

LIONEL LOUBAKI

**MOLÉCULES DE CO-STIMULATION IMPLIQUÉES DANS  
L'INTERACTION ENTRE LES FIBROBLASTES  
BRONCHIQUES ET LES LYMPHOCYTES T  
DANS L'ASTHME**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Médecine Expérimentale  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

## RÉSUMÉ

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes dont les caractéristiques principales sont le remodelage bronchique et la fibrose sous épithéliale. Les cellules structurales et inflammatoires interagissent les unes avec les autres tant par contact direct que par l'entremise de médiateurs sécrétés. Cette interaction contribue de manière importante à la régulation du processus inflammatoire qui a cours dans la muqueuse bronchique. Les fibroblastes et les lymphocytes T produisent de nombreuses cytokines et médiateurs proinflammatoires dont l'interleukine-6 (IL-6). L'expression de cette dernière est étroitement associée avec la présence de fibrose dans de nombreux tissus. L'IL-6 agit également comme facteur de croissance et d'activation pour les lymphocytes T. L'objectif de ce projet est d'identifier les molécules de co-stimulation impliquées dans la communication entre les fibroblastes et les lymphocytes T ainsi que de déterminer leur rôle dans la production d'IL-6 par les fibroblastes lors de l'interaction entre ces deux types cellulaires. Les nombreuses investigations menées indiquent que les lymphocytes T entraînent l'augmentation de la production de l'IL-6 autant par les fibroblastes de sujets sains que ceux provenant de sujets asthmatiques. Cette augmentation de la production d'IL-6 se fait principalement par l'entremise de molécules de surface. L'interaction LFA-1/ICAM-1 semble être impliquée dans cette augmentation de la production d'IL-6. Ces résultats montrent à quel point l'interaction entre les fibroblastes et les lymphocytes T peut moduler la production de cytokines tel l'IL-6 et par conséquent dans quelle mesure elle peut influencer le processus inflammatoire.

## AVANT-PROPOS

Le présent mémoire résulte de plusieurs mois de travail. Il s'agit d'un aboutissement que je dois aux nombreuses personnes qui m'ont aidées et accompagnées quotidiennement dans la réalisation de mes études et dans l'achèvement de ce deuxième cycle universitaire.

En premier lieu, je voudrais remercier le Docteur Jamila Chakir avec qui je travaille depuis près de deux ans et demi et qui m'a donné la chance de faire mon stage de fin de Baccalauréat et ensuite une maîtrise dans son laboratoire. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour la confiance dont elle fait preuve à mon égard et pour tous ses conseils et encouragements dans mes moments de doute. Ces années passées dans ce laboratoire m'ont permis de développer grandement mon sens de l'organisation. Merci également à mon codirecteur, le Docteur Walid Mourad, pour ses nombreux éclairages scientifiques, ses recommandations et conseils.

J'aimerais également remercier Eric Jacques, et Abdehabib Semlali respectivement assistant de recherche et étudiant post doctoral avec qui j'ai appris et continue d'apprendre énormément en laboratoire. Je voudrais également les remercier pour leur grand esprit de camaraderie ainsi que pour leur sollicitude à mon égard. Je voudrais leur dire un grand «Merci» pour les encouragements, merci de m'avoir écouté, et surtout merci d'avoir contribué à la merveilleuse ambiance de travail qui règne dans notre équipe. Je voudrais également témoigner ma gratitude aux autres membres de l'équipe à savoir, Sophie Plante et Sabrina Biardel qui ont également contribué significativement à ma formation dans le laboratoire. A toutes ces personnes je veux dire «un gros Merci » pour tous ces moments passés ensemble, merci pour les rires, les encouragements ainsi qu'aux remarques destinées à me faire aller de l'avant, bref merci pour tout.

Depuis toujours, j'ai bénéficié du soutien indéfectible des membres de ma famille. Ils ont toujours été présents depuis le début de mes études et m'ont toujours encouragés à aller plus loin et à laisser de côté mes appréhensions. Je voudrais donc, du plus profond de mon cœur leur exprimer mon éternelle gratitude et mon amour. Alors, «Merci!» à ma mère et ma grande mère, Mayenne Liliane et Mayenne Henriette, ainsi qu'à ma sœur Lyz et à mon petit frère Habib

(junior) qui m'ont toujours poussé à ne pas baisser les bras et à poursuivre mes études. Merci pour ce que vous avez fait pour moi.



## TABLE DES MATIÈRES

	<b>Page</b>
<b>Résumé</b> .....	II
<b>Avant-propos</b> .....	III
<b>Table des matières</b> .....	IV
<b>Liste des figures</b> .....	VI
<b>Liste des tableaux</b> .....	VIII
<b>Liste des abréviations</b> .....	IX
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	1
1.1. Généralités sur l'asthme.....	2
1.2. L'inflammation dans l'asthme.....	5
1.2.1. L'inflammation allergique dans l'asthme.....	7
1.2.2. Les cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme allergique.....	9
1.2.3. Les lymphocytes T dans l'asthme allergique.....	11
1.3. Remodelage bronchique .....	14
1.3.1. Implication des cellules structurales dans le remodelage.....	16
1.3.2. Fibroblastes et myofibroblates dans le remodelage.....	17
1.3.3. Interaction entre les fibroblastes et les cellules inflammatoires.....	19
1.4. Les cytokines.....	21
1.4.1. L'interleukine-6.....	21
1.5. Les molécules de surface.. ..	25
1.5.1. Interaction ICAM-1/LFA-1.....	27
1.5.2. Interaction CD28/B7.....	29
1.5.3. Interaction CD40/CD40L.....	30
1.5.4. Interaction ICOS/ICOSL.....	32
1.5.5. Interaction OX40/OX40L.....	33

<b>Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de l'étude.....</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre 3 : Matériel et méthodes.....</b>	<b>38</b>
3.1. Sélection des sujets.....	39
3.2. Culture des fibroblastes bronchiques.....	40
3.3. Isolation des lymphocytes T.....	40
3.4. Coculture de fibroblastes et de lymphocytes T.....	42
3.5. Extraction et dosage des ARNs.....	44
3.6. Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction(RT-PCR).....	44
3.7. Polymerase Chain Reaction en temps réel (PCR <sub>tr</sub> ).....	44
3.8. Clonage des standards .....	45
3.9. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	47
3.10. Cytométrie de flux.....	47
3.11. Analyses statistique.....	48
<b>Chapitre 4 : Résultats.....</b>	<b>49</b>
4.1. Courbe standard pour le PCR.....	50
4.2. Expression de l'ARNm de IL-6 après co-culture.....	52
4.3. Expression de LFA-1 et ICAM-1.....	54
4.4. Expression du CD28 et des molécules B7.....	59
4.5. Expression du CD40L et du CD40 .....	62
4.6. Expression ICOS.....	64
4.7. Expression OX40.....	65
<b>Chapitre 5 : Discussion.....</b>	<b>66</b>
<b>Références.....</b>	<b>72</b>

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
<b>Figure 1.</b> Sections histologiques de muqueuses bronchiques normale et asthmatique.....	6
<b>Figure 2.</b> Schéma du processus menant à la réaction allergique aiguë et chronique.....	8
<b>Figure 3.</b> Facteurs influençant la déviation de la réponse immune vers une réponse de type Th1 ou Th2.....	13
<b>Figure 4.</b> Caractéristiques histopathologiques du remodelage bronchique dans l'asthme.....	15
<b>Figure 5.</b> Le complexe de récepteurs de IL-6.....	24
<b>Figure 6.</b> Illustration de quelques interactions impliquées dans la communication entre les cellules T et les cellules présentatrices de l'antigène.....	26
<b>Figure 7.</b> Concentration d'IL-6 dans les surnageants de co-culture des fibroblastes-lymphocytes T par test ELISA.....	35
<b>Figure 8.</b> Présentation schématique du protocole expérimentale des co-cultures de fibroblastes et de lymphocytes T .....	43
<b>Figure 9.</b> Vecteur p-Drive.....	46
<b>Figure 10.</b> Amplification de différentes concentrations de standards.....	50
<b>Figure 11.</b> Exemple d'une courbe standard.....	51
<b>Figure 12.</b> Expression de l'ARNm de l'IL-6 mesurée chez les fibroblastes après co-cultures de 4 heures avec les lymphocytes T.....	53
<b>Figure 13.</b> Expression de LFA-1 chez les lymphocytes T.....	55
<b>Figure 14.</b> Expression ICAM-1 chez les fibroblastes bronchiques.....	56
<b>Figure 15.</b> Expression de ICAM-1 après co-cultures de 24 h chez les fibroblastes bronchiques.....	57
<b>Figure 16.</b> Expression CD28 chez les lymphocytes T.....	60
<b>Figure 17.</b> Expression B7-2 (CD86) chez les fibroblastes bronchiques.....	61
<b>Figure 18.</b> Expression CD40L chez les lymphocytes T.....	62
<b>Figure 19.</b> Expression CD40 chez les fibroblastes bronchiques.....	63
<b>Figure 20.</b> Expression ICOS chez les lymphocytes T.....	64
<b>Figure 21.</b> Expression OX40 chez les lymphocytes T.....	65

**LISTE DES TABLEAUX**

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1.</b> Classification du degré de sévérité de l'asthme .....	4
<b>Tableau 2.</b> Caractéristiques des sujets ayant fournis les fibroblastes.....	39
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques des sujets ayant fournis les lymphocytes T.....	41
<b>Tableau 4.</b> Expression de LFA-1 chez les lymphocytes T.....	54
<b>Tableau 5.</b> Fluorescence moyenne de ICAM-1 chez les fibroblastes bronchiques avant et après co-culture de 24 h.....	58

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm :</b>	Acide ribonucléique messager
<b>AP-1 :</b>	Activateur de protéines
<b>CMH :</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>DMEM :</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>dNTP :</b>	Desoxyribonucléotide triphosphate
<b>EGF :</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>ELISA :</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ERK :</b>	Extracellular regulated kinase
<b>FBS :</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FEV<sub>1</sub> :</b>	Forced Expiratory Volume in 1 seconde
<b>FGF :</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>GAPDH :</b>	Glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
<b>G-CSF :</b>	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
<b>GM-CSF :</b>	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
<b>INF :</b>	Interféron
<b>Ig :</b>	Immunoglobuline
<b>IGF :</b>	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>IPTG :</b>	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
<b>JAK :</b>	<i>Janus Kinases</i>
<b>JNK :</b>	Jun N-terminal Kinases
<b>kDa :</b>	Kilodalton
<b>KO :</b>	Knockout
<b>LB :</b>	<i>Luria Bertani (Agar, Bouillon)</i>
<b>LBA :</b>	Lavage Bronchoalvéolaire
<b>LTs :</b>	Leucotriènes

<b>M :</b>	Mastocytes
<b>mAc :</b>	Anticorps monoclonal
<b>MAPK :</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MBP :</b>	Protéines basiques majeures
<b>MEC :</b>	Matrice extracellulaire
<b>MMLV-RT :</b>	<i>Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase</i>
<b>MMP :</b>	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
<b>MPOC :</b>	Maladie pulmonaire obstructive chronique
<b>NFAT :</b>	Facteur nucléaire des cellules T activées
<b>NF-<math>\kappa</math>B :</b>	<i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>NK :</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NS :</b>	Non significatif
<b>PAF :</b>	<i>Platelet Activating Factor</i>
<b>PAI :</b>	Plasminogen Activator Inhibitor
<b>PDGF :</b>	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
<b>PEF:</b>	Peak Expiratory Flow
<b>PGs :</b>	Prostaglandines
<b>PI3K:</b>	Phosphoinositide-3 kinase
<b>RT-PCR :</b>	<i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>
<b>sIL-6R :</b>	Soluble IL-6 récepteur
<b>sCD40L:</b>	Soluble CD40Ligand
<b>SOCS:</b>	Suppressor of cytokine signalling
<b>STAT :</b>	<i>Signal Transducer and Activators of Transcription</i>
<b>TGF :</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>TIMP :</b>	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
<b>TNF :</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

**CHAPITRE 1**

**INTRODUCTION**

## **1.1. Généralités sur l'asthme**

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes qui apparaît généralement au cours des premières années de vie mais également à l'âge adulte [1]. Son incidence et sa morbidité n'ont cessé d'augmenter dans les pays industrialisés au cours des dernières décennies. Au Canada, plus de deux millions de personnes ont déclaré avoir été diagnostiquées comme souffrant d'asthme en 2003. Santé Canada a ainsi estimé que 8,4 % des personnes de 12 ans et plus, soit 9,6 % des femmes et 7,1 % des hommes souffrent d'asthme dans les collectivités canadiennes [2]. Ces chiffres nous montrent à quel point l'asthme constitue un problème de santé des plus importants.

L'American Academy of Allergy Asthma and Immunology recense l'asthme allergique ou extrinsèque, l'asthme non allergique et l'asthme professionnel. L'asthme allergique fait suite au processus inflammatoire enclenché par une agression, causée par différents allergènes de l'environnement (les pollens, les poils d'animaux, la poussière et les acariens)[3-5]. L'asthme non allergique peut être déclenché par de nombreux stimuli tel qu'un exercice vigoureux, l'air froid ou par tout autre stimulus en mesure d'induire une hyperréactivité bronchique. L'asthme professionnel peut être causé par divers stimuli spécifiques tels des poussières présentes dans un environnement de travail. Ainsi, les sujets asthmatiques sont hypersensibles à certains excitants. Le contact avec un ou plusieurs de ces stimuli va induire une modification de la structure bronchique ainsi que de l'inflammation. Cette inflammation va conduire à de l'hyperréactivité bronchique, qui elle va entraîner la bronchoconstriction ainsi qu'une production excessive de mucus [6;6;7]. Cette bronchoconstriction va ultimement conduire à l'apparition des symptômes d'asthme que sont, la toux sèche avec des expectorations, des épisodes de dyspnée, une respiration sifflante ainsi qu'une augmentation du rythme cardiaque lors d'une crise sévère. Ces symptômes font donc suite à une hyperréactivité bronchique conduisant à une obstruction variable réversible des bronches. L'intensité, la durée et la fréquence de ces symptômes donnent un indice sur le degré de sévérité de la maladie [8].



Il convient de signaler que de nombreux facteurs augmentent les risques de développer de l'asthme. Parmi ceux-ci, le fait d'avoir souffert d'infections respiratoires durant l'enfance, l'obésité, le tabagisme, des facteurs génétiques et un faible poids à la naissance [6-8].

Il existe plusieurs classes d'asthme. Le «National Asthma Education and Prevention Program» des États-Unis le classe en quatre catégories : l'asthme léger intermittent, l'asthme léger persistant, l'asthme modéré persistant et l'asthme sévère persistant. Cette classification est basée sur la sévérité des symptômes, la présence ou non de symptômes nocturnes ainsi que sur la qualité des tests de fonction pulmonaire (Tableau 1) [6;8].

	Symptoms* *	Nighttime Symptoms	Lung Function
<b>STEP 4</b> Severe Persistent	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Continual symptoms</li> <li>■ Limited physical activity</li> <li>■ Frequent exacerbations</li> </ul>	Frequent	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FEV<sub>1</sub> or PEF ≤ 60% predicted</li> <li>■ PEF variability &gt; 30%</li> </ul>
<b>STEP 3</b> Moderate Persistent	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Daily symptoms</li> <li>■ Daily use of inhaled short-acting beta<sub>2</sub>-agonist</li> <li>■ Exacerbations affect activity</li> <li>■ Exacerbations ≥ 2 times a week; may last days</li> </ul>	> 1 time a week	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FEV<sub>1</sub> or PEF &gt; 60% – &lt; 80% predicted</li> <li>■ PEF variability &gt; 30%</li> </ul>
<b>STEP 2</b> Mild Persistent	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptoms &gt; 2 times a week but &lt; 1 time a day</li> <li>■ Exacerbations may affect activity</li> </ul>	> 2 times a month	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FEV<sub>1</sub> or PEF ≥ 80% predicted</li> <li>■ PEF variability 20–30%</li> </ul>
<b>STEP 1</b> Mild Intermittent	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptoms ≤ 2 times a week</li> <li>■ Asymptomatic and normal PEF between exacerbations</li> <li>■ Exacerbations brief (from a few hours to a few days); intensity may vary</li> </ul>	< 2 times a month	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FEV<sub>1</sub> or PEF ≥ 80% predicted</li> <li>■ PEF variability &lt; 20%</li> </ul>

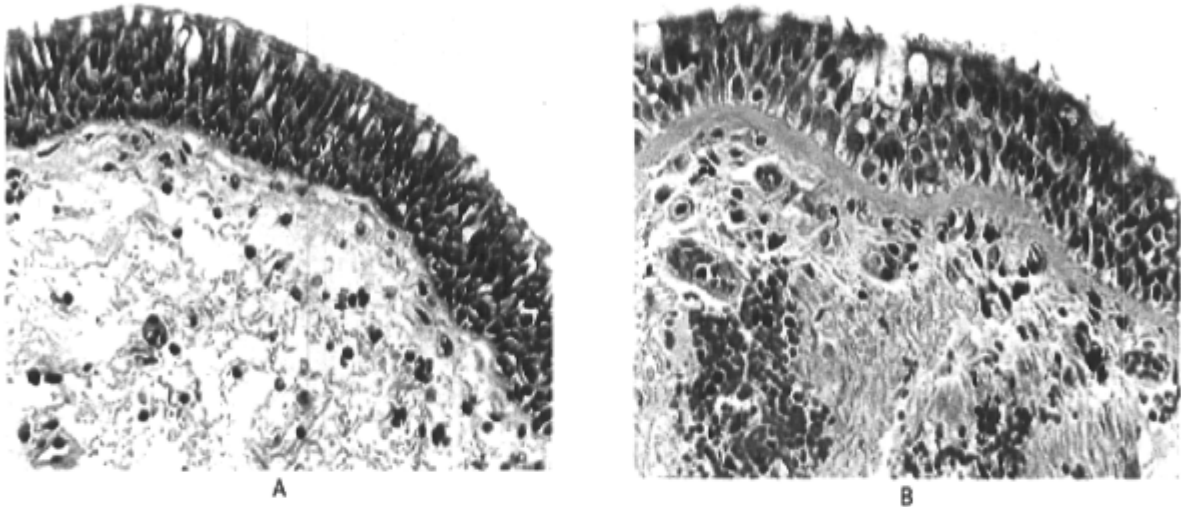
**Tableau 1 : Classification du degré de sévérité de l'asthme.**

Cette classification est basée sur la sévérité des symptômes et la nature des tests de fonction pulmonaire. FEV<sub>1</sub> : Forced expiratory volume in 1 seconde; PEF : Peak expiratory flow. National Asthma and Educational Program, Clinical practice guidelines Jul 1999. *Expert Panel Report 2, NIH publication*[6].

## **1.2. L'inflammation dans l'asthme**

De nombreux facteurs contribuent au développement du processus inflammatoire dans l'asthme. Il s'agit principalement de facteurs génétiques et environnementaux [4;5]. Ainsi, grâce notamment à des analyses histopathologiques de biopsies bronchiques, nombre d'études ont mis en évidence la présence d'inflammation chez les sujets asthmatiques. Ces biopsies montrent une infiltration de neutrophiles, d'éosinophiles, de lymphocytes T, une dégranulation des mastocytes, une desquamation de l'épithélium bronchique, un œdème de la muqueuse ainsi qu'un épaississement de la membrane basale (Figure 1) [9-11]. Ces caractéristiques du remodelage bronchique qui font suite au processus inflammatoire sont observées chez les sujets souffrant d'asthme modéré à sévère et elles varient avec le degré de sévérité de la maladie.

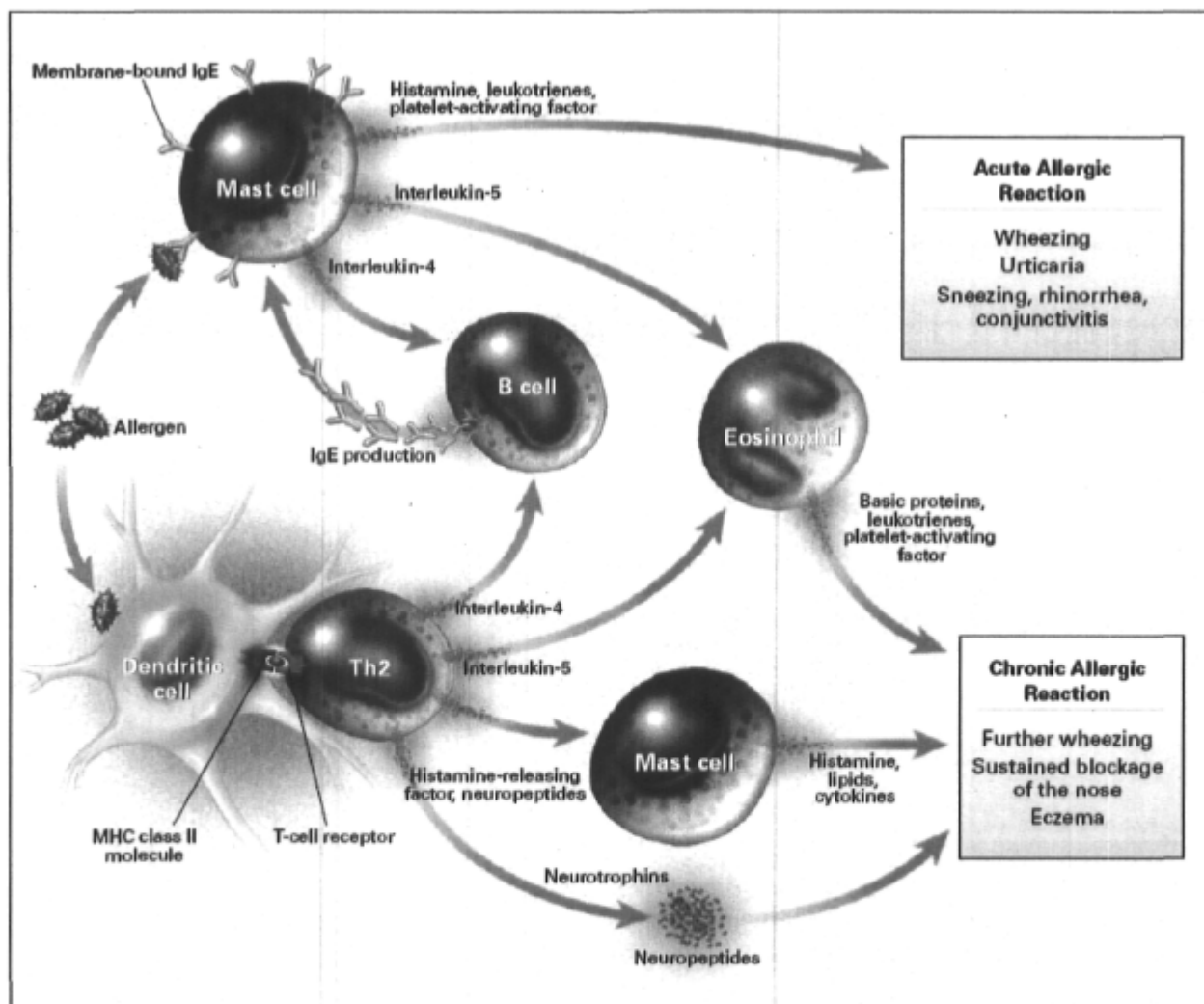
D'autres études portant sur l'inflammation dans l'asthme montrent une présence accrue de cytokines et de chimiokines dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) de sujets asthmatiques [12;13]. Ces cytokines, chimiokines et autres médiateurs de l'inflammation produits tant par les cellules résidentes que par les cellules immunitaires peuvent influencer la réponse inflammatoire de diverses manières. En effet, certains d'entre eux sont en mesure d'activer des facteurs de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire asthmatique, dont le facteur nucléaire-  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), activateur de protéines (AP-1), facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) et plusieurs membres de la famille des «Signal transducers and activator of transcription» (STAT) [14;15]. Ces facteurs de transcription agissent sur les gènes qui codent pour les cytokines, les chimiokines, les molécules d'adhésion et les autres médiateurs impliqués dans l'induction et la pérennité de la réponse inflammatoire [16].



