

JEAN-FRANÇOIS LAUZON-JOSET

**CARACTÉRISATION DES CELLULES
ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES MURINES DANS
UN MODÈLE ASTHMATIQUE**

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

2010

RÉSUMÉ

L'altération des fonctions des cellules épithéliales dans l'asthme a été démontrée par plusieurs études. Afin de mieux comprendre l'implication des cellules épithéliales dans la cascade asthmatique, des cellules épithéliales bronchiques ont été isolées de rats Brown Norway (un modèle murin d'asthme) naïfs (NBE), sensibilisés (SBE) et sensibilisés/challengés avec l'allergène (ABE). Différentes fonctions des cellules épithéliales ont ensuite été analysées pour les différentes lignées. L'expression des protéines des jonctions cellulaires a été mesurée par immunobuvardage, la sécrétion de cytokines par ELISA et l'expression d'une molécule de surface immunomodulatrice, CD200, par cytométrie en flux. Les cellules épithéliales NBE, SBE et ABE présentent des phénotypes distincts et ces phénotypes sont maintenus en culture sur une longue période. De plus, les ABE ont un phénotype semblable à ce qui a été observé chez les sujets asthmatiques. Il semble donc que ce modèle d'étude soit un bon outil afin de mieux comprendre le rôle des cellules épithéliales dans l'asthme.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire représente une portion des travaux effectués au cours de ma maîtrise, qui sont soumis pour publication. J'ai participé à cet article en effectuant la majorité des manipulations, avec l'aide de Véronique Turmel, et en rédigeant le manuscrit. Ma directrice de recherche, Dre Élyse Bissonnette, a élaboré et supervisé ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier Dre Élyse Bissonnette pour le support et les précieux avis et conseils qu'elle m'a prodigués tout au long de ma maîtrise. Je ne peux passer sous silence son inestimable sens de l'organisation et de la planification, dont j'arriverai peut-être un jour à imiter, ou à tout le moins à y tendre, ne serait-ce que pour organiser mon bureau et ma paillasse.

Je ne pourrais pas avoir fait tout ce travail sans l'aide inestimable de docteure Annie Dubé et de maître Véronique Turmel, ainsi que des nombreuses conversations autour d'un café.

La vie en laboratoire ne serait pas possible sans les nombreux collègues et amis avec qui j'ai partagé un dîner (ou une poutine), un café (ou plusieurs), une bière (jamais plus d'une...presque) et de nombreuses idées.

Je tiens également à souligner le support des mes parents qui ont écouté les nombreuses tentatives de vulgarisations de mon projet, celui de mes amis pour les moments de « ressourcement » et celui de ma copine pour m'avoir enduré (et qui, j'espère, continuera à le faire durant mon doc).

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	I
Avant-propos	II
Table des Matières	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des Figures	VI
Liste des Tableaux	VI
Chapitre 1 : Introduction.....	7
1. Asthme	8
2. Pathophysiologie de l'asthme	10
3. Cellules inflammatoires	10
3.1 Lymphocytes	10
3.1.1 Lymphocytes B	11
3.1.2 Lymphocytes T	11
3.2 Mastocytes.....	14
3.3 Éosinophiles	15
3.4 Cellules dendritiques.....	16
4. Cascade asthmatique.....	16
5. Cellules structurales.....	18
5.1 Cellules épithéliales	19
6. Modèles utilisés pour l'études des cellules épithéliales.....	23
Chapitre 2 : Hypothèses et Objectifs	25
Chapitre 3 : <i>Disregulation of CD200 expression and chemokine profile</i> <i>in primary culture of bronchial epithelial cells in asthma</i>	27
RÉSUMÉ	28
CONTRIBUTION DES AUTEURS	28
ABSTRACT.....	30
INTRODUCTION	32
MATERIALS AND METHODS.....	33
RESULTS	36
DISCUSSION	38
REFERENCES	42
Chapitre 4 : Discussion et conclusion.....	54
Chapitre 5 : Références.....	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ABE : *Allergen-Challenged epithelial cells*
- ADAM33 : *A disintegrin and metalloproteinase 33*
- APC : Cellule présentatrice d'antigènes
- CCR : Récepteurs à chimiokines de type C-C
- CD : *Cluster of differentiation*
- CD4+ : Lymphocytes T positives pour CD4
- CD8+ : Lymphocytes T positives pour CD8
- CE : Cellules épithéliales
- Cldn-1 : Claudin-1
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CTLA4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CD152)*
- DALY : Année de vie corrigé d'invalidité (*Disabilated-Ajusted Life Years*)
- E-Cad : E-cadherin
- ECP : *Eosinophil cationic protein*
- EDN : *Eosinophil-derived neurotoxin*
- EGF : *Epithelial growth factor*
- EPC : *Eosinophil peroxydase*
- FcεR : Récepteur aux immunoglobulines de type E
- GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- IFN : Interféron
- Ig : Immunoglobuline
- IL : Interleukine
- JAM : *Junctional adhesion molecules*
- LT : Leucotriène
- MBP : *Major basic protein*
- MCP : *Monocyte chemoattractant protein*
- MIP : *Monocyte inflammatory protein*
- NBE : *Normal epithelial cells*
- NK : *Natural Killer*

NKT : *Natural Killer T cells*

NO : *Nitric Oxyde*

Occ : Occludine

PG : Prostaglandine

RANTES : *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted (CCL5)*

SBE : *Sensitized epithelial cells*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

T_c : Lymphocyte T cytotoxique

TCR : Récepteur des cellules T

TGF : *Transforming growth factor*

Th : *T helper*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

T_{reg} : Lymphocyte T régulateur

TSLP : *Thymic stromal lymphopoietin*

UTEM : Unité trophique épithéliale-mésenchyme

VEGF : *Vascular-epithelial growth factor*

ZO-1 : Zonula occludens-1

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Les différentes cellules impliquées dans l'asthme.	9
Figure 1.2 : Différenciation Th1/Th2/Th17 : Immunité humorale et cellulaire.	13
Figure 1.3 : Cascade de l'asthme allergique.	17
Figure 1.4 : Les cellules structurales et l'asthme.	19
Figure 1.5 : La barrière épithéliale et l'asthme.	20
Figure 1.6 : Assemblages des protéines des jonctions cellulaires	21
Figure 1.7 : Effets du TSLP sur les cellules immunitaires dans l'asthme	22
Figure 3.1: Junction molecules disregulated in ABE.	48
Figure 3.2: Overproduction of TGF- β by ABE.	49
Figure 3.3: Inhibition of TNF production in ABE.	50
Figure 3.4: Production of IL-23 mRNA by epithelial cells.	51
Figure 3.5: Increased production of chemokines in ABE.	52
Figure 3.6: Expression of CD200 in NBE.	53
Figure 4.1 : Implication des cellules épithéliales dans l'homéostasie pulmonaire.	57

LISTE DES TABLEAUX

Table 3.1: Mediators not modulated in bronchial epithelial cells.	45
--	----

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. ASTHME

L'asthme est une maladie de plus en plus répandue, affectant environ 300 millions de personnes mondialement (7, 8). Même si la mortalité et la morbidité ne la classent pas parmi les maladies les plus graves (25^e position en 2001 selon l'indice DALY (7)), sa prévalence est en augmentation depuis les dernières décennies (9). Cette augmentation est encore plus drastique chez les enfants et atteint 30 % chez les 13-14 ans. Puisque les deux tiers des enfants asthmatiques le seront toujours à l'âge adulte (9), cette croissance ne semble pas sur le point d'arrêter. Tous ces facteurs font que l'asthme entraîne un fardeau économique important aussi bien aux gouvernements qu'aux personnes malades. En comparaison, les dépenses reliées à l'asthme sont plus élevées que celles du SIDA et de la tuberculose combinées (9), même si ces deux maladies se retrouvent dans les 10 maladies les plus graves selon l'indice DALY.

Malgré l'ignorance des causes de l'asthme, la compréhension de cette maladie a beaucoup évolué, tout comme sa définition. En effet, à la fin du 19^e siècle, l'asthme était une « neurotic affection characterized by hyperemia and turgescence of the mucosa ». Par la suite au milieu du 20^e siècle, l'asthme a été défini comme une contraction des voies aériennes spontanément réversible et par une hyperréactivité des bronches (9). Ce n'est que récemment, qu'une composante inflammatoire chronique a été découverte dans l'asthme et que celle-ci a été associée à différents types cellulaires, tels que les lymphocytes Th2, les mastocytes et les éosinophiles (Fig. 1.1) (9, 10). En plus de l'inflammation, il y a également des modifications des cellules structurales des voies respiratoires qui contribuent, elles aussi, au développement de l'inflammation (Fig. 1.1) (10).

