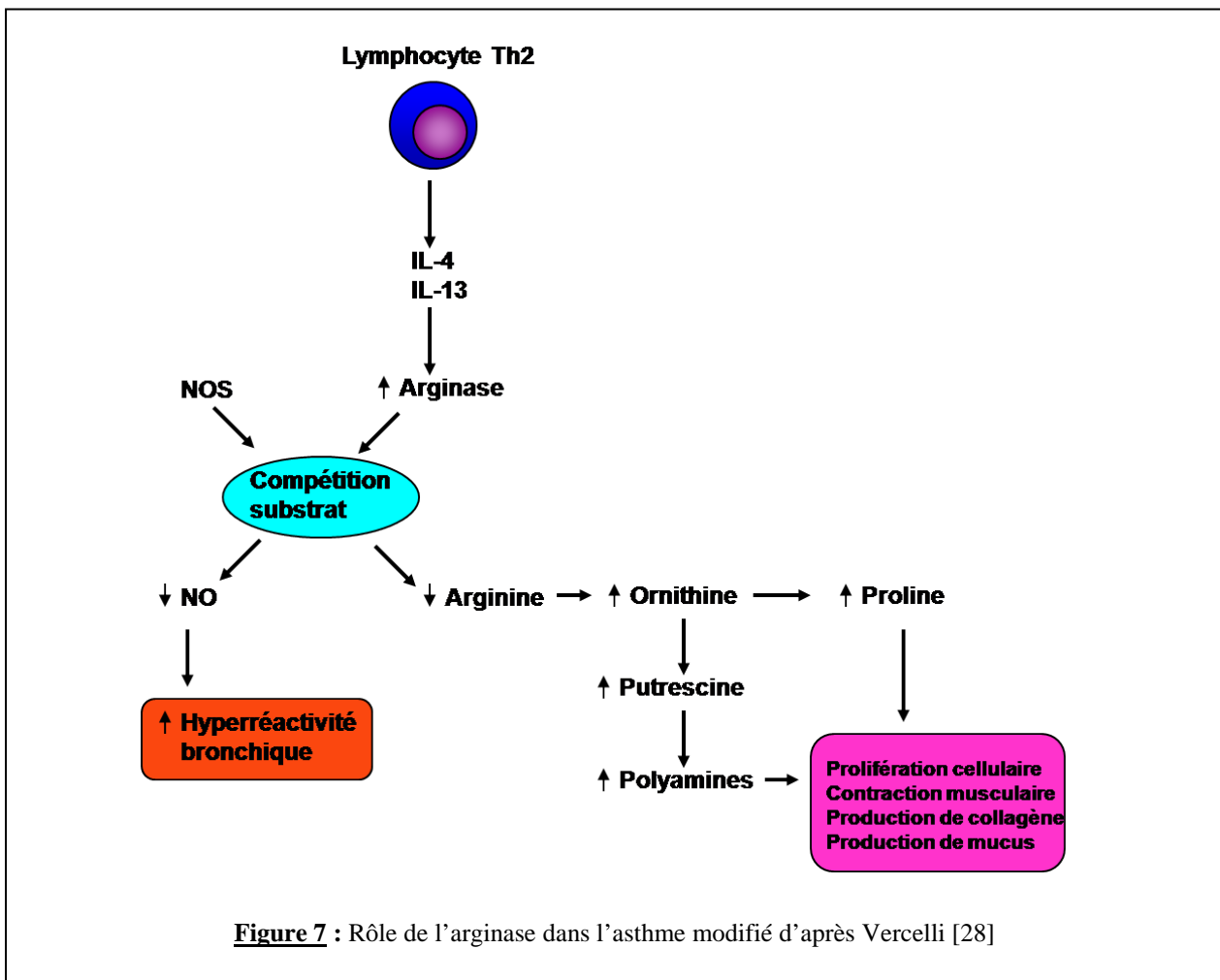
L'IL-13 joue également un rôle important dans l'hyperréactivité bronchique et la métaplasie muqueuse [17].

Nous allons passer à une description des différentes protéines dont l'expression sera étudiée ci-après dans le travail expérimental. Ces protéines sont l'arginase, les chitinases et chitinase-like et CCL-11 (éotaxine).

c. Rôle de l'Arginase I

L'IL-4 et l'IL-13 induisent fortement l'expression d'arginase (Figure 7) [23]. L'arginase est une enzyme clé du cycle de l'urée qui convertit la L-arginine en L-ornithine et en urée. Elle est exprimée au niveau du foie mais également dans d'autres cellules et tissus qui n'exercent aucun rôle dans le cycle de l'urée comme, par exemple, le poumon. L'arginase existe sous deux isoformes, l'arginase I et l'arginase II qui sont encodées par des gènes distincts. L'arginase I est une enzyme cytosolique et est la forme principalement retrouvée au niveau du foie. De faibles taux d'arginase II ont également été retrouvés au niveau hépatique mais cette enzyme est principalement extra-hépatique. Dans les voies aériennes, les arginases I et II sont exprimées de façon constitutive par les cellules épithéliales bronchiques, les cellules endothéliales, les myofibroblastes et les macrophages alvéolaires. L'expression d'arginase I est augmentée dans les poumons de souris auxquelles a été appliqué un modèle murin d'asthme allergique [24-25]. Cette enzyme joue un rôle important dans le développement de l'hyperréactivité bronchique induite par l'IL-13. En effet, une des fonctions biologiques

principales de l'arginase extra-hépatique est la régulation de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par compétition avec la NO-synthase pour leur substrat commun, la L-arginine. L'augmentation de l'expression de l'arginase I entraîne une diminution de la production de NO, un bronchodilatateur pouvant atténuer les effets spasmogènes. Ceci a une implication importante dans la réponse bronchique à des agents contractiles [26]. De plus, l'arginase peut être impliquée dans la réparation tissulaire par la synthèse de L-ornithine. La L-ornithine est un précurseur de polyamines (spermidine et putrescine) et de proline qui sont impliquées dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la synthèse de collagène (Figure 7) [27].



d. Rôle des chitinases et chitinase-like

En 2001, Webb et ses collaborateurs ont montré que l'IL-4 et l'IL-13 provoquent également une augmentation de l'expression des chitinase-like Ym1 et Ym2 chez les souris sensibilisées et exposées à un allergène [29]. Ces protéines (Ym1 et Ym2) appartiennent à la famille des chitinase-like comme les chitinases acides du mammifère (*AMCases*) et YKL-40. Elles sont dépourvues d'activité enzymatique mais peuvent lier les carbohydrates comme l'héparine et l'héparan sulfate et entraîner la migration cellulaire. Ym1 et Ym2 peuvent donc participer à l'inflammation des voies aériennes et/ou au remodelage bronchique. Cependant, ces protéines sont exclusivement murines [30]. Par contre, des quantités exagérées d'*AMCases* ont été détectées dans les cellules épithéliales bronchiques et dans les macrophages alvéolaires de biopsies bronchiques de patients asthmatiques. De plus, la protéine YKL-40, une protéine chitinase-like est également accrue dans le sérum et les poumons de patients asthmatiques. Les taux d'YKL-40 circulants sont corrélés avec la sévérité de la maladie, l'épaisseur de la membrane basale, la fréquence d'utilisation de l'inhalateur de secours et la détérioration de la fonction pulmonaire [31]. Le mécanisme par lequel les *AMCases* exercent leurs effets sur l'inflammation n'est pas encore parfaitement élucidé. Le substrat des *AMCases* dans ce système n'est pas encore connu. Il est possible que les *AMCases* possèdent une activité chimiotactique inhérente indépendante de leur activité chitinase [32]. La neutralisation des *AMCases* par un sérum anti-*AMCases* ou par un inhibiteur de chitinase, l'allosamidine, diminue l'éosinophilie et l'accumulation de lymphocytes, probablement en diminuant la production des chimiokines telles que Monocyte Chemotactic Protein-1 et -2 (*MCP-1*, *MCP-2*), Macrophage Inflammatory Protein-1 (*MIP-1 β*), Epithelial-derived neutrophil-activating protein-78 (*ENA-78*) et CCL-11. Ces effets conduisent à une atténuation de l'inflammation et de l'hyperréactivité bronchiques (Figure 8). Ces données suggèrent que les *AMCases* ont un rôle dans la physiopathologie asthmatique et pourraient être considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles [33-34].

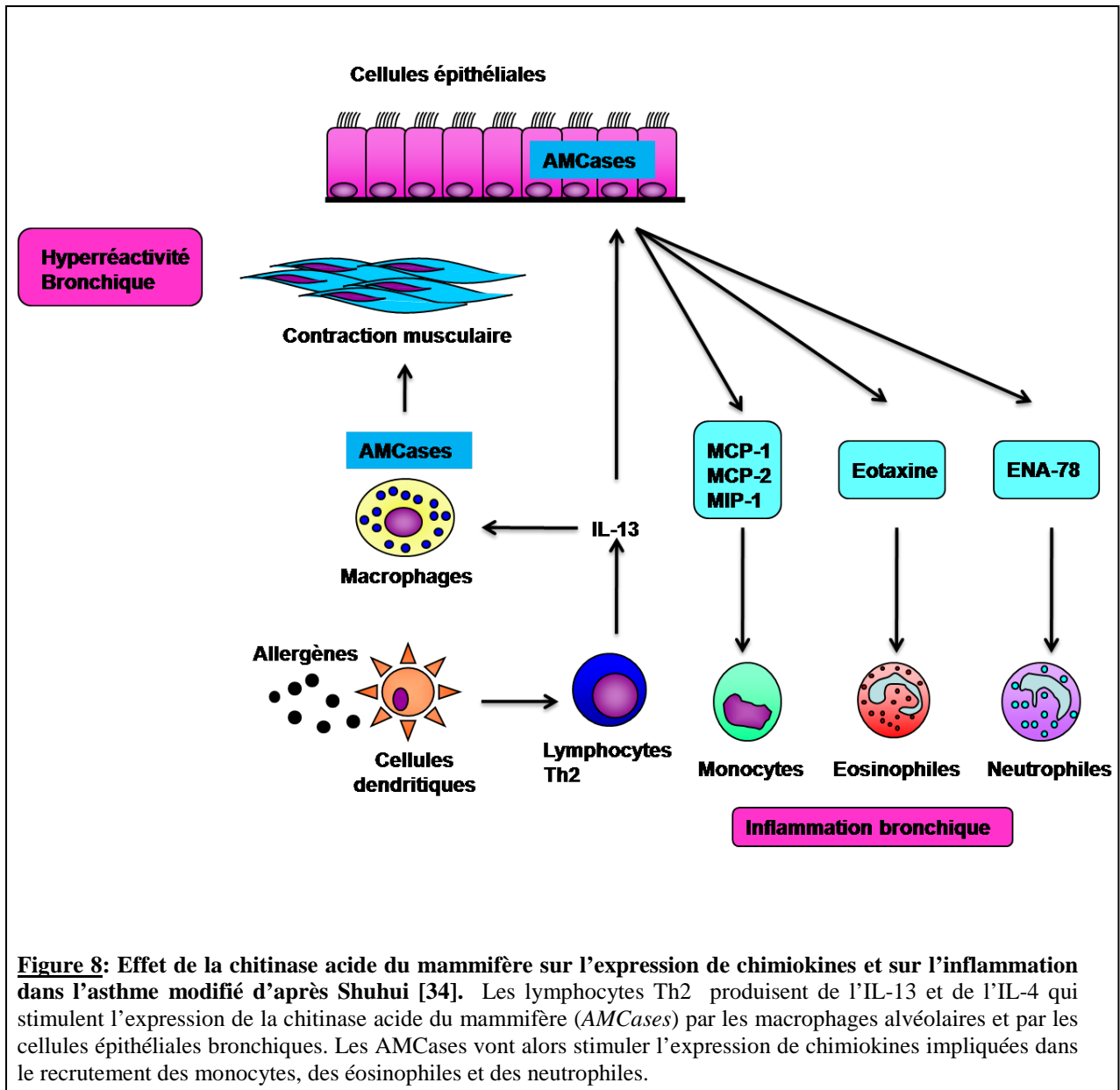


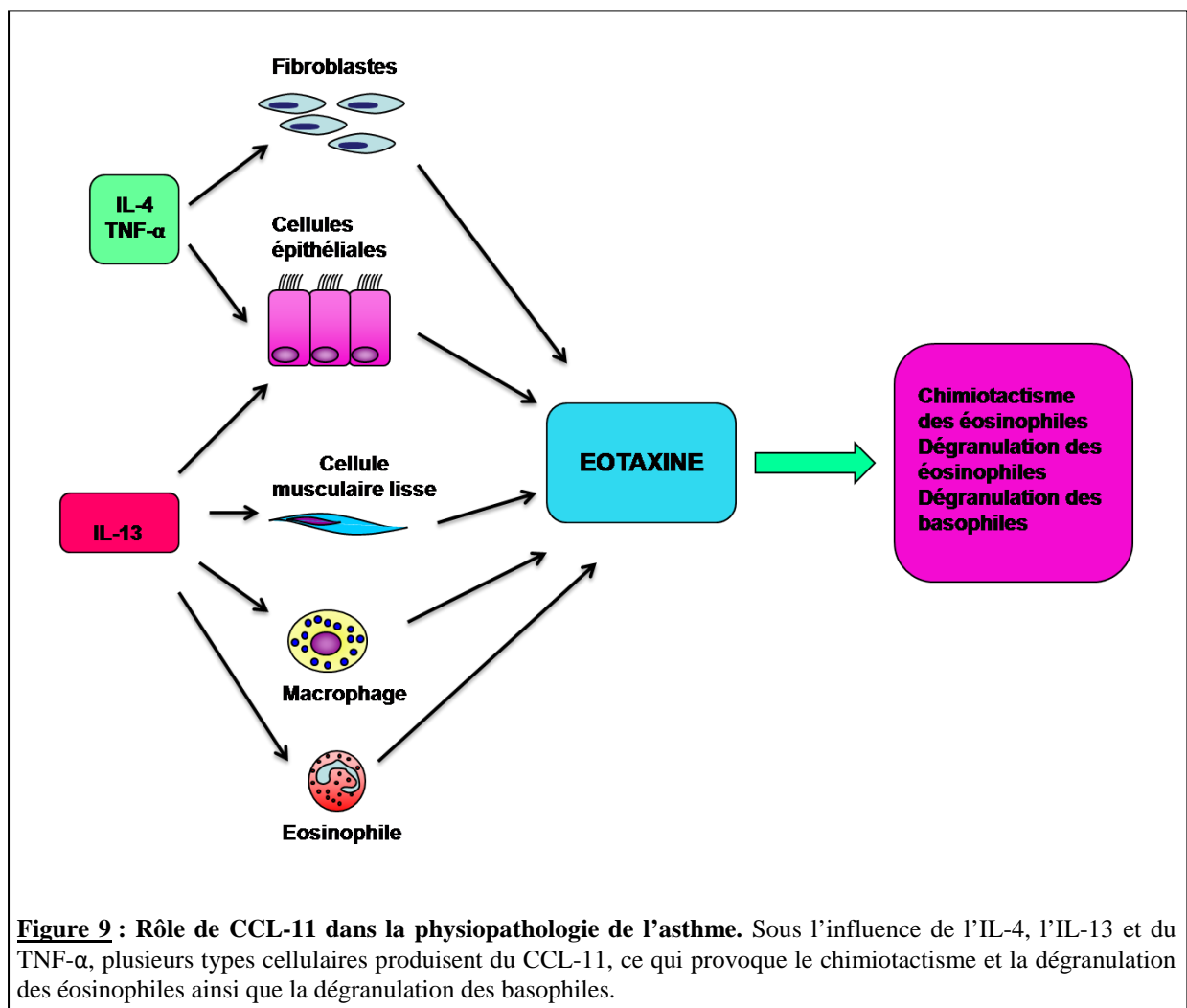
Figure 8: Effet de la chitinase acide du mammifère sur l'expression de chimiokines et sur l'inflammation dans l'asthme modifié d'après Shuhui [34]. Les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-13 et de l'IL-4 qui stimulent l'expression de la chitinase acide du mammifère (AMCase) par les macrophages alvéolaires et par les cellules épithéliales bronchiques. Les AMCases vont alors stimuler l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes, des éosinophiles et des neutrophiles.

e. Rôle de CCL-11

CCL-11, précédemment appelée éotaxine est une chimiokine possédant une puissante activité chimioattractrice sur les éosinophiles. Le nom de cette chimiokine vient de la contraction de deux termes anglais « eosinophil chemotaxin » [35].

La production de TNF- α et d'IL-4 par les lymphocytes T stimule l'expression de CCL-11 dans les fibroblastes pulmonaires et les cellules épithéliales bronchiques. L'IL-13 est également connue comme facteur d'induction de CCL-11 [36]. Le CCL-11 recrute les éosinophiles mais aussi les basophiles et les lymphocytes Th2 en se liant à un récepteur spécifique couplé à une protéine G, le CCR3, présent à leur surface. La signalisation induite

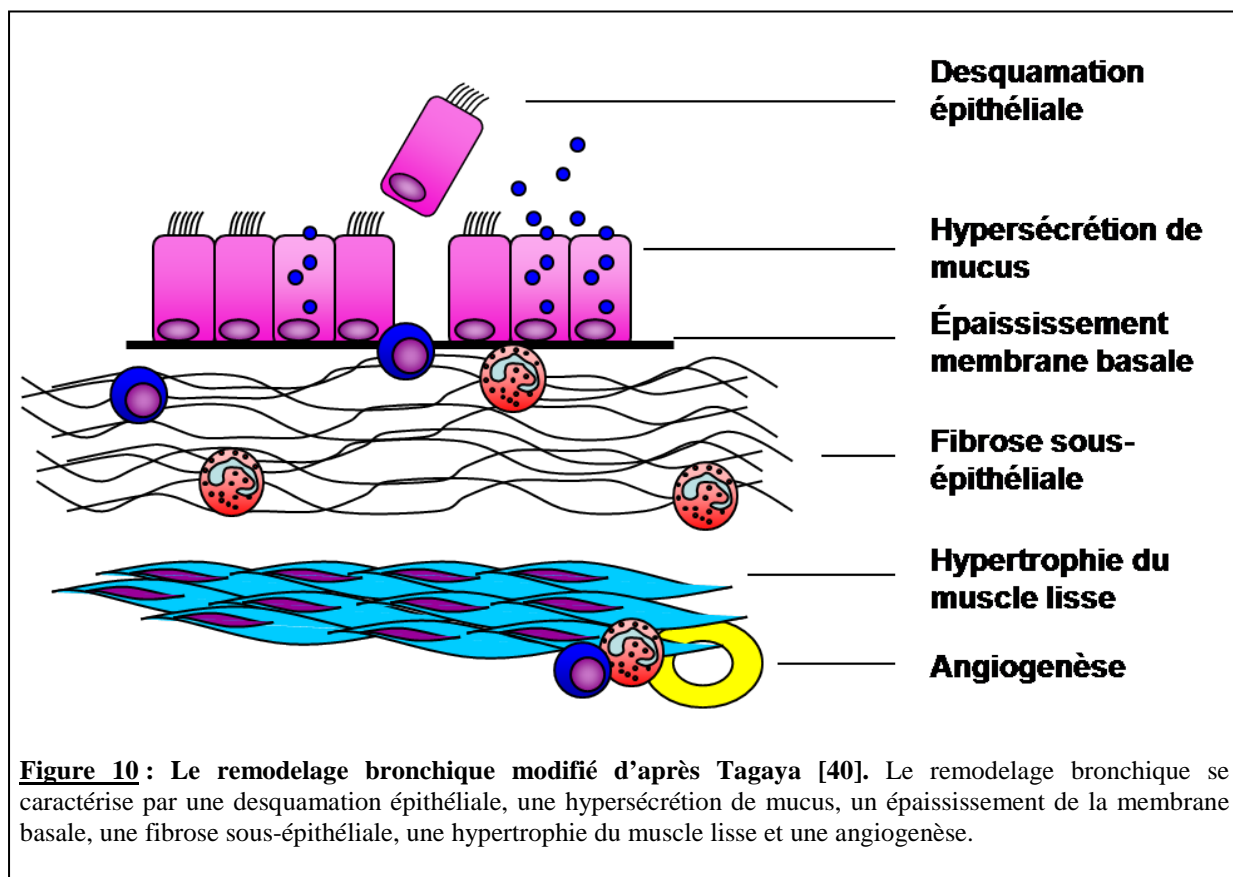
par l'activation du récepteur mène à divers processus biologiques dont la migration des leucocytes ou la dégranulation des basophiles et la libération consécutive de l'histamine. Dans le cadre de l'asthme, CCL-11 fut découvert dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de cochons d'Inde exposés à un allergène [37]. Au niveau pulmonaire, le recrutement des éosinophiles se déroule à l'échelle locale, à partir de la microcirculation mais également à l'échelle systémique, par mobilisation des éosinophiles présents dans la moelle osseuse et ce, en synergie avec l'IL-5 (Figure 9). Il est actuellement démontré que l'expression de CCL-11 est augmentée au niveau des sites inflammatoires de patients asthmatiques [38].



C. Le remodelage bronchique

L'inflammation chronique conduit à des changements cytologiques et histologiques des parois bronchiques appelés *remodelage bronchique*. Le remodelage bronchique peut être défini comme des changements de la composition, de l'organisation, de la quantité de cellules et de constituants extracellulaires présents dans les parois bronchiques.

