

Interactions mastocyte - muscle lisse bronchique dans l'asthme

R Marthan*, P Berger, P.O. Girodet, M Tunon de Lara

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, Inserm U 885, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat F- 33076 Bordeaux

* Correspondance : Pr. R Marthan : roger.marthan@u-bordeaux2.fr

Résumé

Dans l'asthme allergique, une série de travaux récents insistent sur l'importance particulière de l'infiltration mastocytaire au sein de la couche musculaire lisse de la paroi bronchique. Cette infiltration (micro-localisation) résulte d'un dialogue qui s'établit au cours de la sensibilisation entre le mastocyte et la cellule musculaire lisse (CML) aboutissant à la constitution d'une boucle d'auto activation. Ainsi **l'objectif général de la proposition de recherche** était d'analyser **l'interaction mastocyte - cellule musculaire lisse** chez l'homme et dans un modèle murin d'asthme par exposition chronique à l'allergène.

Le projet associait des expérimentations *in vitro* sur cellules humaines, des expérimentations *ex vivo* sur prélèvements de tissus de patients asthmatiques et un volet d'expérimentation *in vivo* sur un modèle murin d'asthme allergique chronique.

Le projet identifiait **6 objectifs spécifiques** :

1. Identification des couples ligands/récepteurs impliqués dans la boucle d'auto-activation.
2. Analyse des mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués dans l'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice.
3. Etude des conséquences fonctionnelles de l'adhérence.
4. Etude de cibles thérapeutiques pouvant interrompre l'adhérence au niveau des mastocytes
5. Etude de cibles thérapeutiques pouvant interrompre l'adhérence au niveau des cellules musculaires lisses
6. Etude de cibles thérapeutiques pouvant interrompre directement l'adhérence

Les travaux réalisés au cours du contrat ont permis, d'une part, d'approfondir les mécanismes de l'interaction mastocyte - cellule musculaire lisse et, d'autre part, d'identifier des cibles thérapeutiques innovantes.

En terme de mécanismes tout d'abord, il a été montré que la fractalkine produite par les CML bronchiques contribue, au même titre que le TGF- β 1 et le SCF, au recrutement des mastocytes au sein du muscle lisse bronchique et participe ainsi à l'organisation et à l'entretien de l'inflammation des voies aériennes dans la maladie asthmatique. De plus, la myosite mastocytaire observée chez les sujets asthmatiques est positivement corrélée avec l'expression de CD44 par le muscle lisse bronchique indiquant que CD44v6 et CD51 jouent un rôle clé dans l'adhérence mastocytes-CML via la matrice extracellulaire. Enfin, il a été mis en évidence que l'adhérence augmente la survie mastocytaire et augmente la prolifération musculaire lisse par coopération entre le SCF exprimé par la CML et l'IL6 et le CADM1 mastocytaire. De plus l'interaction favorise la dégranulation mastocytaire et se présente donc comme un mécanisme additionnel indépendant de la dégranulation allergénique.

En terme de cibles thérapeutiques ensuite, une sous-population mastocytaire, les mastocytes CXCR3 positifs, apparaît particulièrement importante à cibler dans l'asthme. En effet ces mastocytes sont recrutés en priorité dans le muscle lisse de l'asthmatique sécrétant de fortes quantités de CXCL10 (IP10) et ils pourraient présenter des caractéristiques phénotypiques différentes. Au niveau des cellules musculaires lisses, la technique de l'interférence ARN qui permet d'inhiber l'expression du PAR-2 dans les CML bronchiques humaines s'accompagne d'une perte des réponses fonctionnelles médiées PAR-2. Une extinction de plus longue durée par vecteurs lentiviraux est mise au point et les résultats fonctionnels sont en cours d'investigation. Enfin, l'extinction des gènes codants pour les variants 6 et 7 de CD44 (animaux CD44 v6/v7^{-/-}) bloque l'adhérence mastocytaire et diminue l'HRB et le remodelage bronchique.

Au total, les 6 objectifs spécifiques de ce contrat ont fait l'objet d'investigations approfondies et ont globalement été atteints. Les objectifs n° 1, 2 et 5 ont, chacun, fait l'objet d'une publication scientifique. L'objectif n° 3 a fait l'objet d'une publication en collaboration. Les objectifs 2 et 6 font, chacun, l'objet d'un article en cours de soumission. Les objectifs 4 et 5 ont fait l'objet de mémoires de M2 et de travaux de thèse. Enfin, 16 communications dont 10 internationales ont été réalisées. Les travaux menés dans le cadre d'une thèse (shRNA – lentivirus) se poursuivent actuellement.