**Figure 1 :** Sections histologiques de muqueuses bronchiques normale (A) et asthmatique (B). Chez les sujets asthmatiques, on note un épaississement de la membrane basale, une desquamation de l'épithélium ainsi qu'une infiltration accrue de cellules inflammatoires. (Busse WW, et al. 2001. Asthma. *N Engl J Med.* 344: 350-62 [17]).

### 1.2.1. L'inflammation allergique dans l'asthme

L'asthme est souvent associé à de l'atopie (facteur de risque le plus clairement associé à son développement), qui est la prédisposition génétique à produire de manière inappropriée des immunoglobulines (IgE) en réponse à des allergènes communs (les pollens, les poils d'animaux, la poussière et les acariens) [4;5;18]. Les patients atopiques présentent un taux sérique d'IgE élevé ainsi que des réactions positives aux tests d'allergies cutanées [19]. L'inhalation d'un allergène par des sujets asthmatiques donne lieu à deux types de réponses : la réaction d'hypersensibilité immédiate qui se produit en quelques minutes et la réaction retardée ou tardive qui se produit entre six et neuf heures après l'exposition à l'allergène. La réaction immédiate implique l'activation des mastocytes par le pontage d'anticorps IgE par l'allergène. Ces anticorps IgE sont produits par les lymphocytes B activés suite à la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques [20]. Le complexe ainsi formé par l'allergène, l'IgE et le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) à la surface des mastocytes, mais aussi des basophiles, va conduire à la dégranulation des mastocytes, donc à la libération de médiateurs nouveaux et préformés, dont l'histamine et la tryptase. Cette dégranulation conduit également à la libération de médiateurs dérivés des lipides membranaires (leucotriènes LT), facteur d'activation des plaquettes (PAF), prostaglandines (PG) ainsi que de cytokines qui vont ultimement conduire à une bronchoconstriction et à de l'œdème bronchique. Chez certains sujets, selon la concentration de l'allergène, la réaction immédiate pourra être suivie d'une réaction tardive plus ou moins importante alors que, d'autres n'en présenteront jamais. Cette dernière se distingue par l'influx et l'activation des lymphocytes, des éosinophiles, des macrophages ainsi que des autres cellules inflammatoires[19]. Cet influx de cellules inflammatoires fait suite à la production de cytokines induite par la présentation de l'antigène. Ces cytokines sont en mesure d'induire et d'augmenter l'expression des molécules d'adhésion, procurant ainsi un mécanisme par lequel les cellules inflammatoires peuvent migrer de la circulation sanguine vers les voies aériennes [20;21]. Ces cellules inflammatoires vont à leur tour augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires et ainsi contribuer à la perpétuation de ce mécanisme de migration.



**Figure 2 :** Schéma du processus menant à la réaction allergique aiguë et chronique.

La réaction allergique fait suite à l'induction par l'antigène de la libération d'histamine et de médiateurs lipidiques provenant des mastocytes qui donnera lieu à une réponse aiguë ou à une réponse chronique. (Kay AB. 2001. Allergy and allergic diseases, First of two parts. *N Engl J Med.* 344(1) :30-37 [19]).

### **1.2.2. Les cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme allergique**

Les cellules inflammatoires jouent un rôle central dans la protection de l'organisme contre les infections ainsi que contre les agressions environnementales de toutes sortes. Toutefois, ce processus de protection peut être plus délétère que profitable entraînant même dans les cas chroniques de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles. L'inflammation chronique qui caractérise l'asthme et d'autres maladies inflammatoires, implique une infiltration de cellules immunitaires (éosinophiles, mastocytes, lymphocytes, macrophages, etc...) qui, par la sécrétion de médiateurs tels l'histamine, le PAF et les LT conduisent à une bronchoconstriction, à l'apparition d'œdème dans les voies respiratoires ainsi qu'à la sécrétion de mucus [22]. Ces cellules immunitaires orchestrent des aspects différents de l'inflammation allergique.

Ainsi, les éosinophiles jouent un rôle important dans la réaction allergique retardée. Suite à leur activation, les éosinophiles libèrent, à partir de leurs granules des protéines toxiques et des radicaux libres qui tuent les micro-organismes et les parasites. Cette activation induit une production importante de cytokines, de facteurs de croissance et de protéases qui vont stimuler les cellules environnantes comme les fibroblastes [23;24]. Dans l'asthme, certaines de ces protéines éosinophiliques jouent un rôle important à l'image de la protéine basique majeure (MBP) et des cystéinyl LT qui induisent entre autres effets, une augmentation de la réactivité et de la constriction des cellules musculaires lisses qui sont impliquées dans l'hyperréactivité bronchique. Ces protéines éosinophiliques produisent leur effet en causant notamment un dysfonctionnement des récepteurs muscariniques de type M2 présents chez les cellules musculaires lisses [23]. Une éosinophilie est également observée dans le tissu pulmonaire. L'administration d'anticorps anti-interleukine-5 (IL-5) conduit à une réduction du nombre d'éosinophiles ainsi qu'à celle de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire chez des sujets humains atteints d'asthme, ce qui atteste de l'importance des éosinophiles dans la physiopathologie de l'asthme [25].

D'autres cellules immunitaires comme les macrophages ont également des rôles importants dans l'asthme notamment grâce aux nombreuses cytokines (Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-8 et TGF notamment) et pourrait par la production de médiateurs tels les eicosanoïdes (LT), influencer sur le remodelage et la fibrogenèse comme c'est le cas dans la fibrose pulmonaire idiopathique [26].

Les mastocytes jouent également un rôle dans la physiopathologie de l'asthme notamment dans l'homéostasie du tissu, la cicatrisation et lors d'infections bactériennes. Il en existe deux sous-types, ceux contenant de la tryptase ( $M_T$ ) et ceux contenant aussi bien de la tryptase que de la chymase ( $M_{TC}$ ). Les mastocytes contenant de la tryptase ( $M_T$ ) prédominent dans les poumons [27]. L'activation des mastocytes conduit à la libération de médiateurs préformés, de protéases neutres, à la synthèse et à la libération de produits lipidiques et cytokines dont le «Platelet derived growth factor» (PDGF<sub>2</sub>), l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-13 et les LT [28-30]. Il est aujourd'hui établi que les mastocytes jouent un rôle déterminant dans la réaction immédiate, car l'administration de sodium cromoglycate et de  $\beta$ -agonistes tels le salbutamol, connus pour être des inhibiteurs de la dégranulation des mastocytes *in vitro*, entraîne une abolition complète de la réponse immédiate [28]. Les mastocytes sont également en mesure de présenter l'antigène aux cellules T [31]. Ils pourraient, sachant que le type de cellule présentatrice d'antigène influence de manière importante le phénotype des cellules T, participer à la différenciation en Th2 des lymphocytes [32].



### 1.2.3. Les lymphocytes dans l'asthme allergique

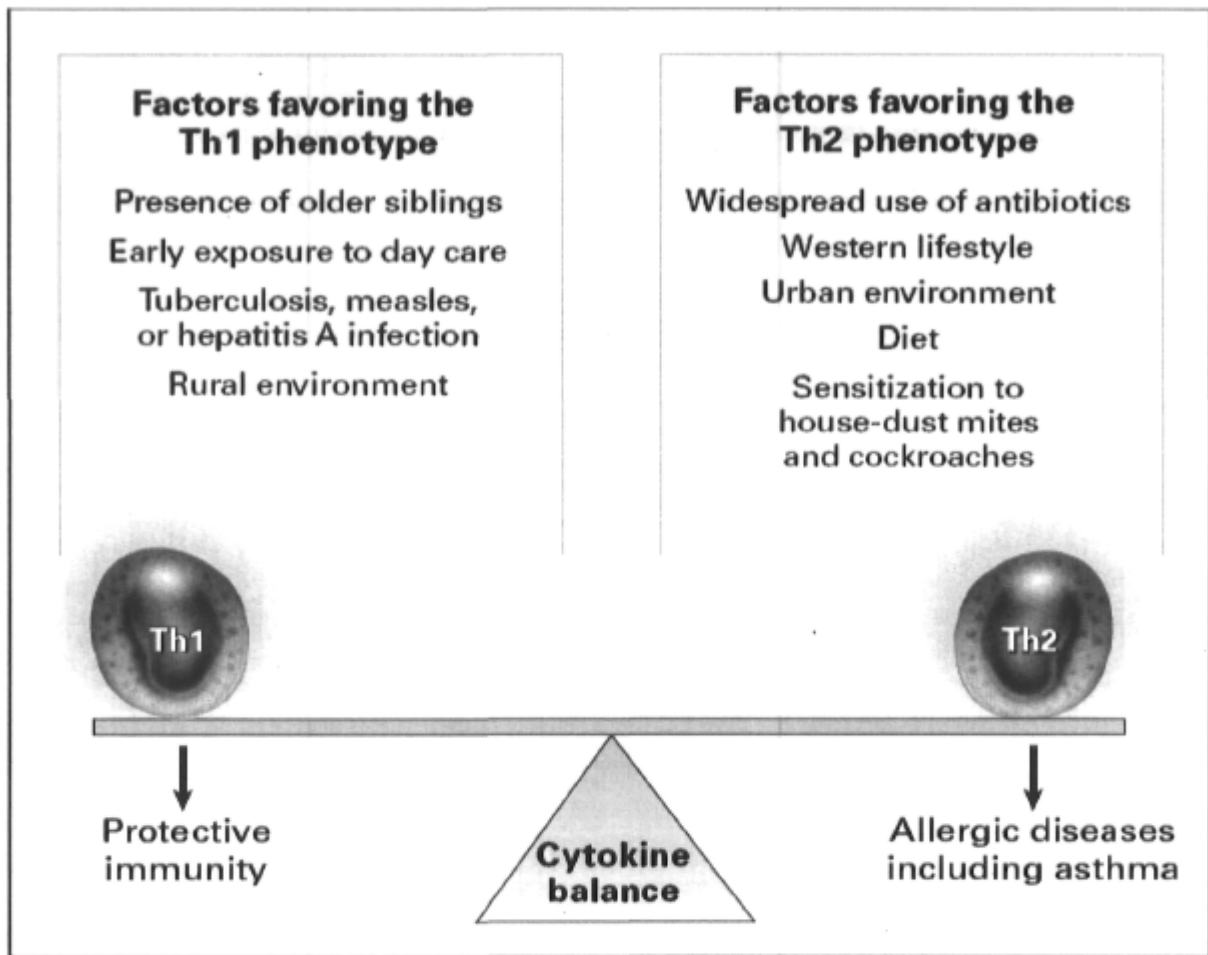
Les lymphocytes sont des cellules hématopoïétiques qui, en fonction du site où elles parviennent à maturité, peuvent se différencier en cellule T ou B [33]. Les lymphocytes B qui deviennent mature dans la moelle osseuse sont responsables de la production des anticorps, tandis que les lymphocytes T dont le site de maturation est le thymus sécrètent de nombreux médiateurs impliqués dans l'inflammation [33;34]. Dans le sang, la majorité des lymphocytes sont de type T et font un circuit entre les voies lymphatiques, les veinules post-capillaires, les régions paracorticales des ganglions lymphatiques, le canal thoracique et la circulation sanguine.

Il existe plusieurs sous-types de lymphocytes T soit, les T auxiliaires ou *helper* (Th ou CD4<sup>+</sup>), les T régulateurs, les T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) et les T mémoires (CD45RO<sup>+</sup>) [33]. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle de «catalyseur» aussi bien dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire que celle à médiation humorale qui est sous la dépendance des lymphocytes B. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire donc, sont capables d'attaquer directement les cellules exprimant l'antigène étranger [33].

Dans l'asthme, un nombre élevé de lymphocytes T est retrouvé dans le lavage bronchoalvéolaire ainsi que dans les biopsies bronchiques [35;36]. On note également un recrutement sélectif des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la muqueuse bronchique, lequel est corrélé à une baisse du nombre de lymphocytes circulants [37;38]. Cette augmentation du nombre de lymphocytes T activés est corrélée avec la sévérité de la maladie [39;40]. Sous l'influence de l'IL-4, les Th0 activées par les cellules présentatrices d'antigènes se différencient en lymphocytes T auxiliaires de type Th2 [32;41]. Ensuite, la déviation vers l'une ou l'autre de ces deux types de réponses est déterminée par l'environnement lors de la réponse immunitaire. Ainsi, la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules Th1 se fait en réponse à l'activation des cellules présentatrices de l'antigène par un pathogène sous l'influence de cytokines telle que l'IL-12 [32;41;42]. Les lymphocytes Th1 produisent des cytokines tels l'IL-2, la lymphotoxine- $\beta$  et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) notamment qui joue dans le cas de ce dernier un rôle important dans la destruction intracellulaire des pathogènes. La différenciation en Th2, a lieu en réponse à des allergènes environnementaux via des cellules présentatrices d'antigène (CPA) sous l'influence de cytokines telle l'IL-4 [41-43].

Les lymphocytes Th2 activés produisent de nombreuses cytokines dont l'IL-4, IL-13, l'IL-6, l'IL-5 et l'IL-10 impliquées dans la production d'IgE par les cellules B, ainsi que dans l'activation et le recrutement des éosinophiles et dans la production de mucus [42]. Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la production de cytokines de type Th2 tels l'IL-4, 5, 6, 13 et le «Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor» (GM-CSF) ainsi qu'une faible production de cytokines de type Th1 tel (IFN- $\gamma$ ) [42;44;45]. Chez les sujets sains, un équilibre existe entre la production de cytokines Th2 et Th1 tandis que, chez les sujets atopiques, on note une forte concentration de cytokines Th2. Ceci amène à penser qu'une rupture de l'équilibre entre les cytokines Th1 et Th2 aurait un rôle majeur dans le développement de l'asthme tels que l'énonce «la théorie de l'hygiène» qui stipule que l'exposition réduite aux microbes dans les premières années de la vie conduirait à une déviation de la réponse immunitaire spécifique aux allergène des cellules T mémoires vers un profil Th2 au lieu de la réponse de type Th1 (Figure 3) [43].

Ainsi, les lymphocytes T jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire en orchestrant les interactions entre les cellules prenant part à ce processus. Grâce notamment au large éventail de cytokines qu'ils produisent, lesquelles sont en mesure d'attirer, de stimuler et d'activer les autres types cellulaires, les lymphocytes T jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'asthme.

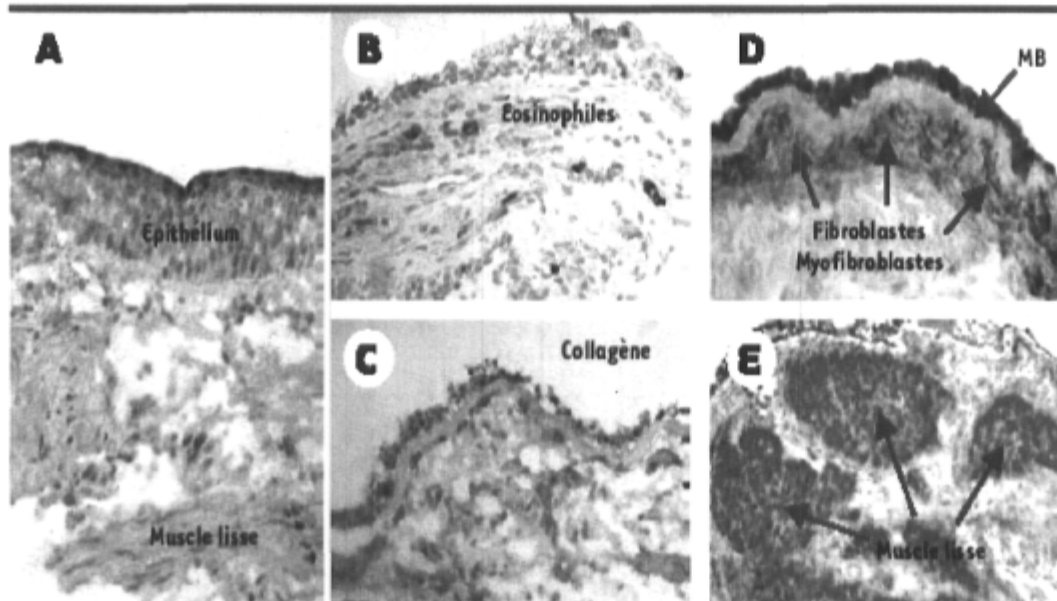


**Figure 3 :** Facteurs influençant la déviation de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 ou Th2. (Busse WW, et al. 2001. Asthma. *N Engl J Med.*; 344(5): 350-62 [17]).

### 1.3. Le remodelage bronchique

Le remodelage est un aspect critique de la réparation après une lésion et ceci, dans tous les organes. Il s'agit d'un processus dynamique qui associe la production et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) en réaction à une lésion inflammatoire aboutissant à un processus de réparation normal ou pathologique [46;47]. Parmi les caractéristiques du remodelage bronchique on note: une desquamation de l'épithélium, un épaissement de la membrane basale réticulaire causé par un dépôt de collagène, une fibrose sous épithéliale, une hyperplasie des glandes à mucus ainsi qu'une hyperplasie et une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Figure 4) [48-50].

La fibrose est l'une des composantes principale du remodelage, elle se produit au niveau de la membrane basale (MB). Cette dernière est composée de deux feuillets, soit la lame basale ou *basal lamina*, et la lame réticulaire ou *lamina reticularis* qui elle, est le site privilégié du remodelage chez les asthmatiques. C'est sous cette membrane que l'on observe une déposition de réticuline, de fibronectine et surtout de collagènes de type I et III qui sont produits par les fibroblastes et les myofibroblastes [50;51]. La prolifération des fibroblastes et des autres cellules résidentes couplée à un épaissement excessif du tissu conjonctif, sont les caractéristiques majeures de la fibrose. Nombre de cytokines et de médiateurs affectent le métabolisme du collagène. Le principal médiateur impliqué dans ce processus est le TGF- $\beta$ , qui stimule la synthèse du collagène, induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et prévient l'induction de l'apoptose, contribuant ainsi à la persistance des myofibroblastes [52-54]. L'accumulation de collagène est due à un déséquilibre entre sa synthèse et sa dégradation suite à une modification du ratio des métalloprotéinases de la matrice (MMP) sur les inhibiteurs des protéinases présents dans les tissus (TIMP) [55].



**Figure 4 : Caractéristiques histopathologiques du remodelage bronchique dans l’asthme.**

On note en (A), l’épithélium intact et absence d’infiltrat de cellules inflammatoires dans la muqueuse bronchique, absence de fibrose sous-épithéliale sur les biopsies effectuées chez un sujet sain. (B, C, D et E), biopsies provenant de patients asthmatiques sur lesquelles on observe une desquamation de l’épithélium ainsi que l’épaississement de la MB une augmentation nette de la masse musculaire, l’infiltration de la muqueuse bronchique par les cellules inflammatoires. On note également en (C et D), des fibroblastes et des myofibroblastes qui sont responsables de la sécrétion de collagène. (Benayoun et al. 2003. Le remodelage bronchique dans l’asthme: mécanismes et enjeux thérapeutiques. *Médecine/Sciences*; 19 : 319-26 [56]).

### 1.3.1. Implication des cellules structurales dans le remodelage

Le remodelage bronchique est un processus complexe impliquant de nombreuses interactions cellulaires et dans lequel les cellules structurales jouent un rôle des plus déterminants. Les cellules structurales ne sont pas des cellules passives. Au même titre que les lymphocytes T, les éosinophiles ou les mastocytes, elles participent à la réponse immunitaire et sont en mesure d'influencer cette dernière. Ces cellules, grâce aux contacts ainsi qu'aux médiateurs, cytokines et chimiokines qu'elles produisent, contribuent de manière significative au maintien de l'infiltrat inflammatoire [57]. L'interaction des cellules inflammatoires avec les cellules résidentes de la muqueuse bronchique ainsi qu'avec certains constituants de la matrice extracellulaire est impliquée dans les changements morphologiques et fonctionnels observés dans l'asthme.