Sur le plan histopathologique, le remodelage bronchique se caractérise par une desquamation de l'épithélium accompagnée d'une augmentation des espaces entre les cellules épithéliales basales, une hypertrophie et une hyperplasie des muscles lisses, une hyperplasie des cellules à mucus et une hypertrophie des glandes muqueuses associées à une hypersécrétion de mucus, une fragmentation des fibres élastiques, un épaissement de la membrane basale accompagné d'une fibrose sous-épithéliale, une angiogenèse et des modifications du cartilage bronchique [39]. Toutes ces modifications des voies aériennes conduisent à une augmentation de la résistance bronchique (Figure 10).



a. Desquamation épithéliale

L'épithélium bronchique est une structure pseudostratifiée qui tapisse la lumière bronchique. Il joue un rôle de barrière protectrice contre les corps étrangers contenus dans l'air extérieur mais il joue également un rôle de régulateur des fonctions métaboliques et immunologiques des voies aériennes. L'épithélium normal est composé de cellules spécialisées liées entre elles par des jonctions intercellulaires qui permettent l'étanchéité de la structure. L'épithélium est une bonne barrière immunitaire grâce à la présence de mucus sécrété par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses. Chez les sujets asthmatiques, l'épithélium subit des altérations structurelles telles qu'une desquamation. La desquamation de l'épithélium est un trait caractéristique du remodelage bronchique. Ce traumatisme de l'épithélium peut être la conséquence de l'inflammation ou du stress mécanique causé par la bronchoconstriction [41-42]. Différentes études [43] ont montré un nombre élevé de cellules épithéliales dans les expectorations induites et les lavages bronchoalvéolaires de patients asthmatiques. De plus, des études de biopsies bronchiques ont montré que la membrane basale est parfois dénudée. La desquamation de l'épithélium favorise l'accès des antigènes, des agents bronchoconstricteurs et des médiateurs inflammatoires.

b. Fibrose sous-épithéliale

La fibrose sous-épithéliale un trait caractéristique de l'asthme pouvant varier d'un simple épaississement à une fibrose étendue. Cette zone de fibrose apparaît très tôt dans la maladie. Chez les patients asthmatiques, la véritable membrane basale est d'apparence normale en microscopie électronique. L'épaississement se situe directement sous cette membrane au niveau de la *lamina reticularis* et correspond à un dépôt de matrice extracellulaire qui contient du collagène de types I, III et V, de la laminine, de la ténascine et de la fibronectine. La nature et la quantité des protéoglycans, de l'élastine et du cartilage sont également modifiées. Les mécanismes conduisant à ces dépôts semblent être dus à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Le dépôt de collagène dans les tissus est contrôlé par un équilibre entre les protéines capables de dégrader les substrats de la matrice extracellulaire (les MMPs) et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs). Dans l'asthme, la MMP-9 et le Tissue inhibitor of Metalloprotease-1 (*TIMP-1*), un inhibiteur physiologique de

cette protéase, sont présents en quantités augmentées dans les sécrétions bronchiques. Lorsque les éosinophiles traversent la membrane basale, ils produisent et sécrètent la MMP-9 qui dégrade le collagène de type IV, un composant de la membrane basale. Cependant dans l'asthme, un épaississement de la *lamina reticularis* est constaté et est probablement lié à des cycles répétés de dégradation-reconstruction anormale de la matrice extracellulaire par des protéases comme les MMPs [40].

Le TGF- β est une cytokine connue pour réguler la fonction des fibroblastes et des myofibroblastes. Il contrôle la production d'un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire incluant notamment, les collagènes, les protéoglycans et la ténascine. Il est synthétisé par différentes cellules pulmonaires comme les macrophages, les lymphocytes T, les éosinophiles, les mastocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Le TGF- β 1 est surexprimé dans les parois bronchiques des asthmatiques et l'expression de cette cytokine est directement corrélée avec l'épaisseur de fibrose sous-épithéliale. L'activation de TGF- β dépend de la MMP-9, entraîne une augmentation de l'expression d'IL-13 [42] et semble jouer un rôle dans la différenciation et la prolifération des myofibroblastes au niveau de la *lamina reticularis*. Les myofibroblastes sont des cellules spécialisées dérivant des fibrocytes et ont certaines caractéristiques identiques aux fibroblastes et aux myocytes. Elles expriment l' α -smooth muscle actine (α SMA) et elles ont la capacité de sécréter différentes protéines de la matrice extracellulaire tels que les collagènes de types I et III et la fibronectine. De plus, ces cellules sécrètent des chimiokines qui peuvent prolonger la survie des éosinophiles [44].

Plusieurs études ont montré que la fibrose sous-épithéliale joue un rôle dans le développement de l'hyperréactivité bronchique et dans le déclin du VEMS [45].

c. Augmentation de la masse de muscle lisse

L'hypertrophie et l'hyperplasie du muscle lisse jouent un rôle important dans le développement de l'hyperréactivité bronchique et le rétrécissement du diamètre des bronches. L'hyperplasie musculaire est observée uniquement au niveau des grosses bronches tandis que l'hypertrophie musculaire se retrouve dans tout l'arbre bronchique. Cependant, les raisons de cette différence restent encore inconnues [46]. Une des raisons pour laquelle le muscle lisse bronchique prolifère plus rapidement chez les patients asthmatiques comparativement aux sujets sains peut être le résultat d'une stimulation de ce muscle lisse par des facteurs mitogéniques ou par des stimuli inflammatoires. Les stimuli mitogéniques impliqués dans la

prolifération des cellules musculaires lisses incluent notamment le TGF- β , l'epidermal growth factor (*EGF*), l'insulin-like growth factor (*IGF*), le platelet derived growth factor (*PDGF*), le fibroblast growth factor (*FGF*)-2, les β -hexominidases, la β -glucuronidase, l' α -thrombine, la tryptase, les sphingosine 1-phosphate, l'endothéline-1, la substance P, la phényléphrine, la sérotonine, le thromboxane A2, le leukotriène D4, le stress mécanique et les agents réactifs dérivés de l'oxygène [42]. La MMP-2 est également un facteur de croissance essentiel pour les cellules musculaires lisses [47]. Les cellules musculaires lisses ont la capacité de produire un vaste répertoire de cytokines, de chimiokines et de médiateurs inflammatoires comme RANTES, CCL-11, IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, MCP-1, MCP-2, MCP-3, Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (*GM-CSF*), IFN- β ,... Beaucoup de ces facteurs sont produits en réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-1 β ce qui conduit à l'amplification de la cascade inflammatoire dans les voies aériennes des patients asthmatiques.

d. Hyperplasie glandulaire

Le mucus protège la surface épithéliale des agressions et facilite l'élimination des débris cellulaires et bactériens du poumon. Ce mucus est produit par des cellules spécialisées de l'épithélium bronchique aussi appelées cellules caliciformes et par les glandes sous-muqueuses. L'augmentation de la production de mucus est une caractéristique importante de l'asthme qui contribue grandement à la morbidité et à la mortalité de la maladie. Cette hypersécrétion de mucus est due à une augmentation du nombre de cellules productrices du mucus, les cellules caliciformes, et à une augmentation de la taille des glandes sous-muqueuses qui provoque un rétrécissement de la lumière des bronches et donc une aggravation de l'obstruction des voies respiratoires.

Les IL-4, -5, -9 et -13 jouent un rôle important dans l'induction de l'hyperplasie des cellules caliciformes en induisant la transformation des cellules épithéliales en cellules caliciformes. Le mucus produit par les cellules caliciformes est constitué de glycoprotéines de mucines. A l'heure actuelle 13 mucines (MUC 1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC 6-9, MUC 11-13) ont été identifiées dans les voies respiratoires humaines. Cependant, l'expression de MUC5AC semble être prédominante dans les voies aériennes [40]. L'activation du récepteur de l'EGF, surexprimé par les cellules épithéliales des patients asthmatiques [48] est une des causes de l'hypersécrétion de MUC5AC. La surexpression du Calcium-activated chloride channel-1

(*CLCA-1*) dans les voies aériennes de ces patients induit également la production de MUC5AC et de MUC5B [49].

e. Angiogenèse

Le poumon contient un riche réseau de capillaires systémiques allant des bronches centrales jusqu'aux bronchioles périphériques. Les vaisseaux sanguins bronchiques sont adjacents à la membrane basale épithéliale. Une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins peut être observée dans les voies aériennes des sujets asthmatiques [50] (Grenn et al, Abnormalities of the bronchial arteries in asthma, 2006). Plusieurs facteurs de croissance ont été décrits dans l'asthme incluant, le VEGF, le PDGF et l'hépatocyte growth factor (*HGF*). Un certain nombre de facteurs angiogènes comme les prostaglandines, l'adénosine et des facteurs de croissance (TGF- β , TGF- α , FGF et TNF- α) sont capables de stimuler l'expression du VEGF. D'autre part, l'expression du VEGF est inhibée par les corticostéroïdes qui sont souvent utilisés dans le traitement de l'asthme [51].

f. Modifications du cartilage bronchique

Le cartilage bronchique joue un rôle important dans la rigidité et l'intégrité des parois bronchiques. Des changements structuraux et biomécaniques du cartilage bronchique sont observés dans la pathologie asthmatique et affectent la fonction pulmonaire. La quantité de cartilage n'est pas changée mais la qualité de ce dernier est affectée. Ces altérations observées au niveau du cartilage peuvent résulter en une bronchoconstriction plus importante [42].

D. Traitements de l'asthme

Etant donné que l'asthme est une maladie chronique, les traitements peuvent être très longs. Certains patients doivent rester sous traitement pour le reste de leur vie. L'asthme ne peut pas être soigné mais il peut être contrôlé. Le fait que l'intensité soit variable permet toutefois à de nombreux patients de devenir asymptomatiques durant de longues périodes.

Il existe trois types de traitement de l'asthme : les traitements étiologiques, les traitements de la crise d'asthme et les traitements de fond.

a. Traitements étiologiques

Dans le cas de l'asthme allergique, le premier principe de traitement est d'éviter l'exposition aux éléments favorisants, déclenchants ou aggravants la maladie. Les asthmatiques ne peuvent pas réellement échapper à leur environnement mais, avec quelques changements dans leur mode de vie, ils peuvent tenter de contrôler l'impact de l'environnement sur leur santé. La liste ci-après représente les diverses possibilités permettant de diminuer les risques d'apparition d'une crise d'asthme.

- Nettoyer la maison au moins une fois par semaine et porter un masque lors du nettoyage
- Eviter les animaux domestiques
- Laver les draps de lit une fois par semaine
- Stocker les draps de lit à l'abri de la poussière
- Utiliser des édredons et oreillers en matières synthétiques
- Préférer le parquet ou le vinyle au tapis dans les chambres à coucher
- Garder l'humidité basse dans la maison.

Enfin, la désensibilisation est un traitement spécifique des causes de l'asthme. Elle vise à corriger le défaut de tolérance aux substances allergènes. Elle peut être réalisée par injection ou par voie sublinguale. A ce jour, seule la désensibilisation vis-à-vis des acariens de maison a montré une efficacité dans le traitement de l'asthme [52] .

b. Traitements des crises d'asthme

Une crise d'asthme se caractérise par une exacerbation aiguë de la dyspnée, de la toux et des sifflements respiratoires. Elle s'accompagne également d'une altération passagère de la fonction pulmonaire. La crise d'asthme peut avoir différents degrés d'intensité, allant de la simple gêne à l'urgence vitale.

Les crises d'asthme sont soignées uniquement par l'utilisation de bêta-2-mimétiques (bronchodilatateurs) visant à libérer la circulation de l'air dans les petites bronches. Le

salbutamol ('ventolin') ou la terbutaline provoquent la décontraction des muscles bronchiques et une dilatation des bronches. Ces médicaments à action rapide sont administrés sous forme d'aérosols à forte concentration. Un certain nombre de données suggèrent que l'administration concomitante de stéroïdes inhalés peut contribuer à une amélioration des crises d'asthme [53].

c. Traitements de fond

Les traitements de fond ont pour but de prévenir la survenue des crises, d'empêcher que les symptômes ne se manifestent, de maintenir un niveau d'activité aussi proche que possible de la normale, de préserver la fonction respiratoire et d'assurer une bonne qualité de vie. Ils visent deux objectifs : réprimer la cascade inflammatoire et induire une bronchodilatation de longue durée.

Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires permettent de réduire le nombre de cellules inflammatoires dans les voies aériennes.

Les corticoïdes (par exemple, la fluticasone ou le budésonide) représentent le traitement de référence de l'inflammation bronchique. Ils peuvent être pris par voie inhalée (fluticasone, budésonide) ou par voie orale (méthylprérisolone). Dans tous les cas, il convient d'utiliser la dose minimale efficace pour limiter les effets secondaires éventuels. L'effet des corticoïdes résulte de leur liaison à leur récepteur cytoplasmique suivie d'une translocation nucléaire qui inhibe l'expression des gènes de l'IL-1, -2, -5, -6, -8 et -13, du TNF- α , de RANTES, du CCL-11, du GM-CSF, des métalloprotéinases et d'ICAM-1. Ceci suggère que cette interaction représente un des aspects fondamentaux des propriétés anti-inflammatoires des corticoïdes. Ils peuvent également stimuler l'expression de gènes par liaisons du complexe corticoïdes/récepteurs aux GRE (Glucocorticoid Responsive Element). Ces interactions sont responsables des effets secondaires des corticoïdes.

Les anti-leucotriènes (Montelukast ou Zafirlukast) sont également des médicaments anti-inflammatoires. Ils sont utilisés dans le cas d'asthme léger ou d'asthme d'effort. Ils sont pris par voie orale. Ils inhibent l'action des leucotriènes en se liant aux muscles lisses et ils diminuent le recrutement des éosinophiles.

Des anti-IgE peuvent également avoir des effets bénéfiques. L'Omalizumab est commercialisé en France et en Belgique depuis 2005 mais sous des conditions restrictives de prescription.

D'autres anti-inflammatoires étaient abondamment utilisés autrefois (Cromones et Théophyllines) mais leur usage est plus confidentiel aujourd'hui.

Traitements contre l'obstruction bronchique (bronchodilatateurs)

Ces médicaments agissent en augmentant le diamètre bronchique.

Les bêta-mimétiques de longue durée sont des bronchodilatateurs permettant de remédier à l'obstruction bronchique. Largement utilisés en association avec les corticoïdes, ils ont quelques effets indésirables. En effet, il leur est reproché une perte de l'efficacité des corticoïdes de courte durée utilisés en cas de crise ainsi qu'une accoutumance.

Les anti-cholinergiques (bromide de tiotropium) limitent le tonus musculaire des grosses bronches et sont surtout utilisés dans la prise en charge de la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (*BPCO*).

Les traitements de l'asthme actuellement disponibles ne sont pas curatifs. Ils agissent sur les symptômes de la maladie et non sur ses causes.

2. Les métalloprotéases matricielles

A. Introduction

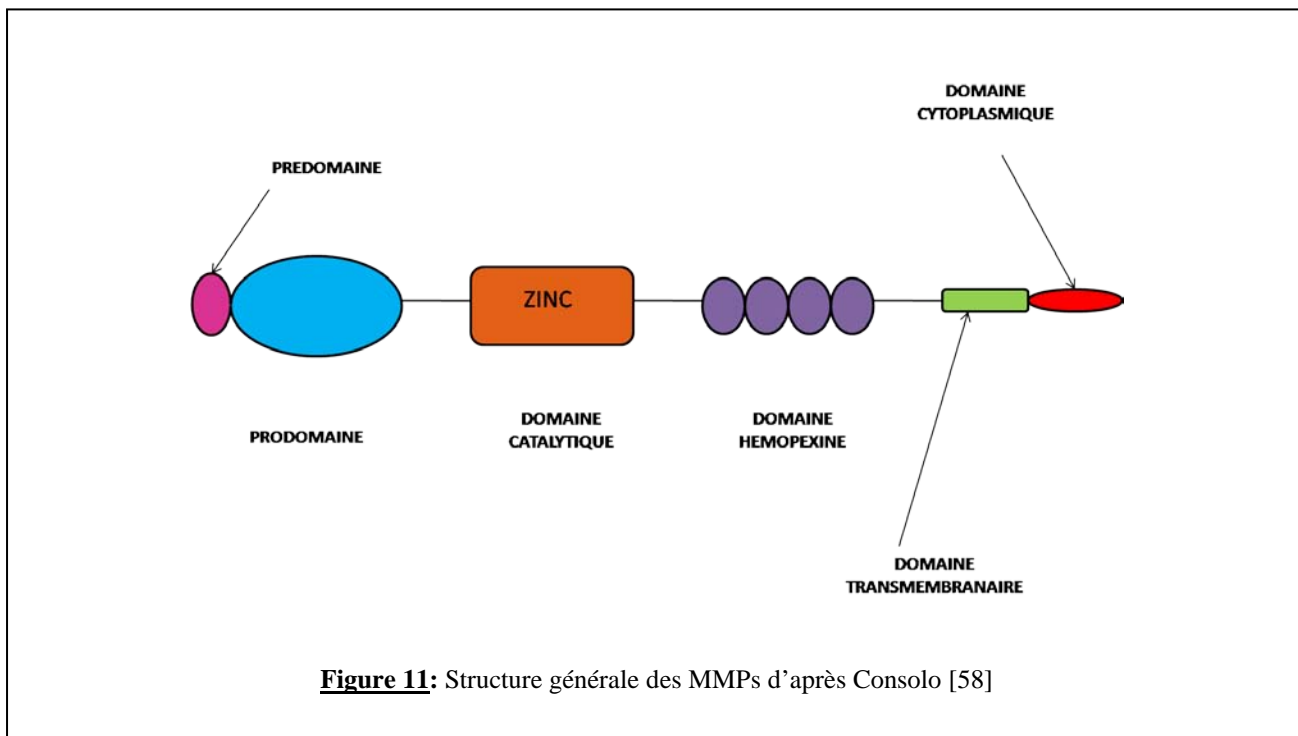
Les métalloprotéases matricielles (MMPs) aussi appelées matrixines appartiennent à la superfamille des metzincines comprenant également, les serralysines, les astacines, les ADAMs protéases (A Disintegrin And Metalloproteases domain) et les ADAM-TS protéases (ADAM avec un motif ThromboSpondine) [54]. Les MMPs constituent une famille d'au moins 28 enzymes qui sont soit sécrétées, soit transmembranaires et dont 22 d'entre elles sont exprimées dans les tissus humains. Ce sont des endopeptidases dépendantes du zinc et du calcium qui, comme leur nom l'indique, sont activement impliquées dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Initialement, le premier membre de la famille fut décrit par Jérôme Gross et Charles Lapière en 1962. Ils observèrent une activité enzymatique responsable de la dégradation de la triple hélice de collagène, durant la métamorphose de la queue du têtard. L'enzyme impliquée fut alors dénommée, « collagénase interstitielle » ou MMP-1 [55].

B. Structure des MMPs

Les MMPs partagent une structure commune hautement conservée (Figure 11). Elles sont constituées de quatre domaines communs à toutes les MMPs : le prédomaine, le prodomaine, le domaine catalytique et le domaine homologue à l'hémopexine présent à l'extrémité carboxy-terminale. Le *prédomaine* est nécessaire à l'acheminement intracellulaire. Il est rapidement éliminé après la sécrétion de la protéine et est absent de la forme enzymatique mûre. Le *prodomaine* maintient l'enzyme sous forme latente. Il est constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le site catalytique ainsi que, dans certains cas, un site de clivage pour la furine permettant une activation intracellulaire de l'enzyme. Le site de clivage pour la furine est présent sur les MMP-11, -21 et -28 ainsi que sur les MMP transmembranaires (MT-MMPs). Le *domaine catalytique* contient un atome de zinc maintenu par trois résidus cystéine au fond d'une structure peptidique tridimensionnelle en forme de poche. Le résidu cystéine du prodomaine agit comme le quatrième ligand de cet ion métallique. Le clivage protéolytique du prodomaine permet de rendre l'atome de zinc accessible ce qui entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors lier son substrat. Enfin, le *domaine carboxy-terminal* est une chaîne polypeptidique dont la structure est homologue à l'hémopexine ou à la vitronectine. Cette chaîne est attachée au site catalytique

par une région charnière riche en résidus proline. Elle détermine la spécificité du substrat des MMPs et sert également de site pour l'interaction avec leurs inhibiteurs. Ce domaine est absent dans la structure des MMP-7, -23 et -26 [56].

Six MMPs possèdent également un domaine transmembranaire à l'extrémité carboxy-terminale. Ces MMPs représentent la famille des MT-MMPs et sont exprimées à la surface cellulaire [57].



C. Classification

Les MMPs peuvent être classées en six groupes sur base de leurs différences structurales. Ces différents groupes sont représentés par les matrilysines, les collagénases interstitielles, les stromélysines, les gélatinases, les métalloprotéases transmembranaires (MT-MMP) et les autres MMPs (Table 2) [59].

a. Les collagénases interstitielles

Les MMP-1, -8 et -13 constituent le groupe des collagénases interstitielles. Elles interviennent dans la dégradation des collagènes fibrillaires incluant les collagènes de types I, II, III et VII [60].

La MMP-1 est exprimée par les fibroblastes et est capable de dégrader le collagène de la matrice extracellulaire. Elle existe sous deux formes latentes dans les tissus, une forme de 57 kDa et une forme de 52 kDa, la plus courante. La forme active de l'enzyme hydrolyse les collagènes de types I, II, III, VII, VIII et X ainsi que l' α 1(I)-macroglobuline, la gélatine, la caséine, la ténascine, l'IL-1 β et les pro-MMP-2 et -9 [61].

La MMP-8 représente la seconde collagénase. Elle est produite majoritairement par les neutrophiles mais également par toute une autre série de cellules comme les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Elle est capable de dégrader les collagènes de types I, II, III, VII, VIII et X ainsi que l'aggrécan, la gélatine, et le fibrinogène [62] [60].

La troisième collagénase qui fut découverte est la MMP-13. Elle est exprimée par les chondrocytes, les fibroblastes et est surexprimée dans le cancer du sein. Son substrat principal est le collagène de type II mais elle dégrade également les collagènes de types I, III, IV, IX, X et XIV, la gélatine, la ténascine, la fibronectine, les protéoglycans du cartilage, l'aggrécan, le fibrinogène et le facteur XII [60].

Enfin, la dernière collagénase est la MMP-18. Elle fut découverte chez le *Xenopus laevis* et son homologue n'a pas encore été identifié chez l'homme. Chez l'amphibien, elle dégrade la gélatine et le collagène de type I [63].

b. Les gélatinases

La classe des gélatinases est constituée des MMP-2 et -9. Elles dégradent principalement la gélatine qui est un métabolite du collagène interstitiel mais également d'autres protéines de la matrice extracellulaire. Le site catalytique de ces MMPs possède trois séquences peptidiques répétitives analogues à la fibronectine de type II. Ces trois séquences permettent la liaison de la gélatine au niveau du site catalytique [63-64].