Les médicaments actuellement disponibles pour les asthmatiques ne font que contrôler les symptômes existant ou diminuer les exacerbations (11). Pour les asthmes légers, les β_2 -agonistes à courte durée sont utilisés seulement sur demande pour contrôler les exacerbations. Pour les asthmes modérés ou sévères, le contrôle de l'asthme est effectué quotidiennement à l'aide de corticostéroïdes inhalés seuls ou d'une combinaison de corticostéroïdes inhalés et de β_2 -agonistes à longue durée (12). Il existe également des anti-

IgE et des anti-leucotriènes qui peuvent être ajoutés chez les patients sévères ou dont les symptômes sont mal contrôlés par le traitement classique (13). Malgré tout, une certaine portion d'asthmatiques n'arrive toujours pas à contrôler leurs symptômes avec les différentes options disponibles (13, 14).

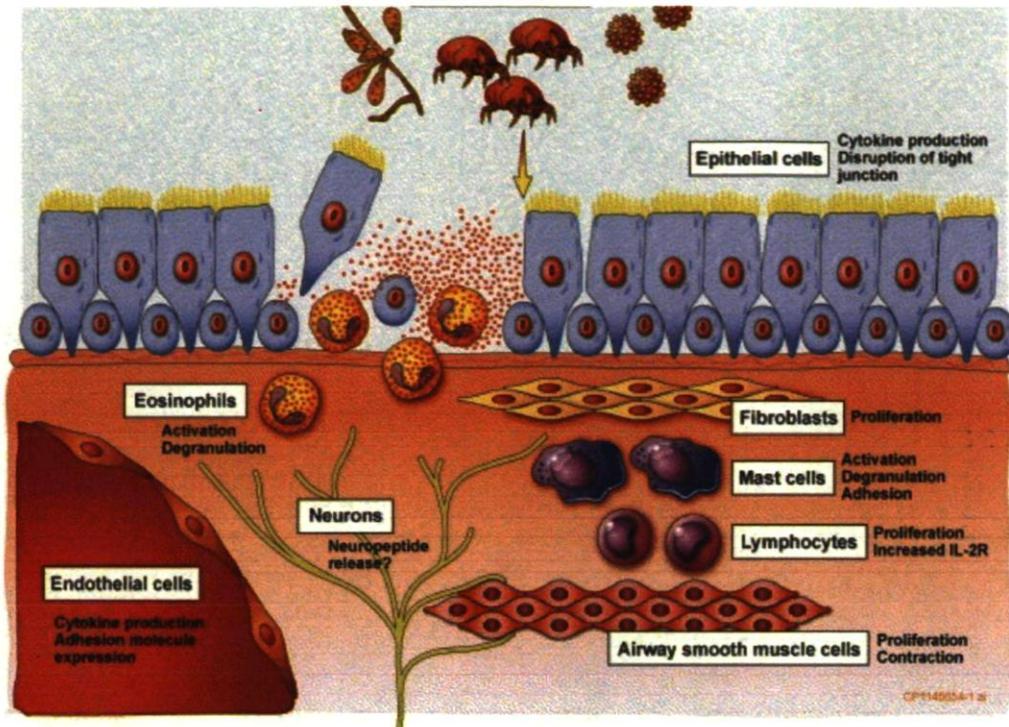


Figure 1.1 : Les différentes cellules impliquées dans l'asthme.

Tiré de Reed 2004 (6) avec la permission de le reproduire.

Cette incapacité à bien traiter certains patients pourrait être due aux causes de l'asthme qui sont multiples et peu comprises. De plus, même si l'asthme est considérée comme une seule maladie, elle est souvent divisée en plusieurs sous-types qui se chevauchent, tels que l'asthme intrinsèque, l'asthme allergique ou l'asthme pauci-granulocytique (15). Certaines catégories d'asthme ne sont pas affectées ou répondent très peu aux traitements actuels (5). Il est donc essentiel de mieux comprendre la pathophysiologie ainsi que le développement de l'asthme afin de pouvoir offrir des nouvelles pistes de traitements alternatifs.

2. PATHOPHYSIOLOGIE DE L'ASTHME

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes qui est caractérisée par plusieurs phénomènes. Les patients asthmatiques développent une hyperréactivité bronchique ainsi qu'une obstruction partielle et réversible des voies aériennes (16). Lors d'une provocation allergénique, il y a une réaction immédiate et une réaction semi-retardée. La réaction immédiate se produit quelques minutes après la provocation et entraîne une contraction des muscles lisses principalement causée par l'activation des mastocytes des voies aériennes (17). La réaction semi-retardée n'est pas présente chez tous les asthmatiques, mais lorsque présente, elle débute de 3 à 6 heures après la provocation et peut durer quelques jours si elle n'est pas contrôlée (16). Lors de cette réaction semi-retardée, il y a un rétrécissement des voies aériennes, mais celui-ci est davantage causé par une infiltration de cellules inflammatoires dans la muqueuse bronchique. À long terme, il y a développement d'un remodelage bronchique qui se caractérise par une désorganisation de l'épithélium, un épaississement de la membrane basale, une hypersécrétion de mucus et une prolifération des cellules musculaires lisses et des myofibroblastes (5).

3. CELLULES INFLAMMATOIRES

Plusieurs cellules inflammatoires jouent un rôle important dans l'asthme (Fig. 1.1). En effet, les lavages broncho-alvéolaires ou les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques présentent une quantité plus élevée de lymphocytes, d'éosinophiles et de mastocytes activés (5, 18). Chez les asthmatiques sévères, il y a également présence d'une neutrophilie (16). Parmi ces cellules, les cellules effectrices les plus importantes sont les lymphocytes, les mastocytes et les éosinophiles (17). De plus, récemment, les cellules dendritiques ont émergé comme des cellules clés responsables d'une étape précoce du développement de l'asthme (19).

3.1 LYMPHOCYTES

Les lymphocytes sont des cellules immunitaires hématopoïétiques remplissant une panoplie de fonctions. Contrairement à la plupart des autres cellules immunitaires, leur

différenciation s'effectue premièrement dans un organe lymphoïde primaire (la moelle osseuse ou le thymus), mais se poursuit dans un organe lymphoïde secondaire, tel que la rate ou les ganglions lymphatiques. Il y a formation de lymphocytes B dans la rate et de lymphocytes T dans le thymus. Par contre, un autre sous-type de lymphocyte, les lymphocytes NK (*Natural Killer*) ressemblent aux lymphocytes T, mais n'ont pas besoin de murer dans le thymus ni de développer de récepteur spécifique des lymphocytes T (20). Les NK ne seront pas abordés ici puisqu'ils sont impliqués davantage dans le rejet de greffe et la lutte contre les cellules infectées ou tumorales.

3.1.1 LYMPHOCYTES B

Les lymphocytes B sont responsables de la production d'immunoglobulines (Ig). Chaque clone cellulaire reconnaît un peptide particulier grâce à la recombinaison génomique de leurs gènes pour Ig (VDJ) et exprime à sa surface des Ig de types M et D. Des Ig ayant des fonctions particulières, tels les IgA, IgE et IgG, sont produits en réponses à différents stimuli et selon les cytokines présentes dans son environnement (21). Lors de la réaction asthmatique allergique, les lymphocytes B sont stimulés afin de produire des IgE (22). Ces IgE se lient aux récepteurs à haute affinité pour IgE (FCεRs) ce qui permet l'activation des cellules, dont les mastocytes.

3.1.2 LYMPHOCYTES T

Les lymphocytes T immatures qui entrent dans le thymus sont double négatifs pour les marqueurs de surfaces CD4 et CD8. Ils deviennent double positifs avant de se spécialiser en CD4⁺, en CD8⁺ ou en cellules NKT (*Natural Killer T cell*). Leur différenciation se termine dans la circulation. Les CD4⁺ acquièrent un phénotype différent selon le milieu environnant. Ils peuvent devenir des cellules régulatrices (T_{reg}) ou des cellules effectrices (Th). Les cellules CD8⁺ deviennent des cellules cytotoxiques (T_c) (23). Dans le poumon, il y a une faible population de NKT et de T_c, mais leur rôle n'est pas bien compris dans l'asthme, ils ne seront donc pas abordés ici.

Lors de la sélection des CD4⁺ dans le thymus, il y a exclusion des cellules reconnaissant fortement les antigènes du soi. Ceux ne reconnaissant pas le soi deviennent des Th, mais ceux reconnaissant faiblement le soi se différencient en T_{reg} ce qui induit l'expression du facteur de transcription Foxp3 (23, 24). Ce facteur permet l'expression des molécules de surface immunorégulatrices, tel TRAIL, impliquées dans l'induction de l'apoptose, et CTLA4, impliqué dans l'effet cytotoxique. De plus, l'expression de ce facteur inhibe la production de cytokines inflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-4, l'interféron (IFN) et le *tumor necrosis factor* (TNF), et active la production d'IL-10 et de *transforming growth factor* (TGF)- β (24). Tous ces facteurs permettent de contrôler la survie des lymphocytes T auto-réacteur, soit par contact direct soit via la production de médiateurs. Les T_{reg} sont recrutés au poumon grâce aux récepteurs à chimiokines de types CCR4, CCR5, CCR7 et CCR8 (23).