Parmi ces cellules structurales, les cellules épithéliales jouent un rôle particulier. Elles constituent à la fois une barrière physique et chimique en raison du grand nombre de cytokines (IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1, l'epiderma growth factor (EGF), etc...) et médiateurs inflammatoires (PG LT, etc...) qu'elles produisent [58-61]. Les médiateurs produits par les cellules épithéliales ont un impact sur le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires. Ces médiateurs et cytokines agissent autant sur les cellules inflammatoires que sur les autres cellules résidentes. D'autres cellules résidentes telles les cellules musculaires lisses ont aussi un rôle important dans le remodelage bronchique. En effet, ces dernières produisent certaines protéines de la matrice extracellulaire tels les collagènes de type I et IV, la laminine ainsi que de nombreuses cytokines telle l'IL-6 contribuant ainsi significativement au remodelage [60;61]. Outre leur rôle dans le remodelage bronchique, les cellules musculaires lisses sont également capables de prendre une part active dans la réponse immunitaire grâce notamment à la grande quantité de médiateurs qu'elles produisent mais aussi par contact direct. En effet, ces dernières expriment des molécules de co-stimulation tel l'OX40L qui est impliqué dans l'activation des cellules T [22].

### 1.3.2. Fibroblastes et myofibroblastes dans le remodelage

Les fibroblastes sont des cellules structurales ubiquitaires qui permettent de maintenir l'intégrité du tissu. Les fibroblastes sont les principales cellules en charge de la sécrétion de différents composants de la MEC tels les collagènes, la fibronectine et la laminine notamment [62;63]. Certaines cytokines et facteurs de croissance tels l'IL-4 et le TGF- $\beta$ , induisent les fibroblastes à exprimer l' $\alpha$ -smooth muscle actine ( $\alpha$ -SMA), les transformant ainsi en myofibroblastes dont le nombre est augmenté dans l'asthme [63]. Cette augmentation du nombre de myofibroblastes est corrélée avec l'épaississement de la membrane basale ainsi qu'à une augmentation des collagènes I et III [64]. Des études ont montré que les fibroblastes provenant des sujets asthmatiques produisent significativement plus de protéoglycans (perlecan, versican, decorine) que les fibroblastes provenant de sujets sains [65]. D'autres études ont également montré que les fibroblastes bronchiques provenant de sujets asthmatiques présente une capacité réduite à dégrader le collagène comparé aux fibroblastes provenant de sujets sains et que l'expression de pro-collagène I en réponse à une stimulation par l'IL-4 ainsi que par le PDGF est augmentée chez les fibroblastes provenant de sujets asthmatiques [66-68]. Les fibroblastes et les myofibroblastes jouent un rôle central tant dans la formation que dans la dégradation de la MEC. En effet, il a été montré que ces derniers produisent moins de MMP-2 et plus TIMP-2 notamment modifiant le rapport TIMP/MMP en faveur du maintien de la MEC [67].

Les fibroblastes sont également en mesure de produire une grande panoplie de cytokines dont l'IL-6, l'IL-8 et le TGF- $\beta$ , des chimiokines et des prostanoïdes tels le PGE<sub>2</sub>, grâce auxquels ils peuvent influencer les cellules environnantes tant inflammatoires que structurales [67;68]. Les fibroblastes à leur tour peuvent être influencés par les médiateurs produits par d'autres cellules environnantes ou encore par les médiateurs qu'ils ont eux-mêmes produits. Ces médiateurs et autres cytokines jouent un rôle important dans la détermination de la nature et de la magnitude de l'infiltration des cellules inflammatoires [68]. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle actif des fibroblastes dans le processus inflammatoire. En effet, des fibroblastes bronchiques isolés de souris dans lesquels sont induit des granulomes de type Th1 et Th2 expriment différents types de chimiokines et produisent des nombreux types de protéines de la MEC, ce qui suggère

que les fibroblastes pourraient jouer un rôle dans la balance Th1-Th2 dans le tissu inflammé [69]. Les fibroblastes sont donc en mesure d'influencer le comportement des cellules inflammatoires, non seulement grâce aux cytokines, mais également en interagissant directement avec elles. Cette interaction directe se fait au moyen de protéines membranaires exprimées à la surface des cellules impliquées. Les fibroblastes expriment de nombreuses molécules de surface pouvant participer aux interactions cellulaires dont ICAM-1 et CD40. Il a été montré que la liaison du CD40 sur les fibroblastes de différents types de tissus mène à l'activation de nombreux facteurs de transcription entraînant les fibroblastes à produire notamment de hauts niveaux de cytokines [68].

Ainsi, grâce aux cytokines et autres facteurs de croissance qu'ils produisent, les fibroblastes peuvent contribuer à la présence continue de l'infiltrat leucocytaire dans la muqueuse bronchique présente dans l'asthme. Ceci conduit probablement à un dérèglement de la balance homéostatique entre le recrutement des leucocytes, leur prolifération, leur migration et leur mort.



### 1.3.3. Interaction entre les fibroblastes et les cellules inflammatoires

L'inflammation est un processus qui implique des interactions complexes à la fois des cellules immunitaires entre elles, des cellules résidentes entre elles et des interactions entre ces deux groupes. C'est ce dernier aspect qui est d'intérêt, particulièrement celui de l'interaction entre les fibroblastes et les cellules immunitaires. L'interaction des cellules résidentes tels les fibroblastes avec les cellules immunitaires est d'un grand intérêt sachant que dans l'asthme, une infiltration chronique ainsi qu'une augmentation du nombre de lymphocytes, de macrophages, d'éosinophiles et de mastocytes dans la muqueuse bronchique est constatée [24;40;68]. Ainsi, cette proximité histologique augmente la possibilité d'interactions de natures diverses entre les cellules immunitaires et les cellules résidentes de la muqueuse bronchique tels les fibroblastes. De nombreuses études ont été menées dans le but d'évaluer l'impact spécifique de certaines de ces interactions sur le processus inflammatoire et sur le remodelage des voies aériennes. Des études portant sur les interactions impliquant les mastocytes et les fibroblastes notamment ont montrées que les mastocytes induisent les fibroblastes (pulmonaires et dermiques) à produire une plus grande quantité d'IL-6 et de facteurs de croissance (Fibroblast Growth Factor (FGF-2), FGF7, GM-CSF). Les mastocytes induisent également une augmentation de la contractilité et de la prolifération des fibroblastes [70-72].

Outre les mastocytes, les éosinophiles, également sont en mesure de moduler le profil sécrétoire et celui des molécules d'adhésion exprimées par les fibroblastes. Ainsi, il a été montré que la MBP contenue dans les granules des éosinophiles en synergie avec le TGF- $\beta$  ou l'IL-1 induisent chez les fibroblastes pulmonaires une augmentation significative de la transcription de nombreux gènes ainsi que la sécrétion de plusieurs cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-11 qui vont contribuer à la pérennité du processus inflammatoire [73]. Les éosinophiles induisent chez les fibroblastes pulmonaires une augmentation de l'expression de l'ARN<sub>m</sub> de la fibronectine, des TIMP, des «Plasminogen Activator Inhibitor-1» (PAI-1) (inhibiteur des protéases à serine) qui sont impliqués dans le remodelage bronchique [55].

Les lymphocytes quant à eux, ont attirés et continuent d'attirer beaucoup d'attention quant à leur capacité à moduler les fibroblastes. Dans ce dernier cas, des études récentes ont montré que les lymphocytes T induisent l'augmentation de l'expression de la cyclooxygenase-2 (COX-2) et des molécules d'adhésion cellulaire telle ICAM-1 chez les fibroblastes pulmonaires, lesquels à leur tour induiraient une réduction de la transcription des gènes et de l'expression de protéines tel le TNF- $\alpha$  [74]. Des expériences antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que les lymphocytes T stimulent les fibroblastes bronchiques à produire une plus grande quantité de cytokines et de chimiokines telles l'IL-6 et l'IL-8 et que la majeure partie du signal à l'origine de cette augmentation est médiée par un contact direct entre les lymphocytes T et les fibroblastes bronchiques [75]. Toutefois, l'identité de molécules impliquées dans ce processus demeure inconnue.

En somme, grâce à leur capacité d'induire la production de nombreuses cytokines et médiateurs inflammatoires qui leur permettent d'avoir un impact notamment sur l'apoptose cellulaire et l'état d'activation des cellules, les interactions fibroblastes-lymphocytes T pourraient contribuer de manière significative au maintien du processus inflammatoire.

## **1.4. Les cytokines**

Les cytokines sont des médiateurs peptidiques impliqués dans l'inflammation. Leur mode d'action peut être paracrine, endocrine, autocrine ou juxtacrine [76]. Elles proviennent de nombreuses sources, principalement des cellules du système immunitaire, soit les lymphocytes, les macrophages, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes, mais également des cellules structurales ou résidentes tels les fibroblastes et les cellules épithéliales [77;78]. Elles ont chacune des rôles qui leur sont propres mais certaines redondances peuvent être observées. Elles ont généralement des effets pléiotropiques dont la capacité à induire l'activation, la prolifération, le chimiotactisme et celle de moduler leur propre synthèse ou celle d'autres cytokines. Elles agissent en se fixant sur leurs récepteurs de haute affinité induisant ainsi l'activation des différents facteurs de transcription tels le NF- $\kappa$ B, AP-1, les STAT, etc... [78].

### **1.4.1 L'interleukine-6**

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle ayant des propriétés tant « anti » que « pro » inflammatoires. Elle est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les cellules présentatrices d'antigène professionnelles telles les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques. Elle est également produite par des cellules présentatrices d'antigène non professionnelles comme les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et par les cellules inflammatoires. Cette cytokine est impliquée dans les phases aiguës et chronique de la réponse inflammatoire [78]. Plusieurs études ont montré que l'IL-6 est en mesure d'induire la production initiale d'IL-4 par les cellules T CD4+ naïves provenant de la rate. Cette production fait suite à l'activation du facteur de transcription NFATc2 qui contribue à la différenciation de ces cellules CD4+ naïves en cellules Th2 [78]. L'IL-6 agit comme cofacteur de l'IL-4 pour favoriser la synthèse des IgE, phénomène qui est notamment observé dans l'asthme allergique. L'IL-6 est également un facteur de survie pour les cellules T CD4+ naïves mais pas pour les cellules T CD4+ activées. Elle est également en mesure de protéger les cellules T CD8+ de l'apoptose [78-80]. Cette cytokine induit l'expression de suppresseur de la signalisation des

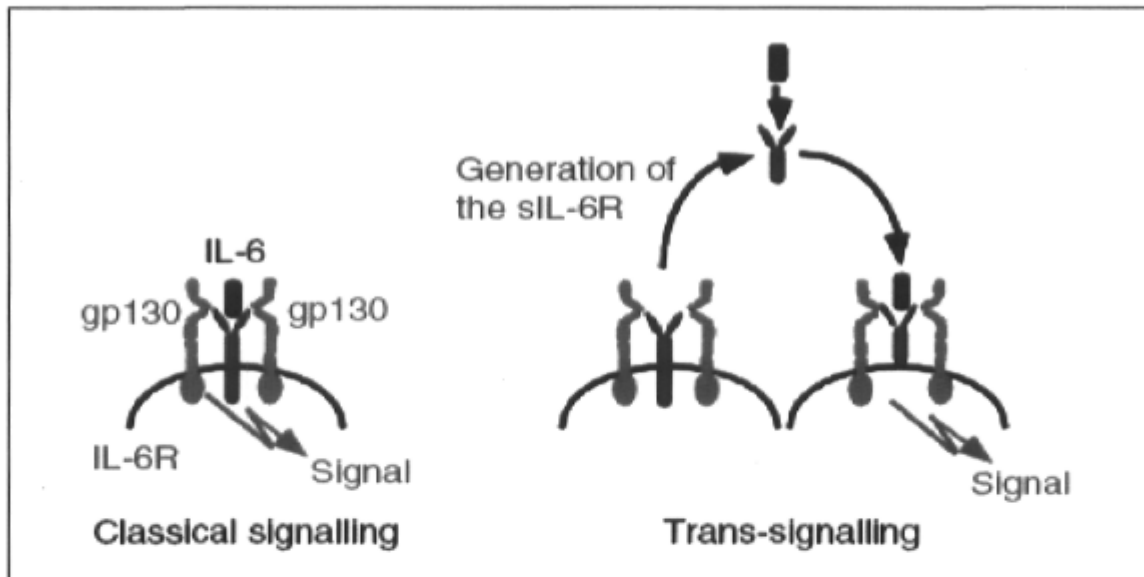
cytokines-1 (SOCS-1) qui inhibe la signalisation de l'IFN- $\gamma$ , une fonction qui résulte en l'inhibition de la voie de signalisation conduisant au développement préférentiel de la voie Th2 [81]. L'IL-6 agit aussi sur les cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en empêchant leur anergie et en médiant une production significative d'IL-2[80;82].

L'IL-6 exerce son effet en se liant à deux différentes protéines membranaires fonctionnellement différentes (Figure 5). Il s'agit du récepteur de liaison au ligand IL-6R $\alpha$  (aussi connu sous le nom de gp80) et du récepteur de transduction du signal gp130 [83]. L'IL-6 se lie spécifiquement à l'IL-6R $\alpha$ , le complexe IL-6/IL-6R $\alpha$  formé conduit au recrutement du récepteur de signalisation gp130 qui va initier l'activation de différentes voies de signalisation. Il s'agit notamment de la voie des Janus Kinases (JAKs) responsable de la phosphorylation du résidu tyrosine de la queue cytoplasmique du gp130 qui va entraîner l'activation de nombreuses familles de transducteurs de signaux, celle des activateurs de la transcription de la famille des STAT, ainsi que la voie des «Mitogen-activated protein kinase» (MAPK) [83;84]. Le gp130 est présent dans la membrane de nombreux types cellulaires, l'expression de l'IL-6R $\alpha$  est plus restreinte (notamment chez hépatocytes et certains leucocytes), induisant donc l'impossibilité pour plusieurs cellules de répondre à l'IL-6 via la voie classique du complexe IL-6R $\alpha$ :gp130 [83;85]. Toutefois, autant l'IL-6R $\alpha$  que le gp130 possèdent des formes solubles. La forme soluble de IL-6 $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) procure un mécanisme alternatif par lequel l'IL-6 peut activer le gp130 et ainsi induire la transduction du signal de l'IL-6 dans les types cellulaires qui ne peuvent pas de manière intrinsèque répondre à l'IL-6. La forme soluble de gp130 inhibe de manière exclusive la réponse à l'IL-6 médiée par sIL-6R $\alpha$  sans interférer avec la réponse via l'IL-6R lié à la membrane. Le gp130 peut également moduler la migration des leucocytes [84;85].

Des niveaux élevés de sIL-6R avant stimulation allergénique, ont été mis en évidence dans les lavages bronchoalvéolaires de sujets asthmatiques [78]. Aussi, le blocage local de sIL-6R par une protéine de fusion, le gp130Fc, dans un modèle murin de phase tardive d'asthme après une sensibilisation à l'ovalbumine (OVA), induit une suppression des cellules Th2 dans les poumons. Parallèlement, l'administration dans les poumons d'un anticorps anti-IL6R induit des lymphocytes Th1, des cellules Foxp3-positives, et IL-6R positives ayant des fonctions

suppressives [78]. Tout ceci suggère un rôle possible du sIL-6R dans le contrôle de la fonction Th2 chez les asthmatiques.

Dans l'asthme, des taux d'IL-6 élevés ont été trouvés dans le sang, les lavages bronchoalvéolaires ainsi que dans les tissus pulmonaires [78]. Plusieurs études ont également montrées l'existence d'une forte corrélation entre la fibrose et l'expression d'IL-6 dans de nombreux tissus dont la peau et les poumons [78;79;86]. D'autres études ont mis en évidence chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-6, une augmentation de l'espace alvéolaire, un épaississement des voies aériennes, de l'inflammation lymphatique avec production de mucus et d'éotaxine ainsi qu'un développement de la fibrose sous épithéliale. Cette dernière est significativement réduite chez des souris Knockout (KO) dans un modèle de fibrose hépatique. Ces évidences plaident pour un rôle important de l'IL-6 dans le remodelage [78;87;88].



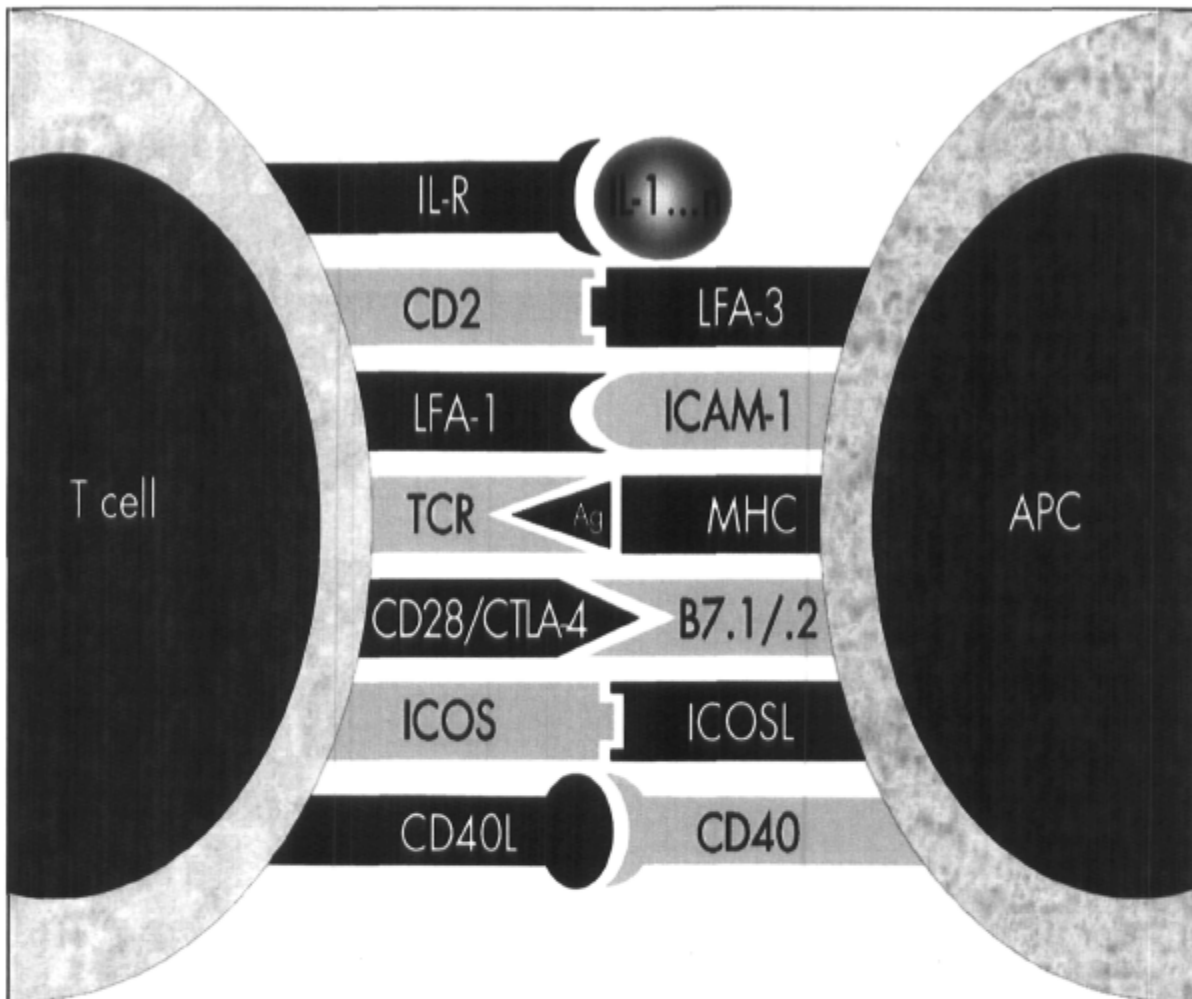
**Figure 5 : Le complexe de récepteurs de l'IL-6.**

Cette figure montre le mode de signalisation de l'IL-6: la signalisation classique impliquant le récepteur gp130 et la signalisation alternative impliquant à la fois le sIL-6R et le gp130. (Scheller et al., 2006. *Scand. J. Immunol.* 63 :321-329 [85]).

### **1.5. Les molécules de surface**

L'efficacité de la réponse immunitaire dépend de la régulation de l'activation des lymphocytes. Pour y arriver, les lymphocytes ont besoin de deux signaux indépendants. Le premier est un signal antigène spécifique qui est transmis via le récepteur unique à l'antigène présent à la surface des lymphocytes T (TCR) ou sur les cellules B (BCR). Le deuxième signal appelé « co-stimulation » est indépendant du récepteur de l'antigène et joue un rôle critique pour permettre l'activation, le maintien de la prolifération cellulaire, la prévention de l'anergie ou de l'apoptose, la différenciation en cellules effectrices et mémoires ainsi que dans la coopération cellulaire [79]. Ce second signal de co-stimulation peut être délivré par une ou plusieurs molécules de surfaces distinctes qui sont exprimées à la surface aussi bien des CPA que des cellules T ou B [79].

Un grand nombre de molécules de surface exprimées tant par les cellules T que par les CPA participent à la transmission du signal d'activation des lymphocytes T (Figure 6). Parmi celles-ci, les molécules B7 (B7-1 et B7-2) avec leurs co-récepteurs CD28/CTLA-4, ICMA-1/IFA-1, LFA-3/CD2, et VCAM-1/VLA-4 dont l'expression peut varier selon la nature des CPA et peut également être régulée ou induite par l'activation ou par les cytokines [80;81;83].



**Figure 6 :** Illustration de quelques interactions moléculaires impliquées dans la communication entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène. (Danese S, Sans M, Fiocchi C. 2004. The CD40/CD40L Costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut.* 53 :1035-1043.[89]).



### 1.5.1. Interaction ICAM-1/LFA-1

ICAM-1 (CD154) est une glycoprotéine de poids moléculaire variant entre 76-114 KDa qui est un membre de la superfamille des immunoglobulines et qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales, des cellules épithéliales, des fibroblastes et aussi des cellules T, des cellules B, des cellules dendritiques, des macrophages, et des éosinophiles [90]. LFA-1 (CD11a/CD18) est un membre de la sous famille des intégrines  $\beta 2$  et est exprimé de manière constitutive par les lymphocytes T et B ainsi que par les monocytes. La liaison de ICAM-1 avec son ligand (LFA-1) affecte l'adhésion et l'activation cellulaire. Cette interaction est l'une des premières étapes de la formation de la synapse immunologique et y joue un rôle important en facilitant la formation du conjugué cellule T/CPA menant à l'activation des cellules T ainsi qu'à la production de cytokines [91;92].