La MMP-2 est exprimée par les cellules du stroma de la plupart des tissus. Les substrats principaux de cette protéase sont la gélatine et le collagène de type IV. Elle est aussi capable de cliver les collagènes de types I, II, III, V, VII, X, XI et XIV ainsi que la laminine, l'élastine, la fibronectine, la décorine, les protéoglycans du cartilage et l'IL-1 β [65].

La MMP-9, quant à elle, est exprimée par les macrophages et les leucocytes polynucléaires. Son expression est induite dans le remaniement tissulaire comme le développement embryonnaire, la cicatrisation ou l'invasion tumorale. Elle dégrade les collagènes de types IV,

V, VII, X et XIV ainsi que la gélatine, l'élastine, l'aggrécan et aussi les pro-MMP-9 et -13 [65].

c. Les stromélysines

Les MMP-3, -10 et -11 constituent la classe des stromélysines.

La MMP-3 est exprimée par les fibroblastes et par les cellules épithéliales normales. Elle dégrade les collagènes de types I, II, III, IV, IX, X et XI, l'aggrécan, le fibrinogène, la fibrine, la décorine, l'élastine, et les pro-MMP-7, -8, -9 et -13 [63].

La MMP-10 est, quant à elle, exprimée par les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les lymphocytes T, les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Elle peut cliver les collagènes de types III, IV et V, la fibronectine, la gélatine et des protéoglycans. Les MMP-3 et -10 sont exprimées dans certains cancers [63].

La MMP-11 est exprimée par les cellules mésenchymateuses et intervient dans le clivage des inhibiteurs de sérines protéases. Ses substrats sont la fibronectine, la laminine, la gélatine et l'aggrécan [63].

d. Les métalloprotéases transmembranaires

Les MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25 sont également appelées MT1-MMP à MT6-MMP. Elles se lient à la membrane cellulaire soit par l'intermédiaire d'un site hydrophobe transmembranaire présent dans leur domaine homologue à l'hémopexine, soit par un pont inositol-phosphate. Ces enzymes jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et interviennent dans l'activation protéolytique des autres MMPs [66].

La MMP-14 fut découverte comme la protéase capable d'activer la pro-MMP-2 à la surface cellulaire des cellules invasives de carcinome pulmonaire. Elle clive les collagènes de types I, II et III, la gélatine, les protéoglycans du cartilage, la fibronectine, la vitronectine, la ténascine, et l'aggrécan. Elle agit comme une protéine régulatrice car son domaine cytoplasmique est capable d'activer des protéines kinases qui induisent un signal extracellulaire. Elle est impliquée dans la migration cellulaire et la régulation de certains gènes [66].

La MMP-15 fut caractérisée dans le poumon. Ses substrats sont la fibronectine, la ténascine, le laminine, l'aggrécan et la pro-MMP-2.

La MMP-16 est principalement exprimée dans le placenta et dans le cerveau. Elle est également capable d'activer la pro-MMP-2 et elle peut hydrolyser le collagène de type III, les protéoglycans du cartilage, la gélatine, la fibronectine et la vitronectine [66].

La MMP-17 est largement exprimée dans les organes internes et par les leucocytes. Elle est capable de cliver la gélatine mais aucun autre composant de la matrice extracellulaire [67].

La MMP-24 est exprimée dans le cerveau, le rein, le pancréas et le poumon. Elle est capable d'activer la pro-MMP-2 mais les autres substrats de cette protéase sont encore inconnus.

Enfin, la MMP-25 est exprimée par les leucocytes et les neutrophiles dans les poumons, la rate et les tumeurs cérébrales. Elle peut dégrader le collagène de type IV, la gélatine, la fibronectine et la fibrine [67].

e. Les matrilysines

Les matrilysines sont les MMPs possédant la structure la plus simple car elles ne comprennent pas de domaine carboxy-terminal homologue à l'hémopexine. Les MMP-7 et -26 constituent cette classe de MMP. Leurs spectres protéolytiques sont partiellement divergents mais incluent la fibronectine et la gélatine [68-69].

La MMP-7 est également connue sous le nom de putative metalloprotease (*PUM*). Elle est capable de dégrader un grand nombre de composants incluant le collagène de type II, la fibronectine, la gélatine, les protéoglycans, la décorine, la ténascine, la laminine, l'E-cadhérine et le pro-TNF- α [70].

Les substrats de la MMP-26 sont la gélatine, le TNF- α , la fibronectine, le collagène de type IV, le fibrinogène, la caséine et la vitronectine [71].

f. Les autres MMPs

Les MMP-12, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -27 et -28 forment le groupe hétérogène des MMPs. La MMP-12 aussi appelée metalloélastase du macrophage dégrade essentiellement l'élastine. Elle est exprimée principalement par les macrophages alvéolaires [72]. Ses propriétés seront détaillées dans la section 3 de cette introduction.

La MMP-19 est exprimée par les cellules sanguines mononucléaires, les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules myéloïdes. Ses substrats sont la gélatine, la laminine, le collagène de type IV, la ténascine, la fibronectine et l'aggrécan [63].

La MMP-20, également appelée énamélysine, intervient quant à elle, dans la formation de l'émail dentaire. Elle dégrade l'amélogénine, la gélatine, la caséine, l'aggrécan, la fibronectine, la laminine et la ténascine [63].

Les processus par lesquelles les autres MMPs de ce groupe sont activées ne sont actuellement pas encore connus, de même que leurs modes d'action et leurs substrats.

Tableau 2

NOM	SUBSTRATS
<i>Collagénases interstitielles</i>	
MMP-1 (Collagénase-1)	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X, α 2-macroglobuline, gélatine, caséine, ténascine, II-1 β , pro-MMP-2, pro-MMP-9
MMP-8 (Collagénase-2)	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X, agrécan, gélatine, fibrinogène
MMP-13 (Collagénase-3)	Collagènes I, II, III, IV, IX, X, XIV, gélatine, ténascine, fibronectine, protéoglycans, agrécan, fibrinogène, facteur XII
MMP-18 (Collagénase-4)	Gélatine, collagène I
<i>Gélatinases</i>	
MMP-2 (Gélatinase-A)	Collagène I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, gélatine, élastine, fibronectine, agrécan, laminine, décorine, protéoglycans, II-1 β .
MMP-9 (Gélatinase-B)	Collagène IV, V, VII, X, XIV, gélatine, pro-MMP-9, pro-MMP-13, élastine, agrécan
<i>Stromélysines</i>	
MMP-3 (Stromélysine-1)	Collagènes I, II, III, IV, IX, X, XI, agrécan, fibrinogène, fibrine, décorine, élastine, pro-MMP-7, -8, -9 et 13
MMP-10 (Stromélysine-2)	Collagènes III, IV, V, fibronectine, gélatine, protéoglycans
MMP-11 (Stromélysine-3)	Fibronectine, laminine, gélatine, agrécan
<i>MT-MMP</i>	
MMP-14 (MT1-MMP)	Collagènes I, II, III, gélatine, , fibronectine, vitronectine, ténascine, agrécan, laminine, pro-MMP-2, pro-MMP-13
MMP-15 (MT2-MMP)	Pro-MMP-2, gélatine, fibronectine, laminine, ténascine, agrécan
MMP-16 (MT3-MMP)	Pro-MMP-2, collagène III, protéoglycans, gélatine, fibronectine, vitronectine
MMP-17 (MT4-MMP)	Gélatine
MMP-24 (MT5-MMP)	Pro-MMP-2
MMP-25 (MT6-MMP)	Gélatine, collagène IV, fibronectine, fibrine
<i>Matrylisines</i>	
MMP-7 (Matrylisine-1)	Collagène II, fibronectine, gélatine, protéoglycans, décorine, ténascine, laminine, E-cadhérine, pro-TNF- α
MMP-26 (Matrylisine-2)	Gélatine, TNF- α , fibronectine, collagène IV, fibrinogène, caséine, vitronectine
<i>Autres</i>	
MMP-12 (Métalloélastase)	Elastine,
MMP-19	Ténascine, gélatine, agrécan, laminine, collagène IV, fibronectine
MMP-20 (Enamélysine)	Enamel, gélatine, caséine, agrécan, fibronectine, laminine, ténascine
MMP-21	Inconnu
MMP-22	Inconnu
MMP-23	Inconnu
MMP-27	Inconnu
MMP-28	Inconnu

Tableau 2 : Classification des MMPs

D. Régulation de l'activité des MMPs

L'activité des MMPs dans l'espace extracellulaire dépend de l'équilibre entre leur inhibition et leur activation. La synthèse et la fonction des MMPs sont régulées par trois mécanismes principaux tels que, l'activation transcriptionnelle, la régulation post-transcriptionnelle (clivage du prodomaine et détachement de la surface cellulaire) et le contrôle de l'activité par différents inhibiteurs endogènes tissulaires connus sous le nom de TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteinase) ou circulants, tels que l' α 2-macroglobuline [73].

L'expression des MMPs est stimulée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance comprenant l'IL-1 β , les IFNs, l'EGF, le PDGF et le TNF- α . Ces différents facteurs induisent l'expression et/ou l'activation de *c-fos* et de *c-jun* qui se lie et activent l'Activator Protein-1 (AP-1), un site promoteur dans les gènes de MMPs. Le TGF- β (Tumor Growth Factor- β) est connu, quant à lui, pour réduire l'expression de ces gènes.

Comme décrit plus haut, les MMPs sont sécrétées sous formes latentes nécessitant le clivage du prodomaine par protéolyse pour être activées. Cette activation peut avoir lieu soit dans le milieu extracellulaire, soit à la surface cellulaire, soit dans le cytoplasme [74]. Certaines MMPs contiennent un motif qui peut être reconnu par des enzymes homologues de la furine et qui permet une activation intracellulaire de la protéase. Les MMPs ne possédant pas ce site de clivage ne peuvent être activées qu'après leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. L'élimination du prodomaine des MMPs et leur activation peuvent être réalisées sous l'action de la plasmine mais aussi des MMPs elles-mêmes.

Enfin, l'activité des MMPs est contrôlée par des inhibiteurs endogènes, les TIMPs. Les TIMPs représentent une famille de protéines sécrétées de 20 à 29 kDa qui inhibent spécifiquement les formes actives de MMPs et, dans certains cas, les formes latentes. Les TIMPs ont une structure commune avec 12 résidus cystéines conservés.

Jusqu'à présent, quatre TIMPs ont été identifiées chez les vertébrés (TIMP-1 à TIMP-4). TIMP-1 est une protéine de 28.5 kDa qui contient deux sites de glycosylation. TIMP-2 est une protéine de 21 kDa qui est chargée négativement à l'extrémité carboxy-terminale. TIMP-3 existe sous deux formes, une forme glycosylée de 27 kDa et une forme non glycosylée de 24 kDa. Les deux formes de TIMP-3 sont retrouvées dans le milieu extracellulaire. Enfin, TIMP-4 est la protéine de la famille des TIMPs la plus neutre en conditions physiologiques. Ces inhibiteurs forment un complexe équimoléculaire avec les formes actives des MMPs. Le domaine amino-terminal des TIMPs se lie au site catalytique des MMPs et bloque l'accès de

ce site pour le substrat. Ces complexes sont stables et irréversibles. Les quatre TIMPs ont des affinités distinctes pour les différentes MMPs. Par exemple, TIMP-1 et TIMP-2 sont capables d'inhiber les formes actives de MMP-2 et de MMP-9 respectivement. Comme pour les MMPs, l'expression des TIMPs dans les tissus est étroitement régulée afin de maintenir un équilibre entre les phénomènes de protéolyse par les MMPs et l'inhibition de ces phénomènes par les TIMPs permettant ainsi à la matrice extracellulaire d'être stable. La régulation des MMPs par les TIMPs est donc un facteur important contrôlant le catabolisme de la matrice extracellulaire et une dérégulation de cet équilibre peut être à l'origine de différents états pathologiques comme l'arthrite, la cicatrisation, le cancer, la cirrhose... [59].

L'expression des TIMPs semble être régulée par les membres de la superfamille du TGF- β . Le TGF- β 1 augmente les taux d'ARNm de TIMP-1 et TIMP-3 [75]. La BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) quant à elle, stimule l'expression de TIMP-2 et TIMP-3 [76].

E. Rôle des MMPs dans l'asthme

Les patients atteints d'asthme présentent des taux importants de MMP-2, MMP-9 et TIMP-1 dans leur sputum. La MMP-9 est la première MMP étudiée pour son implication dans la pathologie de l'asthme. Des taux élevés de MMP-9 sont retrouvés dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire [77], le sputum induit par inhalation d'une solution saline hypertonique [47, 78] et dans le sérum des patients asthmatiques [79]. Le niveau d'expression de la MMP-9 est corrélé avec le degré de sévérité de la maladie. En effet, la quantité de MMP-9 mesurée dans le sputum de patients atteints d'asthme sévère est significativement plus importante que celle mesurée chez les patients présentant un asthme modéré [80].

La MMP-9 est exprimée par les neutrophiles [47, 78], les éosinophiles [62] et les cellules épithéliales bronchiques (référence). Elle semble être un facteur important capable de stimuler l'infiltration des éosinophiles dans les voies aériennes de patients asthmatiques [81].

La régulation de la sécrétion de la MMP-9 dans les voies aériennes est assez complexe car plusieurs types cellulaires sont capables de produire cette protéase. Le récepteur PAR-2 (Protéinase Activated Receptor-2) joue un rôle important dans la sécrétion de la MMP-9. Ce récepteur est présent à la surface des cellules épithéliales et est activé par des sérines protéases ainsi que par la tryptase des mastocytes. L'activation de ce récepteur induit non seulement la sécrétion de MMP-9 mais également la libération de GM-CSF et de CCL-11 par les cellules épithéliales bronchiques. Le GM-CSF et le CCL-11 induisent la survie et le recrutement des éosinophiles respectivement [82].

L'IL-17 joue également un rôle important dans la sécrétion de MMP-9. Cette cytokine permet la libération de pro-MMP-9 ainsi que de MMP-9 active dans les voies aériennes et stimule l'accumulation locale de neutrophiles [83].

La MMP-2 est également une métalloprotéase dont l'expression est augmentée dans l'asthme. Elle est produite par les cellules musculaires lisses et stimule la prolifération de ces cellules de façon autocrine. Ceci contribue probablement à une augmentation de la masse musculaire lisse [84]. De plus, cette protéase est capable, tout comme la MMP-9, de dégrader la membrane basale. Cette dégradation est suivie d'une réparation altérée entraînant finalement des dépôts de collagènes de types I, III et V et de fibronectine désorganisés. Ce sont vraisemblablement ces cycles de dégradation/réparation qui provoquent la formation de la zone de fibrose sous-épithéliale.

En plus de leur capacité à sécréter la MMP-9, les polynucléaires neutrophiles peuvent également produire la MMP-8. Cette protéase se retrouve également en quantité importante dans les biopsies et dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des patients asthmatiques [78]. La MMP-8 joue un rôle important dans la cascade d'événements conduisant à l'apoptose des neutrophiles et possède des propriétés anti-inflammatoires. En effet, lorsque des souris déficientes en MMP-8 sont exposées à un allergène comme l'ovalbumine, elles présentent, par rapport aux souris de type sauvage ayant été exposées au même allergène, une augmentation du nombre de neutrophiles et d'éosinophiles dans les parois bronchiques, une augmentation des taux d'IgE et d'IgG1 dans le sérum ainsi qu'une augmentation des taux d'IL-4 dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire [85].

D'autres MMPs sont surexprimées dans l'asthme, la MMP-3 [86] et la MMP-12 [87] par exemple, mais leur mécanisme d'action doit encore être élucidé.

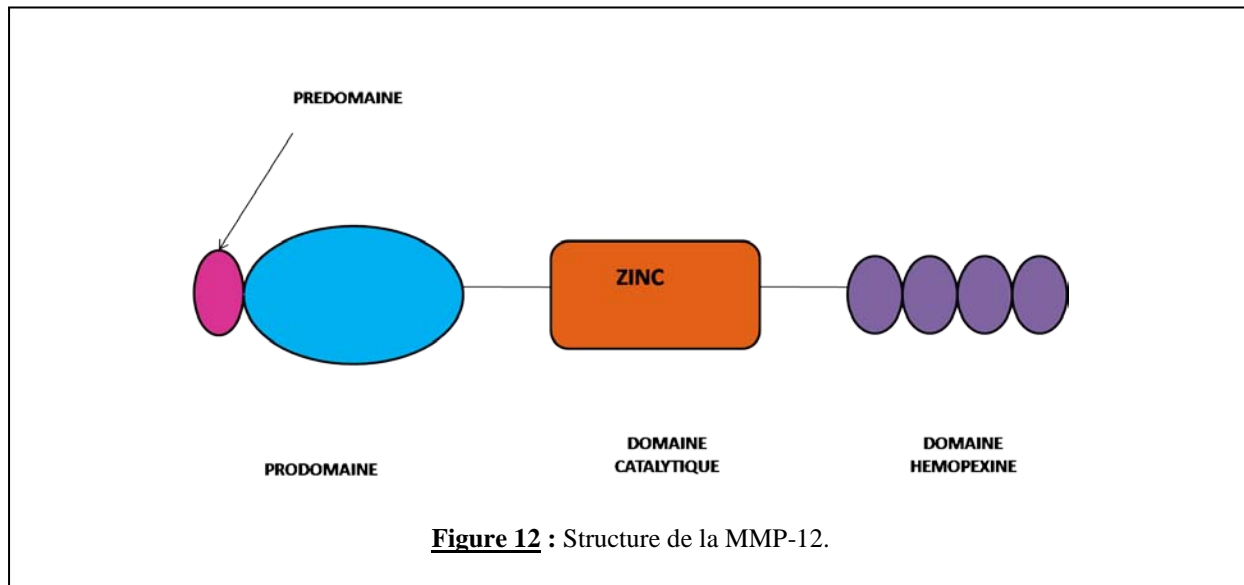
3. La
métalloprotéase
matricielle-12
(MMP-12)

A. Introduction

Comme indiqué ci-avant, la MMP-12 est une protéine appartenant à la grande famille des métalloprotéases matricielles. Elle est aussi appelée *élastase du macrophage* car elle fut identifiée comme une métalloprotéase à capacité élastolytique sécrétée par les macrophages. Elle possède les caractéristiques typiques des MMPs, à savoir, une structure organisée en domaines, la localisation de son gène sur le chromosome 11q22 et une capacité à dégrader différents composants de la matrice extracellulaire [88].

B. Structure

La MMP-12 est une protéine de 54 kDa constituée des trois domaines communs aux protéines de cette famille, un prodomaine, un domaine catalytique contenant un atome de zinc et un domaine homologue à l'hémopexine (Figure 12). Le prodomaine de 9 kDa est situé à l'extrémité amino-terminale et contient des résidus cystéines hautement conservés dont le thiol interagit avec l'ion zinc dans la forme inactive. Cette interaction est impliquée dans le maintien de la latence de l'enzyme. Le domaine catalytique contient un ion zinc maintenu par trois résidus histidines. Lors du clivage du prodomaine, l'atome de zinc est rendu accessible et le site catalytique devient disponible pour son substrat. Enfin, le domaine carboxy-terminal est constitué de séquences homologues à la vitronectine et à l'hémopexine. Ce domaine détermine la spécificité du substrat et permet la liaison des TIMPs. Il participe également à la localisation de l'enzyme dans la matrice extracellulaire. Le domaine hémopexine est lié au site catalytique par une région charnière riche en résidus prolines [88].



C. Régulation de l'expression et de l'activation de la MMP-12

L'expression du gène de la MMP-12 peut être régulée durant différentes étapes conduisant de l'ADN à l'ARNm et finalement à la protéine. Ces régulations peuvent avoir lieu au niveau transcriptionnel ainsi qu'au niveau post-transcriptionnel.

a. Régulation transcriptionnelle

Différentes cytokines comme le GM-CSF ou le PDGF sont capables de stimuler l'expression de la MMP-12 [89]. L'IL-1 β est également connue pour stimuler l'expression de la MMP-12 dans la BPCO et dans l'asthme [90]. D'autres facteurs ont été identifiés pour induire l'expression de la MMP-12 mais leur mécanisme d'action n'est pas encore connu. Ces facteurs sont, notamment, l'hyaluronan, le peptide amyloïde- β , le VEGF, le TNF- α [91], MCP-1 [92], l'IFN- γ [72].

Par contre, le TGF- β 1 est, quant à lui, capable d'inhiber l'expression de la MMP-12 [93].

b. Régulation post-transcriptionnelle

Dans les macrophages, la MMP-12 est stockée dans des granules cytoplasmiques et peut être sécrétée sous forme d'une pro-enzyme cytosolique de 54 kDa qui est alors clivée en deux formes actives de 22 et 45 kDa [88].

La plasmine et la thrombine sont libérées en grande quantité dans les maladies inflammatoires telles que l'asthme. Elles sont capables d'activer le récepteur PAR-1 (Proteinase Activated Receptor-1) présent à la surface des macrophages. Cette activation de PAR-1 permet la sécrétion des vésicules contenant la pro-MMP-12 [92, 94]. D'autre part, les chimiokines CXCL9 et CXCL10 sont également capables de stimuler la sécrétion de MMP-12 en activant leur récepteur CXCR3 également présent à la surface des macrophages [95]. Une fois sécrétée, la MMP-12 est ensuite activée par clivage protéolytique du prodomaine. Ce clivage peut être réalisé par la MMP-12 elle-même ou par d'autres protéases comme la plasmine.

L'activité de la MMP-12 est également régulée, comme pour les autres MMPs, par des inhibiteurs endogènes présents dans les tissus, les TIMPs. Les 4 TIMPs découvertes jusqu'à présent ont une affinité variable pour les différentes MMPs. TIMP-1 possède une grande affinité pour la MMP-12 et est donc capable d'inhiber l'activité de cette protéase [96].