Contexte et rappel de l'objectif général

Il existe un lien étroit entre environnement et pathologie respiratoire immuno-allergique comme l'asthme, la principale maladie allergique respiratoire dont la prévalence est, en France, d'environ 6% chez l'adulte et 10% chez l'enfant. Cette maladie se caractérise par une inflammation des bronches associée à une hyperréactivité bronchique dont les mécanismes restent encore incomplètement élucidés. Dans l'asthme allergique, les effets de l'exposition aiguë à l'allergène sont bien connus. Par contre, très peu de données sont disponibles sur l'exposition chronique, plus proche de la réalité clinique. Des données récentes obtenues sur des modèles animaux suggèrent néanmoins que cette exposition chronique à l'allergène pourrait induire des lésions de remodelage bronchique, c'est-à-dire un processus anormal de réparation contribuant à la genèse de lésions peu sensibles au traitement, voire irréversibles. En rapport avec ce remodelage, dans l'asthme allergique, une série de travaux récents insistent sur l'importance particulière de l'infiltration mastocytaire au sein de la couche musculaire lisse de la paroi bronchique. Cette infiltration (micro-localisation) résulte d'un dialogue qui s'établit au cours de la sensibilisation entre le mastocyte et la cellule musculaire lisse aboutissant à la constitution d'une boucle d'auto activation.

Ainsi l'objectif général de la proposition de recherche était d'analyser l'interaction mastocyte - cellule musculaire lisse chez l'homme et dans un modèle murin d'asthme par exposition chronique à l'allergène

Méthodologie générale

Le projet associait des expérimentations *in vitro* sur cellules humaines, des expérimentations *ex vivo* sur prélèvements de tissus de patients asthmatiques et un volet d'expérimentation *in vivo* sur un modèle murin d'asthme allergique chronique.

Objectifs spécifiques

Le contrat identifiait 6 objectifs spécifiques.

Objectif spécifique n° 1 : Identification des couples ligands/récepteurs impliqués dans la boucle d'auto-activation.

Objectif spécifique n° 2 : Analyse des mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués dans l'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice.

Objectif spécifique n° 3 : Etude des conséquences fonctionnelles de l'adhérence.

Objectif spécifique à visée thérapeutique n° 4 au niveau des mastocytes : les mastocytes pulmonaires selon la présence ou non de CXCR₃ afin d'étudier leur spécificité.

Objectif spécifique à visée thérapeutique n° 5 au niveau des cellules musculaires lisses : inhiber l'expression de PAR-2 pour évaluer l'impact de son inhibition sur la boucle d'auto-activation.

Objectif spécifique à visée thérapeutique n° 6 au niveau de l'adhérence : les mécanismes impliqués dans l'adhérence constituent certainement une cible pertinente. Le modèle murin d'asthme permet d'évaluer le rôle des molécules impliquées dans l'adhérence.

Travaux réalisés : description, résultats et faits marquants

Les 6 objectifs spécifiques indiqués ci-dessus ont fait l'objet d'investigations approfondies et ont, globalement, été atteints. Les objectifs n° 1, 2 et 5 ont, chacun, fait l'objet d'une publication scientifique. L'objectif n° 3 a fait l'objet d'une publication en collaboration. Les objectifs 2 et 6 font, chacun, l'objet d'un article en cours de soumission. Enfin les objectifs 4 et 5 ont fait l'objet de mémoires de M2 et de travaux de thèse.