Cette interaction est également impliquée dans le processus de migration des cellules inflammatoires du sang vers le site de l'inflammation dans les tissus. Cette migration est un processus qui comporte plusieurs étapes et l'interaction ICAM-1/LFA-1 joue un rôle très important dans l'étape de la transmigration endothéliale ainsi que dans l'adhésion ferme aux cellules endothéliales qui est une étape critique de la migration des cellules inflammatoires à travers les jonctions serrées des cellules endothéliales [90]. Les conséquences physiologiques de cette interaction incluent une augmentation de la production de cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, etc...) ainsi que de l'expression d'autres molécules d'adhésion cellulaire tel le VCAM-1 [78;79].

Une activation optimale des cellules T requiert deux signaux : un étant spécifique à l'antigène et l'autre de co-stimulation. De nombreuses études ont montré que la liaison ICAM-1/LFA-1 pouvait servir de signal de co-stimulation. En effet, cette liaison est en mesure d'induire en conjonction avec le TCR une activation de la «Phosphoinositide 3-Kinase» (PI3K), ainsi qu'une augmentation de la transcription du gène de l'IL-2, en plus d'être impliquée dans l'induction de la division cellulaire, dans la production de cellules mémoires et de protéger les cellules de l'apoptose [93;94].

Dans l'asthme, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation proéminente de ICAM-1 dans les voies aériennes de sujets asthmatiques. Cette augmentation a été rapportée chez différents types cellulaires à savoir les lymphocytes T, les éosinophiles, les cellules endothéliales et épithéliales isolés de patients asthmatiques [90].

D'autres études ont montré que l'inflammation des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique sont réduites comparé aux témoins sains dans un modèle murin d'asthme déficient en ICAM-1, confirmant ainsi le rôle important que cette interaction aurait dans la pathogenèse de l'asthme [95].

### 1.5.2. Interaction CD28/B7

L'interaction CD28/B7 est assurément la voie de co-stimulation la mieux caractérisée. Celle-ci implique le CD28, une glycoprotéine de 44 KDa, constitutivement exprimée à la surface des lymphocytes T et qui avec des affinités différentes se lie aux deux molécules de co-stimulation que sont B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). Ces dernières sont principalement exprimées par les CPA incluant les macrophages, les cellules B et les cellules dendritiques [96]. B7-1 et B7-2 peuvent être induites chez des fibroblastes et des cellules épithéliales suite à une stimulation par l'IFN- $\gamma$ . Chez la majorité des CPA, B7-2 est exprimée de manière constitutive à de faible taux, tandis que B7-1 est induite plus tard après l'activation [97]. CD28 délivre un signal important pour l'activation et la différenciation des cellules T [98]. Comme énoncé précédemment, CD28 se lie aux molécules B7-1 et B7-2 avec une plus grande affinité pour la molécule B7-2. Cette interaction est impliquée dans de nombreux processus. Ainsi, elle agit en synergie avec la liaison entre le TCR et le complexe majeur d'histocompatibilité II-peptide (CMH) des CPA pour optimiser l'activation des cellules T [96-98]. Les interactions CD28/B7-1 et CD28/B7-2 n'aboutissent pas aux mêmes phénomènes physiologiques en ce sens que certaines études ont montré que la liaison CD28/B7-1 jouent un rôle dans la déviation des cellules T vers un phénotype Th1, tandis que l'interaction CD28/B7-2 est impliquée dans le développement d'un phénotype Th2 [99]. Cette interaction est aussi impliquée dans la production de nombreuses cytokines (IL-2, IL-4, IL-5) ainsi que dans la prévention de l'anergie et de l'apoptose [98].

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de B7-2 chez des patients souffrant d'asthme atopique suite à une stimulation allergénique [100]. D'autres études ont également montré une augmentation du taux sérique de sB7-2 (soluble B7-2) chez les patients asthmatiques comparé à des patients sains. Aussi, le blocage de l'interaction CD28/B7-2 inhibe le développement d'IgE, l'éosinophilie pulmonaire ainsi que l'hyperréactivité bronchique chez la souris [100;101].

### 1.5.3. Interaction CD40/CD40L

CD40 est une glycoprotéine membranaire de 50 KDa appartenant à la famille des récepteurs du TNF (TNF-R). Elle est exprimée par de nombreux types cellulaires dont les cellules B, les monocytes macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, cellules endothéliales ainsi que par les fibroblastes [101].

Le CD40L (CD154) est une glycoprotéine membranaire de 33 KDa, appartenant à la famille du TNF et est exprimée par les cellules T CD4<sup>+</sup>, les plaquettes, les éosinophiles, les mastocytes et les basophiles [102;103]. Après sa formation, CD40L est clivé et relâché de la surface cellulaire et circule de manière systémique sous une forme biologiquement active [104;105]. Le CD40 forme un trimère qui va se lier au CD40L induisant une cascade de signalisation complexe impliquant les membres de la superfamille des récepteurs du TNF, l'activation de différentes protéines tyrosine kinases telles «Extracellular signal regulated Kinase» (ERK-2), Protéine 38 (P38) et «c-Jun N-terminal kinase» (JNK). Éventuellement, cette liaison peut aboutir à l'activation de plusieurs facteurs de transcription incluant NF- $\kappa$ B, AP-1 et NFAT [105].

Dans l'inflammation, la liaison CD40/CD40L sur les monocytes et les cellules dendritiques conduit notamment à une augmentation de la production de cytokines telles l'IL-6, IL-8, IL-10 et l'IL-12. Une augmentation de certaines molécules de co-stimulation telles ICAM-1, LFA-3, B7-1 et B7-2 est également noté. L'interaction CD40/CD40L conduit aussi à une augmentation de la sécrétion de MMPs, telles les MMP-1, -2, -3 et -9 [96-98]. Cette interaction est importante dans la réponse spécifique à l'antigène comme le témoigne la faible prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup>, leur faible production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  dans un modèle animal déficient en CD40L [89].

Au niveau pulmonaire, l'administration de la forme soluble de CD40L (sCD40L) est en mesure d'induire une inflammation pulmonaire, tandis que chez des souris KO pour CD40L, cette déficience prévient le développement de l'inflammation dans les poumons ainsi que celle de la fibrose [106;107]. Aussi, chez des patients souffrant d'asthme allergique, des études ont montré des niveaux élevés de sCD40L associés avec une réaction allergique immédiate induite par les

IgE [107]. La synthèse d'IgE étant l'une des caractéristiques de l'allergie atopique, l'interaction CD40/CD40L pourrait jouer un rôle dans le développement de l'inflammation associée à l'asthme. En effet, la production par les lymphocytes B d'isotypes particuliers d'immunoglobulines nécessite deux signaux. Ainsi, pour la synthèse d'IgE, le premier signal provient de l'IL-4 ou de l'IL-13 lors de la liaison de leur récepteur sur les cellules B [108]. Quant au second signal, celui-ci provient de la liaison du CD40 sur les cellules B avec son ligand présent sur les cellules T [109].

#### 1.5.4. Interaction ICOS/ICOSL

L'« Inducible Costimulator » (ICOS) est le troisième membre de la superfamille de CD28. C'est un homodimère de 55-60 KDa qui possède environ 24% d'homologie avec le CD28 [110]. Il est exprimé à la surface des cellules T activées et par les cellules NK. ICOS se lie à son propre membre de la famille de B7 soit le B7RP-1/B7h ou ICOSL. Ce ligand d'ICOS possède environ 20% d'homologie de séquence avec les molécules B7-1 et B7-2 et est exprimé autant dans les tissus lymphoïdes que non lymphoïdes incluant les reins, le foie et les poumons [110-112]. Son expression a été montrée chez les fibroblastes du derme après stimulation avec du TNF et de l'IFN- $\gamma$  [94]. Il est également détecté à la surface des macrophages, des cellules dendritiques, épithéliales et endothéliales [110].

L'interaction ICOS/ICOSL est impliquée dans de nombreux processus dont la différenciation des cellules B, la formation de centres germinaux, la production d'immunoglobuline et le développement des cellules B mémoires notamment. En effet, il a été montré que des souris déficientes en ICOS présentaient une formation réduite de centres germinaux en réponse à une immunisation primaire ainsi qu'une malformation de ces derniers lors d'une sensibilisation secondaire. On note aussi une altération dans la commutation isotypique des IgG [96].

Cette liaison joue un rôle clé dans la régulation de la réponse Th2 impliquée dans l'asthme et l'allergie en médiant entre autre, le recrutement, l'activation et la survie des leucocytes. Elle induit l'augmentation de la production de cytokines Th2, telles l'IL-4, et l'IL-6 notamment [113]. D'autres études ont mis en évidence que ICOS peut réguler la fonction des cellules Th2 effectrices sans affecter leur différenciation suite à une stimulation antigénique de type Th2 [96]. Cette interaction est donc d'un grand intérêt dans la compréhension de la physiopathologie de l'asthme car le blocage d'ICOS dans un modèle murin de provocation allergénique actif diminue l'inflammation allergique et le développement de l'hyperréactivité bronchique [113-115]. Ainsi, ICOS semble être impliqué dans des aspects très importants de l'inflammation allergique et peut donc être une bonne cible thérapeutique.

### 1.5.5. Interaction OX40/OX40L

OX40 (CD134) et son ligand OX40L sont respectivement des membres de la famille des récepteurs du TNF et de la superfamille du TNF. OX40 est exprimé préférentiellement par les cellules T CD4<sup>+</sup> que par les cellules T CD8<sup>+</sup>. OX40 joue un rôle notamment dans la survie des cellules T effectrices ainsi que dans la production de cellules T mémoires [116]. Son ligand OX40L est présent sur les CPA professionnelles et non professionnelles telles que les cellules B activées, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les lymphocytes T. De nombreuses études utilisant des souris déficientes en OX40L ont révélé que l'absence de OX-40L sur les CPA conduisait à une réduction marquée de la prolifération et de la production de cytokines par les cellules T CD4<sup>+</sup> [117;118].

Cette interaction semble être impliquée aussi bien dans la réponse inflammatoire primaire que secondaire. Elle joue un rôle dans l'expansion et la survie des cellules T CD4<sup>+</sup> ainsi que dans les réponses Th1 et Th2 [116]. Cette liaison est donc impliquée dans l'activation des cellules T, leur prolifération ainsi que dans leur production de cytokines. Elle pourrait également jouer un rôle dans la migration des cellules, car cette liaison influence le nombre de cellules T qui s'accumulent dans les follicules des cellules B par un facteur de deux à trois fois [119]. Aussi, des souris déficientes en OX40 montrent une baisse de deux à trois fois de l'accumulation des cellules T CD4<sup>+</sup> dans les sites inflammatoires [120]. Cette interaction induit aussi une augmentation préférentielle de la production de cytokines de type Th2 et contribue au maintien d'une réponse de type Th2 [116]. Le blocage de OX40, ou encore sa déficience, réduit la sévérité de l'inflammation, réduit l'hyperréactivité bronchique et la production de mucus dans un modèle murin d'asthme, ce qui fait de cette interaction une cible thérapeutique intéressante.

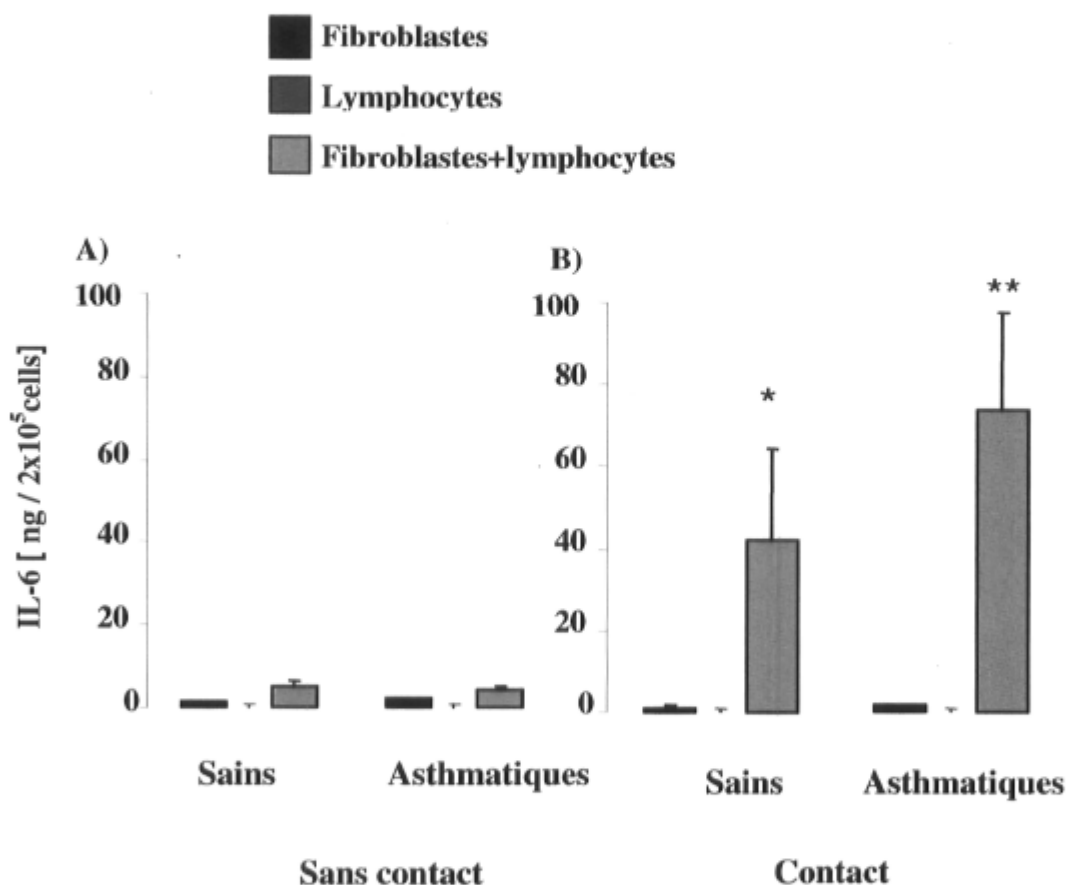
## **CHAPITRE 2**

### **HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**



## 2.1. Origine du projet

Mon projet s'inscrit dans la suite des travaux réalisés par Véronique Turmel lors de sa maîtrise dans notre laboratoire [75]. Au cours de sa maîtrise, Véronique s'est intéressée aux interactions entre les lymphocytes T et les fibroblastes bronchiques en évaluant leur capacité à moduler la production de l'IL-6 et de l'IL-8 chez chacun de ces deux types cellulaires. Elle s'est également intéressée à documenter la nature de cette interaction grâce à des co-cultures sans contact cellulaire ou en contact direct.



**Figure 7:** Concentration d'IL-6 dans les surnageants de co-culture fibroblastes-lymphocytes T par test ELISA. (A) Culture en système sans contact, (B) Culture en contact direct. 2002.

(Turmel V. Le contact cellulaire entre les fibroblastes bronchiques et les lymphocytes T augmente la production d'IL-6 et d'IL-8 dans l'asthme. *Mémoire de Maîtrise*. Université Laval [75]).

Les résultats du test ELISA pour l'IL-6 réalisé par Mme Turmel sont présentés dans la figure 6 et montrent que dans les systèmes de co-culture en transwell, les lymphocytes T stimulent très faiblement les fibroblastes bronchiques à produire de l'IL-6, tandis que cette stimulation est importante dans la co-culture en contact direct. Ainsi, lors des co-cultures en contact une augmentation de la production d'IL-6 qui est plus marquée chez les fibroblastes provenant de sujets asthmatiques que ceux provenant de sujets sains est notée. L'augmentation de la production d'IL-6 qui est observée serait donc principalement médiée par les molécules de surface exprimées par les lymphocytes et les fibroblastes.

## **2.2. Hypothèse et objectifs de l'étude**

Ce travail tire son origine de plusieurs observations. Il est aujourd'hui communément acquis que l'inflammation chronique et le remodelage bronchique sont deux composantes majeures de la pathophysiologie de l'asthme. Ainsi, dans la muqueuse bronchique on note l'infiltration de cellules immunitaires qui sont dans un état d'activation permanent et qui secrètent des médiateurs et des cytokines qui peuvent moduler la fonction des cellules structurales. Les lymphocytes T jouent un rôle important dans l'asthme. Il existe une corrélation entre le nombre de lymphocytes activés et la sévérité de l'asthme. Azzawi *et al* ont montré qu'après une provocation allergénique, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont recrutés de façon sélective dans la muqueuse bronchique et que ce recrutement est associé à une diminution du nombre des lymphocytes circulants [37]. Les lymphocytes Th2 retrouvés dans l'asthme produisent de nombreuses cytokines, principalement l'IL-4, l'IL-5, le GM-CSF et l'IL-13 [41;42]. Ainsi, par son profil de cytokines, le lymphocyte T semble être l'un des principaux modulateurs de la réponse immune dans l'asthme. Les fibroblastes libèrent des cytokines telles le GM-CSF, l'IL-8, l'IL-6 et le CSF qui jouent un rôle non seulement dans la régulation autocrine et paracrine de la fonction de ces cellules mais aussi dans la régulation de la réponse immune lors de l'inflammation. L'adhérence des lymphocytes activés aux fibroblastes augmente leur survie et peut promouvoir leur rétention aux sites inflammatoires. L'interaction entre les fibroblastes et les lymphocytes est nécessaire pour un bon équilibre homéostatique. Cette communication peut se faire soit à distance soit par contact

cellules-cellules grâce aux molécules d'adhésion exprimées par ces deux types cellulaires. De nombreuses études ont mis en évidence l'expression d'un large éventail de molécules de surface impliquées dans les maladies allergiques aussi bien chez les lymphocytes T que chez les fibroblastes. Ainsi, il a été mis en évidence que les lymphocytes T expriment entre autres, des molécules telles le CD28, LFA-1, CD40L, ICOS et OX40 dont l'interaction avec leurs ligands respectifs participent clairement au développement d'une réponse inflammatoire de type Th2 ou encore au maintien d'une réponse de ce type. Les fibroblastes également expriment de nombreuses molécules de surface dont ICAM-1, CD40 ainsi qu'ICOSL notamment.

Nous émettons l'hypothèse selon laquelle, **les molécules de co-stimulation impliquées dans les interactions cellules-cellules tels B7/CD28, LFA-1/ICAM-1, ICOS/ICOSL, CD40/CD40L ainsi que OX40/OX40L, qui sont des acteurs importants dans la production de cytokine de type Th2, sont impliquées dans l'augmentation de la production de l'IL-6 induite par le contact entre les lymphocytes T et les fibroblastes bronchiques. Ceci pourrait partiellement expliquer la persistance de l'inflammation dans l'asthme même en absence de stimulation antigénique.**

Le but de ce projet est donc d'une part d'évaluer l'expression des molécules de co-stimulation que sont ICOS, ICOSL, CD40L, CD40, OX-40, OX40L sur les lymphocytes et les fibroblastes de sujets asthmatiques et de sujets normaux avant et après co-culture et d'autre part, d'évaluer leur implication dans l'augmentation de la production d'IL-6 qui fait suite à la co-culture en utilisant des anticorps bloquants spécifiques pour chacune de ces molécules.

## **CHAPITRE 3**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **3.1. Sélection des sujets**

Tous les sujets asthmatiques ont eu un diagnostic d'asthme selon les critères de l'American Thoracic Society (ATS) [121]. Les caractéristiques de ces sujets sont présentées dans le tableau 2. Les sujets asthmatiques étaient atopiques avec au moins une réponse positive aux allergènes communs lors des tests d'allergie cutanée. Aucun des sujets n'avaient rapporté une infection respiratoire ou une augmentation des symptômes d'asthme dans le mois précédant l'étude. Ces sujets n'étaient pas couramment exposés à l'allergène auquel ils étaient sensibilisés, excepté pour les allergènes qu'on retrouve dans les poussières de maison. Les sujets normaux n'avaient pas d'histoire présente ou passée d'asthme ou d'atopie. Aucun sujet n'était sur médication. Tous les sujets, tant asthmatiques que sains, étaient non-fumeurs. Les caractéristiques des

	<b>Sujets sains (n=6)</b>	<b>Sujets asthmatiques (n=6)</b>
<b>Age (années)</b>	<b>26,4 ± 1,5</b>	<b>22,5 ± 1,4</b>
<b>VEMS (% de la prédite)</b>	<b>101,7 ± 3,6</b>	<b>97,4 ± 2,6</b>
<b>CP<sub>20</sub> (mg/mL)</b>	<b>83,8 ± 16,1</b>	<b>2,5 ± 1,1</b>
<b>Atopie</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>

**Tableau 2: Caractéristiques des sujets ayant fournis les fibroblastes**

### **3.2. Culture des fibroblastes bronchiques**

Les fibroblastes ont été isolés à partir de biopsies bronchiques obtenues lors de bronchoscopies chez des sujets sains et asthmatiques légers [122]. Les biopsies bronchiques fraîchement isolés ont été immédiatement traitées avec 500 µg/mL de thermolysine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durant toute la nuit à 4°C afin de permettre la séparation complète de l'épithélium. Les tissus restants ont par la suite été traités avec de la collagenase (0,1%) (Roche, Laval, QC). Les fibroblastes ont été identifiés et caractérisés par immunofluorescence et par cytométrie de flux en utilisant de l'anti-vimentine ainsi que l'anti-antigène Ab-1 spécifiques des fibroblastes (Calbiochem, San Diego, CA). Cette identification a confirmée la pureté de la culture cellulaire. Les fibroblastes ont ensuite été cultivés dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplémenté avec 20 U/ml de pénicilline-streptomycine (Invitrogen), 12,5 µg/ml de fungizone (Invitrogen) et 10% de *sérum de veau foetal* inactivé (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et utilisés à des passages 4 ou 5. Une fois la confluence atteinte, les cellules ont été détachées avec de la trypsine à 0,025% pendant 3 min à température ambiante. Ensuite, les fibroblastes ont été transférés dans des plaques de six puits (Corning, Whitby, ON, Canada) à raison de 5 x 10<sup>5</sup> cellules par puit et incubées pendant 24 h pour leur permettre d'adhérer.