L'activation des Th naïfs se fait via l'interaction entre un antigène présenté à l'aide d'une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) par une cellule présentatrice d'antigènes et le récepteur des cellules T (TCR) spécifique pour ce complexe antigène/CMH II (23, 25). Cette interaction induit la différenciation de ces cellules en type 1 (Th1), 2 (Th2) ou le récemment découvert type 17 (Th17), chacun ayant un profil de cytokines particulier (Fig. 1.2).

La différenciation des lymphocytes Th1 est médiée par certaines molécules de surfaces et par l'IL-12 et l'IFN- γ (23). Une fois différenciés, ils sécrètent principalement de l'IL-2, du TNF et de l'IFN- γ (26). Ces médiateurs favorisent une réponse immunitaire cellulaire (via les T_c) qui permet de combattre les infections intracellulaires (virales ou bactériennes) et les cellules cancéreuses (25). Par contre, lorsque mal contrôlé, une réponse de type Th1 peut engendrer une inflammation persistante et éventuellement entraîner le développement de pathologie, telle que la réaction d'hypersensibilité retardée, la maladie intestinale inflammatoire ou la sclérose en plaque.

Les cytokines de type Th1 inhibent la prolifération des lymphocytes Th2. En effet, chacun des sous-types de Th favorise sa différenciation et inhibe celles des autres types. Pour les Th2, l'IL-4 est la cytokine centrale. Elle inhibe l'expression du récepteur à l'IL-12 qui est

essentielle pour les Th1 et favorise l'expression de facteurs de transcription spécifiques aux Th2 (25). La source primaire d'IL-4 provient des NKT, des éosinophiles ou des mastocytes, mais une fois différenciés les Th2 deviennent les principaux producteurs d'IL-4 (26). Ces cellules sécrètent aussi de l'IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13, ce qui favorise une réponse humorale. Par contre, lorsqu'exagérée ou persistante, cette réponse peut conduire au développement des maladies atopiques, telles que l'asthme ou l'allergie. En effet, les Th2 sont considérés comme les cellules orchestrant le développement de la réaction asthmatique allergique (17).

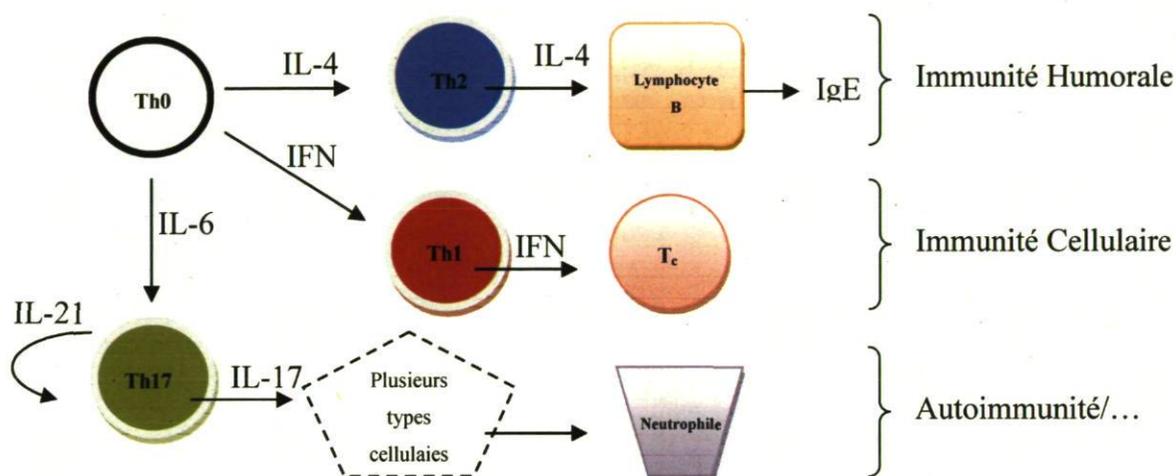


Figure 1.2 : Différenciation Th1/Th2/Th17 : Immunité humorale et cellulaire.

Le dernier sous-type de lymphocytes Th, les Th17, est moins bien connu. Les cytokines importantes pour son développement sont le TGF- β , l'IL-6 et l'IL-21. Le TGF- β et l'IL-6 sont essentielles pour induire l'expression de l'IL-21 qui agit de façon autocrine sur les Th17 ainsi que pour l'induction de l'expression du récepteur de l'IL-23. Même si l'IL-23 n'est pas nécessaire au développement des Th17, elle est essentielle pour leur survie (25). De plus, les Th17 sécrètent de l'IL-17, de l'IL-6 et de l'IL-22. La réponse Th17 permet d'éliminer les pathogènes extracellulaires via l'attraction des neutrophiles (25, 26). Il semble que plusieurs maladies autoimmunes associées à IL-12 (cytokine de type Th1) soient en fait causées par l'IL-23 (cytokine de type Th17) qui partage la sous-unité IL12-p40 (26). De plus, certaines études ont reporté un rôle des Th17 dans la cascade asthmatique (27). En effet, il semble qu'ils puissent favoriser le recrutement des Th2 et participer à leur activation.

3.2 MASTOCYTES

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires hématopoïétiques qui, contrairement à leurs proches cousins les basophiles, résident dans les tissus (19). Il y a des mastocytes dans presque tous les tissus, sauf les os. Ils sont retrouvés en plus grande quantité aux barrières entre le soi et l'extérieur, telles que la peau, l'intestin et le poumon. Les mastocytes sont des cellules immunitaires centrales du poumon qui font le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise (28). En effet, la présence de mastocytes dans l'épithélium bronchique permet la détection rapide de pathogènes ou d'allergènes (28). De plus, la distribution des mastocytes dans le tissu conjonctif leur permet d'interagir avec les autres cellules pulmonaires et de les activer, au besoin. Finalement, les mastocytes peuvent migrer parmi les cellules musculaires lisses, ce qui leur permet d'activer une contraction directe et rapide des bronches (19).

Les mastocytes sont classiquement activés via l'agrégation des récepteurs à haute affinité pour les IgE (FcεRI) (22). Les mastocytes possèdent un grand nombre de FcεRI à leur surface cellulaire qui leur permet de lier les IgE circulant. Lors des rencontres subséquentes avec la protéine reconnue par l'IgE (l'allergène), les récepteurs se multimérisent ce qui entraîne une cascade de phosphorylation et le relâchement de trois types de médiateurs (19). Rapidement après son activation, le mastocyte libère des médiateurs préformés emmagasinés dans ses granules (5). Les principales composantes des granules sont l'histamine et les protéases. L'histamine agit sur un grand nombre de cellules, aussi bien la sensibilisation nerveuse que la contraction des cellules musculaires lisses ou l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales (22). Les protéases ont un rôle *in vivo* indéterminé, mais *in vitro*, elles permettent l'activation des fibroblastes, l'initiation de la cascade du complément et elles agissent en synergie avec l'histamine pour activer les cellules musculaires lisses. Il a également été proposé que les protéases soient toxiques pour les cellules bronchiques ou contribuent à la destruction locale du tissu pulmonaire (22).

Les mastocytes synthétisent aussi *de novo* des dérivés de l'acide arachidonique, tels que les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT), principalement le PGD₂ et le LTC₄. Ces

molécules agissent aussi bien sur les cellules inflammatoires que sur les cellules nerveuses et endothéliales. De plus, les mastocytes sécrètent une panoplie de cytokines proinflammatoires, dont le TNF, l'IL-4 et l'IL-5 (22). Le TNF est une cytokine pléiotropique, notamment impliquée dans la modulation des fonctions des cellules endothéliales et épithéliales, ainsi que dans l'inflammation. L'IL-4 est une cytokine favorisant la production d'IgE et permet la différenciation des lymphocytes Th2. L'IL-5 est essentielle pour le recrutement et l'activation des éosinophiles. Toutes ces fonctions font du mastocyte une cellule clé de l'asthme aussi bien lors de la réaction immédiate (en dégranulant et libérant des LT/PG), que lors de la réaction semi-retardée (en sécrétant de cytokines) (17).

3.3 ÉOSINOPHILES

Les éosinophiles sont des cellules immunitaires circulantes déjà matures. Leur principal rôle est la défense antiparasitaire, mais elles sont aussi considérées comme un biomarqueur d'inflammation (29). Lors de la réaction asthmatique semi-retardée, les éosinophiles sont considérés comme les cellules effectrices centrales (30). Elles sont recrutées au poumon et libèrent le contenu de leurs granules. Les médiateurs essentiels pour l'éosinophile sont l'éotaxine, l'IL-3 et l'IL-5 (22). L'IL-5 est la cytokine dont le rôle est le plus diversifié. En effet, elle est impliquée dans la maturation, l'activation et la survie des éosinophiles (5). L'éotaxine a comme principal rôle d'attirer les éosinophiles au site d'inflammation et l'IL-3 contribue à leur activation.