Objectif spécifique n° 1 :

Nous avons évoqué l'hypothèse que la fractalkine sécrétée par les CML bronchiques participe à la migration des mastocytes. Nous avons donc analysé l'effet de la fractalkine sur le chimiotactisme mastocytaire et examiné les voies de transduction concernées par l'activation du récepteur CX₃CR₁. Ce volet de la recherche a fait l'objet de la publication suivante (jointe en annexe n° 1) :

Amr El-Shazly, Patrick Berger, Pierre-Olivier Girodet, Olga Ousova, Michael Fayon, Jean-Marc Vernejoux, Roger Marthan et J. Manuel Tunon-de-Lara Fractalkine Produced by Airway Smooth Muscle Cells Contributes to Mast Cell Recruitment in Asthma. J Immunol, 2006, Feb 1; 176(3):1860-8

L'effet de la fractalkine recombinante sur son récepteur spécifique CX₃CR₁ résulte de la mise en jeu d'une voie de signalisation indépendante du calcium, impliquant la PKC- δ et une réorganisation du réseau actinique. Dans les conditions expérimentales basales, la production de fractalkine par les CML bronchiques n'est pas suffisante pour induire le recrutement des mastocytes. Cependant, en présence de VIP, la capacité de la fractalkine à provoquer un chimiotactisme mastocytaire est amplifiée. Chez les sujets asthmatiques, l'expression de fractalkine et VIP par les CML bronchiques est augmentée par rapport aux sujets témoins, avec une corrélation positive entre l'intensité de coloration pour le VIP et l'infiltration du muscle lisse bronchique par les mastocytes. Au total, la fractalkine produite par les CML bronchiques contribue, au même titre que le TGF- β 1 et le SCF, au recrutement des mastocytes au sein du muscle lisse bronchique et participe ainsi à l'organisation et à l'entretien de l'inflammation des voies aériennes dans la maladie asthmatique.

Objectif spécifique n° 2 :

Le concept d'une adhérence mastocytes-CML bronchiques via la matrice extracellulaire a été évoqué, avec un intérêt particulier porté aux molécules d'adhésion dont les ligands sont les composants de la matrice extracellulaire. Parmi elles, le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire exprimée notamment par les CML bronchiques et les mastocytes, dont les ligands principaux sont l'acide hyaluronique et le collagène. De plus, la variabilité d'expression des variants de CD44 issus d'un épissage alternatif en fonction des pathologies nous a conduit à focaliser notre attention sur les variants 6 et 7, impliqués dans certaines maladies inflammatoires et les réactions d'hypersensibilité allergique. Les objectifs de ce volet du travail étaient de déterminer le rôle de CD44 dans un mécanisme d'adhésion entre les mastocytes et les CML bronchiques

Les mastocytes stimulés par le TGF- β 1 adhèrent aux CML bronchiques activées par le TNF- α via les molécules d'adhésion CD44 et CD51 et le collagène type I α 1. La myosite mastocytaire observée chez les sujets asthmatiques est positivement corrélée avec l'expression de CD44 par le muscle lisse bronchique. L'expression de CD44v6 à la surface des mastocytes et des CML bronchiques augmente après stimulation par le TGF- β 1 et le TNF- α respectivement. En conclusion, CD44v6 et CD51 jouent un rôle clé dans la myosite mastocytaire dans l'asthme.

Ces résultats font l'objet d'un article actuellement soumis pour publication.

Par ailleurs, une analyse ultrastructurale de l'interaction mastocytes-CML a été réalisée et a fait l'objet de la publication suivante (jointe en annexe n° 2)

Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. Thorax. 2007;62(1):8-15.

Objectif spécifique n° 3 :

L'adhérence des mastocytes directement aux cellules musculaires lisses ou indirectement via la matrice est susceptible d'entraîner des modifications phénotypiques de la cellule musculaire lisse. En collaboration avec le "Department of Infection, Immunity and Inflammation, Institute for Lung Health, University of Leicester Medical School", il a été mis en évidence que l'adhérence augmente la survie mastocytaire et augmente la prolifération musculaire lisse via une coopération entre le SCF exprimé par la CML et l'IL6 et le CADM1 mastocytaire. De plus l'interaction favorise la dégranulation mastocytaire et se présente donc comme un mécanisme additionnel indépendant de la dégranulation allergénique.

Ces résultats font l'objet de l'article suivant publié par l'équipe de Leicester auquel un membre de l'équipe a collaboré (jointe en annexe n° 3).

Hollins F, Kaur D, Yang W, Cruse G, Saunders R, Sutcliffe A, Berger P, Ito A, Brightling C, Bradding P Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6. *J Immunol.* 2008;181(4):2772-80.