### **3.3. Isolation des lymphocytes T**

Un volume de 150 mL de sang veineux périphérique a été prélevé autant chez des patients sains qu'asthmatiques. Les caractéristiques de ces patients sont résumées dans le tableau 3. Ces derniers étaient atopiques et n'avaient pas rapporté d'infection respiratoire ou des symptômes d'asthme dans le mois précédant la prise de sang. Les sujets normaux n'étaient pas atopiques et ne présentaient pas d'histoire présente ou passée d'asthme. Ces patients ne souffraient d'aucune crise d'allergie. Ce sang a ensuite été aliquoté en petit volume de 15 mL puis, dilué 1:2 avec du «Hank's Balanced Salt Solution» (HBSS)(Invitrogen). Dix mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) ont été ajoutés à chacun des aliquots et le tout a été centrifugé pendant 20 min à 500 g à 20°C afin de séparer le sang en différentes couches soient le plasma, la couche des lymphocytes/monocytes, le ficoll lui-même et la couche des érythrocytes et granulocytes. Par la

suite, la couche des lymphocytes/monocytes est récoltée et centrifugée de nouveau afin d'éliminer le restant de Ficoll (10 min à 500 g à 20°C). Les cellules ont ensuite été lavées avec du RPMI (Invitrogen) supplémenté avec 10% de FBS inactivé, 20 U/ml de pénicilline-streptomycine et 12,5 µg/ml de fungizone puis, centrifuger à 500 g pendant 10 min toujours à 20°C. Puis, elles ont été resuspendues dans 40 mL de RPMI, transférées dans des flacons de culture 75 cm<sup>2</sup> et incubées pendant 1 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> afin de permettre l'adhésion des monocytes. Enfin, les lymphocytes récoltés ont été passés dans une colonne de nylon (Polysciences Inc., Warrington, PA) afin de faire adhérer les lymphocytes B et ainsi séparer les lymphocytes T des lymphocytes B. L'éluât de lymphocytes T a tout d'abord été compté et ensuite, 3 x 10<sup>6</sup> cellules ont été rajoutées par puits pour les co-cultures avec les fibroblastes.

	<b>Sujets sains (n=11)</b>	<b>Sujets asthmatiques (n=11)</b>
<b>Age (années)</b>	<b>24 ± 2,58</b>	<b>29,75 ± 4,48</b>
<b>VEMS (% de la prédite)</b>	<b>98 ± 5,32</b>	<b>94,75 ± 6,37</b>
<b>CP<sub>20</sub> (mg/mL)</b>	<b>95,56 ± 14,25</b>	<b>1,35 ± 0,42</b>
<b>Atopie</b>	<b>non</b>	<b>oui</b>

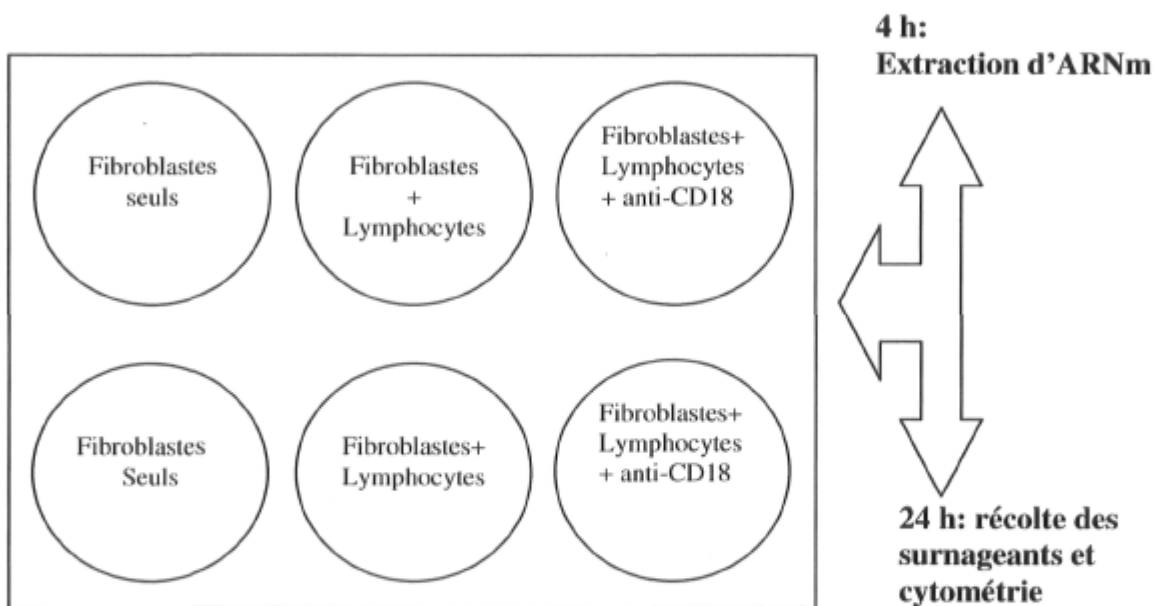
**Tableau 3: Caractéristiques des sujets ayant fournis les lymphocytes T**

### **3.4. Co-culture de fibroblastes et de lymphocytes T**

Les co-cultures ont été effectuées en rajoutant  $3 \times 10^6$  lymphocytes T en contact avec  $5 \times 10^5$  cellules de fibroblastes ayant préalablement adhérents toute la nuit dans un volume final de 1 mL de DMEM à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. En plus des conditions de base et des co-cultures simples, des co-cultures ont été effectués en présence d'anticorps bloquant (Figure 7) anti-CD18 pour empêcher la liaison ICAM-1/LFA-1. Pour ce faire, les lymphocytes T ont été préalablement incubés durant 30 min avec l'anti-CD18 (fourni par le Dr Walid Mourad) à une concentration finale de 5 µg/mL. Les fibroblastes ont été préalablement lavés et leur milieu de culture a été remplacé par la suspension de lymphocytes T.

Différents temps d'incubation ont été réalisés soient 4 et 24 h. Après 4 h de co-cultures, les lymphocytes ont été récupérés et les fibroblastes ont d'abord été lavés avec du «Phosphate buffered saline» (PBS) puis lysés pour récupérer les ARN totaux. Pour ce qui est de l'incubation à 24 heures, les lymphocytes ont été récupérés et centrifugés à 500 g pendant 10 min à 20°C. Ensuite, les surnageants ont été récoltés, centrifugés et le culot de lymphocytes T a été lavé avec du PBS avant d'être utilisé pour la cytométrie de flux. Ainsi, le surnageant récupéré ne contient que les lymphocytes T qui sont des cellules non adhérentes. De leur côté, les fibroblastes ont tout d'abord été lavés avec du PBS afin d'éliminer les lymphocytes adhérents puis ont été trypsinisés tel que décrit précédemment et utilisés pour la cytométrie de flux. En outre, l'absence de lymphocytes sur les fibroblastes après co-culture, a été évaluée par cytométrie de flux en utilisant l'anti-CD18.





**Figure 8** : Présentation schématique du protocole expérimental des co-cultures de fibroblastes et de lymphocytes T.

### **3.5. Extraction et dosage des ARNs**

Pour obtenir l'acide ribonucléique (ARN) cellulaire total, les fibroblastes ont été lysés au moyen d'un tampon de lyse puis, l'extraction d'ARN a été effectuée au moyen de la trousse «RNeasy mini kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) suivant les directives du manufacturier. Les concentrations de ces ARNs ont été déterminées par fluorescence en utilisant le réactif Ribogreen (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) dilué 1 :200.

### **3.6. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction( RT-PCR)**

L'ADN complémentaire (ADN<sub>c</sub>) a été obtenu en préparant un mélange réactionnel contenant 500 ng d'ARN, 200 U de l'enzyme MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase*, Invitrogen), un tampon de réaction à 1X (Invitrogen), des hexamères aléatoires à 0,25 µg/µl (GE) et des déoxynucléotides triphosphate (dNTPs) à 0,5 mM (GE). Toutefois, avant l'ajout du mélange réactionnel chacun des échantillons a été préalablement incubés à 65°C pendant 10 min afin de linéariser les brins d'ARN. L'ADN complémentaire a été amplifié à 37°C pendant 60 min, puis à 65°C pendant 10 min afin de dénaturer l'enzyme.

### **3.7. Polymearse Chain Reaction en temps réel (PCR<sub>tr</sub>)**

Les ADN<sub>c</sub> obtenus ont été amplifiés par PCR en temps réel (PCR<sub>tr</sub>). Ce dernier a été effectué sur l'appareil Opticon 2 (MJ research Inc, Waltham, MA, USA) dans un volume final de 25 µL, contenant les amorces spécifiques soit pour l'IL-6 ou le GAPDH et le réactif SyBr Green (Qiagen). Les séquences des amorces sont respectivement : 5'-TCT CCA CAA GCG CCT TCG-3' et 5'-CTG AGG GCT GAG ATG CCG-3' sens et anti-sens qui vont servir à amplifier un produit d'une longueur de 150 pb pour l'IL-6; 5'-ATG CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' et 5'-CTG AGG GCT GAG ATG CCG-3' qui vont également servir à amplifier un produit de 221 pb pour GAPDH. Ces amorces ont été utilisées à une concentration finale de 400 µM. Pour les réactions de PCR<sub>tr</sub>, 25 ng d'ADN<sub>c</sub> ont été utilisés suivant les conditions suivantes: une

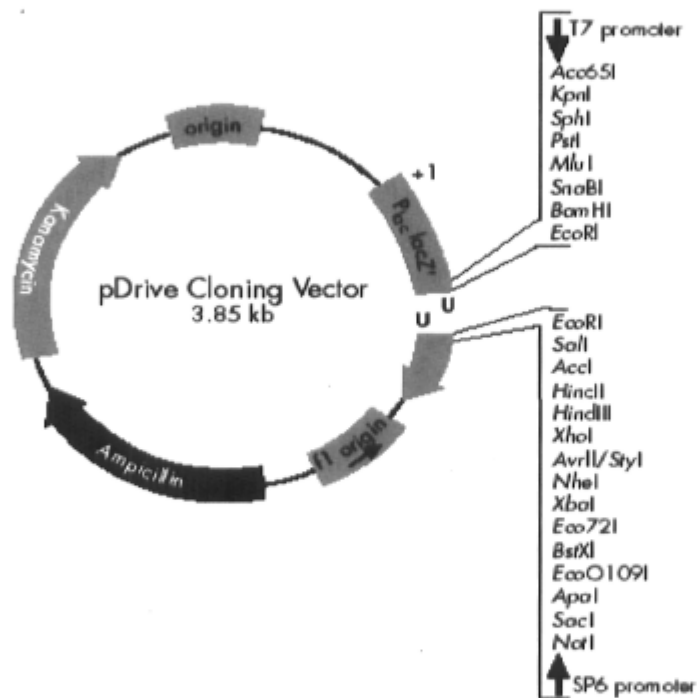
dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min suivie de 40 cycles de 95°C pendant 30 sec, 56 et 60°C pendant 30 sec respectivement pour GAPDH et IL-6 puis, 72°C durant 60 sec. Un cycle final d'élongation a été réalisé à 72°C pendant 2 min. Suite à la réaction, les produits ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 1µg/mL de bromure d'éthidium afin de vérifier la correspondance entre la longueur des amplicons et les gènes amplifiés.

### **3.8. Clonage des standards**

Pour quantifier les résultats de PCR<sub>ir</sub>, des courbes standard ont été réalisées à l'aide du produit PCR<sub>ir</sub> amplifié. Pour ce faire, ce dernier est avant tout migré sur un gel d'agarose puis extrait grâce à la trousse «QIAquick gel extraction kit» (Qiagen). Ensuite, on procède à une ligation (à 15°C toute la nuit) de notre produit purifié avec le vecteur d'expression pDrive de 3,85 kb (Figure 8) à un ratio molaire de 1 vecteur pour 10 produits PCR avec la trousse de clonage «QIAGEN PCR cloning kit» (Qiagen). Par la suite, on a procédé à une transformation de 250 µL de bactéries *E.Coli* DH5α compétentes avec 23 ng d'ADN purifié. La transformation s'est faite par choc thermique suivant les conditions suivantes : 4°C pendant 30 min sur glace suivi de 2 min à 42°C puis de 2 min sur glace. Les bactéries ont ensuite été incubées dans 750 µL de milieu LB (*Luria Bertani Agar*) (Difco, Sparks, MD, USA) pendant 1 h à 37°C pour permettre l'expression de la résistance à l'ampicilline. Les bactéries transformées ont été cultivées sur des géloses LB (Difco) contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 1% de IPTG/X-gal, pour sélectionner les bactéries ayant incorporées l'insert en raison de la présence dans ce dernier du gène de résistance à l'ampicilline et de colorer en bleu ou en blanc les bactéries ayant incorporées respectivement le vecteur seul ou le plasmide. Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies ayant incorporées le plasmide ont été repiquées sur d'autres géloses identiques, pour ensuite être cultivées dans du milieu LB liquide (Difco). Enfin, la trousse «Mini Prep» (Qiagen) a été utilisée selon les instructions du manufacturier afin de purifier les plasmides.

Par la suite, afin de déterminer l'efficacité de l'amplification des gènes de l'IL-6 et de GAPDH, des courbes standard ont été réalisées en PCR<sub>ir</sub> utilisant des dilutions allant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>6</sup> nombres

de copie du gène par tube de PCR<sub>ir</sub>. Après plusieurs séries de PCR<sub>ir</sub>, les pentes des courbes standard obtenues ont permis d'obtenir l'efficacité (E) de nos réactions en utilisant l'équation :  $E = 10^{(-1/pente)}$ . Ceci nous a permis par la suite de quantifier de manière absolue l'expression de nos gènes d'intérêts.



**Figure 9 :** Vecteur pDrive (Qiagen).

### **3.9. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Les concentrations d'IL-6 dans les différentes conditions de co-culture ont été déterminées à l'aide d'une trousse commercial ELISA (R&D systems Inc. Minneapolis, MN, USA) suivant les instructions du manufacturier. Les échantillons ont été lus avec un spectrophotomètre (Molecular Devices corp. CA, USA) à une longueur d'onde de 450 nm avec une correction de 550 nm. Le kit utilisé avait un seuil de détection d'IL-6 de 0,70 pg/mL.

### **3.10. Cytométrie de flux**

Dans le but de déterminer l'expression d'ICAM-1, CD40, B7-1 et B7-2 chez les fibroblastes, et celle de LFA-1, CD40L et ICOS chez les lymphocytes, ces deux types cellulaires ont été isolés et cultivés telles que décrits précédemment. Après 24 h de co-culture, les fibroblastes ont été transférés dans des tubes de cytométrie à raison de  $5 \times 10^5$  cellules/tube. Après centrifugation, ces derniers ont été lavés avec du PBS/1% d'albumine provenant de sérum de bovin (BSA) et ensuite incubés avec les anticorps primaires suivants : anti-CD40 monoclonal (mAc) (BD pharmingen, Mississauga, ON, Canada), anti-ICAM-1 mAc (R&D system), anti-CD18 mAc. Les anticorps précités ont été utilisés à une concentration de 1µg/mL. Les fibroblastes ont également été marqués avec les anti-B7-1 (BD pharmingen) et B7-2 (BD pharmingen) respectivement couplés avec la phycoerythrine (PE) et la fluorescein Isothiocyanate (FITC). Pour ces deux derniers anticorps, les concentrations utilisées sont celles recommandées par le manufacturier. Tous ces anticorps ont été incubés pendant 1 h sur glace avant d'être à nouveau lavés avec PBS/1% BSA afin d'éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés. Par la suite, les cellules ont été incubées pendant 1 h avec un anticorps secondaire couplé à la FITC à 1µg/mL pour ensuite être analysés au cytomètre de flux. Les lymphocytes pour leur part, sont marqués avec, l'anti-CD40L (fourni par le Dr Walid Mourad), l'anti-ICOS (e-biosciences, San Diego, CA, USA) et avec un anti-CD69 (BD pharmingen) couplé à la FITC. Ces anticorps ont été utilisés à une concentration de 5µg/mL. Les anticorps primaires non-couplés (ICOS et CD40L) ont été incubés suivant le même protocole que celui utilisé pour les fibroblastes.

### **3.11. Analyses statistiques**

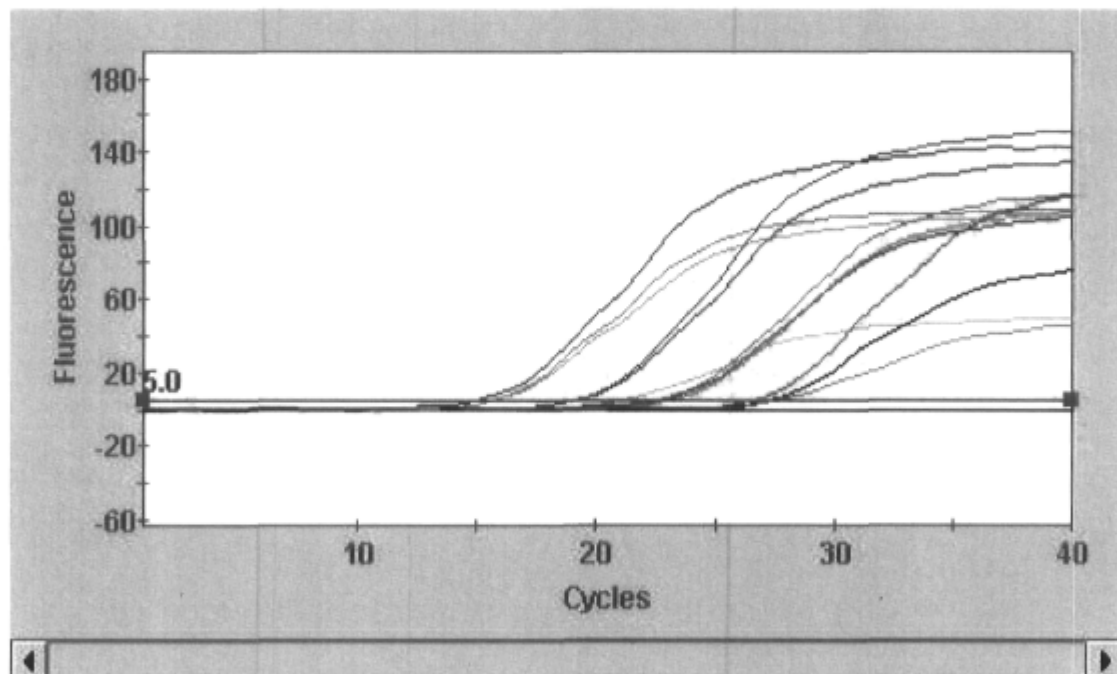
Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  «Standard Error of the Mean (SEM)». Des analyses de variance (ANOVA) à un seuil de significativité de 0,05 ont été effectuées pour comparer les deux groupes.

## **CHAPITRE 4**

## **RÉSULTATS**

#### 4.1. Courbe standard pour le PCR<sub>ir</sub>

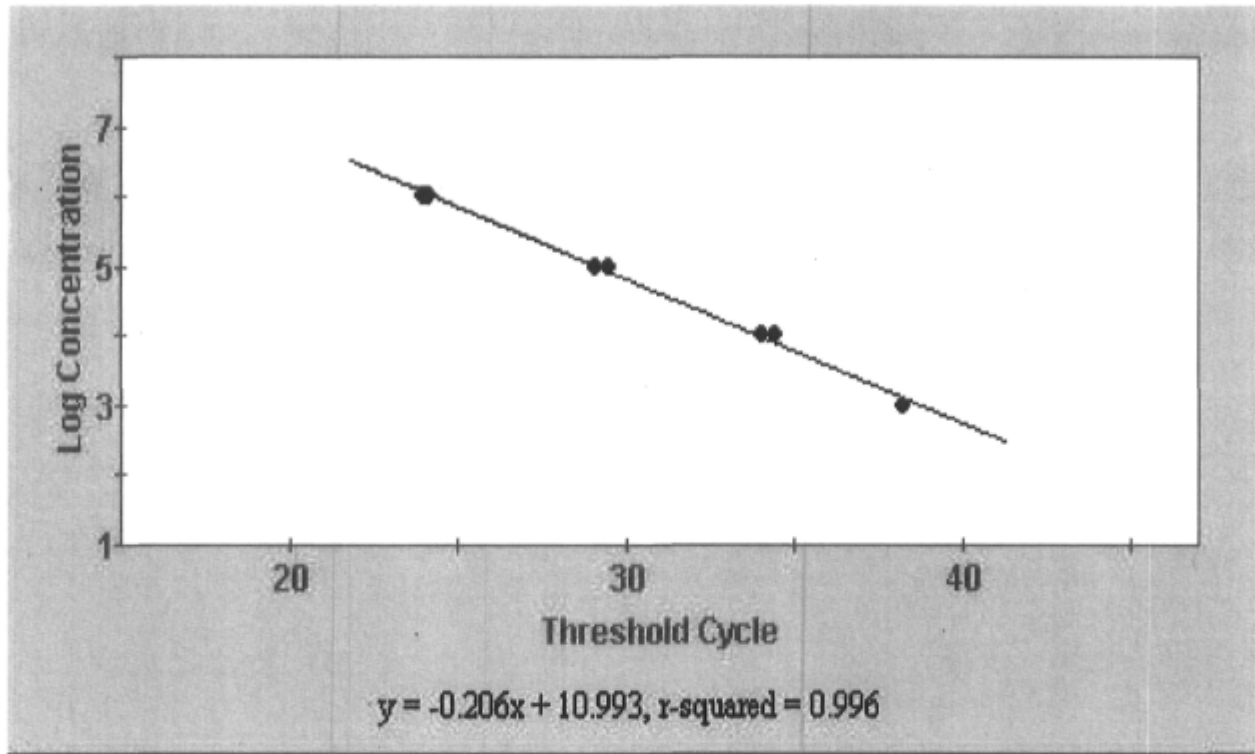
Afin de quantifier l'expression des gènes d'intérêts (IL-6 et GAPDH), des courbes standards (Figure 10 et 11) ont été réalisées. Ces dernières servent à déterminer l'efficacité de la réaction de PCR et ultimement à quantifier de manière absolue l'expression des gènes d'intérêts. Ainsi, plusieurs séries de PCR<sub>ir</sub> sont réalisées afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats et surtout pour déterminer la pente de la courbe standard qui permettra d'obtenir l'efficacité de la réaction en utilisant l'équation  $E = 10^{(-1/pente)}$ . Suite à ces différentes séries de PCR<sub>ir</sub>, les efficacités des réactions sont les suivantes :  $1,917 \pm 0,035$  pour le GAPDH et  $1,831 \pm 0,027$  pour l'IL-6.