D. Implications physiologiques de la MMP-12

Le substrat principal de la MMP-12 est l'élastine qui est une protéine très abondante dans les poumons et dans les parois artérielles. Une régulation anormale de l'expression de cette protéase est impliquée dans l'anévrisme de l'aorte abdominale, l'athérosclérose et l'emphysème. Elle est capable de cliver une grande variété d'autres composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la fibrilline-1, la laminine, l'entactine, le collagène de type IV, le chondroïtine sulfate, l'héparan sulfate et la vitronectine [97].

La MMP-12 est également capable de cliver et d'activer les pro-MMP-2 et -3 qui sont alors, à leur tour, capables d'activer les pro-MMP-1 et -9. Cette cascade protéolytique conduit à la dégradation exagérée d'un large spectre de protéines de la matrice extracellulaire [98].

La MMP-12 joue un rôle d'inhibiteur dans l'angiogenèse et dans la progression tumorale. En effet, en dégradant le plasminogène, elle entraîne une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales [99].

E. Implication de la MMP-12 dans différentes pathologies

Le rôle de la MMP-12 dans les maladies pulmonaires comme la BPCO et l'emphysème est bien documenté dans la littérature. Dans le poumon, cette enzyme est produite par les macrophages activés, les cellules épithéliales [100], les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses [101] et les cellules dendritiques [102]. Son substrat principal, l'élastine, représente 2.5% du poids sec pulmonaire et joue un rôle important dans l'élasticité et la résistance des alvéoles et des bronches.

Dans l'emphysème, le contenu du parenchyme pulmonaire en élastine est diminué et les fibres élastiques présentes sont désorganisées et non fonctionnelles. De plus, un produit de dégradation de l'élastine, la desmosine, est retrouvé en quantité importante dans les urines de patients atteints de BPCO. Ceci est expliqué par une augmentation de l'expression de la MMP-12 dans ces deux maladies [103]. En effets, des taux importants de MMP-12 ont été détectés dans les poumons de souris exposées à la fumée de tabac [102] ainsi que dans les sputum induits de patients atteints de BPCO [104].

Peu de données concernant le rôle exact de la MMP-12 dans l'asthme ont été publiées. Les taux d'ARNm de MMP-12 sont augmentés dans les poumons de rats exposés à un allergène comparativement aux rats contrôles [87, 105]. De plus, les souris déficientes pour le gène de la MMP-12 montre une diminution de l'inflammation après exposition à un allergène de blatte par rapport aux souris de type sauvage exposées au même allergène [106].

La MMP-12 joue un rôle dans différents types de maladies de la peau comme le psoriasis, les lésions dues aux coups de soleil, les maladies caractérisées par des fibres élastiques anormales (sarcoïdose p.e.) et les maladies caractérisées par une altération de la membrane basale. Elle joue également un rôle clé dans l'arthrite rhumatoïde qui est une maladie causée par la dégradation du cartilage, des os et des tendons [92]. Enfin, comme mentionné plus haut, la MMP-12 joue un rôle dans certaines maladies cardio-vasculaires (anévrisme de l'aorte et formation des plaques d'athérosclérose) ainsi que dans les cancers et la progression tumorale [91].

4. Les modèles murins d'asthme

4. Les modèles murins d'asthme

Les modèles animaux expérimentaux permettent de dévoiler d'importantes informations sur différents aspects de la maladie asthmatique. A l'heure actuelle, la souris est le vertébré le plus utilisé dans ce type de modèle au vu de sa grande disponibilité, sa petite taille, son faible coût, sa manipulation aisée et son taux élevé de reproduction. De plus, la bonne connaissance de l'immunologie de la souris ainsi que les techniques d'ingénierie génétique pour la génération de souris génétiquement modifiées permettent l'étude détaillée des mécanismes de la réponse Th2.

L'allergène le plus classiquement utilisé dans les modèles d'asthme et principalement utilisé dans notre laboratoire est l'ovalbumine (*OVA*). L'ovalbumine est la principale protéine constituant le blanc d'œuf. Seule, cette protéine est inerte et donc non reconnue par le système immunitaire. La co-administration d'hydroxyde d'aluminium lors de la sensibilisation est nécessaire afin d'orienter la réponse immunitaire vers le système Th2 [107]. Néanmoins, d'autres allergènes peuvent être utilisés tel que les allergènes de blattes ou de pollen combinés à des constituants bactériens ou présentant une activité protéolytique comme le dermatophagoïdes pteronyssinus (*Der p 1*).

Divers types d'asthme peuvent être obtenus en fonction des protocoles utilisés. Les symptômes d'asthme aigu sont obtenus par deux sensibilisations par injection intrapéritonéale d'ovalbumine en présence d'hydroxyde d'aluminium à une semaine d'intervalle suivie de sept provocations par aérosols d'OVA. Des modèles d'asthme chroniques ont également été utilisés. Dans ce cas, les expositions aux allergènes ont lieu pendant plusieurs semaines ce qui permet d'obtenir un remodelage bronchique.

La souche murine utilisée dans les modèles d'asthme est également importante. En effet, il a été montré que le degré de l'hyperréactivité et d'inflammation induite par un allergène [108] ainsi que le développement du remodelage bronchique [109] dépend de la souche murine utilisée.

Nous avons pu mettre en évidence, au sein de notre laboratoire, diverses différences entre les souris de souche Balb/C et les souris de souche C57BL/6 qui sont les souches murines les

plus communément utilisées dans les modèles murins d'asthme. Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

- Suite à l'exposition à l'allergène, les souris Balb/C montrent une réactivité bronchique à la méthacholine plus importante que celle observée chez les souris C57BL/6.
- Les pourcentages d'éosinophiles, de neutrophiles et de cellules épithéliales sont plus importants dans le lavage bronchoalvéolaire des souris C57BL/6 par rapport à ceux présent dans le lavage bronchoalvéolaire des souris Balb/C. Par contre, le nombre de mastocytes est plus important dans les parois bronchiques des souris Balb/C exposées à l'OVA que celui retrouvé au sein des parois bronchique des souris C57BL/6.
- Les taux d'IgG1 (un marqueur d'un milieu enclin à une réponse Th2) sont drastiquement plus importants dans le sérum des souris Balb/C comparativement aux souris C57BL/6.
- Les taux de CCL-11, d'IL-5, d'IL-4 d'IL-13 sont plus élevés dans les extraits pulmonaires des souris BALB/C exposées à l'OVA lorsqu'on les compare aux souris C57BL/6 exposées au même allergène. Par contre, CCL-11 et CCL-5 sont présents en plus grande quantité dans les lavages des souris C57BL/6 par rapport aux souris Balb/C.

En conclusion, le background génétique des souris est important pour les caractéristiques de l'inflammation de maladies telles que l'asthme. Ce paramètre doit être pris en compte dans la conception et dans l'interprétation des protocoles expérimentaux tentant de démontrer les mécanismes de l'inflammation allergique ou l'activité pharmacologique de molécules.

Publication n°1 : Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production.

Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart JM, Noël A, Cataldo DD.

Inflamm Res. 2009 Dec;58(12):845-54. Epub 2009 Jun 9.

II. Buts et plan du travail

II. Buts et plan du travail

La prévalence de la maladie asthmatique est en constante augmentation à travers le monde. Au cours de la vie d'un asthmatique, la fonction pulmonaire diminue plus fortement comparativement aux sujets normaux. Ceci est lié à l'inflammation et au remodelage des voies aériennes. Les caractéristiques principales du remodelage bronchique consistent en des dommages épithéliaux, une hyperplasie des cellules musculaires lisses, une hyperplasie glandulaire, et une fibrose sous-épithéliale incluant un dépôt de collagène dans la lamina reticularis de l'épithélium bronchique.

Les traitements actuels de l'asthme ne sont pas efficaces dans le contrôle du remodelage bronchique et ne permettent pas de contrôler efficacement la maladie d'un point de vue clinique. Pour cette raison, le développement de nouveaux agents thérapeutiques semble nécessaire afin de permettre un contrôle de l'inflammation aigue, de l'hyperréactivité et du remodelage bronchiques.

Dans ce travail, nous avons dans un premier temps, mis au point un modèle murin permettant l'étude de la réponse inflammatoire aigue mais également du remodelage bronchique. Grâce au développement de ce modèle murin, nous avons pu détecter par analyse transcriptomique de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour la maladie asthmatique telles que l'Agr2, le Cd209e, le Col6 et le C1qa. D'autres gènes préalablement décrits comme surexprimés dans l'asthme ont également été étudiés afin de valider notre modèle (MMP-12, Fcgr2b, Ccl8, chi3l3 et Arg1).

Suite à cela, nous avons décidé d'investiguer le rôle de la MMP-12 dans la pathologie asthmatique car bien que ce gène soit connu pour être surexprimé dans la maladie, son rôle exact dans la pathologie asthmatique n'était pas encore clair.

La MMP-12, également appelée métalloélastase du macrophage, est une pro-enzyme de 54 kDa qui est clivée en deux formes actives de 45 kDa et de 22 kDa. Elle est exprimée principalement par les macrophages alvéolaires mais également par les cellules épithéliales bronchiques, les cellules dendritiques et les cellules musculaires lisses. Le substrat principal de cette enzyme est l'élastine qui représente environ 2.5% du poids sec des poumons. En plus de son activité élastolytique, la MMP-12 peut dégrader d'autres composants de la matrice extracellulaire comme le collagène de type IV, la fibronectine, la laminine, la vitronectine, les

protéoglycans, etc. Elle a également la capacité d'activer la pro-MMP-2 et la pro-MMP-3 qui peuvent à leur tour activer la pro-MMP-9 et la pro-MMP-1. Cette cascade protéolytique explique comment la MMP-12 peut provoquer une dégradation exagérée d'une grande variété de composant de la matrice extracellulaire. La MMP-12 est également capable de dégrader d'autres substrats non liés à la matrice extracellulaire. Une régulation anormale de l'expression de la MMP-12 est rencontrée dans différentes pathologies telles que les maladies inflammatoires de la peau, l'anévrisme de l'aorte, le cancer et l'emphysème pulmonaire.

Afin d'étudier plus avant le rôle de la MMP-12 dans l'inflammation allergique et dans le remodelage bronchique, nous avons appliqué notre modèle murin à des souris déficientes pour le gène de la MMP-12 ainsi qu'aux souris wild-type correspondantes.

Suite aux résultats obtenus avec les souris déficientes pour le gène de la MMP-12, les effets éventuels d'un siRNA ciblant le gène de cette protéase administré par instillation intratrachéale dans notre modèle murin d'inflammation aigue ont également été testés.

III. RESULTATS

A. Découverte de nouveaux biomarqueurs de l'asthme dans un modèle murin d'inflammation allergique aigue et dans un modèle murin de remodelage bronchique chronique

Durant ces dernières décennies, la prévalence de l'asthme a dramatiquement augmenté dans le monde. Au cours de la vie d'un asthmatique, la fonction pulmonaire diminue plus fortement que chez le sujet normal à cause d'un remodelage des voies aériennes. Les caractéristiques principales du remodelage bronchique consistent en des dommages épithéliaux, une hyperplasie des cellules musculaires lisses, une hyperplasie glandulaire, et une fibrose sous-épithéliale incluant un dépôt de collagène dans la lamina reticularis de l'épithélium bronchique.

Les traitements actuels de l'asthme ne sont pas efficaces dans le contrôle du remodelage bronchique et ne permettent pas aux patients de contrôler efficacement la maladie d'un point de vue clinique. Pour cette raison, de nouveaux agents thérapeutiques sont nécessaires afin de permettre un contrôle de l'inflammation aigue, de l'hyperréactivité et du remodelage bronchiques.

Dans ce travail, un modèle murin d'asthme permettant le développement d'une réponse aigue et chronique à un allergène a été utilisé pour identifier, par analyse transcriptomique, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour la maladie.

Voici un résumé des résultats obtenus lors de ce travail :

- A la fin de chaque protocole, la résistance bronchique mesurée à l'aide du système Flexivent est plus importante chez les souris exposées à l'allergène comparativement aux souris contrôles correspondantes exposées au PBS. Les souris exposées à court et moyen terme à l'allergène montrent une inflammation péribronchique plus importante comparativement aux souris contrôles correspondantes. L'infiltration des éosinophiles dans les parois bronchiques est plus importante dans les poumons de souris exposées à l'allergène comparativement aux souris témoins et ce quelque soit la durée de l'exposition mais le nombre d'éosinophiles dans les parois bronchiques des souris exposées à l'allergène diminue au cours du temps.

- Les taux d'IgE spécifiques anti-OVA sont plus importants après exposition à l'ovalbumine.
- Une hyperplasie muqueuse évidente peut être mise en évidence dans notre modèle expérimental. Le pourcentage de cellules caliciformes dans l'épithélium bronchique augmente progressivement au cours du temps chez les souris exposées à l'allergène et est plus important comparativement aux contrôles. Une augmentation du dépôt de collagène est observée chez les souris exposées à l'allergène pour une durée intermédiaire et longue mais pas après une exposition de courte durée. Ceci a été confirmé par immunohistochimie montrant une accumulation sous-épithéliale de collagène de types III et V aux temps intermédiaire et long mais pas au temps court. Par contre, la masse de muscle lisse est augmentée chez les souris exposées à l'ovalbumine comparativement aux souris contrôles et ce, quelque soit la durée de l'exposition.
- Une analyse transcriptomique a été réalisée par microarray Affymetrix Wide Genome permettant de vérifier l'expression de plus de 14000 gènes. Après une exposition à l'ovalbumine de courte durée, 598 gènes sont régulés positivement et 490 gènes sont régulés négativement. Par contre, les gènes modulés sont principalement régulés positivement (1406 contre 153) après le temps intermédiaire et négativement (321 contre 117) après le temps long. Les gènes sont considérés comme significativement modulés lorsque leur expression est augmentée ou diminuée au moins de deux fois par rapport aux contrôles.

L'expression des gènes relatifs à la sécrétion de mucus augmente progressivement durant l'exposition à l'allergène. Les gènes des facteurs de croissance, des MMPs et des collagènes sont principalement surexprimés au temps intermédiaire. Cependant, parmi ces groupes, TIMP1 et Col6a2 sont surexprimés à tous les temps alors que l'IGF1 et la MMP-12 sont surtout surexprimés après une exposition de courte durée à l'allergène. Les gènes impliqués dans la division cellulaire, sont quant à eux surexprimés au temps court puis sous exprimés au temps long. CCL11, CCL8, CCL9 et CCR5 sont surexprimés à tous les temps de notre protocole expérimental.

Les gènes modulés aux trois temps de notre protocole expérimental (court, intermédiaire et long) sont particulièrement intéressants. Certains d'entre eux sont déjà

connus pour jouer un rôle dans la pathologie asthmatique alors que pour d'autres gènes aucun rôle dans l'asthme n'est encore connu à ce jour.

- Afin de valider les résultats obtenus grâce au microarray, des RT-PCR quantitatives ont été réalisées. Tous les résultats obtenus par qRT-PCR sont étroitement corrélés aux résultats du microarray.
- Comme les gènes surexprimés à chaque temps d'exposition de notre protocole expérimental peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles pour l'asthme, leurs produits protéiques ont été analysés par immunohistochimie (Agr2, Cd209e, Col6 et C1qa). D'autres gènes préalablement décrits comme surexprimés dans l'asthme ont également été étudiés afin de valider notre modèle (Fcgr2b, Ccl8, chi3l3 et Arg1). Ces immunohistochimies ont montré que Cd209e, Ccl8 et Fcgr2b sont principalement produits par les cellules immunitaires alors que l'Arg1 et Chi3l3 sont produits par les cellules immunitaires et par les cellules épithéliales. La production d'Agr2 a principalement été détectée dans les cellules caliciformes. Enfin, comme prévu, la production de Col6 et C1qa fut détectée dans la matrice extracellulaire.
- Enfin, une analyse des voies de signalisation modulées à chaque temps de notre modèle murin a été réalisée grâce aux programmes Ingenuity Pathway Analysis et GO BP. Plusieurs voies de signalisation telles que la cascade du complément, la voie de l'IGF1, la présentation d'antigènes, le métabolisme de l'arginine,... et processus biologiques comme l'activation du complément, la réponse immunitaire et l'activation du cycle cellulaire sont modulés tout au long de l'exposition à l'allergène.

En conclusion, ce travail représente la première analyse complète des gènes impliqués dans le développement de la pathologie asthmatique et a permis d'établir une liste de gènes et de voies de signalisation constamment modulés au cours de la maladie. De plus, certains de ces nouveaux gènes cibles ont été validés en immunohistochimie. Cette étude fournit dès lors, un nouvel aperçu de la compréhension des mécanismes conduisant à l'établissement de la maladie et dévoile de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Publication n°2: New asthma biomarker: Lessons from murine models of acute and chronic asthma

Crahay C*, **Di Valentin E***, Garbacki N, Hennuy B, Guéders M, Noël A, Foidart JM, Grooten J, Colige A, Piette J, Cataldo D.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Feb;296(2):L185-97. Epub 2008 Nov 21

* These authors contributed equally to this work.

B. Design du siRNA ciblant la MMP-12 dans le but d'une nouvelle approche thérapeutique de l'inflammation et du remodelage pulmonaire.

Structure et fonction de la MMP-12

La MMP-12 est une protéine de la famille des MMPs également dénommée « élastase du macrophage ». Comme les autres membres de cette famille, la MMP-12 possède une structure organisée en trois domaines, un prodomaine, un domaine catalytique liant un atome de zinc et un domaine hémapexine.

Cette protéase est associée aux maladies inflammatoires impliquant l'infiltration des macrophages au sein des tissus. En effet, cette enzyme contribue à la migration des macrophages à travers la membrane basale, un processus permettant le recrutement de ces cellules sur le site inflammatoire où ils activent rapidement diverses cascades inflammatoires. Le rôle de la MMP-12 dans les maladies pulmonaires est bien documenté dans la littérature. L'élastine qui représente 2,5 % du poids sec du poumon est le substrat principal de cette protéase et sa dégradation entraîne une diminution de l'élasticité du parenchyme et de la résistance des bronches et des alvéoles. Il en résulte une désorganisation du parenchyme pulmonaire.

Régulation de l'expression et de l'activation de la MMP-12

L'expression de la MMP-12 est contrôlée aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post transcriptionnel. De plus, elle pourrait être régulée par des microRNA (miRNA).

Le contrôle transcriptionnel peut être réalisé à travers des cascades conduisant à la libération d'une grande variété de facteurs de transcription. La région promotrice du gène de la MMP-12 contient au moins six sites de liaison pour des facteurs de transcription ainsi qu'une boîte TATA. Parmi eux, les sites AP-1 et STAT-5 sont probablement très importants pour l'induction de l'activité du promoteur du gène de la MMP-12. Des cytokines telles que le GM-CSF et le PDGF-BB peuvent induire le complexe AP-1. L'IL-1 β peut également causer une augmentation de l'expression de la MMP-12 dans la BPCO et dans l'asthme. L'INF- γ et l'IL-13 joue également un rôle dans l'induction de l'expression de la MMP-12. Toute une

série d'autres facteurs sont impliqués dans l'induction de l'expression de la MMP-12 dont le VEGF, le TNF- α , le CD40, la fumée de tabac,...

Les miRNA représentent une classe abondante de petits ARNs non codant qui régulent négativement l'expression de protéines en dégradant l'ARNm ou en empêchant sa traduction. La synthèse de MMP-12 pourrait être régulée par des miRNA. En effet, miRBase montre plus de 40 miRNA potentiels pour la MMP-12 humaine et 17 pour la séquence murine. A chaque étape de notre modèle murin, de l'inflammation aiguë au remodelage bronchique chronique nous avons pu observer, une augmentation de l'expression de l'ARNm de la MMP-12 corrélée à une diminution des miRNA mmu-miR-672 et mmu-miR-143. Ceci permet de suggérer que ces deux miRNA pourraient agir comme des régulateurs de l'expression de la MMP-12 et de la progression de la pathologie asthmatique. Le miRNA mmu-Mir-29c est, quant à lui diminué, après une exposition de longue durée aux allergènes et pourrait jouer un rôle dans le développement de la fibrose bronchique.

Dans les macrophages, la MMP-12 est stockée dans des vésicules cytoplasmiques et peut être sécrétées sous forme de proenzyme. La sécrétion de la MMP-12 peut être médiée par la plasmine et la thrombine qui sont deux molécules libérées durant les processus inflammatoires. L' α 1-antitrypsine inhibe la plasmine et la thrombine et prévient la libération de la MMP-12 par les macrophages.

Une fois sécrétée, la pro-MMP-12 doit être activée par le clivage du prodomaine permettant de rendre le site actif accessible. Trois mécanismes permettent d'activer la MMP-12 : (1) des composés chimiques (oxydants, agents alcalins,...) peuvent modifier les interactions entre le thiol du prodomaine et l'atome de zinc, (2) des protéases telles que la plasmine peuvent cliver le prodomaine et (3) un clivage du prodomaine par la MMP-12 elle-même (clivage auto-activateur).

L'activité des MMPs peut être régulée par des inhibiteurs physiologiques comme les TIMPs. TIMP-1 inhibe l'activité de la plupart des MMPs et notamment de la MMP-12.

Les inhibiteurs chimiques de la MMP-12

Les inhibiteurs chimiques des MMPs possèdent deux caractéristiques principales : ce sont des ligands chélateurs du zinc et ils se fixent au site de reconnaissance du substrat. Les peptides phosphiniques sont des inhibiteurs spécifiques de la MMP-12. Parmi les inhibiteurs non peptidiques, un membre du groupe des acides hydroxamiques, l'AS111793 a été administré

par voie orale à des souris et a permis de diminuer l'expression de la MMP-12. L'acide carboxylique γ -kéto entraîne également une inhibition sélective des MMP-2, -9 et -12.