Une fois activés, les éosinophiles relâchent des protéines granulaires basiques, telles l'EPC (*eosinophil peroxidase*), l'EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*) et la MBP (*major basic protein*), et des protéines cationiques, telle l'ECP (*eosinophil cationic protein*) (29). Ces toxines ont pour but d'éliminer les parasites, mais attaquent également les cellules hôtes. Ces protéines peuvent en effet activer les cellules musculaires lisses et neuronales ainsi que causer des dommages aux cellules endothéliales (22). De plus, ces protéines favorisent la production d'histamine par les mastocytes et la sécrétion de mucus dans les voies aériennes. En plus de dégranuler, les éosinophiles sont capables de produire un large éventail de médiateurs impliqués aussi bien dans leur recrutement et activation (éotaxine,

IL-5, etc.), que dans l'inflammation (LT, IL-4, IL-13, etc.) et dans le remodelage (TGF- β , *vascular endothelial growth factor* (VEGF), etc). Toutes ces fonctions font de l'éosinophile la cellule effectrice clé de la phase semi-retardée de la réaction asthmatique (22).

3.4 CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques sont des cellules immunitaires hématopoïétiques résidentes des tissus, principalement retrouvées dans la peau, les poumons, la muqueuse intestinale et les organes lymphoïdes secondaires. Dans le poumon, elles sont situées juste en dessous des cellules épithéliales (sous-épithéliales) ou intra-épithéliales d'où elles étirent leurs dendrites entre les cellules épithéliales, allant jusqu'à former des jonctions serrées avec elles (31). Leur rôle principal est de former un réseau de surveillance à la recherche d'antigènes étrangers, afin de pouvoir activer les lymphocytes spécifiques pour cet antigène. Pour ce faire, les cellules dendritiques ayant capturé un antigène migrent dans les ganglions lymphatiques grâce à l'interaction entre leur récepteur CCR7 et la chimiokine MIP-3 β (*monocyte inflammatory protein 3 β*). Après la capture de l'antigène, celui-ci est présenté à leur surface. Afin de stimuler efficacement les lymphocytes (soit localement dans le poumon ou dans les ganglions lymphatiques), les cellules dendritiques augmentent l'expression d'autres protéines de surface, tel le CD80, le CD86 et le CMH II (19). Cela permet l'activation des lymphocytes T et ainsi l'initiation de la sensibilisation via la production d'IgE par les lymphocytes B. Les cellules dendritiques participent aussi à la réaction semi-retardée en maintenant la réponse Th2 de façon persistante, principalement via le recrutement et l'activation continue des Th2 aux poumons (22).

4. CASCADE ASTHMATIQUE

Toutes ces cellules immunitaires jouent un rôle particulier dans le développement de l'asthme allergique (Fig. 1.3). Tout commence par la rencontre de l'antigène avec une cellule présentatrice d'antigènes. Plusieurs cellules pulmonaires ont démontré une certaine capacité à présenter l'antigène, tels les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales (CE) et les cellules dendritiques. Malgré cette diversité d'acteurs potentiels, il a été démontré que les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices

d'antigènes du poumon (32). Lorsque les cellules dendritiques rencontrent l'antigène, ils l'internalisent, le clivent en petits peptides (épitopes) et les présentent grâce aux molécules du CMH II.

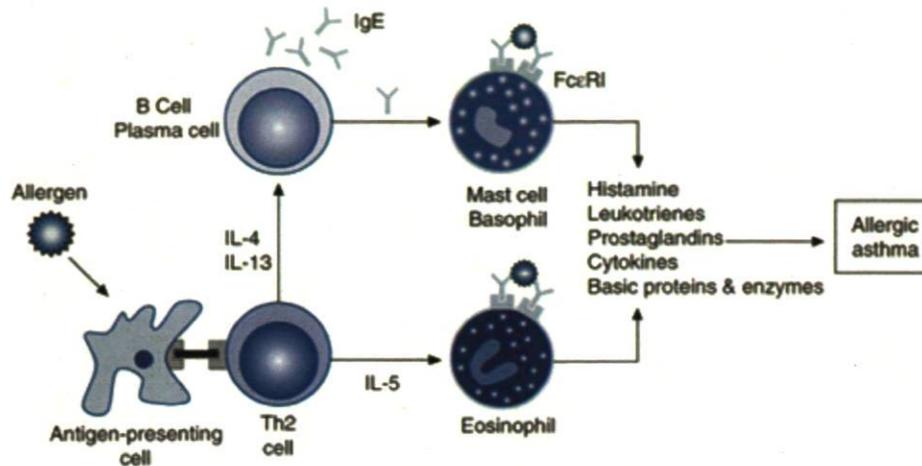


Figure 1.3 : Cascade de l'asthme allergique.

Interaction des principales cellules impliquées dans l'initiation de la cascade inflammatoire dans l'asthme allergique.

Tiré de Holgate 2008 (5) avec la permission de le reproduire.

Une fraction des cellules dendritiques présente l'antigène directement dans le poumon, permettant ainsi une activation locale des Th (19). L'autre fraction migre du poumon vers les ganglions lymphatiques. Lors de leur migration, ils perdent leur capacité à reconnaître des antigènes et gagnent l'expression de plusieurs récepteurs à chimiokines (22). Une fois dans le ganglion lymphatique, les cellules dendritiques activent les lymphocytes Th naïfs à l'aide des molécules du CMH II / TCR et de co-récepteurs.

Dans l'asthme, l'activation des lymphocytes Th par les cellules dendritiques et les cytokines environnantes induit une expansion clonale et une différenciation en Th2. En s'activant, ils libèrent une panoplie de cytokines de types Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, etc.). Ces cytokines favorisent le développement d'une réponse de type Th2, mais aussi la production d'IgE par les lymphocytes B. En effet, les Th2 induisent la commutation de classe des lymphocytes B via l'interaction des molécules de surfaces, tel CD40, et des cytokines, tel l'IL-4 (33). Une fois activés, des lymphocytes Th2 migrent dans le poumon où ils activent les cellules structurales et résidentes, en plus de recruter des cellules inflammatoires, telles que les éosinophiles et les monocytes.

Les IgE sécrétés par les lymphocytes B se lient aux récepteurs à IgE (FcεRs). Il existe deux types de ces récepteurs, le premier est le récepteur à faible affinité (CD23 ou FcεRII). Il est exprimé sur certains types de lymphocytes et de macrophages et sur les CE. Le rôle de ce récepteur semble être davantage orienté pour la défense anti-parasitaire (34). Le récepteur à haute affinité (FcεRI) est quant à lui exprimé principalement sur les basophiles et les mastocytes. Ce récepteur est également impliqué dans la défense anti-parasitaire, mais a un rôle essentiel dans la réaction allergique (35). En effet, la liaison d'IgE à la surface des mastocytes est un signal de survie et de production de cytokines (36, 37). De plus, les IgE permettent l'agrégation des FcεRI lors d'une seconde rencontre avec l'antigène, ce qui induit l'activation des mastocytes.

Tous ces événements mènent au recrutement de cellules inflammatoires dans la muqueuse et la lumière bronchique. En effet, il y a un plus grand nombre d'éosinophiles, de mastocytes, de lymphocytes et de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire et la muqueuse bronchique de patients asthmatiques (19, 38, 39). En plus du rôle important des cellules immunitaires, les fonctions des cellules structurales sont largement modifiées et contribuent également au développement de l'asthme allergique (17).

5. CELLULES STRUCTURALES

La cascade inflammatoire observée dans l'asthme allergique peut être modulée ou amplifiée par des cellules structurales du poumon, tel que les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les CE. Elles participent activement au développement de l'inflammation et de l'asthme, via la libération de médiateurs et l'activation d'autres types cellulaires. De plus, les fonctions des cellules structurales sont modulées aussi bien par l'inflammation que par les facteurs environnementaux (Fig 1.4). En effet, l'asthme se caractérise par une réponse inflammatoire, mais son développement est associé à une panoplie de gènes de susceptibilités (40) et de facteurs environnementaux, tels que l'exposition à des allergènes, à la pollution et aux infections virales (2). Tous ces facteurs interagissent pour mener aux symptômes de l'asthme, telles que la constriction bronchique, l'hyperproduction de mucus et l'infiltration de cellules inflammatoires.

La contraction des bronches est causée par les cellules musculaires lisses. Les cellules musculaires lisses sont également impliquées dans la déposition de la matrice extracellulaire lors du remodelage bronchique (19). Par contre, même si elles sont hyperplasiques et en plus grand nombre dans les voies aériennes périphériques chez les sujets asthmatiques, il est difficile de trouver leurs différences ou leurs défauts comparativement aux cellules de sujets sains (41).

Les fibroblastes, les cellules musculaires bronchiques et les CE du poumon agissent de concert et sont souvent unifiés sous l'unité trophique épithéliale-mésenchyme (UTEM) (Fig. 1.4). En effet, cette interaction a été démontrée *in vitro* dans un modèle de co-culture de myofibroblastes et de CE. Suite à un dommage causé à l'épithélium, la réparation est initiée par les CE qui sécrètent des facteurs de croissance et des médiateurs, tel le TGF- β , afin de favoriser la prolifération des myofibroblastes (42). Ces résultats suggèrent que les CE jouent un rôle important dans la modification des cellules structurales dans l'asthme.