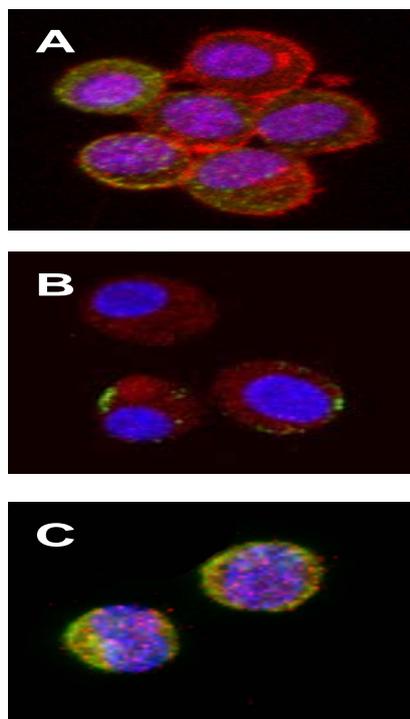
Objectif spécifique n° 4 :

Les mastocytes représentent une population hétérogène. Ils sont classiquement séparés en fonction des protéases qu'ils sécrètent en T mastocyte T (tryptase) et TC (tryptase + chymase, cathepsine G, carboxypeptidase...). De plus, le registre de récepteurs membranaires exprimés peut également varier. Ainsi, seulement 30% des mastocytes expriment le récepteur spécifique de CXCL₁₀ (IP₁₀), CXCR₃ à leur surface. Dans la mesure où le couple IP₁₀ - CXCR₃ est impliqué dans la boucle d'auto-activation, nous avons (i) séparé par microbilles magnétiques et FACS, les mastocytes pulmonaires selon la présence ou non de CXCR₃, et (ii) étudié la réponse calcique mastocytaire dépendante des IgE dans ces différentes populations mastocytaires. Dans la mesure où cet objectif a fait, pour l'instant, uniquement l'objet d'un mémoire de M2, il est décrit plus en détails.

(i) Séparation secondaire de sous populations mastocytaires

Des microbilles MACS permettent la cytométrie en flux directement après la séparation et ne nécessitent pas l'ajout supplémentaire d'anticorps anti-CXCR3-FITC. Néanmoins, les cellules issues de cette technique de séparation ne sont pas fonctionnelles en microspectrofluorimétrie. La séparation secondaire de sous populations mastocytaires a donc été optimisée. Dans la sous population des mastocytes non séparés, des mastocytes n'exprimant pas le CXCR3 coexistent avec des mastocytes qui l'expriment. Après séparation, la sous population négative n'exprime que très faiblement le CXCR3 (figures 6B), alors que la population positive l'exprime fortement (figures 6C). D'un point de vue quantitatif, l'analyse en cytométrie indique que les mastocytes CXCR3 positifs représentent 27 ± 12% contre 73 ± 13% de mastocytes négatifs.

Figure 6 : Séparation de sous populations mastocytaires visualisées en microscopie confocale