Extinction de l'expression des MMPs par les ARN interférences

Les inhibiteurs de MMPs manquent souvent de spécificité. Les ARN interférenciels, incluant les miRNA et les siRNA sont beaucoup plus spécifiques et versatiles que les inhibiteurs chimiques. Les siRNA peuvent être produits naturellement dans les cellules par clivage de longs ARNs doubles brins par un complexe enzymatique spécifique, le DICER. Ils peuvent également être synthétisés chimiquement et délivrés au sein des cellules par transfection. L'utilisation de siRNA pouvant réguler l'expression de protéines présente plusieurs avantages :

- Le design de siRNA ciblant une séquence spécifique est simple et rapide.
- Le siRNA permet d'altérer spécifiquement l'expression de beaucoup de protéines même celles appartenant à une famille de protéines hautement conservées comme les MMPs.
- Les siRNA ne sont pas immunogènes et n'engendrent pas de réponse immunitaire si leur séquence ne contient pas plus de 23 nucléotides.
- Les siRNA pourraient être utilisés comme vaccin ou comme anti-viraux en ciblant l'ARN viral.
- L'avantage principal des siRNA est leur capacité à inhiber des cibles qui ne peuvent pas être inhibées par des drogues synthétisées chimiquement.

Les caractéristiques principales nécessaires au développement de siRNA efficaces sont la spécificité et la stabilité. La sélection des siRNA commence par le design bioinformatique basé sur une combinaison de règles générales. Les siRNA doivent ensuite être validés expérimentalement.

L'effet du siRNA ciblant la MMP-12 qui a été généré dans le cadre du présent travail a été étudié dans les fibroblastes murins transfectés avec des lentivecteurs pour exprimer constitutivement la MMP-12. Le siRNA utilisé dans cette étude est formé de deux nucléotides complémentaires constitués de 19 bases d'ARN et de 2 bases d'ADN. La séquence suivante a été utilisée : 5'-UCACUUACAGGAUCUAUAA-3' et 5'-UUAUAGAUCUGUAAGUGATT-3'. La séquence de ce siRNA n'est homologe à aucune

autre séquence des MMPs et cible donc bien spécifiquement la MMP-12. Notre étude a montré que, *in vitro*, de très faibles concentrations de siRNA ciblant la MMP-12 peuvent produire un effet significatif sur l'expression de la MMP-12. Ce siRNA pouvant être stabilisé et administré dans le poumon, il pourrait être un candidat intéressant pour traiter les maladies pulmonaires telles que l'asthme.

En conclusion, les maladies pulmonaires représentent de bons modèles pour le développement de thérapies par ARN interférence en raison de l'accessibilité potentielle à des traitements topiques. Dans notre étude, nous avons mis au point un SiRNA ciblant la MMP-12 et avons démontré son efficacité *in vitro*.

Publication n°3: Matrix metalloproteinase 12 silencing: A therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling?

Garbacki N, Di Valentin E, Piette J, Cataldo D, **Crahay C**, Colige A.

Pulm Pharmacol Ther. 2009 Aug;22(4):267-78. Epub 2009 Mar 25. Review.

C. Effets de l'inhibition de la MMP-12 dans un modèle murin d'asthme

La MMP-12, également appelée élastase du macrophage est une protéine faisant partie de la famille des métalloprotéases matricielles. Elle est sécrétée sous forme de pro-enzyme de 54kDa qui est clivée en deux formes actives de 45 et 22 kDa. Elle est principalement exprimée par les macrophages alvéolaires mais également par les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les cellules musculaires lisses. Son principal substrat est l'élastine mais elle peut aussi cliver d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que, le collagène de type IV, la fibronectine, la laminine, la vitronectine, des protéoglycans,... Elle peut également cliver d'autres médiateurs qui ne sont pas liés à la matrice extracellulaire comme le TNF- α . Elle joue un rôle important dans les maladies inflammatoires chroniques caractérisées par un remodelage tissulaire intense. De plus, nous avons pu montrer, lors de l'analyse des résultats obtenus par analyse transcriptomique, que l'expression de la MMP-12 est augmentée dans l'asthme.

Dans ce travail, nous avons pour but d'investiguer le rôle de la MMP-12 dans physiopathologie de l'asthme allergique en utilisant nos modèles murins d'asthme appliqués à des souris déficientes pour le gène de la MMP-12 et aux souris de type sauvage correspondantes.

Suite aux résultats obtenus avec les souris déficientes pour le gène de la MMP-12, les effets éventuels d'un siRNA ciblant le gène de la MMP-12 administré par instillation intra-trachéale dans notre modèle murin d'inflammation aigue ont été étudiés.

Voici un résumé des résultats obtenus lors de ce travail :

- A la fin de chaque protocole expérimental, la résistance bronchique mesurée à l'aide du système Flexivent est moins importante chez les souris déficientes pour le gène de la MMP-12 exposées à l'allergène lorsqu'on les compare aux souris de type sauvage correspondantes. Les pourcentages d'éosinophiles présents dans le lavage bronchoalvéolaire des souris déficientes pour le gène de la MMP-12 exposées à

l'allergène sont significativement moins importants que ceux présents chez les souris de type sauvage correspondantes et ce quelque soit le temps d'exposition. Les mêmes différences ont été observées pour le score inflammatoire et pour l'infiltration des éosinophiles au sein des parois bronchiques.

Le pourcentage de cellules caliciformes présentes dans l'épithélium bronchique est significativement moins important chez les souris déficientes pour le gène de la MMP-12 exposées à l'allergène durant 1 et 5 semaines comparativement aux souris de type sauvage correspondantes mais plus aucune différence n'a pu être observée après 10 semaines d'exposition.

Le nombre de mastocyte est significativement moins important chez les souris déficientes pour le gène de la MMP-12 exposées à l'allergène durant 5 et 10 semaines comparativement aux souris sauvages correspondantes. Aucune différence n'a pu être observée après 1 semaine d'exposition. Enfin, l'épaisseur de la couche de muscle lisse est significativement moins importante chez les souris déficientes pour le gène de la MMP-12 exposées à l'ovalbumine durant 5 et 10 semaines comparativement aux souris de type sauvage correspondantes.

Suite à ces résultats, nous avons montré que le MMP-12 était une cible thérapeutique potentielle pour l'asthme. Nous avons également montré que les principales modifications dues au déficit de ce gène survenaient dès la première semaine d'exposition. Nous avons donc décidé de tester les effets de l'instillation d'un siRNA ciblant la MMP-12 dans notre modèle murin d'inflammation aigue.

- Un western blot et une PCR spécifiques de la MMP-12 ont été réalisés afin de s'assurer que le siRNA permettait bien de diminuer l'expression de ce gène. L'instillation de siRNA ciblant la MMP-12 entraine bien une diminution de l'expression de ce gène tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique.
- Le pourcentage d'éosinophiles présents dans le lavage bronchoalvéolaire des souris exposées à l'allergène ayant été instillées avec le siRNA ciblant la MMP-12 est significativement diminué par rapport à celui des souris exposées à l'allergène ayant été instillées avec du PBS ou avec un siRNA scramble. De plus, cette diminution dépend de la dose de siRNA utilisée. Les mêmes observations ont pu être réalisées en

ce qui concerne l'infiltration des éosinophiles au sein des parois bronchiques ainsi que pour le pourcentage de cellules à mucus présentes dans l'épithélium bronchique.

L'instillation du siRNA chez les souris exposées à l'allergène entraîne une diminution du score inflammatoire par rapport aux souris ayant été instillées avec du PBS ou avec le siRNA scramble mais cette diminution semble moins dépendre de la dose de siRNA utilisé.

- Les niveaux d'expression de CCL-11 et de l'IL-13 mesurés par ELISA sont diminués suite au traitement avec le siRNA ciblant l'ARNm de la MMP-12 comparativement aux souris contrôles. De même, les niveaux d'expression du TNF- α et de l'arginase I mesurés par western blot sont diminués après l'instillation du siRNA ciblant la MMP-12.

Au terme de ce travail, nous pouvons donc conclure que le MMP-12 joue un rôle important dans la pathologie asthmatique et que l'administration de siRNA ciblant ce gène permet de diminuer l'inflammation à éosinophiles ainsi que l'hyperplasie des cellules à mucus. Ceci permet de penser que la MMP-12 est une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'asthme.

**Publication n°4: MMP-12 inhibition reduces airway hyperresponsiveness, inflammation
and remodeling in a mouse model of allergic asthma**

Crahay C, Garbacki N, Quesada-Calvo F, Di Valentin E, Gueders M, Hacha J, Paulissen G, Noel A,
Foidart J-M, Piette J, Colige A, Cataldo D.

Abstract

Introduction:

Among the large matrix metalloproteinases family, MMP-12 plays a significant role in various chronic inflammatory disorders characterized by an intense tissue remodeling. MMP-12 has been reported to be increased in the airways of asthmatics. We investigated the role of MMP-12 in allergic asthma by using a murine model of allergen-induced airway inflammation and airway remodeling in MMP-12^{-/-} mice and their corresponding wild type (MMP-12^{+/+}) and we investigated in our model the effects of instillations of siRNA targeting MMP-12.

Methods: mice were sensitized and exposed to ovalbumine (OVA) for 1, 5 and 10 weeks. Inflammation and airway remodeling were studied by histology and immunohistochemistry. In additional experiments, SiRNAs raised against MMP-12 mRNA were intra-tracheally instilled in mice exposed for one week to allergens.

Results: MMP-12^{-/-} mice were protected against significant airway hyperresponsiveness to methacholine after allergen exposure. When challenged with OVA, MMP-12^{-/-} mice showed a lower peribronchial inflammation with lower levels of BALF eosinophils and decreased eosinophilic infiltration in the airway walls as compared to MMP-12^{+/+} mice at 1, 5 and 10 weeks. Allergen-exposed MMP-12^{-/-} mice displayed lower mast cell counts in the airway walls. Goblet cell percentage was significantly lower in airway epithelium of MMP-12^{-/-} mice exposed to OVA for 1 and 5 weeks as compared to corresponding MMP-12^{+/+} groups.

After anti-MMP-12 siRNA instillation, mice showed a dose-dependent decreased eosinophils numbers in BALF and less eosinophilic infiltration and goblet cells hyperplasia. Levels of CCL-11, IL-13, TNF- α and arginase I were decreased in mice treated by siRNA targeting MMP-12 instillations as compared to control mice.

Conclusions: MMP-12 plays a key role in eosinophils and mast cells infiltration during allergen-induced inflammation and is also crucial for the airway remodeling process. We also demonstrate that siRNA targeting MMP-12 can dose-dependently reduce eosinophilic inflammation and goblet cells hyperplasia. MMP-12 therefore appears as a suitable target for asthma and anti-MMP-12 SiRNA as a potentially interesting tool to decrease MMP-12 expression in the airways.

Introduction

Asthma is a clinical syndrome mainly defined by a set of symptoms including wheezing, chest tightness and cough. These symptoms are usually associated with variable airflow obstruction that is at least partly reversible spontaneously or after adequate treatments by corticosteroids or β 2 agonists¹. On a pathophysiological point of view, asthma is characterized by airway inflammation, hyper responsiveness and remodeling. Airway remodeling is defined as structural changes of airway walls and is characterized by goblet cells hyperplasia, subepithelial fibrosis, smooth muscle hypertrophy, deposition of matrix components and angiogenesis.

Eosinophils are the main inflammatory cells in the pathophysiology of the disease². These cells are implicated in both inflammation and remodeling by the release of cytokines and fibrogenic factors and are correlated to bronchial hyperresponsiveness and disease severity³. The activation of a network of cytokines/chemokines including the production of various soluble mediators leads to eosinophilic infiltration and airway hyperresponsiveness. Among those mediators, Il-13, which is produced by CD4⁺ T helper type 2 lymphocytes (Th2

cells), induces the bronchi to become hyperreactive and promotes IgE production and airway eosinophilia⁴. There is an important source of TGF- β 1 as well as other cytokines that can lead to the direct activation of epithelium and mesenchymal cells that are considered to drive airway remodeling⁵.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a large family of Zinc containing structure with well conserved functional domains. MMPs are able to degrade extracellular matrix components but also cleave non matrix-proteins⁶. These proteins are expressed in a variety of normal and pathological processes such as development, involution, repair, inflammation and tumor growth⁷. Their activity is controlled among others by the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)⁸. Most MMPs are secreted from the cells as inactive precursors requiring the cleavage of an amino-terminal peptide⁹.

MMP-12 also referred to as macrophage metalloelastase is a 54-kDa inactive pro-enzyme that is processed into a 45 kDa and 22 kDa active forms. MMP-12 mRNA and protein are predominantly detected in alveolar macrophages¹⁰ but also in bronchial epithelial cells¹¹ and in airway smooth muscle cells¹². The major substrate

for MMP-12 is elastin which represents 2.5% of the dry weight of the lung¹³. In addition to the early described elastolytic activity, MMP-12 is able to degrade other extracellular matrix components including type IV collagen, fibronectin, laminin, vitronectin, proteoglycans, chondroitin sulfate and myelin basic protein. MMP-12 has also the ability to activate other MMPs like pro-MMP-2 and pro-MMP-3 which can activate pro-MMP-9 and pro-MMP-1. This cascade of proteolytic events can explain why MMP-12 exaggerates the cascade of proteolytic processes and leads to the degradation of a wide variety of extracellular matrix proteins¹⁴. Abnormal regulation of MMP-12 expression is associated with inflammatory skin diseases¹⁵, atherosclerosis¹⁴, aneurysms¹⁶, cancer¹⁷ and emphysema¹⁸.

MMP-12 is overexpressed after acute allergen exposure and this overexpression persists over time¹⁹. It has been demonstrated that in vitro, very low concentration of siRNA targeting MMP-12 can produce significant effects on MMP-12 gene expression²⁰.

In the present study, the key role played by MMP-12 in the processes leading to airway inflammation and remodeling after allergen exposure is demonstrated in an experimental mouse model of asthma. Moreover, we demonstrate that the administration of siRNA targeting MMP-

12 lead to a decrease of asthma features. Our data might have implications in therapeutics since MMP-12 appears as a suitable target in asthma.

Material and Methods

Sensitization and allergen exposure protocol

Wild-type (MMP-12^{+/+}) and MMP-12 knockout (MMP-12^{-/-}) mice were generated in a C57BL/6 genetic background. Males of 6 to 8 weeks old were used following “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the national Society for Medical Research (USA) and the experimental protocols were approved by the local animal ethical committee (University of Liege) under the no. 03/158. Two different protocols were used. For the short term exposure protocol mice were sensitized by two intraperitoneal injections of 10 µg of alum (AlumInject; Perbio, Erembodegem, Belgium) precipitated egg chicken ovalbumine (OVA) (OVA grade III; Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) 21 days and 14 days before inhalational exposure. From day 21 to day 27 mice were exposed daily for 30 minutes either to phosphate buffer saline (PBS) or allergen (OVA 1%). These solutions were administered by exposure to an aerosol generated by an ultrasonic nebulizer (Devilbiss 2000, De Vilbiss Healthcare, Somerset, PA). After

determination of airway reactivity, mouse sacrifice was performed on day 28 as previously reported²¹. Three different experiments have been made, and measurements have been performed on cohorts of 12 mice per experimental conditions. An intermediate-term and a long-term exposure protocols were designed and adapted from the short term exposure protocol. Mice were sensitized by intraperitoneal injections on days 1 and 11 and groups of mice were exposed to PBS or OVA aerosols 5 days per weeks (odd weeks) from days 22 to 90. The protocols are illustrated in Fig 1.

Intra-tracheal instillation of siRNA targeting MMP-12

Balb/C males of 6 to 8 weeks old were used following “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the national Society for Medical Research (USA) and the experimental protocols were approved by the local animal ethical committee (University of Liege) under the no. 03/158. Mice were sensitized by two intraperitoneal injections like describe above for the short term exposure protocol. From day 20 to day 27, an intra-tracheal instillation of siRNA targeting MMP-12 was performed every odd day. Three doses were use for the siRNA (50nM, 100 nM et 500nM). A siRNA scramble at 100nM was use as control. 4 hours after the instillation, mice were exposed for 30 minutes either to

phosphate buffer saline (PBS) or allergen (OVA 1%) as the same manner as describe above.

Bronchial airway responsiveness measurements

Bronchial airway responsiveness was measured by assessing mean airway resistance by using the FlexiVent System. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection (200µl) of a mixture of xylazine (1 mg/ml; VMD, Arendonk, Belgium) and ketamine (10mg/ml; Merial, Brussels, Belgium). A tracheotomy was performed by inserting a 20-gauge polyethylene catheter into the trachea. A ligature was performed around the catheter to avoid leaks and disconnections. Mice were ventilated with FlexiVent small-animal ventilator (SQIREC, Montréal, Canada) at a frequency of 250 breaths per minute and a tidal volume of 10ml/kg. A positive end-expiratory pressure was set at 2 hPa. Measurement started after 2 minutes of mechanical ventilation. A sinusoidal 1 Hz oscillation was then applied to the tracheal tube and allowed a calculation of dynamic resistance, elastance and compliance of the airway by multiple linear regressions. A second manoeuvre consisting in an 8-s forced oscillatory signal ranging frequencies between 0.5 to 19.6 Hz allowed measurement of impedance to evaluate tissue damping and tissue

elastance²². Following baseline lung functions measurements, mice were exposed to a saline aerosol (PBS) followed by aerosols of methacholine (ICN, Biomedicals, Asse Relegem, Belgium) in increasing doses (3, 6, 9 and 12 g/l). Aerosols were generated by ultrasonic nebulizer (SYST'AM, LS 2000, Dupont Medical, Rhode-Saint-Genèse, Belgium) and delivered to the inspiratory line of the FlexiVent using a bias flow of medical air following the manufacturer's instruction. Each aerosol was delivered for 10 seconds and periods of measurements were made at 1-minute intervals following each aerosol. The mean airway resistance after methacholine exposure was the main parameter measured during the challenge.

Bronchoalveolar lavage fluid

After measurement of airway resistance, bronchoalveolar lavage was carried out by four instillations of 1 ml of PBS/EDTA 20 nM (Calbiochem, Darmstadt, Germany). The bronchoalveolar lavage fluid was centrifuged (1200 rpm for 10 minutes) and the cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS/EDTA. Total cells were counted by the coulter counter. Differential cell counts were performed on cytopspin after staining with Diffquick.

Pulmonary histology

The thorax was opened and the left bronchus was clamped and excised for protein extraction. Insufflation of the right

lung was performed using a tracheal instillation of 4% paraformaldehyde. Lung is then fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C overnight. After different processing, lungs were embedded in paraffin. Transverse 5 µm sections were cut for histochemical staining and immunohistochemistry. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. The extent of peribronchial inflammation was quantified as a score related to the thickness of inflammatory cells around the bronchi as previously described²¹. Congo red staining was used to detect eosinophils. Eosinophilic infiltration in airway walls was quantified by manual count and reported to the perimeter of epithelial basement membrane yielding an eosinophilic count expressed as number of cells per mm of epithelial basement membrane.

Mast cells were detected in lung tissue using toluidine blue staining and the number of mast cells was counted in paraffin sections.

Glandular hyperplasia was quantified as percentage of Alcian Blue-stained goblet cells per total epithelial cells in randomly selected bronchi.

Masson's trichrome staining was used to detect peribronchial collagen deposition. A score from 0 to 3 was applied to each observed bronchi: 0, no collagen around the bronchi; 1, a thin layer of collagen; 2, a

cluster of collagen; 3, a thick layer of collagen.

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) was detected by immunohistochemistry with mouse primary antibody anti- α -SMA-FITC (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany) allowing the detection of the smooth-muscle-cell layer as previously described²³.

Semiquantitative RT-PCR

Expression level of MMP-12 was measured by semiquantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from lungs by RNA Tissue Kit as recommended by the manufacturer (Roche). RT-PCR was performed on 10 ng of total RNA using the GeneAmp thermostable RNA RT-PCR Kit (Applied Biosystems, USA). Primers were designed as followed (Forward sequence: CTGGAGGTATGATGTGAGGCAG and Reverse sequence: CTGGGAAGTGTGTGGAAATCAG).

Samples were separated by acrylamide gel electrophoresis and were stained with Gel Star (Cambrex, Belgium). Intensity of each band was measured using Quantity One software (Bio-Rad laboratories, USA). In order to normalize mRNA levels in different samples, value of the band corresponding to each mRNA level was divided by intensity of the corresponding 28S RNA value.

Western Blot Analysis

Western Blot were performed on total lung proteins. Samples were migrated on a 12%

polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose PVDF membranes (Perkin Elmer Life Sciences, CA, USA) which was incubated for one hour at room temperature with PBS containing 10% skim milk. Primary antibodies (Anti-MMP-12 antibody diluted 1/500 (SA-107, Biomol) Anti-TNF- α antibody (9739, Abcam) diluted 1/2000, anti-Arginase I antibody (610708, Abcam) diluted 1/1000) were applied on membranes overnight at 4°C. Proteins were detected by chemiluminescence after incubation with the secondary antibody diluted 1/1000 (Goat anti-rabbit; Dako, Denmark for MMP-12 and TNA- α and Goat anti-mouse; Dako, Denmark for Arginase I).

Measurements of cytokines by Elisa

IL-13 and CCL-11 (eotaxin-1) levels were assessed using commercial ELISAs following manufacturer's instructions (R&D systems, Abingdon, UK). Elisa assay detection limits were 7.8 pg/ml (IL-13) and 15.6 pg/ml (CCL-11) respectively.

Statistical analysis

Results were expressed as mean +/- SEM and comparison between groups was performed using a Mann-Whitney U test. Mann-Whitney U test was performed using GraphPad InStat (GraphPad; <http://www.graphpad.com>). Values of $p < 0.05$ were considered as significant.

Results

Airway hyperresponsiveness after allergen challenge

Airway resistances were measured in mechanically-ventilated mice by using the FlexiVent system. After short or long duration allergen-exposure, MMP-12 knock-out mice (MMP-12^{-/-}) failed to increase the airway resistances as compared to wild type mice (MMP-12^{+/+}) (figure 1).

Total and differential cell counts in BALF

After allergen exposure, numbers of eosinophils did fail to increase in MMP-12^{-/-} OVA-exposed mice when compared to MMP-12^{+/+} group. Similar results were obtained for each experimental protocol with varied allergen-exposure duration (figure 2).

Assessment of airway inflammation

OVA-exposed MMP-12^{-/-} mice were protected against allergen-induced airway inflammation. Similar results were obtained in every experimental protocol (1, 5, 10 weeks allergen exposure) (figure 2). Eosinophilic infiltration of the bronchial walls was specifically assessed by using Congo red staining. Number of eosinophils detected in the airways walls were lower in MMP-12^{-/-} mice as compared to MMP-12^{+/+} (figure 2).