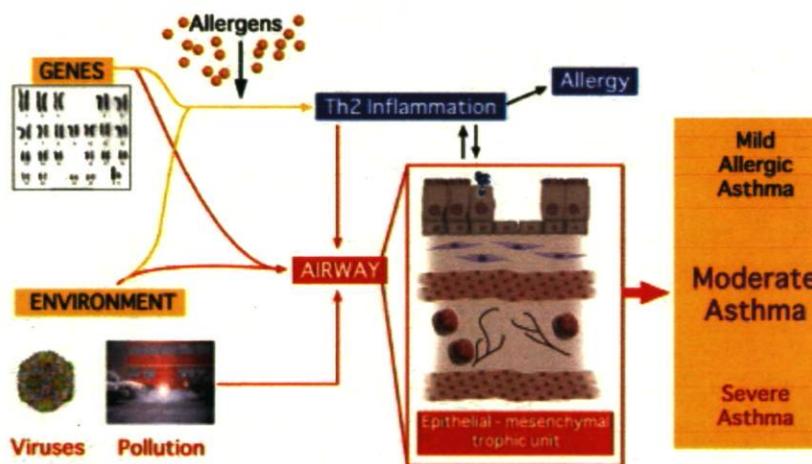


Figure 1.4 : Les cellules structurales et l'asthme.
Interaction entre les différents facteurs influençant les fonctions de l'unité trophique épithéliale-mésenchyme (UTEM).

Tirée de Holgate 2007 (2) avec la permission de le reproduire.

5.1 CELLULES ÉPITHÉLIALES

Les CE sont une des cellules structurales les plus importantes des voies aériennes. Elles forment une couche de cellules pseudo-stratifiées comprenant principalement des cellules ciliées, mais également des cellules sécrétrices et basales (43). Les CE créent la première

barrière entre le soi et le non-soi ce qui les expose constamment à une pléiotropie de stimuli, des allergènes aux pathogènes en passant par les agents inoffensifs (28). Même si l'inflammation est souvent considérée comme l'élément déclencheur de l'asthme, plusieurs évidences laissent croire que l'asthme serait initié par le dysfonctionnement de l'épithélium (3, 44). En effet, plusieurs éléments déclencheurs de l'asthme, tels que les infections virales ou le stress oxydatif / la pollution, induisent une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale (5). De plus, la désorganisation épithéliale est commune aux différents sous-types d'asthme, même si ceux-ci ne présentent pas tous les mêmes infiltrations cellulaires (asthme éosinophilique, neutrophilique ou pauci-granulocytaire) (5). Également, plusieurs facteurs de risques (infections virales, pollution, etc.) et plus récemment des gènes de susceptibilité à l'asthme agissent au niveau de l'épithélium (3, 5, 40, 44).

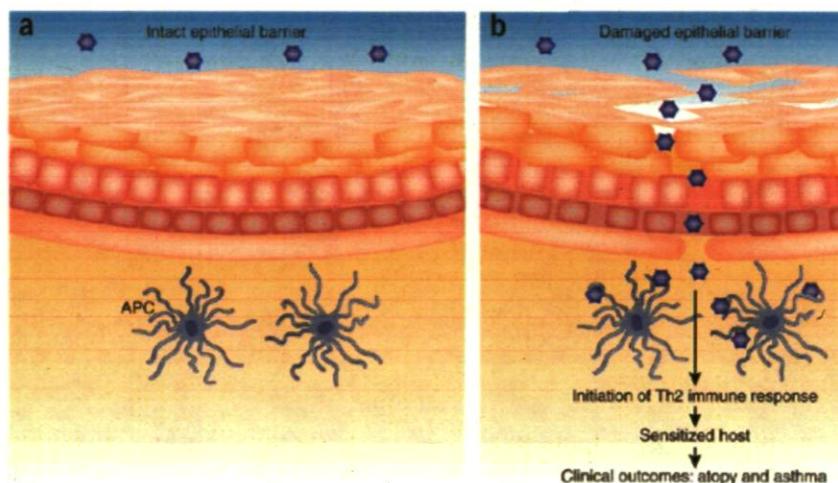


Figure 1.5 : La barrière épithéliale et l'asthme.

Perte de l'intégrité épithéliale chez les sujets asthmatiques (b) comparativement au sujet sain (a), permettant une pénétration plus grande des allergènes. Ces allergènes activent ensuite les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui initie la cascade inflammatoire.

Tiré de Hudson 2006 (3) avec la permission de le reproduire.

Le premier rôle attribué aux CE a été celui de barrière physique. En effet, les jonctions entre les cellules empêchent le passage des protéines et pathogènes (Fig. 1.5). Ces jonctions sont constituées d'un assemblage de protéines qui forment les jonctions serrées (Fig. 1.6). L'échafaudage de ces jonctions est un processus ordonné qui débute avec la formation de jonction d'adhérence via des molécules telles les E-cadherin (E-Cad) et les JAM. Par la suite, des protéines intracellulaires de la famille de zonula ocludens (ZO) sont recrutées au

site de la jonction afin de la stabiliser et de permettre le recrutement des molécules responsables de la jonction serrée, tel l'occludin (Occ) et les claudines (Cldn) (45, 46). De plus, les Cldn sont en partie responsables d'assurer une perméabilité sélective pour les ions de faibles poids moléculaires (47). Chez les sujets asthmatiques, il existe une désorganisation de ces jonctions serrées et plus particulièrement une diminution et une dérégulation de l'expression de l'E-Cad et de la ZO-1 (2, 44, 48). Les autres molécules des jonctions, telles les Occ et les Cldn, ont été peu étudiées chez les CE de sujets asthmatiques.

En plus de cette désorganisation, l'épithélium asthmatique possède un plus petit pouvoir prolifératif, tel que mesuré par les marqueurs Ki67 et PCNA (49). Toutes ces modifications ont pour effet de désorganiser l'épithélium et de favoriser le passage d'allergènes, activant ainsi les cellules immunitaires situées sous l'épithélium, telles les cellules dendritiques et les mastocytes (3).

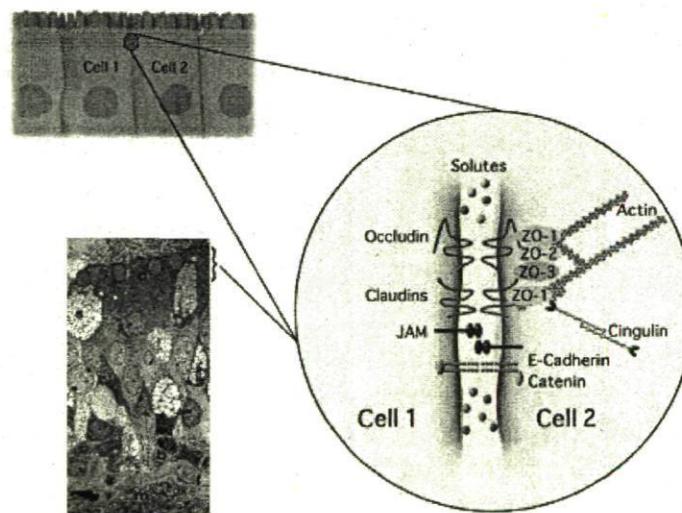


Figure 1.6 : Assemblages des protéines des jonctions cellulaires
Tiré de Holgate 2007 (2) avec la permission de le reproduire.

En plus du rôle de barrière physique, les CE sécrètent un grand nombre de médiateurs régissant « l'environnement » du poumon. Elles peuvent sécréter des médiateurs inflammatoires, immunorégulateurs, impliqués dans le remodelage et des facteurs de croissances (2, 5, 50). Les médiateurs inflammatoires sécrétés par les CE recrutent des cellules immunitaires (*monocyte chemotactic protein* (MCP)-1, éotaxine et RANTES), activent les cellules vers un phénotype Th2 (LT, PG et *granulocyte-macrophage colony-*

stimulating factor (GM-CSF)) ou favorise l'inflammation (IL-6 et IL-8). Elles sécrètent également du TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), une molécule récemment découverte activant plusieurs cellules immunitaires (Fig. 1.7) (4). Les CE expriment également des facteurs impliqués dans le remodelage bronchique (TGF- β , ADAM33, etc.), soit en augmentant la production de mucus, soit en altérant l'activité des cellules musculaires lisses ou des fibroblastes (5).

Il a été démontré que les CE de sujets asthmatiques produisent davantage de médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-6, le TNF et le TSLP (4, 43, 50). De plus, les CE asthmatiques favorisent le remodelage bronchique en sécrétant du TGF- β (51). Par contre, les médiateurs immunorégulateurs (IFN- γ , IL-10 et oxyde nitrique (NO)) sont exprimés plus faiblement chez les asthmatiques.