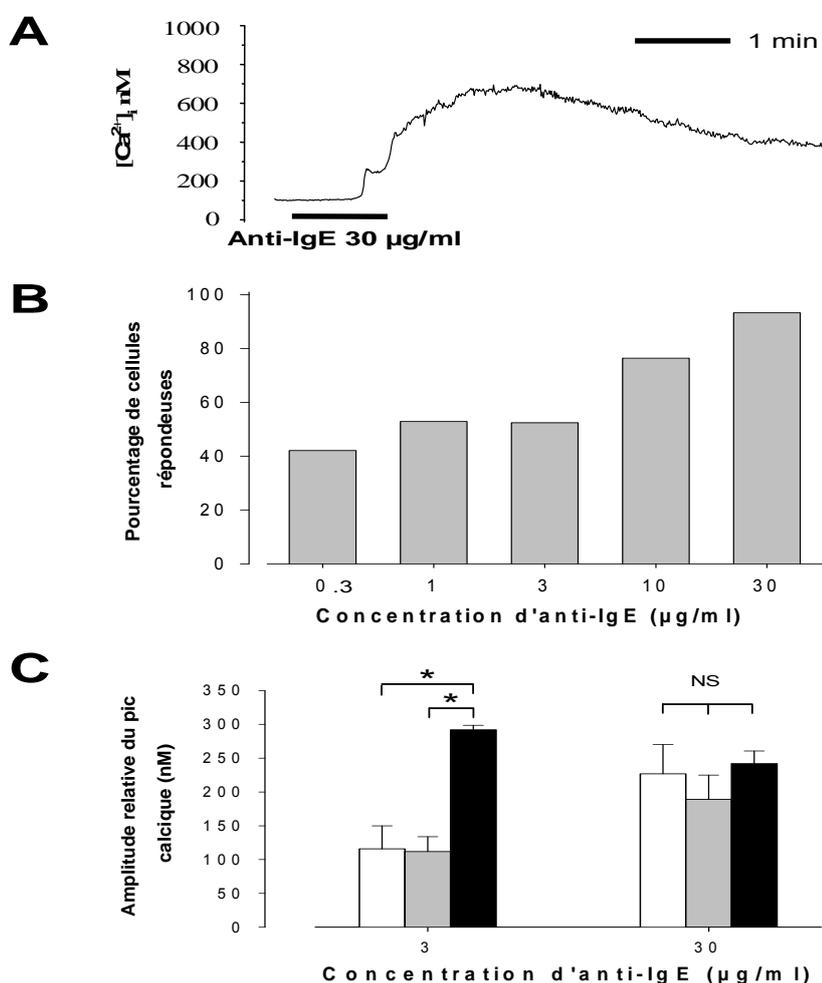
Suite à la séparation secondaire, les mastocytes sont visualisés en microscopie confocale après reconstitution en 3D. Les cellules sont marquées avec des anticorps dirigés contre le récepteur au stem cell factor (CD117) couplés à la phycoérythrine (PE), et contre le récepteur CXCR3 couplés à la fluorescéine (FITC). Enfin les noyaux sont colorés en bleu au DAPI. A : sous population non séparée; B : sous population CXCR3 négative; C : sous population CXCR3 positive

(ii) Conséquence fonctionnelle : mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ par microspectrofluorimétrie

Les concentrations calciques intracellulaires basales ne sont pas significativement différentes dans les trois sous populations mastocytaires étudiées (sous population non séparée : $82,5 \pm 5,2$ nM, $n=102$; sous population CXCR3 négative : $88,7 \pm 9,4$ nM, $n=107$; sous population CXCR3 positive : $81,8 \pm 5,3$ nM, $n=33$; $p=0,5$ Kruskal-Wallis).

Les mastocytes préalablement sensibilisés aux IgE puis stimulés par une concentration maximale d'anti-IgE, présentent une réponse calcique typique. Dans la sous population non séparée, la réponse calcique est dépendante de la concentration en anticorps anti-IgE. L'amplitude relative du signal calcique induit par une concentration d'anti-IgE de $3\mu\text{g/ml}$ est significativement plus élevée dans la sous population CXCR3 positive que dans la sous population CXCR3 négative ou non séparée (test de Kruskal Wallis, $p<0,05$). Le fait que les mastocytes CXCR3 positifs aient une réponse augmentée pour de faibles concentrations d'anti-IgE pourrait être important dans la physiopathologie de l'asthme. En effet ce sont ces mastocytes qui sont recrutés en priorité dans le muscle lisse de l'asthmatique sécrétant de fortes quantités de CXCL10 (IP10).

Figure 8 : Signalisation calcique IgE dépendante des différentes sous populations mastocytaires



Tracé calcique caractéristique (A) et pourcentages de cellules répondeuses (B) des mastocytes non séparés, préalablement sensibilisés aux IgE, obtenus après stimulation par un anticorps anti-IgE. Les amplitudes relatives des pics calciques sont représentées en C : sous population non séparée (□), CXCR3 négative (■), CXCR3 positive (■). * $p<0,05$ (test de Kruskal Wallis)

Objectif spécifique n° 5 :

Une première partie de l'objectif a consisté à mettre au point la technique des interférences ARN sur des cellules musculaires lisses (CML) bronchiques humaines afin d'inhiber l'expression de PAR-2 à leur surface. Les conséquences fonctionnelles de cette inhibition ont été analysées en examinant la signalisation calcique des CML. Cette partie a fait l'objet de la publication suivante (jointe en annexe n° 4) :

Thomas Trian, Pierre-Olivier Girodet, Olga Ousova, Roger Marthan, J. Manuel Tunon de Lara et Patrick Berger RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, Jan; 34(1):49-55