**Figure 10 : Amplification de différentes concentrations de standards**

Cycles d'amplification des différentes concentrations de standards à un seuil de détection de 5 unités de fluorescence.





**Figure 11 : Exemple d'une courbe standard**

La courbe standard est réalisée plusieurs fois afin de s'assurer de sa reproductibilité et celles présentant le meilleur coefficient de corrélation sont retenues pour déterminer l'efficacité de la réaction à l'aide de leurs pentes.

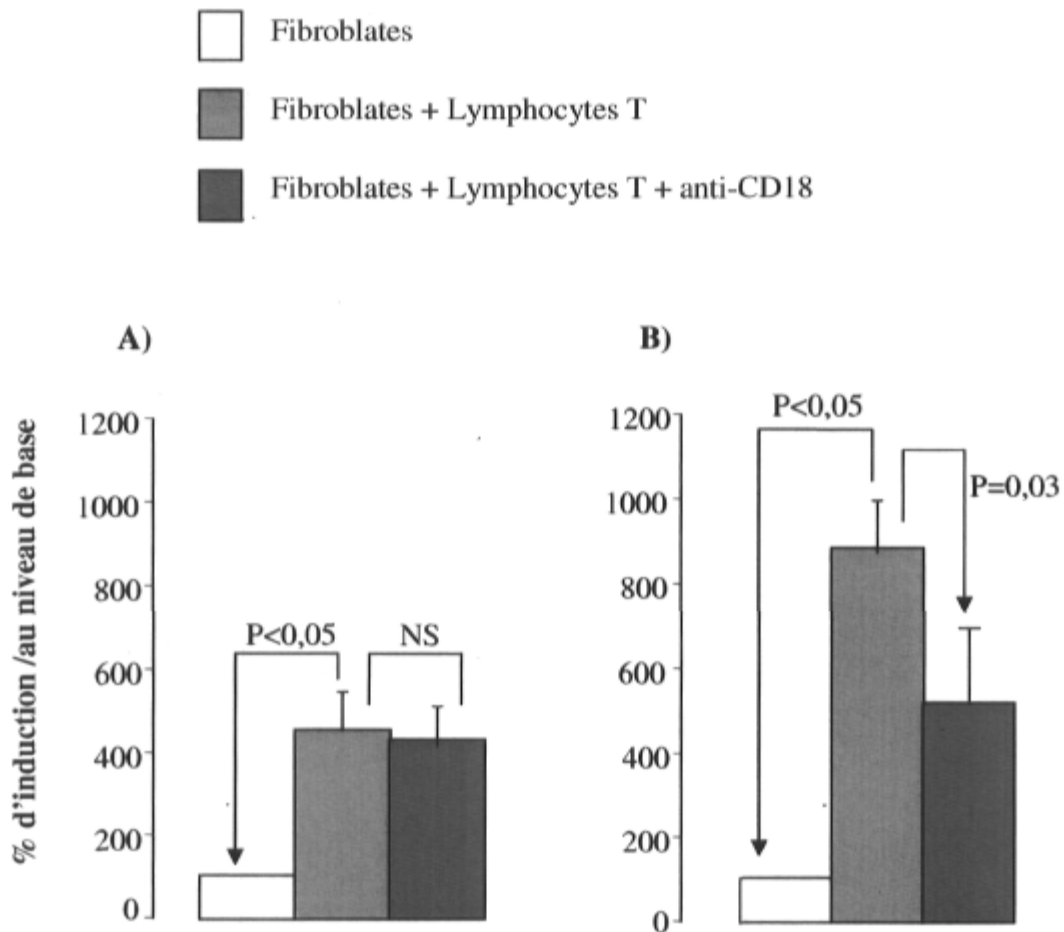
#### **4.2. Expression de l'ARN<sub>m</sub> de l'IL-6 après co-culture**

Dans le but de déterminer l'impact du contact entre les lymphocytes T et les fibroblastes sur l'expression du gène de l'IL-6, le PCR en temps réel a été utilisé.

Les fibroblastes provenant de sujets sains et asthmatiques montrent tous les deux une augmentation significative de l'expression de l'IL-6 suite au contact avec les lymphocytes T (Figure 12). Cette augmentation de l'expression de l'IL-6 est significativement plus importante ( $p = 0,02$ ) chez les fibroblastes provenant de patients asthmatiques ( $881,26 \pm 113,39 \%$ ) que chez les fibroblastes provenant de patients sains ( $452,70 \pm 92,40 \%$ ). Il est à noter qu'au niveau de base, les fibroblastes provenant de sujets asthmatiques expriment plus l'IL-6 que les fibroblastes provenant de sujets sains (résultats non présentés).

Pour évaluer l'implication de l'interaction entre LFA-1 et son ligand ICAM-1 dans l'induction de l'IL-6, un anticorps bloquant (anti-CD18) a été utilisé afin de bloquer cette interaction. Ainsi, suite à la co-culture fibroblastes-lymphocytes T en présence de l'anti-CD18, aucune inhibition significative de la production d'IL-6 n'est observée chez les sujets sains ( $452,70 \pm 92,40 \%$  à  $429,13 \pm 80,93 \%$ ,  $p > 0,05$ ) tandis que les mêmes conditions de co-culture pour les sujets asthmatiques montrent une diminution significative de l'expression de l'IL-6 en présence de l'anti-CD18 ( $881,26 \pm 113,39 \%$  à  $517,35 \pm 162,97 \%$ ,  $p = 0,03$ )

En conclusion le contact entre les lymphocytes T et les fibroblastes bronchiques augmente de manière significative l'expression de l'IL-6 et l'interaction LFA-1/ICAM-1 jouerait un rôle important dans ce processus chez les sujets asthmatiques.



**Figure 12:** Expression de l'ARN<sub>m</sub> de l'IL-6 mesurée chez les fibroblastes après co-culture de 4 h avec les lymphocytes T.

A) Co-culture de fibroblastes sains (n=6).

B) Co-culture de fibroblastes asthmatiques (n=6).

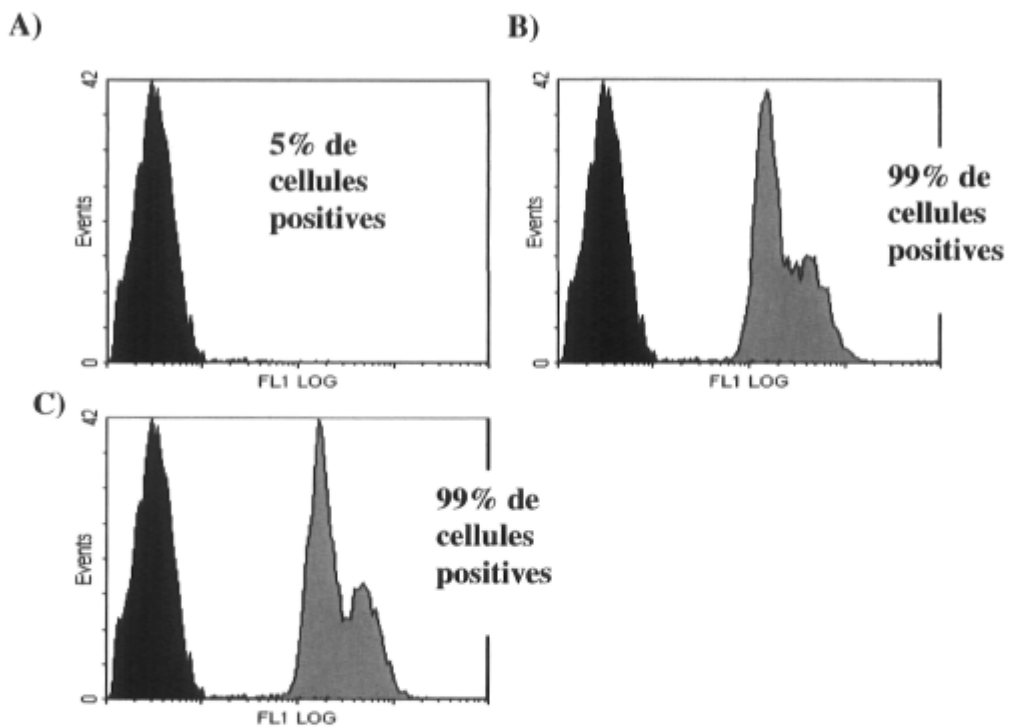
### **4.3. Expression de LFA-1 et ICAM-1**

D'après les résultats qui découlent de l'analyse par PCR en temps réel qui suggère un rôle probable de l'interaction LFA-1/ICAM-1 dans l'augmentation de l'expression d'IL-6 chez les sujets asthmatiques, l'expression de ces deux molécules que sont le LFA-1 et son ligand ICAM-1 à été évaluée par cytométrie de flux.

Les résultats obtenus montrent que LFA-1 est constitutivement exprimé à des taux élevés chez les lymphocytes T provenant aussi bien de patients sains que de patients asthmatiques (Tableau 2 et Figure 13). Les résultats présentés à la figure 13 sont représentatifs des résultats obtenus tant pour les sujets asthmatiques que sains. Aucune différence significative est notée dans le pourcentage de cellules exprimant LFA-1 entre les sujets sains et les sujets asthmatiques ceci tant avant qu'après la co-culture de 24 h. Le pourcentage de cellules exprimant LFA-1 étant très élevé, nous nous sommes intéressés à sa distribution à la surface cellulaire donc à la fluorescence moyenne (Tableau 2). À ce niveau, il n'existe pas non plus de différence statistiquement significative entre les sujets sains et les sujets asthmatiques tant avant, qu'après la co-culture de 24 h. Ces résultats nous indiquent que la molécule LFA-1 semble ne pas être modulée par la co-culture des lymphocytes T avec les fibroblastes bronchiques.

	Fluorescence Moyenne		Pourcentage de cellules positives		
	Sain (n=5)	Asthmatique (n=6)	Sain (n=5)	Asthmatique (n=6)	P-Value
<b>Lymphocytes seuls</b>	<b>17,92 ± 7,40</b>	<b>11,4 ± 6,12</b>	<b>99,53 ± 0,11</b>	<b>98,99 ± 0,89</b>	<b>NS</b>
<b>Co-culture</b>	<b>18,34 ± 8,12</b>	<b>11,13 ± 5,36</b>	<b>99,29 ± 0,13</b>	<b>98,62 ± 0,98</b>	<b>NS</b>

**Tableau 4 : Expression de LFA-1 sur les lymphocytes T.**



**Figure 13: Expression de LFA-1 chez les lymphocytes T**

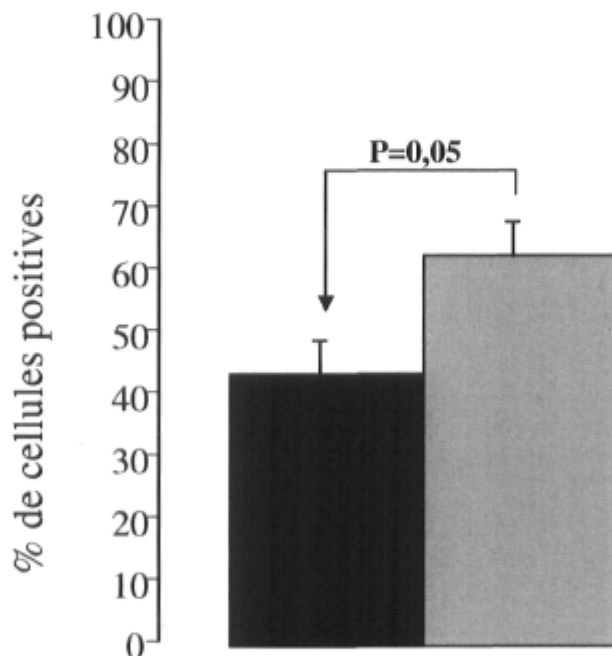
L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

A) Isotype contrôle IgG1κ.

B) Lymphocytes T seuls

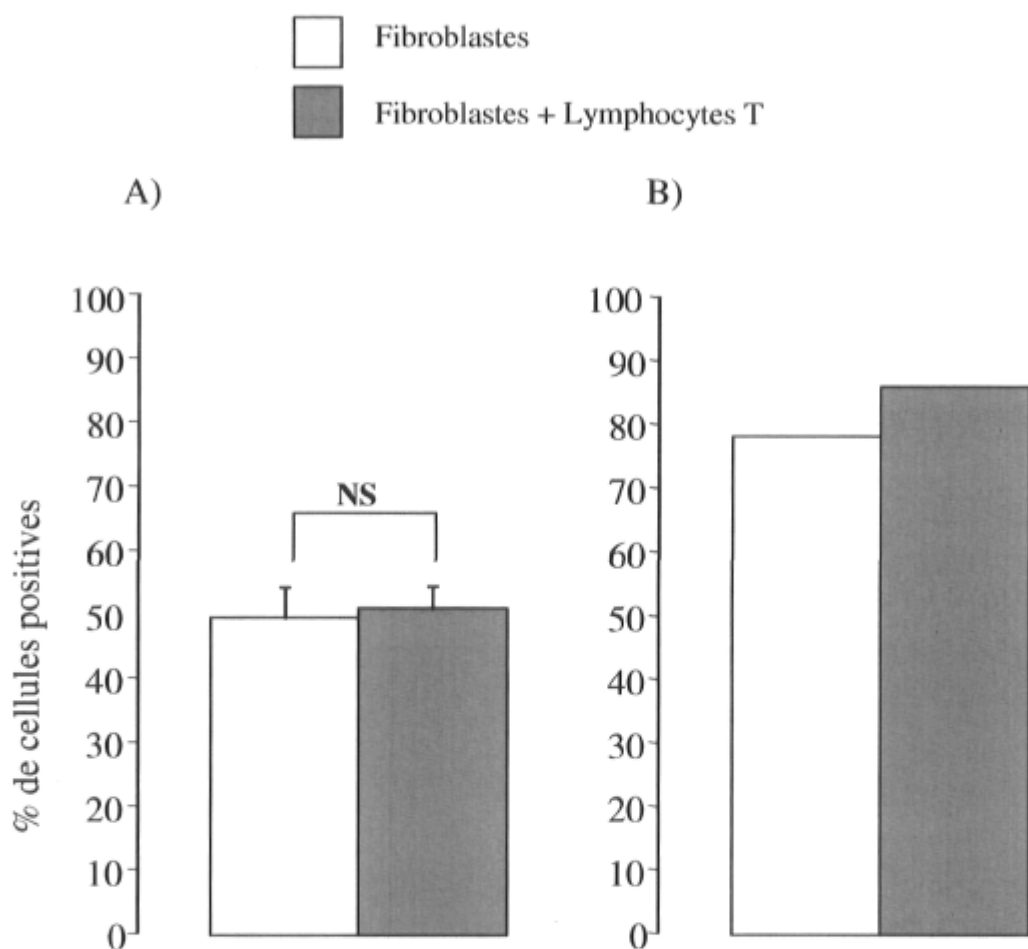
C) Lymphocytes T cultivés avec les fibroblastes bronchiques

Concernant, le ligand de LFA-1, ICAM-1 est exprimé chez les fibroblastes bronchiques. Les analyses par cytométrie effectuées avant la mise en co-culture des fibroblastes mettent en évidence une différence d'expression significative ( $p = 0,05$ ) entre les fibroblastes bronchiques de sujets sains ( $43,27 \pm 5,61 \%$ ) et ceux provenant de sujets asthmatiques ( $62,33 \pm 5,73 \%$ ) (Figure 14). Nous nous sommes alors intéressé à évaluer l'impact de la co-culture sur l'expression de ICAM-1. Les résultats obtenus nous indiquent que la co-culture n'affecte pas tant le nombre de cellules que la fluorescence moyenne chez les sujets sains (de  $43,275 \pm 6 \%$  à  $50,77 \pm 3,60 \%$ ,  $p > 0,05$ ;  $n = 5$ ). Chez les sujets asthmatiques, les résultats de co-cultures à 24 h sont très préliminaires ( $n = 1$ ) ce qui ne permet pas tirer des conclusions quant à une modulation quelconque de l'expression d'ICAM-1 et de la fluorescence moyenne chez ces derniers (Figure 15 et tableau 3).



**Figure 14: Expression de ICAM-1 chez les fibroblastes bronchiques.**

Les fibroblastes bronchiques de sujets sains ( $n = 5$ ) sont présentés en noir et ceux provenant de sujets asthmatiques sont représentés en gris ( $n = 5$ ).



**Figure 15:** Expression de ICAM-1 après co-cultures de 24 h chez les fibroblastes bronchiques.

A) Co-culture de fibroblastes de sujets sains (n=5).

B) Co-culture e fibroblastes de sujet asthmatique (n=1).

	Fluorescence Moyenne		
	Sain (n=5)	Asthmatique (n=1)	P-Value
<b>Fibroblastes</b>	3,90 ± 0,55	4,0	-
<b>Co-culture avec lymphocytes T</b>	3,90 ± 0,49	22,1	-

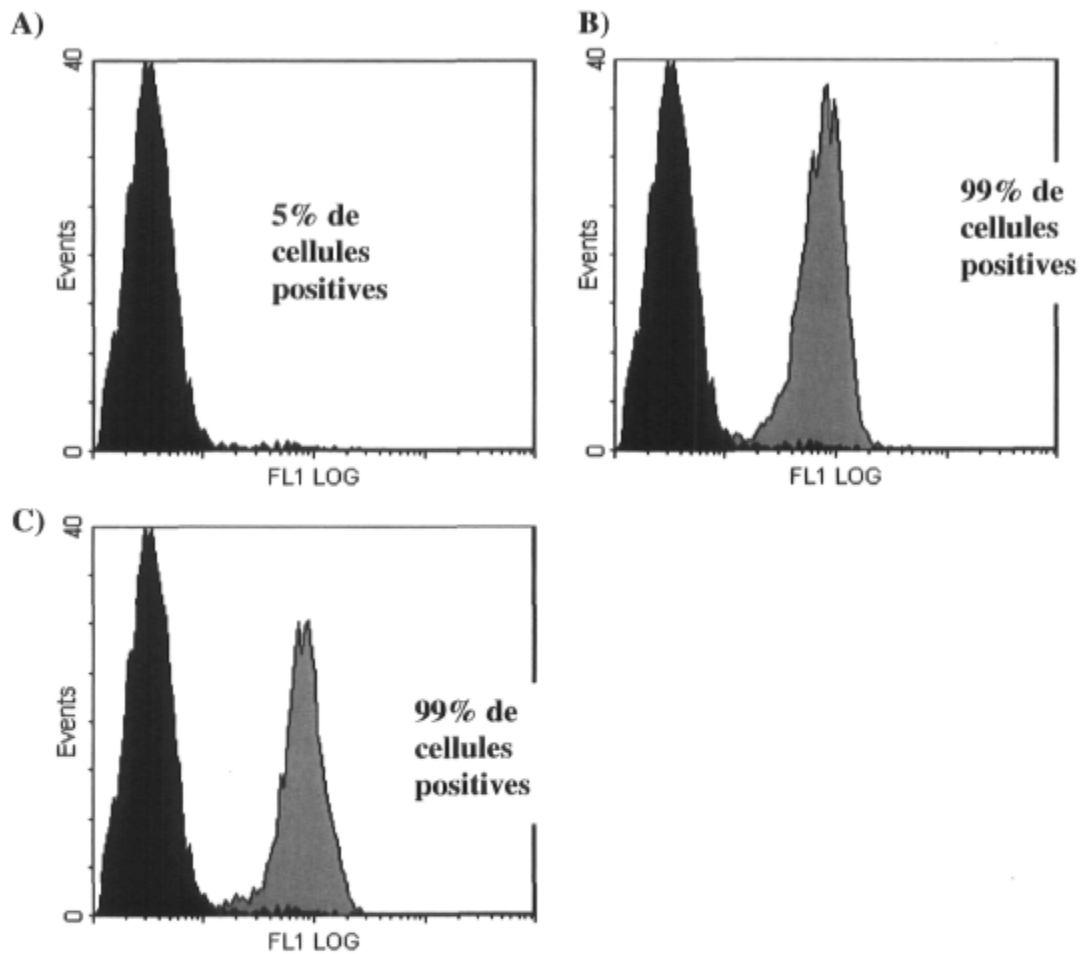
**Tableau 5 : Fluorescence moyenne de ICAM-1 chez les fibroblastes bronchiques avant et après co-culture de 24 h.**



#### **4.4. Expression du CD28 et des molécules B7-1 et B7-2**

Il a déjà été démontré dans la littérature que les lymphocytes T tant normaux qu'asthmatiques expriment constitutivement le CD28. Les résultats obtenus et présentés dans la figure 16 sont représentatifs des sujets asthmatiques et sains. Ces résultats indiquent qu'il n'y a aucune différence de base entre les lymphocytes T provenant des sujets sains et ceux provenant de sujets asthmatiques. La co-culture n'a aucun effet aussi bien sur le pourcentage de cellules (figure 16) qui expriment le CD28 que sur sa distribution à la surface cellulaire (résultats non présentés), ceci aussi bien chez les sujets sains qu'asthmatiques.

Pour ce qui est des molécules B7-1 et B7-2, les résultats indiquent que ces dernières sont très faiblement exprimées à la surface des fibroblastes dans les présentes conditions expérimentales ( $5 \pm 0,53\%$  pour B7-1 et  $5 \pm 0,36\%$  pour B7-2 au baseline). Ainsi, comme le montre la figure 17, l'expression de B7-2 est semblable à celle de l'isotype contrôle avant et après co-culture avec les lymphocytes T ce qui permet de dire que cette dernière n'est pas exprimée par les fibroblastes bronchiques et par conséquent que ces molécules ne semblent pas être impliquées dans l'augmentation de l'expression de l'IL-6 induite par la co-culture. Des résultats similaires ont été obtenus pour la molécule B7-1 (résultats non présentés).