Mast cells infiltration in the airways walls was studied in lung sections stained with

toluidine blue. The number of mast cells was significantly increased after 5 and 10 weeks of allergen exposure in MMP-12^{+/+} mice when compared to PBS counterparts but not after 1 week of exposure. Interestingly, after 5 and 10 weeks allergen exposures, the number of mast cells was significantly higher in MMP-12^{+/+} mice exposed to the allergen as compared with MMP-12^{-/-} mice exposed to OVA (figure 2).

Assessment of airway remodeling

Goblet cells hyperplasia was studied with Alcian blue staining. Goblet cells percentages in bronchial epithelium was significantly increased in MMP-12^{+/+} and MMP-12^{-/-}-allergen exposed mice when compared to corresponding control groups (figure 3). Moreover, MMP-12^{+/+} OVA-exposed mice showed a percentage of goblet cells significantly higher while MMP-12^{-/-} OVA-exposed mice displayed a protection against mucous metaplasia after 1 and 5 weeks of exposure but not after 10 weeks of exposure (figure 3).

Collagen deposition was evaluated by Masson's trichrome staining and did not show any significant difference between study groups (data not shown).

Smooth muscle cell hyperplasia was assessed by immunohistochemistry by measuring the thickness of α -smooth muscle actin positive layer around the bronchi. MMP-12^{-/-} mice failed to show

increased smooth muscle actin positive areas in the bronchial walls while, in the meantime, MMP-12^{+/+} mice did undergo a significant increase of smooth muscle mass (figure 3).

Effects of siRNA targeting MMP-12

Instillations of siRNA targeting MMP-12 induced a significant and dose-dependent decrease in BALF eosinophils number in allergen exposed mice when compared controls (PBS instillation and SiRNA scramble) (figure 4). No differences were observed for the other cell types.

Instillations of siRNA targeting MMP-12 at 50 and 100 nM concentrations induced a decrease in histological-assessed peribronchial inflammation after exposure to the allergen when compared to controls (PBS instillation and SiRNA scramble) (figure 4).

Eosinophils infiltration in the bronchial walls as measured by Congo Red staining was significantly decreased upon treatment with the SiRNA targeting MMP-12 (figure 4).

Goblet cells hyperplasia was studied with Alcian Blue staining. Percentages of goblet cells in the bronchial epithelium were significantly decreased in mice treated by siRNA targeting MMP-12 instillations as compared to controls (figure 4).

Very interestingly, overall those results did show a dose-dependent effect of SiRNA targeting MMP-12 regarding BALF

inflammation, histological inflammation and goblet cells hyperplasia (figure 4).

In the groups treated by SiRNA instillation, levels of MMP-12 mRNA were measured by semi-quantitative RT-PCR and western blot. MMP-12 mRNA expression was decreased after instillations of siRNA targeting MMP-12 as compared to controls (figure 5).

To elucidate possible mechanisms underlying these results, levels of IL-13 and CCL-11 were quantified on total lung protein extracts by ELISA. Levels of IL-13 and CCL-11 were decreased in mice treated by siRNA targeting MMP-12 instillations as compared to control mice (figure 6).

Moreover, the western blot study showed that levels of expression of TNF- α and Arginase I were decreased after instillations of siRNA targeting MMP-12 (figure 7).

Discussion

MMP-12 is known to be overexpressed in asthma but the exact function of this protein in the pathology remains unclear. In order to assess the role of this protease in asthma pathology, we have applied our mouse models of acute inflammation and chronic airway remodeling on MMP-12 deficient mice. We have shown a decreased peribronchial inflammation and

decreased eosinophils numbers in the BALF of MMP-12^{-/-} mice exposed to allergens. Such an inhibition of acute inflammation in MMP-12^{-/-} animals has been previously described by Warner et al²⁴ and Pouladi et al²⁵. In the present study, we have also demonstrated a decreased infiltration of eosinophils and mast cells in the airway walls. Moreover, MMP-12^{-/-} mice display a lower bronchial responsiveness to methacholine when compared to wild type mice. Our data also suggest for the first time that MMP-12 might play a key role in airway remodeling processes since goblet cells numbers and smooth muscle mass are also reduced in MMP-12^{-/-} mice.

In order to demonstrate that MMP-12 could be a suitable therapeutic target allowing to treat acute inflammation but also to avoid the development of allergen-induced airway remodeling, we have tested *in vivo* the effects of siRNA targeting MMP-12 mRNA. This study has shown that a specific siRNA instilled intratracheally could efficiently reduce MMP-12 expression in lung of mice. The instillation of siRNA targeting MMP-12 lead to a decrease of eosinophils numbers in the BALF and in the airway walls as well as a decrease of goblet cells in the bronchial epithelium.

MMP-12 is a protease being able to cleave and to activate a large amount of substrate

including pro-TNF- α ²⁶. Indeed, TNF- α is a potent proinflammatory protein able to upregulate the expression of many mediators including Arginase I²⁷. IL-13 is also implicated in the regulation of Arginase I expression²⁸. In the present study, we have shown that the instillation of siRNA targeting MMP-12 leads to a decreased expression of TNF- α , IL-13, and Arginase I. Arginase I is constitutively expressed by bronchial epithelial cells, endothelial cells, myofibroblasts and alveolar macrophages. The Arginase I expression is upregulated in lung parenchyma of asthmatic mice^{29,30,31}. One of the main functions of this molecule is the regulation of the synthesis of nitric oxide (NO) production by the mean of a competition with NO synthase (NOS) for their common substrate, L-arginin. Thus, the overexpression of arginase I in asthma could lead to a decreased production of NO which is a potent bronchodilator. The loss of this intrinsic bronchodilator could participate to bronchial hyperreactivity. This could be a hypothesis to explain the decreased bronchial resistances observed in our study in MMP-12^{-/-} mice exposed to allergens for short, intermediate and long periods. Moreover, we have also shown a decrease in the goblet cells numbers and a decrease in the thickness of smooth muscle in MMP-12^{-/-} mice and in mice treated with the siRNA and exposed to allergens.

These effects of MMP-12 deletion on mucous secretion could be explained by the fact that L-arginine degradation by Arginase I leads to L-ornithine formation. L-ornithine is a polyamine and proline precursor. These two molecules have been reported to induce an increase in cell proliferation, an increased smooth muscle contraction and an increased mucous secretion³².

Neilsen and coworkers showed that IL-13 induce CCL-11 production and eosinophilic migration³³. This suggests that decreased eosinophils numbers observed in MMP-12^{-/-} mice and in mice treated with de siRNA targeting MMP-12 mRNA could be explained by a decrease of IL-13 expression leading to a decrease of CCL-11 expression which is a potent chemotactic agent for eosinophils.

Decreased expression of IL-13 observed after the instillation of siRNA targeting MMP-12 mRNA could also play an important role in the decrease of goblet cells hyperplasia, smooth muscle hypertrophy and bronchial resistance observed in our study. This cytokine is indeed known to induce bronchial hyperreactivity in animal models but also to cause different structural changes including goblet cells hyperplasia and smooth muscle hypertrophy³⁴.

In conclusion, we have showed that the silencing of MMP-12 lead to an

amelioration of asthmatic phenotype including acute and chronic features of the disease.

Bibliographie

1. Bousquet, J., et al., *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1720-45.
2. Tanaka, H., et al., *Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 62-8.
3. Louis, R., et al., *The relationship between airways inflammation and asthma severity*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(1): p. 9-16.
4. Wills-Karp, M. and M. Chiaramonte, *Interleukin-13 in asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2003. **9**(1): p. 21-7.
5. Kariyawasam, H.H. and D.S. Robinson, *The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 681-6.
6. Chiba, Y., et al., *Increase in the expression of matrix metalloproteinase-12 in the airways*

- of rats with allergic bronchial asthma*. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(2): p. 318-23.
7. Kassim, S.Y., et al., *Individual matrix metalloproteinases control distinct transcriptional responses in airway epithelial cells infected with Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5640-50.
 8. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
 9. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 207-14.
 10. Shapiro, S.D., D.K. Kobayashi, and T.J. Ley, *Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23824-9.
 11. Lavigne, M.C., et al., *Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 534-46.
 12. Xie, S., et al., *Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells*. Respir Res, 2005. **6**: p. 148.
 13. Nenan, S., et al., *Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator?* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 167-72.
 14. Matsumoto, S., et al., *Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development*. Am J Pathol, 1998. **153**(1): p. 109-19.
 15. Suomela, S., et al., *Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions*. Exp Dermatol, 2001. **10**(3): p. 175-83.
 16. Curci, J.A., et al., *Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms*. J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1900-10.
 17. Kerkela, E., et al., *Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in*

- chondrocytes during fetal development and malignant transformation.* Bone, 2001. **29**(5): p. 487-93.
18. Churg, A., et al., *Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs.* Thorax, 2007. **62**(8): p. 706-13.
 19. Di Valentin, E., et al., *New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **296**(2): p. L185-97.
 20. Garbacki, N., et al., *Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling?* Pulm Pharmacol Ther, 2009. **22**(4): p. 267-78.
 21. Cataldo, D., et al., *Matrix Metalloproteinase 9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen induced airway inflammation,* Am. J Pathol, 2002. **161**: p. 491-498.
 22. Hantos et al., *Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lung,* J Appl Physiol, 1992. **72**(1): p. 168-178.
 23. Gueders, M., et al., *A novel formulation of inhaled doxycycline reduces allergen induced inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of asthma,* Biochem Pharmacol, 2008. **75**: p. 514-526.
 24. Warner, R.L., et al., *Role of metalloelastase in a model of allergic lung responses induced by cockroach allergen.* Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 1921-30.
 25. Pouladi, M.A., et al., *Interleukin-13-dependent expression of matrix metalloproteinase-12 is required for the development of airway eosinophilia in mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(1): p. 84-90.
 26. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
 27. Gao, X., et al., *TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion*

- injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(6): p. 1269-75.
28. Kenyon, N.J., et al., *Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: sources and consequences*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **230**(3): p. 269-75.
29. Zimmermann, N., et al., *Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(12): p. 1863-74.
30. Fajardo, I., et al., *Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(5): p. 477-84.
31. Yang, M., et al., *Inhibition of arginase I activity by RNA interference attenuates IL-13-induced airways hyperresponsiveness*. *J Immunol*, 2006. **177**(8): p. 5595-603.
32. Maarsingh, H., T. Pera, and H. Meurs, *Arginase and pulmonary diseases*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008. **378**(2): p. 171-84.
33. Neilsen, C.V. and P.J. Bryce, *Interleukin-13 directly promotes oesophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils*. *Clin Exp Allergy*, 2010. **40**(3): p. 427-34.
34. Barnes, P.J., *The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(11): p. 3546-56.

Figure 1

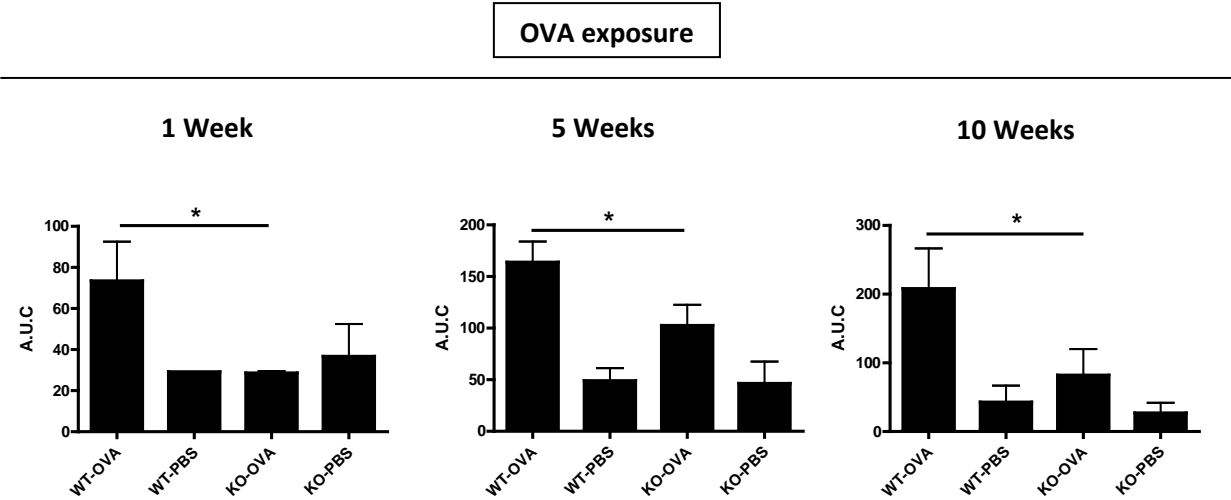


Figure 1: Bronchial resistance analysis by using the flexivent system. Results are expressed in Area Under the Curve of de resistance (A.U.C.). After short or long duration allergen-exposure, MMP-12^{-/-} failed to increase the airway resistances as compared to MMP-12^{+/+}. Results are expressed as mean +/- SE, and comparison between groups was performed using a Mann-Whitney U test. *P<0.05 (n=8).

Figure 2

OVA exposure

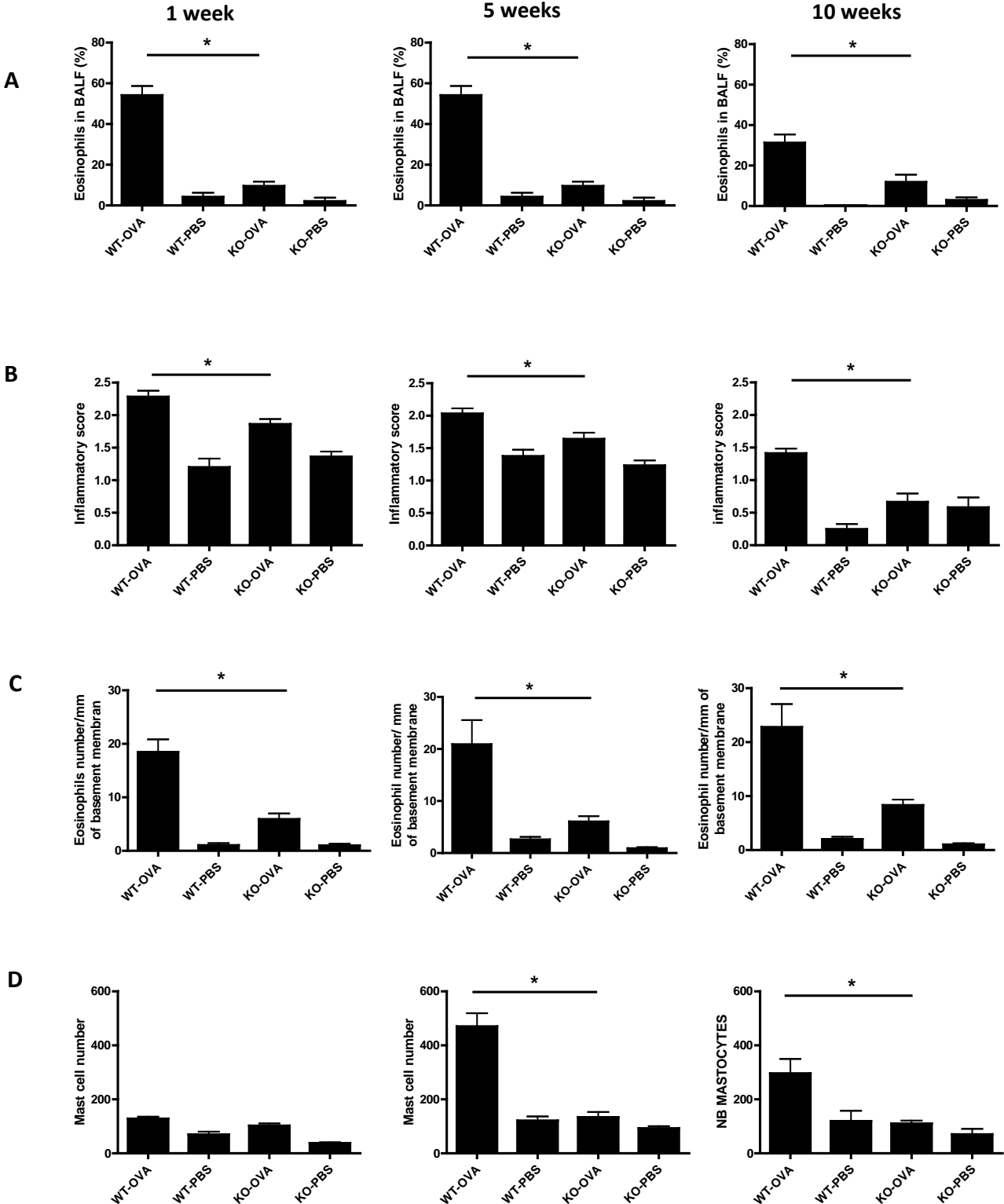


Figure 2: Inflammation features A: Numbers of eosinophils in the BALF. B: Quantification of peribronchial inflammation. Airway inflammation quantified from hematoxylin and eosin-stained slides is expressed as a bronchial inflammation score as previously described. C: Quantification of eosinophilic inflammation. The number of eosinophils was determined using a digitalized picture and was reported to the perimeter of the

bronchus. Mean scores were measured as described above. **D:** Counts of mast cells. Mast cells were counted from Toluidine blue-stained slide. Results are expressed as mean +/- SE, and comparison between groups was performed using a Mann-Whitney U test. *P<.0.05 (n=8).

Figure 3

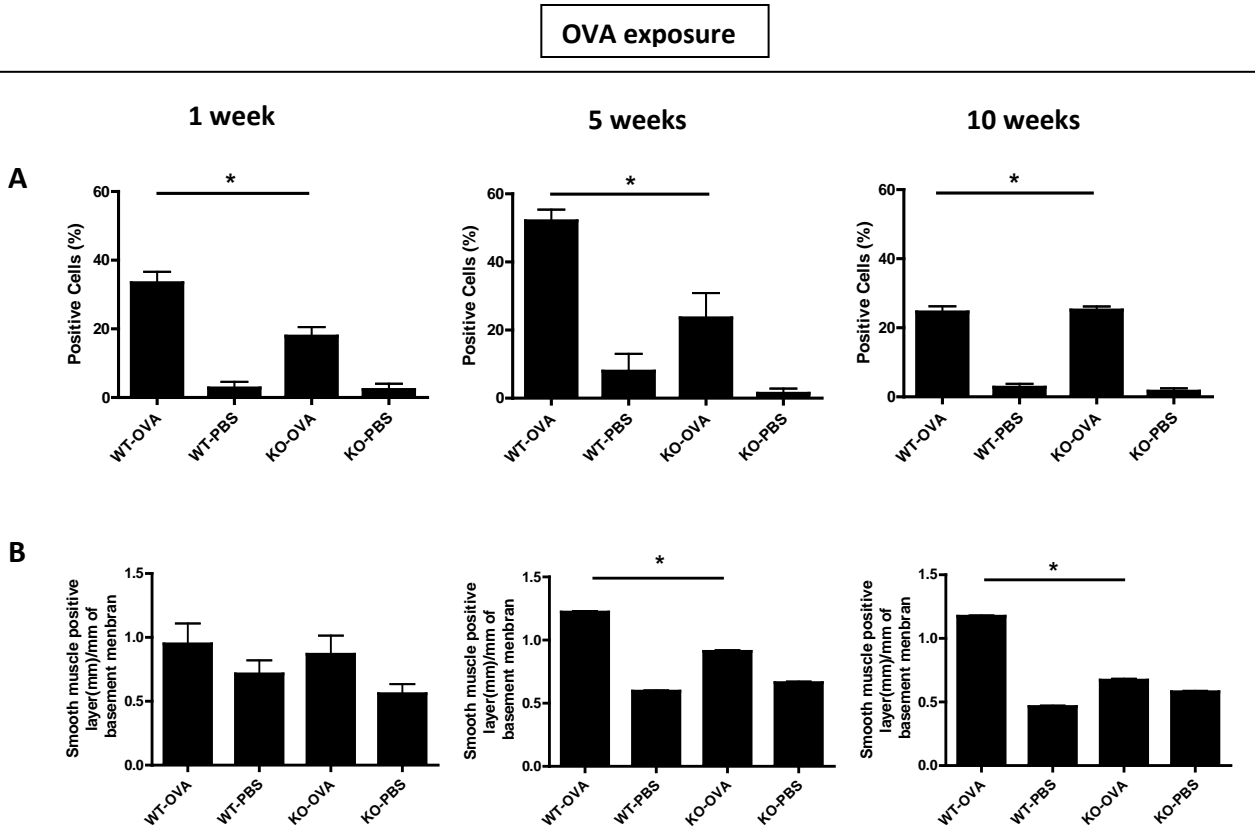


Figure 3: Airway remodelling features A: Goblet cells hyperplasia. Percentages of goblet cells were obtained from Alcian Blue-stained slide and are expressed in percentage of positive Alcian blue cells. **B:** α -smooth muscle actin quantification by immunohistochemistry. Results are expressed as mean +/- SE, and comparison between groups was performed using a Mann-Withney U test. * $P < 0.05$ (n=8).