Les séquences siRNA anti-PAR-2 ont été synthétisées et transfectées dans les CML bronchiques en utilisant la lipofectamine. L'expression du PAR-2 a été évaluée par RT-PCR, Western blot, et cytométrie en flux. La $[Ca^{2+}]_i$ a été mesurée par microspectrofluorimétrie en réponse à plusieurs médiateurs : tryptase, SLIGKV, trypsine et caféine. La technique des interférences ARN permet d'inhiber l'expression du PAR-2 (ARNm et protéines) dans les CML bronchiques humaines. Le signal calcique induit par la tryptase et SLIGKV est diminué pour les CML transfectées, alors que les effets de la trypsine et de la caféine sur la réponse calcique ne sont pas altérés. Ces résultats montrent que l'expression du PAR-2, mais aussi l'une des fonctions essentielles de ce récepteur, sont inhibées par les siRNA. Ils confirment également que les effets de la tryptase et de SLIGKV sur le signal calcique sont en rapport avec l'activation du PAR-2, alors que ceux de la trypsine impliquent d'autres récepteurs.

La 2^e partie de l'objectif, i.e, l'utilisation de vecteurs viraux est encore en cours de réalisation et fait l'objet d'un travail de thèse d'Université. Le choix des séquences shRNA spécifiques de l'ARNm du PAR-2 a été réalisé à l'aide d'outils bioinformatiques actuellement disponibles (www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai). Trois types de plasmides ont été produits générant des lentivirus de type « human immunodeficiency virus » ou HIV pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G). Les gènes codant pour les protéines accessoires (tat, Rev, vif et orf) ont été également supprimés. Un deuxième vecteur lentiviral est utilisé pour ce travail. Il utilise le plasmide de transfert pLV-tTR-KRAB-Red qui code pour la protéine de fusion tTR-KRAB. Elle associe l'élément tTR ou « tetracycline repressor » et le domaine KRAB de Kox1 humain. La protéine tTR se fixe sur TetO correspondant au pLV-THM, en absence de doxycycline. En présence de doxycycline, tTR ne peut plus se fixer à TetO, levant l'inhibition de KRAB et permettant l'activation des promoteurs EF1 α et H1. Ainsi, la transcription de la GFP et des shRNA devient possible. L'intérêt d'utiliser un tel vecteur est donc de contrôler l'activation du pLV-THM et ainsi, la quantité de shRNA anti-PAR-2 produit, selon la présence/absence de doxycycline.

Les cellules musculaires lisses co-transfectées seront mises en culture en l'absence ou en présence de doxycycline. Les premiers résultats montrent une abolition de l'ARNm du PAR-2 pour les CML transfectées avec le lentivirus produisant le shRNA 1. Des expérimentations complémentaires sont en cours en RT-PCR quantitative, western blot, et cytométrie en flux.

L'étude fonctionnelle sur la prolifération et l'apoptose des cellules musculaires lisses bronchiques humaines sont en cours. Un défaut de prolifération des cellules musculaires lisses transfectées par les shRNA anti-PAR-2 est attendu.

Objectif spécifique n° 6 :

La sensibilisation chronique avec l'allergène majeur d'acarien Der.p1 et avec l'ovalbumine a été appliquée à des souris KO pour les différents gènes des molécules impliquées dans les phénomènes d'adhérence. Cette partie du projet a été effectuée en collaboration avec l'équipe de Ursula Gunthert (Institute for Medical Microbiology, University of Basel Switzerland). Dans ce modèle murin d'asthme allergique chronique, le nombre de mastocytes dans la couche musculaire lisse bronchique, l'HRB et le dépôt de collagène au sein de la paroi bronchique sont fortement diminués chez les souris asthmatiques CD44 v6/v7^{-/-} par rapport aux animaux CD44 v6/v7^{-/-} non sensibilisés. Ce travail fait l'objet d'une publication actuellement soumise.

Publications issues du contrat

1 El-Shazly A, Berger P, Girodet P, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara M. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol.* 2006 ;176(3):1860-8.

2 Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax.* 2007;62(1):8-15.

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

Publication en collaboration

1. Hollins F, Kaur D, Yang W, Cruse G, Saunders R, Sutcliffe A, Berger P, Ito A, Brightling C, Bradding P
Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6. *J Immunol.* 2008;181(4):2772-80.