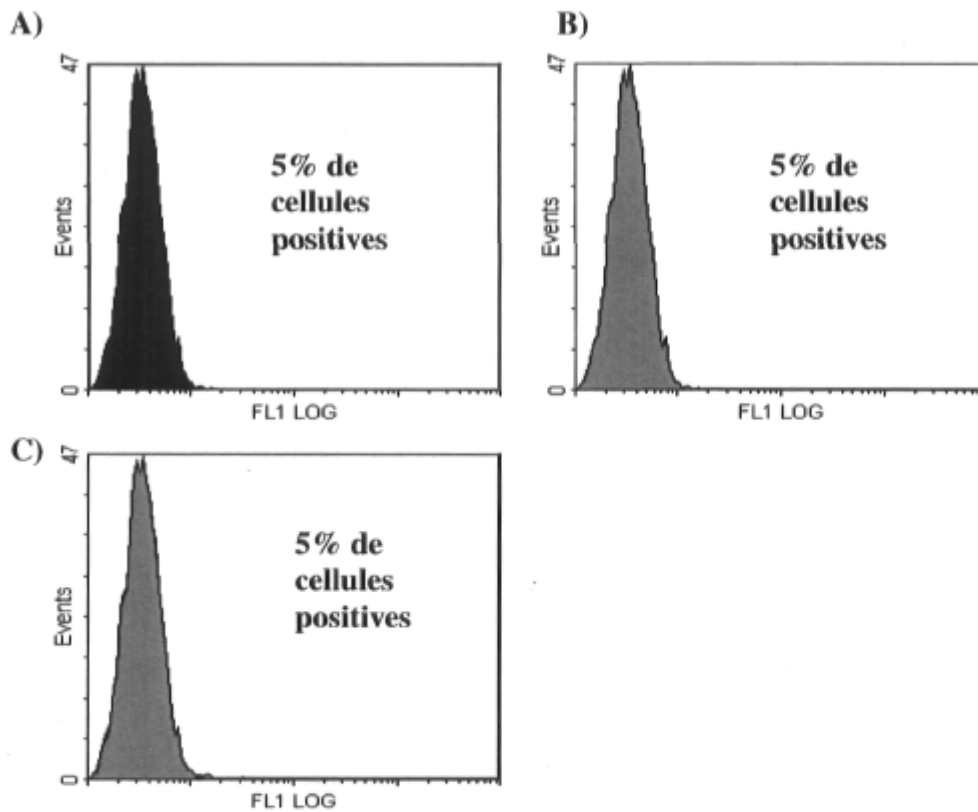
**Figure 16 : Expression de CD28 chez les lymphocytes T.**

L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

A) Isotype contrôle IgG1κ.

B) Lymphocytes T seuls (n=4).

C) Lymphocytes T cultivés avec des fibroblastes bronchiques (n=4).



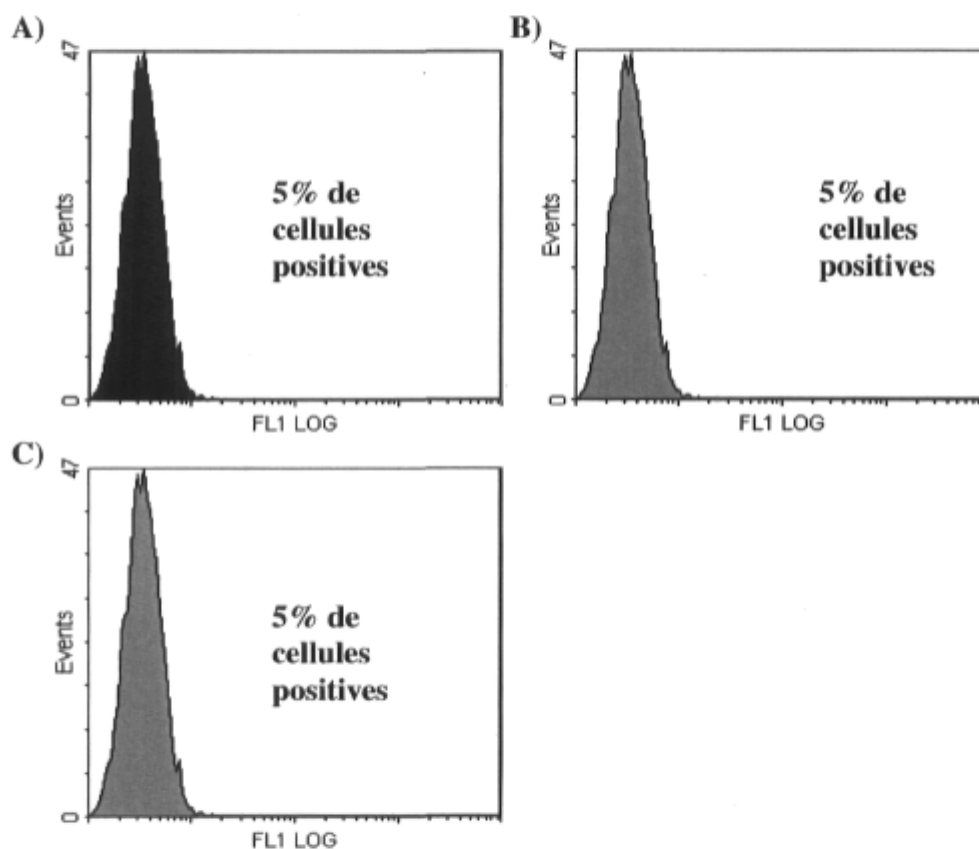
**Figure 17 : Expression de B7-2(CD86) chez les fibroblastes bronchiques.**

L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

- A) Isotype contrôle IgG 2a
- B) Fibroblastes bronchiques seuls (n=4).
- C) Fibroblastes cultivés avec des lymphocytes T (n=4).

#### 4.5. Expression du CD40 ligand et du CD40

Dans nos conditions expérimentales (Figure 18), les lymphocytes T expriment de très faibles taux de CD40L avant co-culture. Ces niveaux très bas sont similaires à ceux obtenus pour l'isotype contrôle. Suite à la co-culture, aucune modulation de l'expression de CD40L tant chez les lymphocytes provenant de sujets sains qu'asthmatiques n'est notée. Les résultats présentés sont représentatifs de ceux obtenus pour les sujets sains et les sujets asthmatiques. Ainsi, ces taux d'expression très faibles amènent à penser que les lymphocytes T utilisés dans nos expériences n'expriment pas le CD40L.



**Figure 18 : Expression CD40L chez les lymphocytes T.**

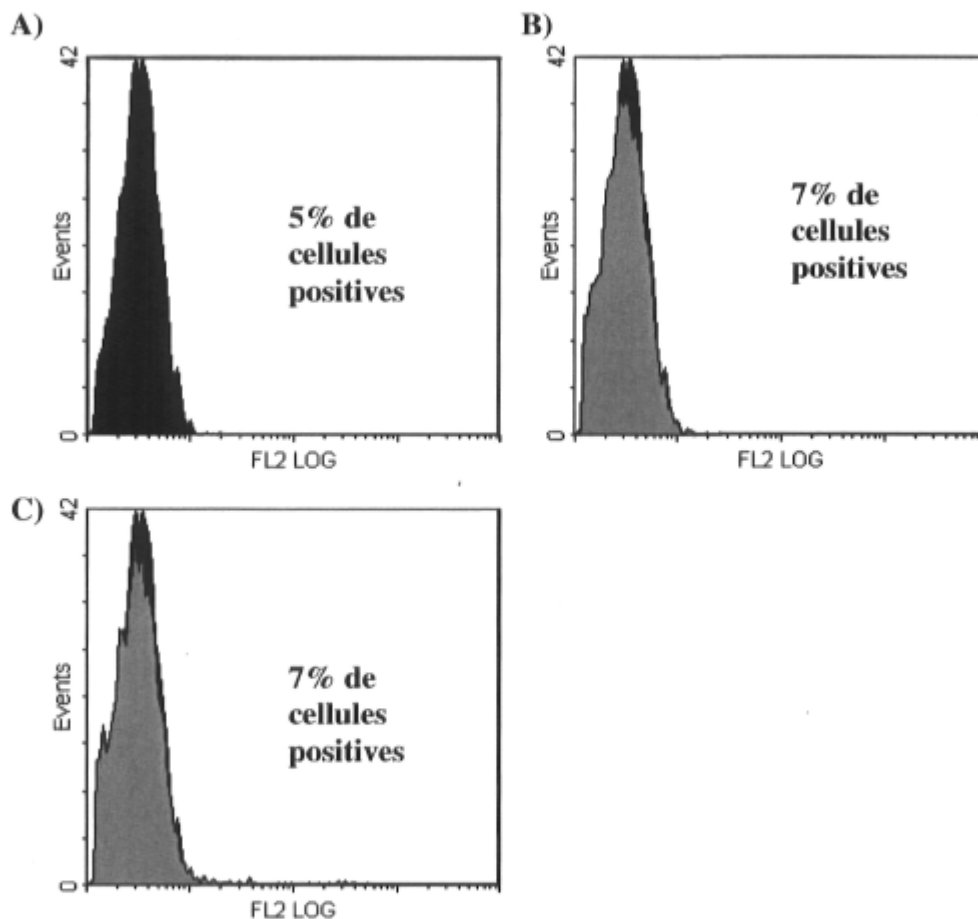
L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

A) Isotype contrôle IgG1κ

B) Lymphocytes T seuls (n=11).

C) Lymphocytes T cultivés avec les fibroblastes bronchiques (n=11).

De faibles niveaux d'expression de CD40 (Figure 19) sont également notés tant chez les fibroblastes provenant de sujets sains que ceux provenant de patients asthmatiques. Aucune modulation du CD40 à la surface des fibroblastes n'a été notée, ce qui laisse penser que cette interaction ne semble pas être impliquée dans l'augmentation de la production d'IL-6 qui fait suite à la co-culture.



**Figure 19: Expression CD40 chez les fibroblastes bronchiques.**

L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

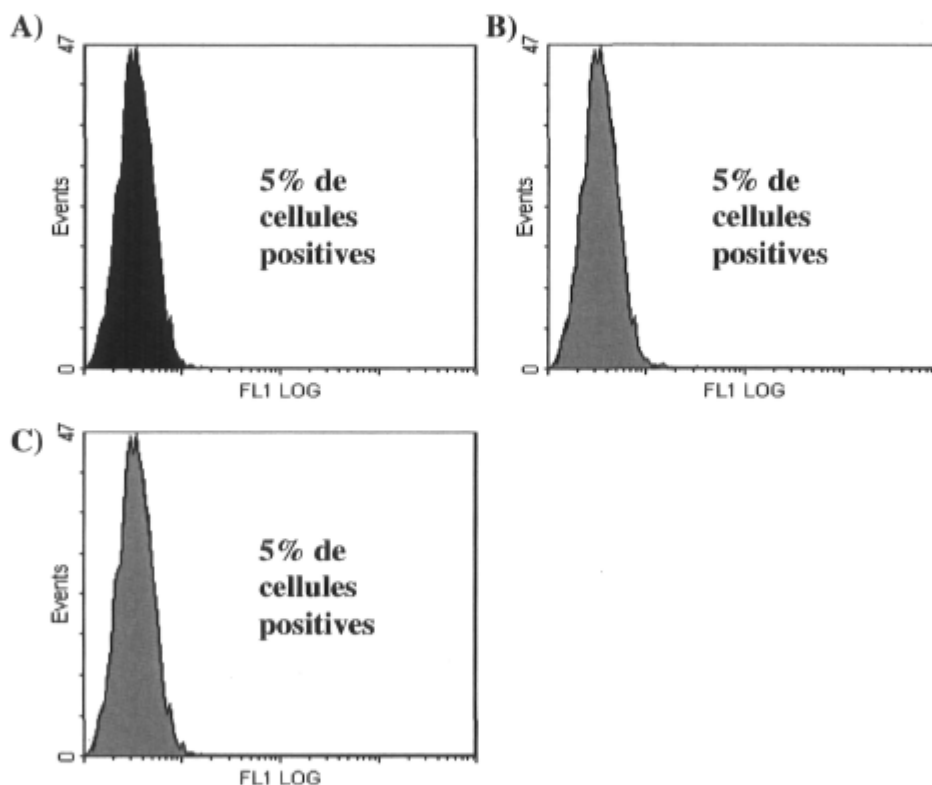
A) Isotype contrôle IgG1κ

B) Fibroblastes bronchiques seuls (n=3).

C) Fibroblastes cultivés avec les lymphocytes T (n=3).

#### 4.6. Expression de ICOS

La molécule ICOS peut être modulée par de nombreuses cytokines et médiateurs produits tant par les lymphocytes T que par les fibroblastes. Nos résultats (Figure 20) montrent que les niveaux d'expression de ICOS chez les lymphocytes T sont très bas et surtout sont identiques à ceux de l'isotype contrôle suggérant ainsi que ce dernier n'est pas exprimé à la surface des lymphocytes T dans nos conditions expérimentales. Les résultats présentés sont représentatifs de ceux obtenus pour les sujets sains et les sujets normaux. Ces résultats, laissent à penser à la non implication de cette interaction dans l'augmentation de l'expression de l'IL-6 induite par la co-culture.



**Figure 20: Expression ICOS chez les lymphocytes T.**

L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

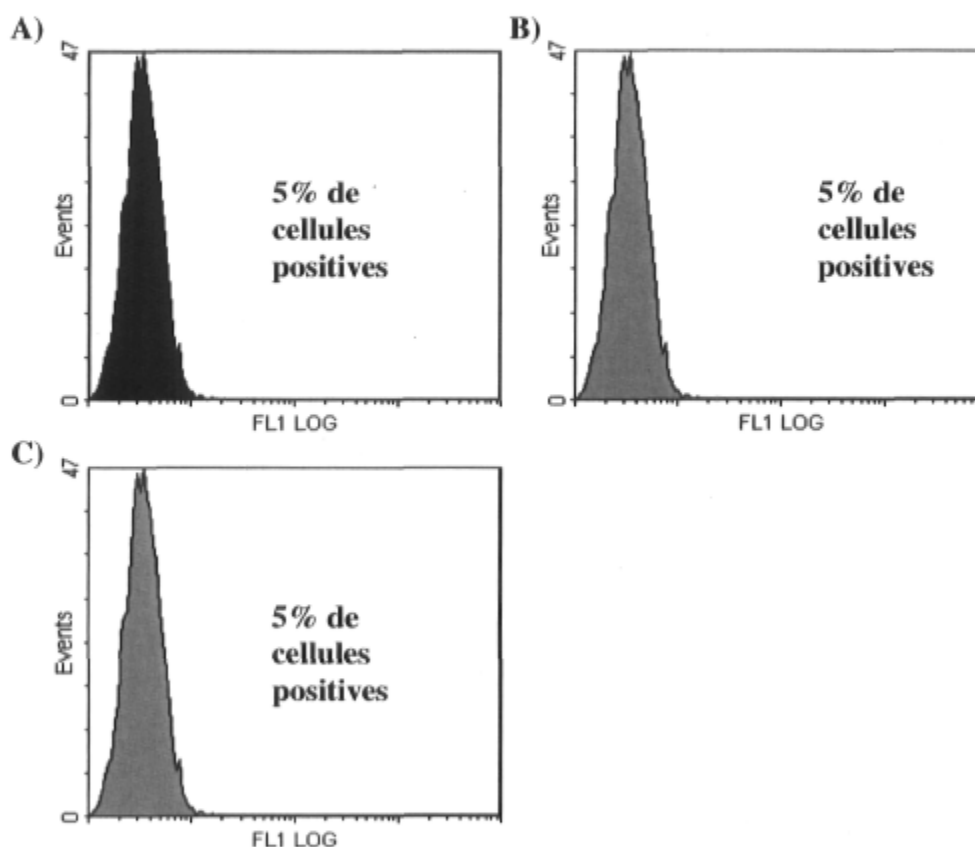
A) Isotype contrôle IgG1κ.

B) Expression de OX40 (n=6).

C) Lymphocytes T cultivés avec des fibroblastes bronchiques (n=6).

#### 4.7. Expression de OX40

Comme le montre la figure 21, les lymphocytes T expriment de très faibles taux de OX40 avant et après co-culture. Les résultats présentés sont représentatifs de ceux obtenus pour les sujets sains et les sujets asthmatiques. Ainsi, ces taux d'expression très faibles amènent à penser que les lymphocytes T utilisés dans nos expériences n'expriment pas le CD40L. Ces résultats montrent que la co-culture n'influence pas l'expression de OX40. Ceci suggère que l'interaction entre OX40 et son ligand OX40L semble ne pas être impliqué dans l'augmentation de l'expression de l'IL-6 qui fait suite à la co-culture.



**Figure 21: Expression OX40 chez les lymphocytes T.**

L'isotype contrôle est présenté en noir et les conditions d'intérêts en gris.

D) Isotype contrôle IgG1κ

E) Lymphocytes T seuls (n=3).

F) Lymphocytes T cultivés avec les fibroblastes bronchiques (n=3).

**CHAPITRE 5**

**DISCUSSION**



L'inflammation dans les voies aériennes est orchestrée par des interactions complexes qui se produisent tant au niveau cellulaire que moléculaire. Ces interactions entre les cellules résidentes de la muqueuse bronchique et les cellules inflammatoires qui se sont infiltrées peuvent se faire soit par contact direct, soit via les cytokines et d'autres médiateurs sécrétés. L'identité des molécules impliquées dans ces interactions ainsi que leurs effets sur la modulation de la réponse inflammatoire ne sont pas encore tous élucidés. Toutefois, il est aujourd'hui admis que le contact cellule-cellule entre les cellules résidentes de la muqueuse bronchique et les cellules immunitaires joue un rôle important dans l'inflammation et le remodelage bronchique.

Chez les sujets asthmatiques, une infiltration de cellules immunitaires impliquant en partie des lymphocytes est infiltrée [24]. Cette infiltration de lymphocytes dans la muqueuse bronchique augmente la probabilité d'interactions directes avec les fibroblastes ce qui contribuerait à la production de nombreuses cytokines tels l'IL-6, et par conséquent à l'activation et à la survie des lymphocytes [87].

Cette étude met en évidence le rôle du contact entre les fibroblastes et les lymphocytes T dans l'induction d'IL-6. En effet, le contact direct entre les lymphocytes T et les fibroblastes induit une augmentation de la production d'IL-6 au niveau du gène après des co-cultures de 4 h tant chez les fibroblastes provenant de sujets asthmatiques que ceux provenant de sujets sains. L'induction de l'expression de l'IL-6 par les fibroblastes a été utilisée comme un indice de la capacité des lymphocytes T à induire une réponse fibrogénique [87;88]. En effet, comme mentionné à la section 1.4.1 de ce mémoire, il existe une forte corrélation entre la fibrose et l'expression d'IL-6 dans différents tissus. L'IL-6 joue également un rôle dans l'accumulation des leucocytes au site inflammatoire. En effet, Romano et al. ont montré que des souris déficientes en IL-6 présentent une réduction significative du recrutement des leucocytes au site inflammatoire [123]. Ces évidences et celles exposées précédemment plaident en faveur d'un rôle important de l'IL-6 dans l'inflammation ainsi que dans le remodelage bronchique dans l'asthme [87;118;124;125]. Les résultats obtenus montrent clairement que les fibroblastes provenant de sujets asthmatiques présentent une expression plus élevée d'IL-6 après co-culture que les fibroblastes provenant de sujets sains.

Dans le but d'identifier les molécules impliquées dans cette interaction et qui seraient responsables de la transmission du signal à l'origine de l'induction de la production d'IL-6, l'expression de certaines molécules de surfaces a été évaluée. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de l'interaction LFA-1/ICAM-1 dans la production de nombreuses cytokines dont l'IL-6 [93]. Afin de déterminer le rôle joué par cette interaction dans l'augmentation de la production d'IL-6 chez les fibroblastes bronchiques induite par les lymphocytes T, un anticorps anti-CD18 a été utilisé pour bloquer cette interaction. Les résultats obtenus suite au blocage (Figure 12) sont édifiants. En effet, une inhibition de l'induction de l'IL-6 chez les asthmatiques mais pas chez les sujets sains est observée. Ces résultats suggèrent deux choses : 1) l'interaction LFA-1/ICAM-1 est impliquée dans l'induction de l'IL-6 chez les sujets asthmatiques mais pas chez les sujets sains; 2) Cette interaction LFA-1/ICAM-1 n'est pas la seule à l'origine de l'augmentation de l'expression de l'IL-6 chez les sujets asthmatiques (inhibition de 40%). L'étude de l'expression de LFA-1 et de son ligand ICAM-1 n'a montré aucune différence au niveau de LFA-1 entre les sujets sains et asthmatiques. Par contre, il existe une différence statistiquement significative entre les sujets sains et les sujets asthmatiques pour l'expression d'ICAM-1 (Figure 14). Aussi, la co-culture n'affecte pas l'expression d'ICAM-1 chez les sujets sains tandis que chez les sujets asthmatiques une faible augmentation de l'expression d'ICAM-1 couplée à une plus forte augmentation de la fluorescence moyenne (Figure 15 et tableau 3) est notée. Cette différence d'expression entre les sujets sains et asthmatiques pourrait expliquer pourquoi les asthmatiques répondent mieux au blocage avec l'anti-CD18. Toutefois, cette différence dans l'expression d'ICAM-1 ne saurait expliquer à elle seule le fait que les sujets sains ne répondent pas du tout au blocage avec l'anti-CD18. Une autre hypothèse serait que l'état d'activation de l'intégrine LFA-1 pourrait être en cause, mais d'autres tests devraient être réalisés afin de déterminer l'état d'activation de cette intégrine chez les sujets sains et les sujets asthmatiques.

Les résultats du test d'inhibition suggèrent l'implication d'autres molécules de surface dans l'induction d'IL-6. D'autres molécules communément impliquée dans les interactions entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène, dont l'interaction avec leurs ligands joue un rôle dans l'induction de cytokines de type Th2 lors de la réponse inflammatoire, ont été étudiées : Les molécules B7-1 et B7-2 dont le contre récepteur CD28 (Figure 16) est

constitutivement exprimé chez les lymphocytes T autant asthmatiques que sains ne semblent pas être exprimées dans nos conditions expérimentales (Figure 17). Ceci amène à penser que cette interaction semble ne pas être impliquée dans l'induction d'IL-6 que nous observons suite à la co-culture.