Figure 4

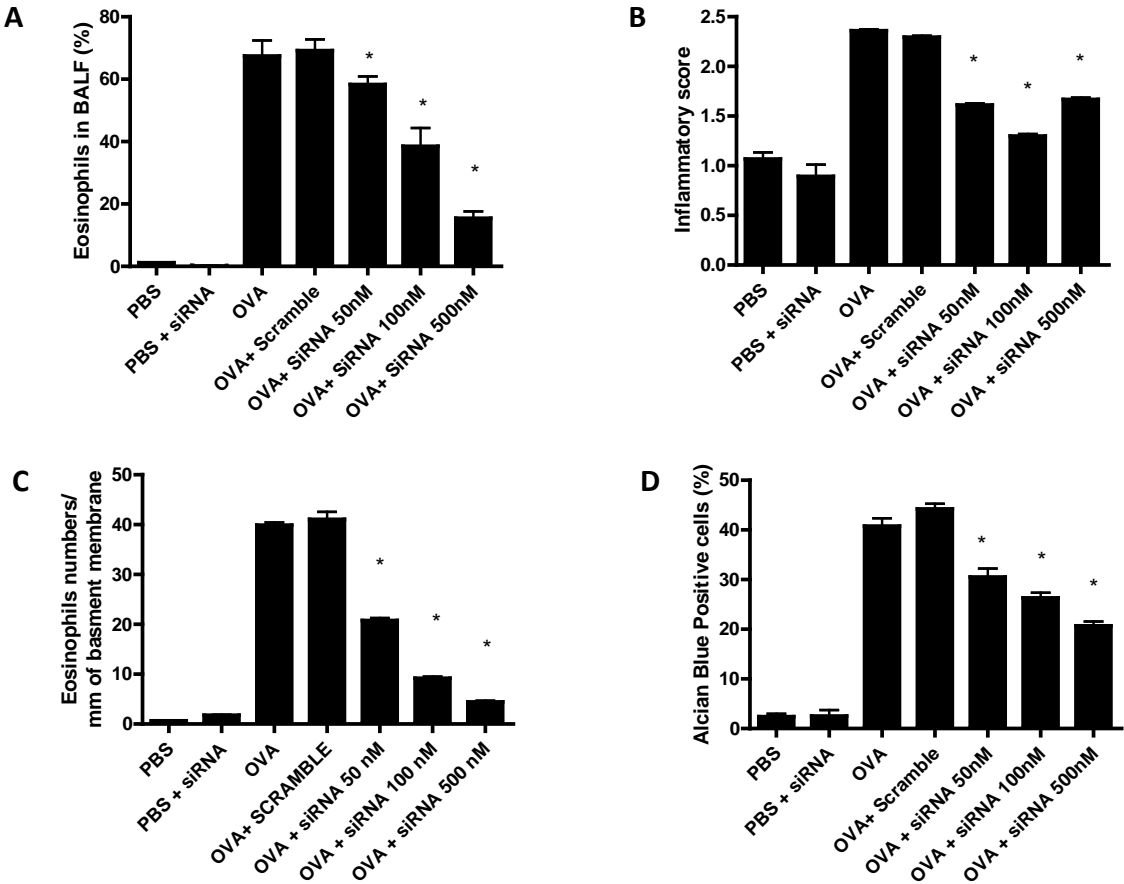


Figure 4: Effects of siRNA targeting MMP-12. A: Numbers of eosinophils in BALF. B: Quantification of peribronchial inflammation. Airway inflammation quantified from hematoxylin and eosin-stained slides is expressed as a bronchial inflammation score as previously described. C: Eosinophilic inflammation score. Numbers of eosinophils were determined as described above. D: Goblet cells hyperplasia. Percentages of goblet cells were obtained from Alcian Blue-stained slide and are expressed in percentage of positive Alcian blue cells. Results are expressed as mean +/- SE, and comparison between groups was performed using a Mann-Whitney U test. *P<0.05 compared to OVA and OVA + Scramble (n=8).

Figure 5

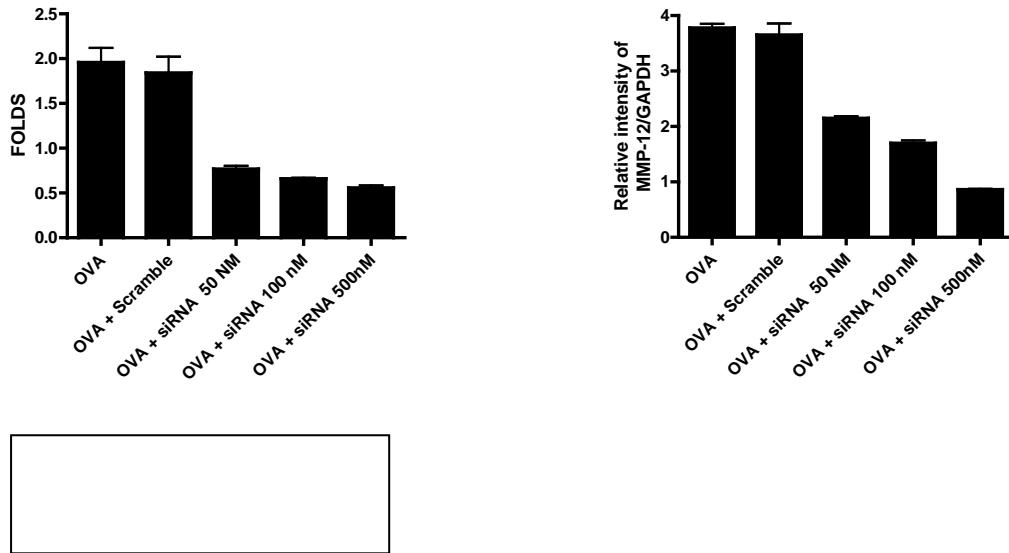


Figure 5: Levels of MMP-12 mRNA were measured by RT-PCR and Western Blot (WB). MMP-12 mRNA expression was decreased after instillations of siRNA targeting MMP-12.

Figure 6

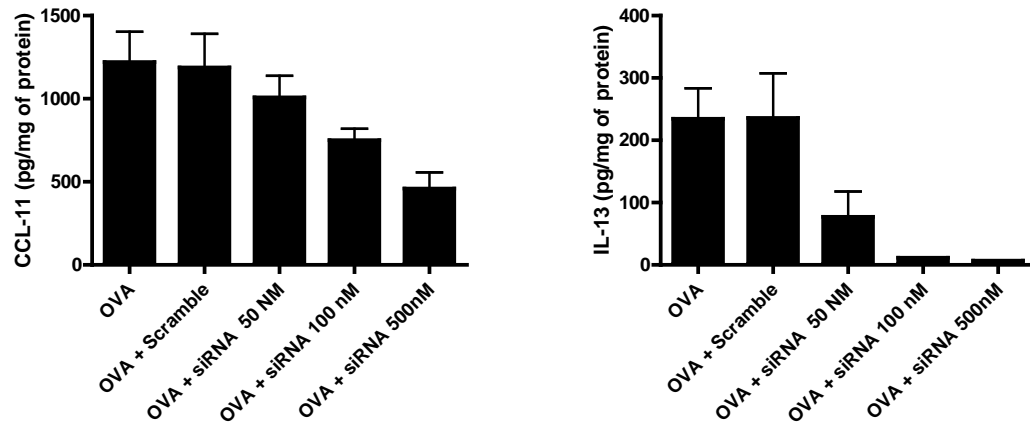
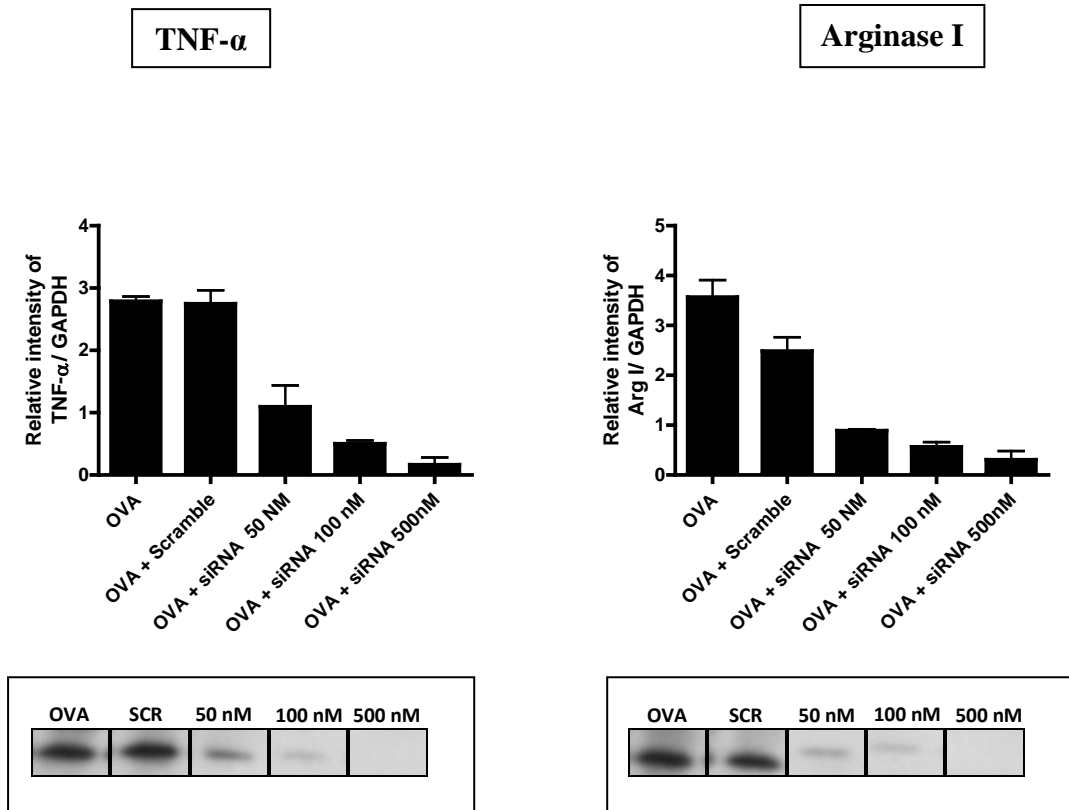


Figure 6: Measurements of levels of CCL-11 and IL-13 in lung protein extracts by ELISA. Levels of CCL-11 and IL-13 were decreased in mice treated by siRNA targeting MMP-12 instillations as compared to control mice.

Figure 7



IV. Discussion générale et conclusion

IV. Discussion générale et conclusion

Au cours de ces dernières décennies, la prévalence de l'asthme ainsi que la sévérité de cette maladie ont nettement augmenté. C'est pourquoi, le développement de nouveaux agents thérapeutiques visant à contrôler les différents aspects de la pathologie et notamment le remodelage bronchique, semble nécessaire. Dans ce contexte, l'identification des gènes régulés durant toute la durée de l'exposition à un allergène nous est apparue comme une étape cruciale.

Dans notre première étude, une analyse transcriptomique a été réalisée afin d'identifier quels sont les gènes dont l'expression est régulée différemment chez les souris exposées à l'allergène par rapport à des souris contrôles exposées au PBS. Parmi les gènes qui sont surexprimés et sous-exprimés après chaque temps d'exposition à l'allergène, 20 ont déjà été décrits pour être associés à l'asthme d'une manière ou d'une autre. Cette cohérence avec les données de la littérature moderne nous a permis de valider l'ensemble de notre approche expérimentale. Plus spécifiquement, l'Arginase-1 (Arg 1) [24, 27], la MMP-12 [87] et la Rnase3 (Ear11) [111] ont été démontrés être surexprimés dans des modèles d'inflammation aiguë. Nos données expérimentales confirment une forte induction de l'expression des ARN messagers de ces différents gènes à court terme et démontrent également que cette surexpression se maintient dans le temps lorsque la stimulation allergénique persiste.

Notre travail a également permis d'identifier 36 autres gènes stimulés au cours du développement de la maladie pour lesquels il s'agit de la première description d'une relation possible avec la pathologie asthmatique (publication n°3). Parmi ces différents gènes, 14 sont surexprimés après chaque durée d'exposition à l'allergène (courte, moyenne ou longue) incluant notamment, le Cd209e, l'Agr2, la Scindérine, et la pendrine, alors que la paraoxonase-1 est sous-exprimée. Ci-après, nous détaillons les données précisément obtenues concernant plusieurs de ces gènes qui ont notamment été également étudiés par immunohistochimie.

Le Cd209e, également appelé DC-Signr4, identifié en immunohistochimie dans les cellules du système immunitaire, montre 70% d'homologie avec le DC-Sign humain exprimé par les cellules dendritiques [112-114]. Cette molécule semble jouer un rôle important dans

l'interaction des cellules dendritiques avec les lymphocytes T et pourrait participer à l'activation exagérée des lymphocytes T dans l'asthme.

Le gène *Agr2* apparaît comme étant un gène potentiellement intéressant car il code pour une protéine exprimée par les cellules sécrétrices de mucus ainsi que par les glandes endocrines [115]. Grâce aux techniques de RT-PCR et d'immunohistochimie, nous avons pu démontrer que l'*Agr2* est continuellement surexprimée dans nos modèles murins d'asthme et que cette protéine est principalement localisée dans les cellules caliciformes. Plusieurs études ont montré que *Agr2* est également fortement exprimée dans les adénocarcinomes de l'œsophage, du pancréas, du sein et de la prostate [116-119] et que cette protéine joue un rôle dans la croissance tumorale, la migration et la transformation cellulaire [118]. Il a aussi été suggéré que l'*Agr2* pourrait être impliquée dans les maladies inflammatoires de l'intestin et dans la fonction de la barrière épithéliale [120]. La transcription de l'*Agr2* peut être induite par des facteurs de transcription typiques des cellules caliciformes tels que *Foxa1* et *Foxa2* [120-121]. Cependant, aucun de ces deux gènes n'est surexprimé dans notre microarray ce qui suggère une autre voie d'activation pour l'*Agr2* dans l'asthme.

Nous avons également identifié deux autres gènes qui sont surexprimés après chaque temps d'exposition à l'allergène et qui sont impliqués dans les processus de sécrétion muqueuse. Ce sont les gènes de la scindérine et de la pendrine (*Slc26a4*).

La scindérine est une protéine activée par le calcium qui est capable de réarranger le pôle apical des filaments d'actine présents dans les cellules caliciformes des voies aériennes [122-123]. La conséquence immédiate de cette réorganisation des filaments d'actine est de permettre aux granules sécrétoires d'atteindre la portion apicale des cellules caliciformes. La scindérine pourrait aussi jouer d'autres rôles dans la pathogénie de l'asthme dans la mesure où elle est impliquée dans la différenciation cellulaire par induction du réarrangement du cytosquelette et qu'elle voit son expression positivement régulée par les voies de PKC et MEK [124].

La pendrine (*slc26a4*) est un transporteur d'anions présent à la surface apicale des cellules épithéliales. Cette molécule permet aux cellules épithéliales des voies aériennes de sécréter des thiocyanates qui sont des molécules impliquées dans les défenses innées des muqueuses et dont le déficit a par exemple été évoqué dans la pathogénie de la mucoviscidose (Xu et al PNAS). L'expression de la pendrine est stimulée par l'IL-4 présente dans les cellules épithéliales bronchiques [125]. Très récemment, il a été montré que l'IL-13 induit une nette surexpression de la pendrine dans les cellules épithéliales de la trachée et que cette protéine

est surexprimée dans le cadre d'une surproduction de mucus au cours de l'asthme [126]. Dans ce modèle, la surexpression de la pendrine est observée après une exposition à court terme aux allergènes mais également, dans une moindre mesure, après des expositions à moyen et à long terme.

Agr2, pendrine et scindérine sont donc trois gènes impliqués à différents niveaux dans la production de mucus et sont surexprimés tout au long de l'exposition à l'allergène. Ces données suggèrent un rôle précoce et crucial de ces molécules dans les processus conduisant à la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes.

La paraoxonase-1 (Pon1) est le seul gène à être régulé négativement après chaque temps d'exposition à l'allergène. La paraoxonase est une protéine pour laquelle un rôle protecteur contre l'oxydation induite par les espèces réactives dérivées de l'oxygène a été montré [127].

Quelques médiateurs plus classiques et bien connus dans la maladie asthmatique, tels que l'IL-13 ou la MMP-9 ne sont pas reconnus comme surexprimés dans notre analyse transcriptomique. Des études antérieures réalisées par microarray ne montrent aucune augmentation de l'expression de ces deux gènes [24, 128]. Différentes hypothèses peuvent expliquer ces divergences. En ce qui concerne l'IL-13, nous pouvons supposer que cette cytokine est produite par un très petit nombre de cellules (principalement les lymphocytes Th₂) et, par conséquent cette surexpression peut passer inaperçue dans un microarray étudiant les ARN provenant du poumon total. Ceci peut être une limite potentielle à l'analyse par microarray de processus pathologiques complexes au cours desquels une petite population cellulaire joue un rôle clé comme dans l'asthme. Par contre, le nombre de cellules produisant la MMP-9 (essentiellement les granulocytes et dans une moindre mesure des macrophages) est assez élevé dans le parenchyme pulmonaire et l'absence d'une régulation positive de la MMP-9 dans notre microarray confirme les résultats obtenus antérieurement par notre équipe [78] qui montraient que la MMP-9 est principalement préformée dans la moelle osseuse durant la maturation des granulocytes, stockée au sein des granules et est ensuite libérée lorsque ces cellules sont activées. La production de MMP-9 est par conséquent certainement sous estimée lors de l'étude de l'expression des gènes issus d'un tissu non-hématopoïétique. Nous avons détecté une surexpression de la MMP-12 après une exposition aigue aux allergènes. Cette augmentation persiste avec le temps et ce phénomène peut être expliqué par le fait que la MMP-12 est produite par les macrophages et les cellules dendritiques localement

[102]. Il est donc, par conséquent, attendu que l'expression de l'ARNm codant pour la MMP-12 soit plus importante au niveau des sites inflammatoires.

Quatorze gènes surexprimés dans notre microarray sont modulés positivement dans deux autres études rapportant le profil des gènes modulés dans des modèles murins d'asthme [24, 128] : *Agr2*, *Arg1*, *Ccl8*, *Ccl11n*, *chi3l3*, *C1qa*, *C1qb*, *C1qc*, *Fcgr2b*, *IGF1*, *Scin*, *Serpina3g*, *Serpina3n* et *Timp1*. Cette corrélation avec des auteurs antérieurs permet de valider le panel de résultats obtenus et renforce la valeur potentielle de ces gènes en tant que cibles thérapeutiques pour la pathologie asthmatique puisqu'ils ont été identifiés comme étant surexprimés dans différentes conditions expérimentales très diverses (allergènes différents, protocoles différents).

L'étude de l'expression des différents gènes identifiés a permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la pathologie de l'asthme mais ne donne toujours pas de schéma général de toutes les voies de signalisation impliquées. Pour résoudre ce problème, l'analyse des voies de signalisation a été réalisée à chaque temps de notre modèle. De nombreuses voies de signalisation et de processus biologiques relevant sont modulés à des périodes spécifiques alors que d'autres sont modulés constamment tout au long de l'exposition à l'allergène.

Les gènes associés à l'inflammation sont fortement modulés après une exposition à court terme à l'allergène. Tout comme Wong et Zaho [129], nous avons pu observer une régulation positive des gènes codant pour les protéines impliquées dans la signalisation de l'actine du cytosquelette aux temps court et intermédiaire.

Les processus biologiques activés aux temps intermédiaires correspondent au développement des organes, à la morphogénèse et à l'angiogénèse et leur identification permet de suggérer que le remodelage pulmonaire commence dès ce moment. La voie de β -caténine/Wnt a été proposée comme un biomarqueur fiable du développement d'un asthme et proposée comme cible thérapeutique potentielle [130-131]. Cependant, dans notre microarray, cette voie est régulée positivement uniquement au temps intermédiaire. Des hypothèses similaires peuvent être proposées pour la voie de l'IL-6 qui a été décrite comme une voie impliquée dans la pathologie de l'asthme [132]. En effet, dans notre étude, l'IL-6, le gp130 (IL-6st) et l'IL-6r ont été identifiés comme des protéines modulées positivement uniquement au temps intermédiaire (5 semaines d'exposition aux allergènes).

Dans le modèle d'exposition de longue durée à l'allergène expérimental, les régulations sont principalement négatives. Les processus biologiques et les interactions cellulaires sont réduits par rapport aux temps précédents.

Dans le cadre de la mise au point de nouveaux agents thérapeutiques, l'intérêt se portera bien entendu davantage sur des voies de signalisation qui sont activées aux trois temps d'exposition à l'allergène. En effet, bien que certains processus biologiques soient régulés positivement à tous les temps, d'autres sont régulés positivement ou négativement en fonction de la durée de l'exposition à l'allergène. Les voies de l'arginase [133], de l'IGF1 [134] et des chimiokines qui ont été précédemment décrites comme des voies importantes dans l'asthme, sont activées tout au long de notre étude. La cascade du complément est également activée aux trois temps d'exposition à l'allergène. Les trois sous-unités du complexe C1q (C1qa, C1qb et C1qc) sont régulées positivement dans notre modèle suggérant que le complément pourrait être une cible thérapeutique de choix pour traiter l'asthme. De plus, il a été précédemment montré que C3 et C5 joue un rôle important dans la pathogénie de l'asthme [122, 135] ce qui permet de valider le fait que le complément pourrait être une cible thérapeutique adéquate pour la maladie.

Ce travail représente la première analyse complète des gènes impliqués dans le développement de la pathologie de l'asthme et a permis d'établir une liste des gènes et des voies de signalisation continuellement surexprimées tout au long du développement de la maladie. De plus, plusieurs nouveaux gènes cibles ont été proposés et validés par immunohistochimie.

Suite aux résultats observés dans notre microarray, nous avons tenté de déterminer plus précisément le rôle de la MMP-12 dans la pathologie asthmatique. En effet, la MMP-12 étant fortement surexprimée tout au long de l'exposition à l'allergène, elle semble représenter une cible thérapeutique potentiellement intéressante pour la maladie asthmatique. La MMP-12 est une protéase de la famille des métalloprotéases matricielles connue pour être surexprimée dans l'asthme mais son rôle exact dans la pathologie n'a pas encore été clairement établi. Afin d'étudier plus avant le rôle de cette protéase dans l'asthme, nous avons appliqué nos modèles murins d'inflammation allergique aigüe et de remodelage bronchique chronique à des souris déficientes pour le gène de cette protéase. Nous avons montré une diminution de l'inflammation péribronchique ainsi qu'une diminution du nombre d'éosinophiles dans le

LBA des MMP-12^{-/-} exposées à l'allergène. Des résultats plus préliminaires avaient déjà été publiés par Warner et al [106] et Pouladi et al [136]. Par rapport à ces auteurs antérieurs, nous avons également montré une diminution de l'infiltration des éosinophiles et des mastocytes dans le parenchyme pulmonaire de ces souris. Notre étude montre une résistance bronchique moindre chez les souris MMP-12^{-/-} exposées à l'allergène. Nos données suggèrent que la MMP-12 pourrait également jouer un rôle clé dans les processus conduisant au remodelage bronchique puisque nombre de cellules caliciformes ainsi que la masse de muscle lisse sont également réduits chez les souris MMP-12^{-/-}.