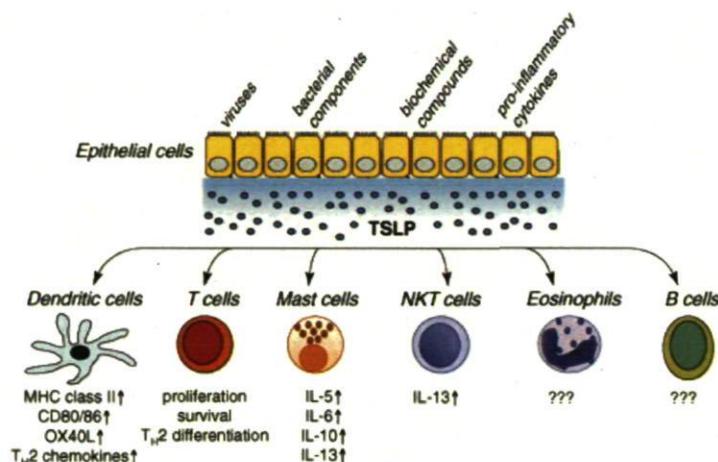


Figure 1.7 : Effets du TSLP sur les cellules immunitaires dans l'asthme
Tiré de Rochman 2008 (4) avec la permission de le reproduire.

Les CE sont également soumises à de nombreux stress extérieurs, principalement des stress oxydatifs. Afin de ne pas être endommagées, les CE possèdent un arsenal de molécules anti-oxydantes, tel la superoxide dismutase ou la glutathion peroxydase (44). Chez les sujets asthmatiques, l'exposition à la pollution ou à un stress oxydatif induit une exacerbation de l'asthme, car les CE de sujets asthmatiques possèdent moins d'antioxydants et ne peuvent donc pas résister adéquatement au stress.

De plus, les CE sont responsables du maintien de l'homéostasie pulmonaire en inhibant l'activation des cellules immunitaires face à des stimuli bénins. En effet, il a été démontré que les CE expriment le CD200 à leur surface (52). CD200 est une molécule transmembranaire exprimée par une variété de cellules (neuronal, thymocytes, lymphocytes T) et induit l'inhibition unidirectionnelle de la cellule exprimant son récepteur (CD200R) (1). CD200R est exprimé uniquement par les cellules myéloïdes, tels les monocytes, les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques. Même si les fonctions de CD200 ont été peu étudiées dans l'asthme, il a été démontré dans un modèle murin d'influenza que les souris déficientes pour CD200 sont davantage susceptibles à l'infection virale (52). De plus, il a été déterminé que les macrophages alvéolaires sont impliqués dans ce processus de régulation immunitaire (1, 52). Ces études suggèrent que CD200 pourrait occuper un rôle important dans la pathogénèse de l'asthme.

Contrairement aux cellules inflammatoires qui sont recrutées aux poumons, les CE sont une des premières cellules à être en contact avec les allergènes et jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse asthmatique. De plus, la désorganisation de la barrière épithéliale est observée dans tous les types d'asthme. Toutes ces raisons font qu'il est essentiel de mieux comprendre le fonctionnement des CE et de ce qui mène à leur dysfonctionnement dans l'asthme.

6. MODÈLES UTILISÉS POUR L'ÉTUDES DES CELLULES ÉPITHÉLIALES

Afin de mieux comprendre l'implication des CE dans la pathogénèse et le développement de l'asthme allergique, l'utilisation d'un modèle bien caractérisé et efficace est nécessaire. Présentement, il existe deux groupes de modèles pour étudier les fonctions des CE. Premièrement, un certain nombre de lignées cellulaires sont commercialement disponibles, tels que les BEAS-2B, les A549, etc. Leur utilisation est répandue, principalement car leur utilisation est simple et facile. Cependant, chaque lignée possède des niveaux variables de similitudes avec ce qui est observé *in vivo*. En effet, les BEAS-2B peuvent se différencier, mais n'expriment pas de grande quantité de protéines de jonctions (19). Ces lignées

cellulaires peuvent permettre de mieux comprendre la réponse des CE à certains stimuli, mais elles sont peu utiles afin de reproduire les modifications observées chez les sujets asthmatiques.

D'un autre côté, il est possible d'isoler des cellules primaires à partir de biopsies ou de nécropsies ou d'en acheter commercialement (Lonza). Même si elles reproduisent mieux les fonctions des CE, il y a une grande variabilité entre les donneurs (ou les lots) (19). Également, la disponibilité des tissus limite le nombre d'études réalisables.

En résumé, il manque donc un modèle de CE qui permet d'étudier les changements induits par l'asthme, aussi bien la désorganisation épithéliale, l'augmentation de la perméabilité que l'augmentation de la réponse inflammatoire. C'est pour ces raisons qu'il est important de mettre au point un modèle reproductible et ressemblant aux fonctions observées *in vivo* afin de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans la pathogénèse de l'asthme.

CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les CE sont des cellules clés de l'immunité innée. Tout d'abord, elles forment une barrière physique qui empêchent l'entrée des molécules du non-soi présentes dans le poumon (28). Également, les CE participent à la réaction inflammatoire asthmatique aussi bien localement que par le recrutement d'autres cellules (4, 43, 50). De plus, elles sont essentielles au maintien de l'homéostasie pulmonaire, entre autres *via* l'expression de molécules immunomodulatrices, tel le CD200 (52). Actuellement, aucun modèle de CE facilement accessible ne permet l'étude de l'altération de ces fonctions dans la pathogenèse de l'asthme.

Pour approfondir nos connaissances sur les fonctions des CE dans l'asthme, un modèle *in vitro* serait un outil inestimable et permettrait de mieux comprendre l'implication des CE dans l'asthme allergique. Notre hypothèse est que des CE bronchiques isolées à partir d'un modèle de rats asthmatiques conservent leurs phénotypes distincts *in vitro* et ce, pour plusieurs passages.

Afin de mieux comprendre la modulation des fonctions des CE dans l'asthme, des CE bronchiques de rats naïfs (NBE), sensibilisés (SBE) et sensibilisés/stimulés avec l'allergène (ABE) ont été isolées. L'objectif principal de cette étude était de caractériser les fonctions des CE des rats naïfs, sensibilisés et sensibilisés/stimulés avec l'allergène. L'objectif est divisé en trois volets :

1. Étudier la capacité des CE à former une barrière physique via l'expression de protéines de jonctions d'adhérences et serrées.
2. Analyser le profil de médiateurs sécrétés, aussi bien inflammatoires que chimiotactiques ou de remodelage.
3. Étudier la capacité immunomodulatrice des CE via l'expression de CD200.

CHAPITRE 3 : *DISREGULATION OF CD200*
EXPRESSION AND CHEMOKINE PROFILE IN
PRIMARY CULTURE OF BRONCHIAL
EPITHELIAL CELLS IN ASTHMA

RÉSUMÉ

Les cellules épithéliales jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire et participent à la réponse immunitaire. Afin de mieux comprendre l'implication des cellules épithéliales dans la cascade asthmatique, des cellules épithéliales bronchiques ont été isolées de rats naïfs (NBE), sensibilisés (SBE) et sensibilisés et sensibilisés/stimulés avec l'allergène (ABE). L'expression des protéines des jonctions cellulaires, la sécrétion de cytokines et l'expression de CD200, ont été mesurées. Les ABE expriment moins de protéines de jonctions cellulaires, mais surexpriment une protéine des jonctions serrées. De plus, les ABE expriment moins de cytokines inflammatoires, mais davantage de chimiokines et de TGF- β . Une cytokine de type Th17, l'IL-23, est davantage exprimée par les SBE. Également, l'expression du CD200 est limitée aux NBE. Ces résultats suggèrent que les lignées conservent des phénotypes distincts *in vitro* et sont un bon modèle afin de mieux comprendre le rôle des cellules épithéliales dans l'asthme.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J.F.L.J. a effectué la majorité des expériences avec l'aide de V.T. L'écriture du manuscrit a été effectuée par J.F.L.J. et le projet a été élaboré et supervisé par E.Y.B.

Disregulation of CD200 expression and chemokine profile in primary culture of bronchial epithelial cells in asthma

Jean-François Lauzon-Joset, Véronique Turmel, and Elyse Y. Bissonnette

Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec,
Université Laval, Québec, QC, Canada.

Running title: Bronchial epithelial cells in asthma

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research

Corresponding author: Dr. Elyse Bissonnette
CRIUCPQ
2725, chemin Ste-Foy
Quebec, QC
Canada G1V 4G5
Phone: 418-656-4760
FAX: 418-656-4509
E-mail: elyse.bissonnette@med.ulaval.ca

ABSTRACT

Epithelial cells play a central role in lung homeostasis. They create a physical barrier and participate to lung immune response and remodelling, by recruiting immune cells and releasing a large number of mediators. CD200, a cell membrane molecule involved in the inhibition of myeloid cell activation, is also expressed by epithelial cells. In order to study the roles and phenotypical modifications of bronchial epithelial cells in the asthmatic cascade, these cells were isolated from naïve (NBE), sensitized (SBE), and allergen-challenged (ABE) Brown Norway rats. Protein expression of the tight junction apparatus was determined by western blot analysis, whereas mediator profile was investigated in cell free supernatants using ELISA. Presence of CD200 on cell membrane was investigated using flow cytometry analysis. ABE showed a reduced expression of adherens junction proteins (E-cadherin and zonula occludens-1), but an overexpression of Claudin-1, a tight junction protein, compared with NBE. SBE expressed low levels of all three proteins. In addition, ABE produced less inflammatory cytokines (IL-6, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), TNF, and IL-1 α), but more chemokines (monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and eotaxin-1) and active transforming growth factor (TGF- β) compared with NBE. Interestingly, SBE showed an intermediate chemokine profile, but high level of IL-23, a Th17 cytokine. Strikingly, CD200 expression was restricted to NBE. These results suggest that epithelial cells maintain their distinct phenotype *in vitro* and that sensitization was sufficient to disturb normal epithelial cell functions. In conclusion, this is an attractive model to further investigate epithelial cell functions and regulation in asthma.