Publications soumises

1. Girodet PO, Ozier A, Trian T, Begueret H, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Berger P, Tunon de Lara M. Crucial role of both CD51 and CD44 variant 6 isoform in mast cell – airway smooth muscle interaction in asthma.

2. Girodet PO, Berger P, Trian T, Ousova O, Begueret H, Pujol W, Vernejoux JM, Günthert U, Marthan R, Tunon de Lara M
Disruption of CD44 Variant Isoforms Abrogates Mast Cell Myositis and Airway Remodelling in Asthma

Communications internationales

1. Human airway smooth muscle cells-derived fractalkine needs VIP to induce mast cell chemotaxis through a calcium independent PKC pathway.

Berger P, El-Shazly A, Girodet PO, Ousova O, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Respiratory Society Lung science 2005, Taormina.
Eur Respir J 2005.

2. Airway smooth muscle cells-derived fractalkine needs VIP to induce mast cell chemotaxis.

Berger P, El-Shazly A, Girodet PO, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Respiratory Society 2005, Copenhagen.
Eur Respir J 2005, 26 (suppl 49) : 128s.

3. Inflammation of airway smooth muscle in allergic asthma: an ultrastructural approach.

Begueret H, Berger P, Girodet PO, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Respiratory Society 2005, Copenhagen.
Eur Respir J 2005, 26 (suppl 49) : 712s.

4. Human airway smooth muscle cell and mast cell interaction is mediated via CD44 and CD51 in asthma.

Girodet PO, Berger P, Ousova O, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Respiratory Society 2005, Copenhagen.
Eur Respir J 2005, 26 (suppl 49) : 712s.

5. RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells.

Trian T, Ousova O, Girodet PO, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P

European Respiratory Society 2005, Copenhagen.
Eur Respir J 2005, 26 (suppl 49) : 128s.

6. Airway smooth muscle induces human lung mast cell proliferation and survival.
Hollins F, Kaur D, Saunders R, Woodman L, Berger P, Sutcliffe A, Brightling C, Bradding P
British Thoracic Society 2005
Thorax 2005,60: 112-112 Suppl. 2, DEC

7. Mast cell myositis is associated with airway remodelling in a chronic model of murine asthma.

Berger P, Girodet PO, Begueret H, Molimard M, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Respiratory Society 2006, Munich
European Respiratory Journal 2006, 28 (Suppl 50) : 226s.

8. Disruption of CD44 variant 6 abolished bronchial hyperresponsiveness, inflammation and mast cell myositis in a murine model of asthma.

Girodet PO, Berger P, Begueret H, Gunthert U, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Respiratory Society 2006, Munich
European Respiratory Journal 2006, 28 (Suppl 50) : 217s.

9. Airway smooth muscle induces human lung mast cell proliferation and survival.
Hollins F, Kaur D, Saunders R, Woodman L, Berger P, Brightling C, Bradding P
British Society for Allergy and Clinical Immunology 2006.
Clinical and Experimental Allergy 2006, 36 (9): 1204-1204 SEP

10. CD44 and CD51 expression by airway smooth muscle layer in asthmatic patients.
Girodet PO, Berger P, Trian T, Ousova O, Begueret H, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon de Lara JM
European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2007, Göteborg
Allergy 2007, 62 6-6 Suppl. 83

Communications nationales

1. Utilisation de la technique d'interférence ARN dans l'étude du rôle physiologique du récepteur PAR-2 des CML bronchiques humaines.

Trian T, Ousova O, Girodet PO, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P
J2R Reims 2005

2. Approche ultrastructurale de l'inflammation du muscle lisse bronchique dans l'asthme allergique.

Bégueret H, Berger P, Girodet PO, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon de Lara JM
J2R Reims 2005

3. Human airway smooth muscle cell and mast cell interaction is mediated via CD44 and CD51 in asthma

Girodet PO, Berger P, Trian T, Ousava O, Marthan R, Tunon de Lara JM
J2R Reims 2005

4. Rôle de la matrice extracellulaire dans l'adhésion mastocytes-cellules musculaires lisses bronchiques.

Girodet PO, Berger P, Ousova O, Marthan R, Tunon de Lara JM
Congrès Français d'Allergologie 2006, Paris. Poster.