Notre attention s'est également portée sur d'autres molécules de surface à savoir, le CD40 et son ligand le CD154 (CD40L), ICOS et OX40. Ces molécules jouent un rôle important dans la production de cytokines de type Th2 dont l'IL-6 [96;116]. Dans le cas de CD40 et de son ligand, les résultats obtenus indiquent que ces derniers sont tous deux exprimés à des niveaux très bas. Ces résultats sont en contradiction avec ce qui est rapporté dans la littérature. En effet, plusieurs études ont montré que le CD40 est exprimé à de faibles niveaux par les fibroblastes provenant de nombreux tissus tels le poumon et les intestins [87]. Des analyses antérieures par cytométrie de flux réalisés dans notre laboratoire ont montré une faible expression de CD40 chez les fibroblastes bronchiques provenant de sujets tant asthmatiques que sains. Ainsi, les très faibles niveaux d'expression obtenus pourraient s'expliquer par l'utilisation d'un anticorps qui n'est pas optimal pour être utilisé en cytométrie de flux. L'utilisation d'un contrôle positif afin de vérifier l'efficacité de l'anti-CD40 utilisé serait nécessaire. Les mêmes remarques pourraient être évoquées dans le cas du CD40L dont les niveaux sont augmentés chez des sujets souffrant de maladies inflammatoires tel l'arthrite rhumatoïde et dont l'expression est bien documenté chez les lymphocytes T activés [126]. Toutefois, les grands écart-types obtenus lors des marquages suggèrent que l'anticorps est en mesure de reconnaître le CD40L et de s'y lier et que par conséquent, une utilisation de l'anticorps en dessous de la concentration optimale requise pourrait expliquer ces résultats. Un autre facteur qui pourrait expliquer ces niveaux inhabituellement bas de CD40L est le fait que nos marquages de cytométrie ont été réalisés après des cultures de 24 h. En effet, des études récentes indiquent que le CD40L est à peine détectable après 16 h parce qu'étant clivé en sCD40L tandis que, d'autres études estiment qu'il atteint son expression maximale à 24 h [127;128].

Pour ce qui est de l'expression d'ICOS, nos résultats indiquent qu'ICOS n'est pas exprimé à la surface des cellules T dans nos conditions expérimentales. Cette incapacité à détecter ICOS pourrait être attribuée au fait qu'il n'est plus exprimé à la surface des lymphocytes T après 24 h.

Quant à OX40, l'expression de cette molécule de co-stimulation est très faible chez les lymphocytes T isolés de patients asthmatiques et chez ceux isolés de sujets sains. La co-culture n'affecte pas l'expression de cette molécule chez les sujets sains et les sujets asthmatiques. Cependant, il est à noter que de nombreuses études ont montré que certaines cytokines influencent les niveaux d'expression de OX40, tel est le cas de l'IL-4 qui induit une réduction du niveau d'expression d'OX40 [125]. Il serait donc intéressant de regarder si le faible taux d'expression observé n'est pas le fait d'une cytokine quelconque. Aussi, sachant que l'augmentation de l'expression de OX40 est associée à une prolongation de la durée de vie des cellules T, il conviendrait de faire des marquages à différents temps soit 4, 24 et 48 h par exemple afin de documenter pleinement l'expression de OX40 [125].

De nombreuses données expérimentales indiquent une augmentation de l'activation des cellules T chez les asthmatiques. Il est donc permis de penser que le niveau d'activation des lymphocytes, qui est très probablement corrélé avec le degré de sévérité de l'asthme est un facteur déterminant dans l'expression de certaines molécules de surfaces par les lymphocytes T. Le fait que nos sujets asthmatiques soient des asthmatiques légers pourrait expliquer le fait que certains lymphocytes n'expriment pas certaines molécules. Toutefois, quelques interrogations demeurent quant à l'implication ou non de certaines interactions moléculaires dans l'augmentation de l'expression et de la production d'IL-6 suite à la co-culture entre les lymphocytes T et les fibroblastes. Pour s'assurer de l'implication de ces interactions moléculaires et confirmer les résultats de nos analyses par cytométrie de flux, des tests de liaison et d'affinité seraient intéressants à effectuer en particulier les interactions moléculaires tels CD40/CD40L, OX40/OX40L et CD28/B7.

Comme le suggèrent nos résultats, plusieurs molécules semblent être impliquées dans l'augmentation de la production d'IL-6 obtenue suite à la co-culture. Ainsi, il serait très intéressant d'utiliser des cocktails d'anticorps bloquant afin d'évaluer l'implication de certaines de ces molécules. Plusieurs combinaisons peuvent être réalisées notamment celle impliquant les anti-CD18 et anti-CD40. Cette approche nous permettrait également d'apprécier le devenir des lymphocytes T et des fibroblastes ainsi que leur profil cytokinique après co-culture avec et sans anticorps bloquants.

En conclusion, ces résultats donnent un aperçu de l'importance du contact entre les cellules inflammatoires et les cellules résidentes dans la pathogenèse de l'inflammation et dans l'asthme en particulier. La réalisation de ce projet a permis d'identifier certaines molécules impliquées dans l'interaction entre les fibroblastes bronchiques et les lymphocytes T et a donc permis de nous renseigner d'une façon simple sur la modulation de l'inflammation et de la réparation de la muqueuse bronchique à l'état normal et dans l'asthme.

## Références

1. Godard P. Asthme: physiopathologie, étiologie, diagnostic, évolution, pronostic, traitement. *Rev Praticien* 1995; 45:1421-31.
2. Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes. Statistique Canada 2003.
3. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, Bousquet J. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998; 157:403-9.
4. Platts-Mills TA, Wheatley LM. The role of allergy and atopy in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 1996; 2:29-34.
5. Wardlaw AJ. The role of air pollution in asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:81-96.
6. National Asthma and Education Programm, Clinical practice guidelines. NIH publication 1997; Expert Pannel Report.
7. Louis-Philippe Boulet. Définition et épidémiologie de l'asthme. In: *L'asthme: notions de base - éducation - intervention*. Québec: Presses de l'Université Laval, 1997: 5-14.
8. National Asthma and Education Programm, Clinical practice guidelines. NIH publication 2007; Expert Pannel Report.
9. Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Mentzer SJ, Sugarbaker DJ, Doerschuk CM, Drazen JM. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:565-72.
10. Guo CB, Liu MC, Galli SJ, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:384-90.
11. Montefort S, Gratziau C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST, Carroll MP. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest* 1994; 93:1411-21.
12. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:863-71.
13. Broide DH, Gleich GJ, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC, Schwartz LB, Wasserman SI. Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:637-48.

14. Jarjour NN, Calhoun WJ, Kelly EA, Gleich GJ, Schwartz LB, Busse WW. The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1515-21.
15. Zangrilli JG, Shaver JR, Cirelli RA, Cho SK, Garlisi CG, Falcone A, Cuss FM, Fish JE, Peters SP. sVCAM-1 levels after segmental antigen challenge correlate with eosinophil influx, IL-4 and IL-5 production, and the late phase response. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1346-53.
16. Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *European Respiratory Journal* 1998; 12:221-34.
17. Busse WW, Lemanske RF. Advances in immunology - Asthma. *New England Journal of Medicine* 2001; 344:350-62.
18. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 160:4730-7.
19. Kay AB. Advances in immunology - Allergy and allergic diseases - First of two parts. *New England Journal of Medicine* 2001; 344:30-7.
20. Kemeny DM, Urbanek R, Ewan P, McHugh S, Richards D, Patel S, Lessof MH. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:545-9.
21. Neeley SP, Hamann KJ, White SR, Baranowski SL, Burch RA, Leff AR. Selective regulation of expression of surface adhesion molecules Mac-1, L-selectin, and VLA-4 on human eosinophils and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8:633-9.
22. Bochner BS, Busse WW. Allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115:953-9.
23. Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD. Human Eosinophil Major Basic-Protein Is An Endogenous Allosteric Antagonist at the Inhibitory Muscarinic M2-Receptor. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91:1314-8.
24. Hamid Q, Tulic' MK, Liu MC, Moqbel R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S5-S12.
25. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356:2144-8.

26. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annual Review of Medicine* 2004; 55:395-417.
27. Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol* 1987; 138:2611-5.
28. Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2003; 33:550-6.
29. Bradding P. The role of the mast cell in asthma: a reassessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3:45-50.
30. Bradding P. Human mast cell cytokines. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:13-9.
31. Stelekati E, Orinska Z, Bulfone-Paus S. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology* 2007; 212:505-19.
32. Delprete GF, Decarli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified Protein Derivative of Mycobacterium-Tuberculosis and Excretory-Secretory Antigen(S) of Toxocara-Canis Expand Invitro Human T-Cells with Stable and Opposite (Type-1 T-Helper Or Type-2 T-Helper) Profile of Cytokine Production. *Journal of Clinical Investigation* 1991; 88:346-50.
33. Goldsky Richard, Kindt Thomas, Osborne Barbara. Réactions d'hypersensibilité. In: *Immunologie*. New York: Dunod, 2000: 395-421.
34. Charles Janeway, Paul Travers. La réponse immune humorale. In: *Immunobiologie*. Garland Publishing Inc., 1997: 309-60.
35. Gerblich AA, Salik H, Schuyler MR. Dynamic T-Cell Changes in Peripheral-Blood and Bronchoalveolar Lavage After Antigen Bronchoprovocation in Asthmatics. *American Review of Respiratory Disease* 1991; 143:533-7.
36. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:935-42.
37. Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of Activated Lymphocytes-T and Eosinophils in Bronchial Biopsies in Stable Atopic Asthma. *American Review of Respiratory Disease* 1990; 142:1407-13.
38. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993; 48:26-32.



39. Umetsu DT, DeKruyff RH. Th1 and Th2 CD4(+) cells in the pathogenesis of allergic diseases. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1997; 215:11-20.
40. Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of Cd4+ T-Cells, Increased T(H2)-Type Cytokine Messenger-Rna Expression, and Eosinophil Recruitment in Bronchoalveolar Lavage After Allergen Inhalation Challenge in Patients with Atopic Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1993; 92:313-24.
41. Kelso A. Th1 and Th2 Subsets - Paradigms Lost. *Immunology Today* 1995; 16:374-9.
42. Meiler F, Zimmermann M, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* 2006; 6:91-6.
43. Bodner C, Godden D, Seaton A. Family size, childhood infections and atopic diseases. *Thorax* 1998; 53:28-32.
44. Delprete GF, Decarli M, Delios MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L, Romagnani S. Allergen Exposure Induces the Activation of Allergen-Specific Th2 Cells in the Airway Mucosa of Patients with Allergic Respiratory Disorders. *European Journal of Immunology* 1993; 23:1445-9.
45. Street NE, Mosmann TR. Functional Diversity of Lymphocyte-T Due to Secretion of Different Cytokine Patterns. *Faseb Journal* 1991; 5:171-7.
46. Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:725-9.
47. Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:951-8.
48. James A, Carroll N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J* 2000; 15:782-9.
49. Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:363-71.
50. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:720-6.
51. Hoshino M, Nakamura Y, Sim J, Shimojo J, Isogai S. Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:783-8.

52. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:1-11.
53. Gabbrielli S, Di Lollo S, Stanflin N, Romagnoli P. Myofibroblast and elastic and collagen fiber hyperplasia in the bronchial mucosa: a possible basis for the progressive irreversibility of airway obstruction in chronic asthma. *Pathologica* 1994; 86:157-60.
54. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3:507-11.
55. Gomes I, Mathur SK, Espenshade BM, Mori Y, Varga J, Ackerman SJ. Eosinophil-fibroblast interactions induce fibroblast IL-6 secretion and extracellular matrix gene expression: implications in fibrogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:796-804.
56. Benayoun L, Pretolani M. Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutical perspectives. *M S-Medecine Sciences* 2003; 19:319-26.
57. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends in Immunology* 2001; 22:199-204.
58. Devalia JL, Davies RJ. Airway Epithelial-Cells and Mediators of Inflammation. *Respiratory Medicine* 1993; 87:405-8.
59. Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, Kay AB. Expression and Generation of Interleukin-8, Il-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor by Bronchial Epithelial-Cells and Enhancement by Il-1-Beta and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha. *Immunology* 1992; 77:330-7.
60. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked Goblet Cell Hyperplasia with Mucus Accumulation in the Airways of Patients Who Died of Severe Acute Asthma Attack. *Chest* 1992; 101:916-21.
61. Boxall C, Holgate ST, Davies DE. The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *European Respiratory Journal* 2006; 27:208-29.
62. Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta 1, TGF-beta 2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clinical and Experimental Allergy* 2004; 34:437-44.
63. Fernandes DJ, Bonacci JV, Stewart AG. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets* 2006; 7:567-77.

64. Westergren-Thorsson G, Chakir J, Lafreniere-Allard MJ, Boulet LP, Tremblay GM. Correlation between airway responsiveness and proteoglycan production by bronchial fibroblasts from normal and asthmatic subjects. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2002; 34:1256-67.
65. Hastie AT, Kraft WK, Nyce KB, Zangrilli JG, Musani AI, Fish JE, Peters SP. Asthmatic epithelial cell proliferation and stimulation of collagen production - Human asthmatic epithelial cells stimulate collagen type III production by human lung myofibroblasts after segmental allergen challenge. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 165:266-72.
66. Bergeron C, Page N, Joubert P, Barbeau B, Hamid Q, Chakir J. Regulation of procollagen I (alpha 1) by interleukin-4 in human bronchial fibroblasts: a possible role in airway remodelling in asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2003; 33:1389-97.
67. Laliberte R, Rouabhia M, Bosse M, Chakir J. Decreased capacity of asthmatic bronchial fibroblasts to degrade collagen. *Matrix Biology* 2001; 19:743-53.
68. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells - Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *American Journal of Pathology* 1997; 151:317-22.
69. Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Lipinski S, Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Kunkel SL. Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. *J Immunol* 1999; 163:2193-201.
70. Skold CM, Ohkuni Y, Liu XD, Numerof R, Rennard SI. Co-cultured human mast cells stimulate fibroblast-mediated contraction of collagen gels. *Inflammation* 2001; 25:47-51.
71. Artuc M, Steckelings UM, Henz BM. Mast cell-fibroblast interactions: Human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 118:391-5.
72. Fitzgerald SM, Chi DS, Hall HK, Reynolds SA, Aramide O, Lee SA, Krishnaswamy G. GM-CSF induction in human lung fibroblasts by IL-1 beta, TNF-alpha, and macrophage contact. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2003; 23:57-65.
73. Rochester CL, Ackerman SJ, Zheng T, Elias JA. Eosinophil-fibroblast interactions - Granule major basic protein interacts with IL-1 and transforming growth factor-beta in the stimulation of lung fibroblast IL-6-type cytokine production. *Journal of Immunology* 1996; 156:4449-56.
74. Vancheri C, Mastruzzo C, Trovato-Salinaro E, Gili E, Lo Furno D, Pistorio MP, Caruso M, La Rosa C, Crimi C, Failla M, Crimi N. Interaction between human lung fibroblasts and T-lymphocytes prevents activation of CD4(+) cells. *Respiratory Research* 2005; 6.

75. Turmel V. Le contact cellulaire entre les fibroblastes bronchiques et les lymphocytes T augmente la production d'IL-6 et d'IL-8 dans l'asthme. Thesis 2002.
76. Bellou A, Finn PW. Costimulation: Critical pathways in the immunologic regulation of asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* 2005; 5:149-54.
77. Dubey C, Croft M, Swain SL. Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol* 1995; 155:45-57.
78. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54:825-57.
79. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109:295-9.
80. Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2005; 28:257-69.
81. Ammit AJ, Moir LM, Oliver BG, Hughes JM, Alkhoury H, Ge Q, Burgess JK, Black JL, Roth M. Effect of IL-6 trans-signaling on the pro-remodeling phenotype of airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292:L199-L206.
82. Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincon M. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 2000; 13:805-15.
83. Vermes C, Jacobs JJ, Zhang J, Firmeisz G, Roebuck KA, Glant TT. Shedding of the interleukin-6 (IL-6) receptor (gp80) determines the ability of IL-6 to induce gp130 phosphorylation in human osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:16879-87.
84. Sporri B, Muller KM, Wiesmann U, Bickel M. Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *Int Immunol* 1999; 11:1053-8.
85. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; 63:321-9.
86. Dicosmo B, Geba G, Picarella D, Elias JA, Rankin JA, Stripp B, Whitsett JA, Flavell RA. Expression of Interleukin-6 by Airway Epithelial-Cells - Effects on Airway Inflammation and Hyperreactivity in Transgenic Mice. *Chest* 1995; 107:S131.
87. Vogel JD, West GA, Danese S, De La Motte C, Phillips MH, Strong SA, Willis J, Fiocchi C. CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-Cell transmigration. *Gastroenterology* 2004; 126:63-80.

88. Gharaee-Kermani M, Phan SH. The role of eosinophils in pulmonary fibrosis (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 1998; 1:43-53.
89. Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53:1035-43.
90. Stanciu LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J* 1998; 11:949-57.
91. Parameswaran N, Suresh R, Bal V, Rath S, George A. Lack of ICAM-1 on APCs during T cell priming leads to poor generation of central memory cells. *J Immunol* 2005; 175:2201-11.
92. Chirathaworn C, Kohlmeier JE, Tibbetts SA, Rumsey LM, Chan MA, Benedict SH. Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a second signal for T cell activation. *Journal of Immunology* 2002; 168:5530-7.
93. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17:251-8.
94. Kohlmeier JE, Rumsey LM, Chan MA, Benedict SH. The outcome of T-cell costimulation through intercellular adhesion molecule-1 differs from costimulation through leucocyte function-associated antigen-1. *Immunology* 2003; 108:152-7.
95. Tang ML, Fiscus LC. Important roles for L-selectin and ICAM-1 in the development of allergic airway inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; 14:203-10.
96. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology* 2005; 23:515-48.
97. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:116-26.
98. Skapenko A, Lipsky PE, Kraetsch HG, Kalden JR, Schulze-Koops H. Antigen-independent Th2 cell differentiation by stimulation of CD28: Regulation via IL-4 gene expression and mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Immunology* 2001; 166:4283-92.
99. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the Th1/Th2 Developmental Pathways - Application to Autoimmune-Disease Therapy. *Cell* 1995; 80:707-18.
100. Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DY. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:96-102.

101. Cagnoni F, Oddera S, Giron-Michel J, Riccio AM, Olsson S, Dellacasa P, Melioli G, Canonica GW, Azzarone B. CD40 on adult human airway epithelial cells: Expression and proinflammatory effects. *Journal of Immunology* 2004; 172:3205-14.
102. Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32:687-93.
103. Kaufman J, Sime PJ, Phipps RP. Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: Differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis. *Journal of Immunology* 2004; 172:1862-71.
104. van Kooten C. Immune regulation by CD40-CD40-L interactions - 2; Y2K update. *Frontiers in Bioscience* 2000; 5:D880-D893.
105. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
106. Lei XF, Ohkawara Y, Stampfli MR, Mastruzzo C, Marr RA, Snider D, Xing Z, Jordana M. Disruption of antigen-induced inflammatory responses in CD40 ligand knockout mice. *J Clin Invest* 1998; 101:1342-53.
107. Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, Iacoviello L, Bodzenta-Lukaszyk A. Soluble CD40 ligand in asthma patients during allergen challenge. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4:2718-20.
108. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115:257-69.
109. Mehlhop PD, van de RM, Brewer JP, Kisselgof AB, Geha RS, Oettgen HC, Martin TR. CD40L, but not CD40, is required for allergen-induced bronchial hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:646-51.
110. Chattopadhyay K, Bhatia S, Fiser A, Almo SC, Nathenson SG. Structural basis of inducible costimulator ligand costimulatory function: determination of the cell surface oligomeric state and functional mapping of the receptor binding site of the protein. *J Immunol* 2006; 177:3920-9.
111. Chen YQ, Shi HZ. CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy* 2006; 61:15-26.
112. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of b7.1 and b7.2, is induced by TNF alpha. *Immunity* 1999; 11:423-32.
113. Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al garawi A, Kroczeck R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nature Immunology* 2001; 2:597-604.

114. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000; 13:95-105.
115. Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, Weinstock J, Matis LA, Bluestone JA, Sperling AI. Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J Immunol* 2001; 167:1996-2003.
116. Watts TH. Tnf/tnfr family members in costimulation of T cell responses. *Annual Review of Immunology* 2005; 23:23-68.
117. Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, Scott S, Lupper ML, Jr., Greenfield EA, Baum PR, Fanslow WC, Calderhead DM, Freeman GJ, Sharpe AH. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 1999; 11:689-98.
118. Kayano K, Okita K. Does IL-6 regulate liver fibrosis/cirrhosis directly and indirectly? *Journal of Gastroenterology* 2000; 35:250-1.
119. Murata K, Ishii N, Takano H, Miura S, Ndhlovu LC, Nose M, Noda T, Sugamura K. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med* 2000; 191:365-74.
120. Fillatreau S, Gray D. T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197:195-206.
121. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:225-44.
122. Goulet F, Boulet LP, Chakir J, Tremblay N, Dube J, Laviolette M, Boutet M, Xu W, Germain L, Auger FA. Morphologic and functional properties of bronchial cells isolated from normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15:312-8.
123. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van H, V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6:315-25.
124. Fries KM, Felch ME, Phipps RP. Interleukin-6 Is An Autocrine Growth-Factor for Murine Lung Fibroblast Subsets. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1994; 11:552-60.
125. Natsume M, Tsuji H, Harada A, Akiyama M, Yano T, Ishikura H, Nakanishi I, Matsushima K, Kaneko S, Mukaida N. Attenuated liver fibrosis and depressed serum

albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 66:601-8.

126. Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN. Targeting CD40L: a promising therapeutic approach. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:635-41.
127. Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, Belshaw PJ, Alberg DG, Stamenkovic I, Harmon W, Geha RS. Cyclosporine-A Inhibits Cd40 Ligand Expression in T-Lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93:1315-20.
128. Crow MK, Kirou KA. Regulation of CD40 ligand expression in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13:361-9.