ABBREVIATIONS:

ABE: Allergen-Challenged epithelial cells

BEC: Bronchial epithelial cells

Cldn-1: Claudin-1

E-Cad: E-cadherin

EGF: Epithelial growth factor

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

IFN: Interferon

IL: Interleukin

MCP: Monocyte chemoattractant protein

NBE: Normal epithelial cells

Occ: Occludin

SBE: Sensitized epithelial cells

TGF: Transforming growth factor

Th: T helper

TNF: Tumor necrosis factor

TSLP: Thymic stromal lymphopoietin

VEGF: Vascular-epithelial growth factor

ZO-1: Zonula occludens-1

INTRODUCTION

Asthma is a chronic lung inflammatory disease with infiltration and activation of immune cells. There is increasing evidence showing long term modification (remodelling) of structural cells in the lung of asthmatic patients (1). Epithelial cells are one of the most important structural cells in the lung (2). Situated at a strategic location, at the limit of the self, they are in constant contact with different stimuli ranging from innocuous agents to microorganisms and allergens.

Classically, the continuous network of bronchial epithelial cells (BEC) was believed to act as a simple physical barrier to block the entry of allergens and pathogens. To do so, cellular junctions (adherens and tight junctions) are created between BEC to guarantee a good impermeability, allowing only the diffusion of small ions (3, 4). In asthmatic patient, the airway epithelium is disorganised and the tight junctions are disrupted allowing foreign molecules to reach the submucosa and activate immune cells (5).

Recently, BEC have also emerged as critical regulators of pulmonary homeostasis and immunity (6). BEC regulate immune responses by secreting a plethora of mediators that activate the epithelial-mesenchymal tropic unit, modulate local immune cells, and recruit inflammatory cells. BEC act on the epithelial-mesenchymal tropic unit via the release of IL-13 which participates to the remodelling process (7). They also influence remodelling and inflammatory processes via the secretion of transforming growth factor- β (TGF- β), epithelial growth factor (EGF), IL-10, IL-6, TNF, and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (5, 8-10). Furthermore, BEC are involved in the recruitment of immune cells through the release of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and eotaxin (11). In addition to their secretory activity, BEC may limit the activation of surrounding cells by direct contact, via the expression of surface molecules, such as CD200 (12). Thus, this cell type may play a crucial role in asthma pathogenesis.

In order to better understand the role of BEC in asthma, a good *in vitro* model would be of great interest. However, to our knowledge, there is no validated *in vitro* model of BEC.

Most of the studies using primary cells did not characterize or validate the cells used, beside the function investigated. To obtain a valid epithelial model, we characterized the phenotype of primary BEC from normal, sensitized, and allergen-challenged Brown Norway rats, a well recognized asthma model. In this study, we demonstrated that BEC maintain their distinct phenotype in vitro and that allergen-challenge profoundly changes BEC, corresponding to changes observed in asthmatic patients. Furthermore, sensitization was sufficient to modulate BEC as they acquired an intermediate phenotype between normal and allergen-challenged BEC.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Brown Norway rats (BN/Ssn) aged 72–80 days were obtained from Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA). They were maintained in filter top cages in virus/pathogen-free conditions at CRIUCPQ animal facility on a 12 h light/dark cycle. Food and water were given *ad libitum*. The protocol was approved by Laval University Animal Care Committee in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

In vivo ovalbumin (OVA) sensitization and challenge

Sensitization was performed as previously described (13) with 1 mg/ml OVA grade V (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) and 10 mg/ml Al(OH₃) (Sigma-Aldrich). Three weeks later, the animals were challenged with 5% aerosolized OVA for 5 min and euthanized 24 h later.

Cell isolation

Bronchial epithelial cells were isolated from naïve (NBE), sensitized (SBE), and allergen challenged rats (ABE). The tracheobronchial tract was isolated from rat and the pulmonary

section was discarded. Bronchial cells were isolated after serial digestions with elastase (14) and the viability was assessed by trypan blue exclusion method. Cells were plated in complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with Ham's F12 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in a 3:1 proportion with 10% FBS and antibiotics). Contaminating fibroblasts were eliminated using rapid Trypsin treatment (less than 2 min). When confluent, cells were subcultured at $2-3 \times 10^5$ cells in T75 flasks. After one or two subculture, purity of cells was assayed using pan-cytokeratin staining. The purity of the cells was over 99% (data not shown). Cells were maintained in culture for less than 10 passages.

Western blot analysis

Cells were washed with cold PBS and lysed with sample buffer (250 mM Tris-Cl, 7.25 M β -mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 20% glycerol). Cell lysates were harvested by scraping and heated for 5 min at 100°C. Western blots were performed with whole cell extracts using standard SDS-PAGE procedures. Proteins were transferred into a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and blocked with 5% nonfat dry milk (blocking solution). Immunoblotting was performed for 1 h at room temperature with anti-E-cadherin (4A2C7), anti-zonula occludens-1 (ZO1-1A12), anti-occludin (OC-3F10) or anti-claudin-1 (JAY.8) (Invitrogen). Proteins of interest were detected using a secondary antibody (anti-mouse for E-Cad/ZO-1/Occ and anti-rabbit for Cldn-1) coupled with horseradish peroxidase (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Proteins were detected by ECL Plus detection reagent (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and developed onto Kodak X-ray films for semi-quantitative analysis. Relative amounts of proteins were normalized with tubulin (Sigma-Aldrich).

Stimulation and cytokine production

Cells were plated in 6-wells plate at 4×10^5 cells/well in 2 ml of complete medium for 24 h to reach confluence. Cells were stimulated with 25 ng/ml of TNF (stimulation) or complete medium alone (control). RNA and supernatants were harvested at 4 and 24 h, respectively.

ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed with BD OptEIA assays (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) for MCP-1, IL-10, IL-6, TNF and IFN- γ , with DuoSet (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) for EGF, GM-CSF, VEGF and IL-1 α/β , with Quantikine Immunoassay (R&D systems) for eotaxin and with Cytoset (Invitrogen) for TGF- β and IL-13 according to the manufacturer's protocols. Optical density was measured using a microplate reader VERSAmax and with SoftMax Pro software v.5.0.1 (Molecular Devices, CA, USA).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted using Trizol reagent according to manufacturer's protocol (Invitrogen). RNA was quantified by optical density and 1 μ g was used for reverse transcription. Reverse transcription was performed with a High Capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Primers for TSLP and IL-23 were obtained from Applied Biosystems (Assay IDs: Rn01761071_g1 and Rn00590334_g1, respectively). cDNAs were analysed with TaqMan Gene Expression on an Opticon platform. Levels of TSLP and IL-23 were normalized with GNB2L1 gene (Assay ID: Rn00821685_g1).

Immunocytochemistry

Cell cytopsin were fixed in acetone:methanol (ratio 6:4) at -20°C for 10 min. Antibody against CD200 (MRC OX2; Abcam, Cambridge, MA USA) or isotype control was used as primary antibodies. Immunocytochemistry was performed with EnVision+ System-HRP for mouse primary antibodies and revealed with AEC (Dako, Glostrup, Denmark), according to manufacturer's instruction.

Flow cytometry analysis

Cells were harvested, blocked in PBS/BSA 1% with 35% goat serum (Sigma -Aldrich) at 37°C for 30 min and then incubated with 0.5 mg CD200 antibody (MRC OX2) or isotypic

control (Sigma -Aldrich) at 4°C for 1 h. After washing, cells were labeled with goat anti-mouse IgG-AlexaFluor 488 (Invitrogen) for 1 h at 4°C. After a final wash, cells were resuspended in PBS/BSA 1% and detection of CD200 was performed using an Expo32ADC-driven Coulter Epics XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cellular debris were excluded using forward and side scatter. Detection threshold was determined using isotype control-labeled cells.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Groups were compared using one-way ANOVA with Tukey HSD adjustment. A difference was considered significant at p value \leq 0.05 (SPSS v16, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Cellular junctions

Cellular junctions are made of a scaffold of protein that begins with the recruitment of E-cadherin (E-Cad) to the cellular membrane. In order to maintain a stable junction, zonula occludens (ZO) are recruited at the cellular domain of E-Cad. In addition, ZO serves to recruit tight junction, such as occluding (Occ) and claudin (Cldn). The expression of these proteins are important for the integrity of the epithelium. Thus, cellular junctions were characterized in bronchial epithelial cells were isolated from normal (NBE), sensitized (SBE), and allergen challenged (ABE) Brown Norway rats. The presence of the main proteins involved in cellular and tight junction formation were investigated by western blot analysis (Fig. 3.1). NBE expressed significantly more E-Cad and ZO-1 than SBE (8 and 154 times more, respectively) and ABE (4 and 15 times more, respectively). However, levels of these proteins did not significantly differ between SBE and ABE. Interestingly, ABE expressed significantly higher level of Cldn-1 compared with NBE (3 times more) and SBE (61 times more). Levels of Cldn-1 were not statistically different between groups

and the levels of Occ were similar in all 3 cell cultures (data not shown). These data suggest that the epithelium is disorganised in allergen challenged animals.