5. Infiltration mastocytaire du muscle lisse bronchique dans un modèle murin d'asthme allergique chronique.

Girodet PO, Berger P, Bégueret H, Marthan R, Tunon de Lara JM
Congrès Français d'Allergologie 2006, Paris. Poster.

6. Régulation du remodelage des voies aériennes par les isoformes de CD44 dans un modèle murin d'asthme allergique chronique.

Girodet PO, Berger P, Bégueret H, Marthan R, Tunon de Lara JM
Congrès Français d'Allergologie 2006, Paris. Poster.

Discussion et Conclusions

L'infiltration (micro-localisation) des mastocytes au sein de la couche musculaire lisse bronchique résulte d'un dialogue qui s'établit au cours de la sensibilisation entre le mastocyte et la cellule musculaire lisse (CML) aboutissant à la constitution d'une boucle d'auto-activation. Les travaux réalisés au cours de ce contrat ont permis, d'une part, d'approfondir les mécanismes de l'interaction mastocyte - cellule musculaire lisse et, d'autre part, d'identifier des cibles thérapeutiques innovantes.

En terme de mécanismes tout d'abord, il a été montré que la fractalkine produite par les CML bronchiques contribue, au même titre que le TGF- β 1 et le SCF, au recrutement des mastocytes au sein du muscle lisse bronchique et participe ainsi à l'organisation et à l'entretien de l'inflammation des voies aériennes dans la maladie asthmatique. De plus, la myosite mastocytaire observée chez les sujets asthmatiques est positivement corrélée avec l'expression de CD44 par le muscle lisse bronchique indiquant que CD44v6 et CD51 jouent un rôle clé dans l'adhérence mastocytes-CML via la matrice extracellulaire. Enfin, il a été mis en évidence que l'adhérence augmente la survie mastocytaire et augmente la prolifération musculaire lisse. De plus l'interaction favorise la dégranulation mastocytaire et se présente donc comme un mécanisme additionnel indépendant de la dégranulation allergénique.

En terme de cible thérapeutique ensuite, une sous-population mastocytaire, les mastocytes CXCR3 positifs, apparaît particulièrement importante à cibler dans l'asthme. En effet ces mastocytes sont recrutés en priorité dans le muscle lisse de l'asthmatique et ils pourraient présenter des caractéristiques phénotypiques différentes. Au niveau des cellules musculaires lisses, la technique des interférences ARN permet d'inhiber l'expression du PAR-2 (ARNm et protéines) dans les CML bronchiques humaines. Cette extinction transitoire s'accompagne d'une perte des réponses fonctionnelles médiées PAR-2. Une extinction de plus longue durée par vecteurs lentiviraux est mise au point et les résultats fonctionnels sont en cours d'investigation. Enfin, l'extinction des gènes sodants pour les variants 6 et 7 de CD44 (animaux CD44 v6/v7^{-/-}) en bloquant l'adhérence mastocytaire diminue l'HRB et le remodelage bronchique.

Parmi les objectifs du contrat, celui en rapport avec les conséquences fonctionnelles de l'adhérence (objectif n° 3) a été plus rapidement réalisé par l'équipe de Leicester avec laquelle nous avons collaboré. Dès lors, cet objectif a été abandonné. Celui en rapport avec l'identification de cibles thérapeutiques au niveau du mastocyte (objectif n° 4) n'a pas encore donné lieu à publication car il demande des expériences complémentaires qui ont été retardées faute de moyens humains au sein du laboratoire. Celui concernant l'extinction de PAR -2 (objectif n° 5) apparaît prometteur dans le cadre de l'extinction transitoire et demande des confirmations fonctionnelles maintenant que l'extinction de longue durée est pratiquement au point.

Au total, les 6 objectifs spécifiques de ce contrat ont fait l'objet d'investigations approfondies et ont globalement été atteints. Les objectifs n° 1, 2 et 5 ont, chacun, fait l'objet d'une publication scientifique. L'objectif n° 3 a fait l'objet d'une publication en collaboration. Les objectifs 2 et 6 font, chacun, l'objet d'un article en cours de soumission. Les objectifs 4 et 5 ont fait l'objet de mémoires de M2 et de travaux de thèse. Enfin, 16 communications dont 10 internationales ont été réalisées. Les travaux menés dans le cadre d'une thèse (shRNA – lentivirus) se poursuivent actuellement.