Afin de tenter de démontrer que la MMP-12 pourrait constituer une cible thérapeutique permettant de traiter non seulement l'inflammation aiguë mais aussi d'éviter le remodelage bronchique induits par les allergènes, nous avons ensuite testé les effets de l'instillation intratrachéale de siRNA ciblant l'ARNm de la MMP-12. Cette étude a permis de montrer qu'un siRNA spécifique instillé par voie intratrachéale pouvait effectivement diminuer l'expression de la MMP-12 dans les poumons des souris. L'instillation de siRNA ciblant la MMP-12 entraîne une diminution du nombre d'éosinophiles dans le LBA et dans le parenchyme pulmonaire, une diminution de l'inflammation péribronchique ainsi qu'une diminution du nombre de cellules à mucus au sein de l'épithélium bronchique.

La MMP-12 est une protéase capable de cliver et d'activer un grand nombre de substrat dont notamment le pro-TNF- α [54]. Le TNF- α est une protéine capable de réguler positivement l'expression de l'arginase I [137]. L'IL-13 est également liée à l'expression de l'arginase I [23]. Or, nous avons pu montrer que l'instillation du siRNA ciblant l'ARNm de la MMP-12 chez les souris exposées à l'allergène entraîne une diminution de l'expression du TNF- α , de l'IL-13 ainsi que de l'arginase I. Dans les voies aériennes, l'arginase I est exprimée de façon constitutive par les cellules épithéliales bronchiques, les cellules endothéliales, les myofibroblastes et les macrophages alvéolaires et l'expression d'arginase I est augmentée dans les poumons de souris asthmatiques [24-25, 105]. Une des fonctions biologiques principales de l'arginase I est la régulation des taux de NO par compétition avec la NO synthase pour leur substrat commun qui est l'arginine. La surexpression de l'arginase I dans l'asthme résulte donc en une diminution de la synthèse de NO, un bronchodilatateur puissant dont la perte pourrait conduire à l'hyperréactivité bronchique [26, 138]. Ceci est une hypothèse qui permettrait d'expliquer la diminution de l'hyperréactivité bronchique observée dans notre étude chez les souris MMP-12^{-/-} exposées à l'ovalbumine pour des temps court, intermédiaire et long. D'autre part, notre étude a également permis de montrer une diminution

de l'hyperplasie des cellules à mucus ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de muscle lisse chez les souris MMP-12^{-/-} ou traitées par siRNA et exposées à l'allergène.

Ces effets sur la sécrétion de mucus pourraient être expliqués par le fait que la dégradation de la L-arginine par l'arginase conduit à la formation de L-ornithine qui est un précurseur de polyamines et de proline. Ces deux molécules causent une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de la contraction musculaire et de la sécrétion de mucus [138].

Neilsen et ses collaborateurs ont décrit que l'IL-13 induisait la production de CCL-11 et la migration des éosinophiles [139]. Ceci permet de suggérer que la diminution du nombre d'éosinophiles dans les poumons MMP-12^{-/-} exposées à l'ovalbumine ainsi que dans les poumons de souris exposées à l'allergène ayant reçu le siRNA ciblant la MMP-12 pourrait être due à une diminution de l'expression de l'IL-13 chez ces souris entraînant une diminution de l'expression de CCL-11, un agent chimiotactique puissant pour les éosinophiles.

La diminution d'expression de l'IL-13 observée suite à l'instillation du siRNA ciblant la MMP-12 dans les poumons de souris exposées à l'OVA joue certainement un rôle important dans la diminution de l'hyperplasie des cellules caliciformes, de l'hypertrophie musculaire lisse ainsi que dans la diminution de l'hyperréactivité bronchique observée dans notre étude. En effet, cette cytokine est connue pour induire l'hyperréactivité bronchique dans les modèles animaux mais également pour produire différents changements structurels incluant l'hyperplasie des cellules caliciformes et l'hypertrophie des muscle lisses [140].

En conclusion, nous avons mis en évidence par une étude extensive des expressions géniques la modulation d'un certain nombre de gènes au cours de l'asthme. Parmi ceux-ci, la MMP-12 apparaît comme une cible thérapeutique pertinente dans la mesure où elle est surexprimée après des expositions de durées variables aux allergènes et où ses propriétés connues suggèrent un rôle possible en tant qu'effecteur de la réaction allergique et en tant qu'agent favorisant le remodelage des bronches. Ainsi, nous avons voulu démontrer que l'inhibition sélective et spécifique de la MMP-12 conduit à une amélioration du phénotype asthmatique. Ceci a été effectué en étudiant le phénotype de souris KO pour la MMP-12 et le rôle d'un SiRNA spécifiquement dirigé contre la séquence de la MMP-12 au cours de l'induction d'un asthme expérimental.

L'utilisation de souris KO pour la MMP-12 ainsi que l'extinction de l'expression de la MMP-12 par l'administration d'un siRNA ciblant spécifiquement l'ARNm de cette protéine permettent de moduler les différents paramètres de la maladie asthmatique étudiables chez

l'animal (réactivité, inflammation et remodelage des bronches). Nos travaux suggèrent donc que la MMP-12 est une cible thérapeutique potentielle et que de nouvelles molécules inhibitrices de diverses natures incluant des SiRNAs devraient être testées pour leur effet dans l'asthme.

V. PERSPECTIVES

V. Perspectives

De très nombreuses perspectives découlent de ce travail et nous ne citerons ici que les plus évidentes et immédiates.

Nous envisageons de tester les effets de l'instillation de siRNA ciblant la MMP-12 dans nos modèles d'exposition à l'allergène de longue durée et de durée intermédiaire afin de déterminer si l'inhibition de l'ARNm de cette métalloprotéase a des conséquences à long terme. De plus, le siRNA ciblant la MMP-12 a été utilisé ici dans un modèle de prévention, c'est-à-dire qu'il a été instillé avant que les expositions à l'allergène débutent. Nous souhaiterions tester ses effets dans un modèle plus proche de la thérapeutique. Dans ce cas, le siRNA sera instillé après l'exposition à l'allergène.

Nous envisageons également de tester les effets de l'instillation d'autres siRNA ciblant nos nouvelles cibles thérapeutiques potentielles déterminées lors de notre étude transcriptomique. Certaines de ces protéines sont déjà connues pour être modulées dans la maladie asthmatique mais leur rôle exact n'est toujours pas clair. Nous souhaiterions déterminer les effets de l'inhibition de l'ARNm de ces protéines ainsi que leurs fonctions dans la pathologie de l'asthme.

VI. Bibliographie

VI. Bibliographie

1. Benayoun, L. and M. Pretolani, [*Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutic perspectives*]. Med Sci (Paris), 2003. **19**(3): p. 319-26.
2. Cataldo, D., et al., [*Bronchial morphologic modification in asthma*]. Rev Med Liege, 2000. **55**(7): p. 715-20.
3. Bai, T.R., et al., *Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma*. Eur Respir J, 2007. **30**(3): p. 452-6.
4. O'Byrne, P.M., et al., *Severe exacerbations and decline in lung function in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(1): p. 19-24.
5. Wegmann, M., *Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(1): p. 85-100.
6. Irvin, C.G. and J.H. Bates, *Physiologic dysfunction of the asthmatic lung: what's going on down there, anyway?* Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(3): p. 306-11.
7. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. Allergy, 2004. **59**(5): p. 469-78.
8. Holt, P.G., *Parasites, atopy, and the hygiene hypothesis: resolution of a paradox?* Lancet, 2000. **356**(9243): p. 1699-701.
9. Devouassoux, G. and C. Brambilla, [*Effect of diesel particles on allergic inflammatory response: cellular targets and molecular mechanisms*]. Rev Mal Respir, 2002. **19**(4): p. 467-79.
10. Cookson, W.O. and J.M. Hopkin, *Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness*. Lancet, 1988. **1**(8577): p. 86-8.

11. Ober, C. and S. Hoffjan, *Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery*. Genes Immun, 2006. **7**(2): p. 95-100.
12. Kauffmann, F., et al., *Epidemiologic study of the genetics and environment of asthma, bronchial hyperresponsiveness, and atopy*. Chest, 2002. **121**(3 Suppl): p. 27S.
13. Weiss, S.T., B.A. Raby, and A. Rogers, *Asthma genetics and genomics 2009*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(3): p. 279-82.
14. Baena-Cagnani, C.E., et al., *Impact of environmental tobacco smoke and active tobacco smoking on the development and outcomes of asthma and rhinitis*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009. **9**(2): p. 136-40.
15. Randolph, C.C., *Allergic rhinitis and asthma in the athlete*. Allergy Asthma Proc, 2006. **27**(2): p. 104-9.
16. Butcher, J.D., *Exercise-induced asthma in the competitive cold weather athlete*. Curr Sports Med Rep, 2006. **5**(6): p. 284-8.
17. Wills-Karp, M., *Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 255-81.
18. Galli, S.J., et al., *Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 749-86.
19. Bousquet, J., et al., *Eosinophilic inflammation in asthma*. N Engl J Med, 1990. **323**(15): p. 1033-9.
20. Fahy, J.V., *Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(3): p. 256-9.
21. Yu, M., et al., *Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1633-41.

22. Barnes, P.J., *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 183-92.
23. Kenyon, N.J., et al., *Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: sources and consequences*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **230**(3): p. 269-75.
24. Zimmermann, N., et al., *Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1863-74.
25. Fajardo, I., et al., *Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(5): p. 477-84.
26. Yang, M., et al., *Inhibition of arginase I activity by RNA interference attenuates IL-13-induced airways hyperresponsiveness*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5595-603.
27. Maarsingh, H., T. Pera, and H. Meurs, *Arginase and pulmonary diseases*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **378**(2): p. 171-84.
28. Vercelli, D., *Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma?* J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1815-7.
29. Webb, D.C., A.N. McKenzie, and P.S. Foster, *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, 2001. **276**(45): p. 41969-76.
30. Welch, J.S., et al., *TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42821-9.
31. Chupp, G.L., et al., *A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma*. N Engl J Med, 2007. **357**(20): p. 2016-27.

32. Donnelly, L.E. and P.J. Barnes, *Acidic mammalian chitinase--a potential target for asthma therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(10): p. 509-11.
33. Zhu, Z., et al., *Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation*. Science, 2004. **304**(5677): p. 1678-82.
34. Shuhui, L., Y.K. Mok, and W.S. Wong, *Role of mammalian chitinases in asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2009. **149**(4): p. 369-77.
35. Hemelaers, L. and R. Louis, [*Eotaxin: an important chemokine in asthma*]. Rev Med Liege, 2006. **61**(4): p. 223-6.
36. Munitz, A., et al., *Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(20): p. 7240-5.
37. Griffiths-Johnson, D.A., et al., *The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **197**(3): p. 1167-72.
38. Pease, J.E. and T.J. Williams, *Eotaxin and asthma*. Curr Opin Pharmacol, 2001. **1**(3): p. 248-53.
39. Warner, S.M. and D.A. Knight, *Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(1): p. 44-8.
40. Tagaya, E. and J. Tamaoki, *Mechanisms of airway remodeling in asthma*. Allergol Int, 2007. **56**(4): p. 331-40.
41. Panettieri, R.A., Jr., et al., *Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling: basic knowledge to clinical relevance*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(3): p. 248-52.

42. Sumi, Y. and Q. Hamid, *Airway remodeling in asthma*. Allergol Int, 2007. **56**(4): p. 341-8.
43. Ordonez, C., et al., *Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology?* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(6): p. 2324-9.
44. Schmidt, M., et al., *Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 380-9.
45. Holgate, S.T., *The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma*. Allergol Int, 2008. **57**(1): p. 1-10.
46. Ebina, M., et al., *Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(3): p. 720-6.
47. Cataldo, D., et al., *MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **123**(3): p. 259-67.
48. Amishima, M., et al., *Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1907-12.
49. Nakanishi, A., et al., *Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5175-80.
50. Baluk, P., et al., *Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways*. Am J Pathol, 2004. **165**(4): p. 1071-85.
51. Bousquet, J., et al., *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1720-45.

52. Vervloet, D., S. Romanet, and A. Magnan, [*Role of desensitization in the treatment of respiratory allergies*]. *Rev Mal Respir*, 2000. **17**(1 Pt 2): p. 287-92.
53. Foresi, A. and P. Paggiaro, *Inhaled corticosteroids and leukotriene modifiers in the acute treatment of asthma exacerbations*. *Curr Opin Pulm Med*, 2003. **9**(1): p. 52-6.
54. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 463-516.
55. Gross, J. and C.M. Lapiere, *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1962. **48**: p. 1014-22.
56. Murphy, G. and F. Willenbrock, *Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases*. *Methods Enzymol*, 1995. **248**: p. 496-510.
57. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
58. Consolo, M., et al., *Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review)*. *Int J Mol Med*, 2009. **24**(2): p. 143-52.
59. Birkedal-Hansen, H., *Proteolytic remodeling of extracellular matrix*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(5): p. 728-35.
60. Ala-aho, R. and V.M. Kahari, *Collagenases in cancer*. *Biochimie*, 2005. **87**(3-4): p. 273-86.
61. Arakaki, P.A., M.R. Marques, and M.C. Santos, *MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes*. *J Biosci*, 2009. **34**(2): p. 313-20.
62. Gueders, M.M., et al., *Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **533**(1-3): p. 133-44.

63. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 827-39.
64. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.
65. Bjorklund, M. and E. Koivunen, *Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1755**(1): p. 37-69.
66. Zucker, S., et al., *Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP)*. *Curr Top Dev Biol*, 2003. **54**: p. 1-74.
67. Sohail, A., et al., *MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2008. **27**(2): p. 289-302.
68. Nelson, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(5): p. 1135-49.
69. Marchenko, G.N., et al., *Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin*. *Biochem J*, 2001. **356**(Pt 3): p. 705-18.
70. Burke, B., *The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity*. *Immunobiology*, 2004. **209**(1-2): p. 51-6.
71. Strongin, A.Y., *Mislocalization and unconventional functions of cellular MMPs in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(1): p. 87-98.
72. Nenan, S., et al., *Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator?* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005. **100 Suppl 1**: p. 167-72.

73. Bode, W., et al., *Insights into MMP-TIMP interactions*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **878**: p. 73-91.
74. Nagase, H., *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-60.
75. Zeng, G., et al., *Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression*. Exp Cell Res, 1996. **228**(2): p. 271-6.
76. Varghese, S. and E. Canalis, *Regulation of collagenase-3 by bone morphogenetic protein-2 in bone cell cultures*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 1035-40.
77. Mautino, G., et al., *Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(5): p. 583-91.
78. Cataldo, D., et al., *Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics*. Allergy, 2001. **56**(2): p. 145-51.
79. Bosse, M., et al., *Serum matrix metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(2): p. 596-602.
80. Mattos, W., et al., *Matrix metalloproteinase-9 expression in asthma: effect of asthma severity, allergen challenge, and inhaled corticosteroids*. Chest, 2002. **122**(5): p. 1543-52.
81. Han, J.L., et al., *[Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human bladder transitional cell carcinoma]*. Ai Zheng, 2003. **22**(11): p. 1158-61.

82. Vliagoftis, H., et al., *Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(3): p. 537-45.
83. Prause, O., et al., *Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways*. Thorax, 2004. **59**(4): p. 313-7.
84. Johnson, S. and A. Knox, *Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. L1109-17.
85. Gueders, M.M., et al., *Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2589-97.
86. Dahlen, B., J. Shute, and P. Howarth, *Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma*. Thorax, 1999. **54**(7): p. 590-6.
87. Chiba, Y., et al., *Increase in the expression of matrix metalloproteinase-12 in the airways of rats with allergic bronchial asthma*. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(2): p. 318-23.
88. Shapiro, S.D., D.K. Kobayashi, and T.J. Ley, *Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23824-9.
89. Wu, L., et al., *Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(3): p. 808-15.
90. Lappalainen, U., et al., *Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(4): p. 311-8.

91. Garbacki, N., et al., *Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling?* Pulm Pharmacol Ther, 2009. **22**(4): p. 267-78.
92. Chen, Y.E., *MMP-12, an old enzyme plays a new role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?* Am J Pathol, 2004. **165**(4): p. 1069-70.
93. Feinberg, M.W., et al., *Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages.* J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25766-73.
94. Bertini, I., et al., *X-ray structures of binary and ternary enzyme-product-inhibitor complexes of matrix metalloproteinases.* Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(23): p. 2673-6.
95. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
96. Gill, S.E. and W.C. Parks, *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1334-47.
97. Gronski, T.J., Jr., et al., *Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase.* J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 12189-94.
98. Matsumoto, S., et al., *Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development.* Am J Pathol, 1998. **153**(1): p. 109-19.
99. Shapiro, S.D., *Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 602-8.
100. Lavigne, M.C., et al., *Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 534-46.

101. Xie, S., et al., *Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells*. *Respir Res*, 2005. **6**: p. 148.
102. Bracke, K., et al., *Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005. **138**(2): p. 169-79.
103. Lagente, V., et al., *Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling*. *Braz J Med Biol Res*, 2005. **38**(10): p. 1521-30.
104. Demedts, I.K., et al., *Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD*. *Thorax*, 2006. **61**(3): p. 196-201.
105. Di Valentin, E., et al., *New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **296**(2): p. L185-97.
106. Warner, R.L., et al., *Role of metalloelastase in a model of allergic lung responses induced by cockroach allergen*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(6): p. 1921-30.
107. Bates, J.H., M. Rincon, and C.G. Irvin, *Animal models of asthma*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(3): p. L401-10.
108. Daser, A., M. Daheshia, and G.T. De Sanctis, *Genetics of allergen-induced asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(2): p. 167-74.
109. Shinagawa, K. and M. Kojima, *Mouse model of airway remodeling: strain differences*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(8): p. 959-67.
110. Kerkela, E., et al., *Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation*. *Bone*, 2001. **29**(5): p. 487-93.

111. Cormier, S.A., et al., *T(H)2-mediated pulmonary inflammation leads to the differential expression of ribonuclease genes by alveolar macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. **27**(6): p. 678-87.
112. Park, C.G., et al., *Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN*. *Int Immunol*, 2001. **13**(10): p. 1283-90.
113. Tailleux, L., et al., *DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis*. *PLoS Med*, 2005. **2**(12): p. e381.
114. Zhou, T., et al., *DC-SIGN and immunoregulation*. *Cell Mol Immunol*, 2006. **3**(4): p. 279-83.
115. Thompson, D.A. and R.J. Weigel, *hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(1): p. 111-6.
116. Komiya, T., Y. Tanigawa, and S. Hirohashi, *Cloning of the gene gob-4, which is expressed in intestinal goblet cells in mice*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1444**(3): p. 434-8.
117. Liu, D., et al., *Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3796-805.
118. Wang, Z., Y. Hao, and A.W. Lowe, *The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation*. *Cancer Res*, 2008. **68**(2): p. 492-7.
119. Zhang, J.S., et al., *AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005. **43**(3): p. 249-59.
120. Zheng, W., et al., *Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease*. *Genes Immun*, 2006. **7**(1): p. 11-8.

121. van der Sluis, M., et al., *Forkhead box transcription factors Foxa1 and Foxa2 are important regulators of Muc2 mucin expression in intestinal epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **369**(4): p. 1108-13.
122. Sarma, V.J., M. Huber-Lang, and P.A. Ward, *Complement in lung disease*. *Autoimmunity*, 2006. **39**(5): p. 387-94.
123. Ehre, C., et al., *Barrier role of actin filaments in regulated mucin secretion from airway goblet cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **288**(1): p. C46-56.
124. Nurminsky, D., et al., *Regulation of chondrocyte differentiation by actin-severing protein adseverin*. *Dev Biol*, 2007. **302**(2): p. 427-37.
125. Pedemonte, N., et al., *Thiocyanate transport in resting and IL-4-stimulated human bronchial epithelial cells: role of pendrin and anion channels*. *J Immunol*, 2007. **178**(8): p. 5144-53.
126. Nakao, I., et al., *Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6262-9.
127. Ekmekci, O.B., et al., *Plasma paraoxonase activities, lipoprotein oxidation, and trace element interaction in asthmatic patients*. *Biol Trace Elem Res*, 2006. **111**(1-3): p. 41-52.
128. Park, J.J., et al., *Genome-wide combination profiling of copy number and methylation offers an approach for deciphering misregulation and development in cancer cells*. *Gene*, 2008. **407**(1-2): p. 139-47.
129. Wong, W.S. and J. Zhao, *Proteome analysis of chronically inflamed lungs in a mouse chronic asthma model*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008. **147**(3): p. 179-89.

130. Syed, F., et al., *Identification of interleukin-13 related biomarkers using peripheral blood mononuclear cells*. *Biomarkers*, 2007. **12**(4): p. 414-23.
131. Van Scoyk, M., et al., *Wnt signaling pathway and lung disease*. *Transl Res*, 2008. **151**(4): p. 175-80.
132. Ammit, A.J., et al., *Effect of IL-6 trans-signaling on the pro-remodeling phenotype of airway smooth muscle*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **292**(1): p. L199-206.
133. Zimmermann, N. and M.E. Rothenberg, *The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **533**(1-3): p. 253-62.
134. Yamashita, N., et al., *Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling*. *Cell Immunol*, 2005. **235**(2): p. 85-91.
135. Gerard, N.P. and C. Gerard, *Complement in allergy and asthma*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(6): p. 705-8.
136. Pouladi, M.A., et al., *Interleukin-13-dependent expression of matrix metalloproteinase-12 is required for the development of airway eosinophilia in mice*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **30**(1): p. 84-90.
137. Gao, X., et al., *TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(6): p. 1269-75.
138. Maarsingh, H., J. Zaagsma, and H. Meurs, *Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives*. *Br J Pharmacol*, 2009. **158**(3): p. 652-64.
139. Neilsen, C.V. and P.J. Bryce, *Interleukin-13 directly promotes oesophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils*. *Clin Exp Allergy*, 2010. **40**(3): p. 427-34.

140. Barnes, P.J., *The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3546-56.