Cytokine profile

Given the variety of cytokines, growth factors, and chemokines produced by epithelial cells, cytokine profile of NBE, SBE, and ABE was characterized. After confluence, cells were washed and fresh culture medium was added. Supernatants were harvested 24 h later. Levels of IFN γ , EGF, and IL-1 β were below the detection limit, whereas no significant difference was detected for IL-10, IL-13, VEGF, and GM-CSF in this experimental condition (Table I). Total level of TGF- β did not vary among groups, but ABE released significantly more active TGF- β compared with NBE (148 times more) and SBE (22 times more) (Fig. 3.2). Interestingly, ABE secreted significantly less TNF than NBE and SBE (Fig. 3.3). Levels of IL-1 α and IL-6 were also lower in ABE than NBE and SBE, but the difference did not reach statistical significance (Table 3.1).

The production of two important mediators, TSLP and IL-23, was quantified at the mRNA level. ABE produced less TSLP than NBE and SBE (ABE, 0.11 ± 0.03 ; NBE, 0.25 ± 0.5 ; SBE, 0.28 ± 0.7 AU), but the difference did not reach statistical significance. Surprisingly, SBE produced significantly more IL-23 than NBE (2 times more) and ABE (4 times more) (Fig. 3.4).

Stimulation of cells with TNF did not significantly modify the release of cytokines and growth factors (data not shown), but secretion of chemokines was modulated. Basal levels of MCP-1 (Fig. 3.5A) and eotaxin-1 (Fig. 3.5B) were approximately $100 \text{ ng}/10^6$ cells and less than $1 \text{ pg}/10^6$ cells, respectively, in all epithelial cell cultures. TNF stimulation did not modulate MCP-1 production in NBE, but significantly increased MCP-1 level in SBE (2 fold increase) and even more in ABE (5 fold increase) (Fig 3.5A). TNF stimulation did not induce eotaxin-1 release in NBE and SBE, but it significantly stimulated eotaxin-1 production in ABE.

Immunosuppressor surface antigen

Given that CD200 has been shown to downregulate alveolar macrophage functions (12, 15), the expression of CD200 on NBE, SBE, and ABE was investigated. Immunocytochemistry revealed that about 25% of NBE expressed CD200, but very few CD200 immunopositive cells were observed in SBE and ABE (Fig. 3.6A). These results were confirmed using flow cytometry analyses. SBE and ABE cultures were not positive for CD200 ($0.8 \pm 0.5\%$ and $0.9 \pm 0.8\%$, respectively), whereas $7.7 \pm 2.3\%$ of NBE expressed CD200 at their surface (Fig. 3.6B).

DISCUSSION

Epithelial cell functions have been studied for many years using transformed cell lines, such as BEAS-2B (16). The main limitation of these studies is that these cells have lost some differentiated functions, thus they do not fully represent normal epithelium. Therefore, their conclusions should be taken with caution. A limited number of studies investigated the differences between normal and asthmatic epithelium using human bronchial epithelial cells purified from biopsies and kept in culture (17-20). Although this is a very attractive model, it is limited by the access to patients and the heterogeneity of asthma pathology (21). Furthermore, it is difficult to get biopsy from challenged patients or patients in exacerbation. The use of a rodent model allows to bypass all these problems and gives access to a greater number of samples with no genetic variation and little variation in exposure and treatment. BEC from naïve, sensitized and allergen-challenged animals have distinct phenotype *in vitro* and maintain them for several passages. This stability allowed a better understanding of their role in asthma pathogenesis.

The first role of epithelial cells is to maintain the integrity of the lung by creating a very selective barrier. The integrity of the epithelium is, at least in part, maintained by the formation of tight junctions. These junctions are the result of a highly regulated multi steps process that starts with the formation of adherens junction. This cell-cell interaction begins

with E-Cad complex (3). Blockade of this molecule impaired the formation of adherens junction and also disabled the formation of tight junctions. Once the first attachment is made, ZO is recruited at the site of adherens junctions contributing to their stabilization (22) and allowing the assembly of tight junction proteins, such as Occ and Cldn, by direct interaction. Cldn-1 deficiency in mice leads to newborn death due to dysfunctional epidermal barrier, highlighting the important role of Cldn in barrier function (23, 24).

The present data show a dramatic reduction of E-Cad and ZO-1 expression in ABE and SBE compared with NBE, as previously observed in biopsies of asthmatic subjects (5, 25). This low expression of adherens junction proteins may reduce epithelial cell adherence and their capacity to form tight junction, two essential steps for an efficient epithelium formation. In contrast, ABE overexpressed Cldn-1 compared to NBE and SBE. Overexpression of Cldn-1 in epithelial cells of asthmatic subjects has not been reported yet. However, high level of Cldn has been observed in lung during pneumonia while epithelium integrity was compromised (26). The increase of Cldn-1 observed in ABE may be a compensation mechanism to preserve the integrity of the epithelium as seen in pneumonia. Interestingly, SBE showed an intermediate phenotype in which they express normal amount of tight junction proteins but low level of adherens junction proteins. This suggests that sensitization is a stimulus that does not only prime the immune system, but also affects structural cell functions.

Given that epithelial cells are involved in the modulation of the immune response, we analysed the production of Th1/Th2/Th17 cytokines. Rat epithelial cells did not spontaneously produce IFN γ (Th1) and there was no variation in IL-13 (Th2) production among groups. Interestingly, IL-23, a cytokine involved in Th17 survival and proliferation (27, 28), was expressed in epithelial cells. There is increasing evidence suggesting the implication of Th17 lymphocytes in asthma (29), but little information is presently known on their exact role. To our knowledge, this is the first time that epithelial cells are shown to produce IL-23, suggesting that these cells may be involved in the maintenance of Th17 lymphocyte subset in the lungs. Surprisingly, SBE were the cells with the highest level of IL-23 expression. However, further investigations are needed to better understand the implication of epithelial cells-derived IL-23 in asthma.

We also investigated the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, such as TNF/IL-1 α /IL-6 and IL-10, respectively. Pro-inflammatory mediators were less secreted in ABE, whereas IL-10 level was similar in all groups. Furthermore, TSLP, a mediator involved in mast cell activation and airway inflammation (10), was also less expressed in ABE. In contrast, human BEC from asthmatic donors have been shown to produce more inflammatory mediators, such as IL-6, IL-1 α , and TSLP than BEC from normal subjects (9, 10, 30). This discrepancy could be explained, at least in part, by the absence of allergen challenge in human before the isolation of BEC. Furthermore, human BEC are continually exposed to various pathogens and virus before being isolated, which may stimulate the release of inflammatory mediators, whereas our animals were kept in a sterile environment before BEC isolation. The pathogen-free environment could also explain the differences in basal production of MCP-1 and eotaxin between BEC isolated from allergen challenged rats and asthmatic patients (1, 11). However, the presence of suboptimal concentration of TNF significantly stimulated chemokine production in ABE without affecting the production in NBE. Similar susceptibility to stress has been observed in human asthmatic epithelium compared to normal epithelial cells (30). Thus, our data suggest that ABE have a low direct impact on the cytokine milieu of the allergen-challenged lung, but rather act once the lung milieu is inflamed by increasing their chemokine secretion to enhance inflammatory cell recruitment.

An important aspect of asthma pathology is airway remodelling of the epithelial-mesenchymal tropic unit (31). The main factor involved in this process is TGF- β and its production is increased in asthmatic epithelial cells (19). Similar data were observed in the current model since ABE produced significantly more active TGF- β than the other cell cultures. Furthermore, our data suggest that the remodelling may be initiated in the early step of asthma (the animals were challenged once with the antigen) and is not only a consequence of long term exposure (31). In contrast, the production of growth factors, involved in the maturation of immune cells (GM-CSF) and in the remodelling process (VEGF and EGF) (32), was not altered in ABE. Given that epithelial cells of asthmatic patients overexpress these mediators (32), our data suggest that a more chronic stimulus may be needed to influence growth factor production in epithelial cells.

Lung epithelial cells have been shown to regulate immune cell functions (12). A new molecule involved in myeloid cell regulation is CD200. This transmembrane molecule possesses a short intracellular domain and is expressed in a variety of cell types, including thymocytes, neurons, and T cells (12). Binding of CD200 to its receptor (CD200R) downregulates the activation of the CD200R-bearing cells (15). Thus, we investigated the differential expression of this molecule on BEC. Using partially permeabilized cells in immunocytochemistry, 25% NBE expressed CD200, whereas flow cytometry analysis of viable non-permeabilized cells showed 7.7% NBE expressing CD200 at their surface. In contrast, CD200 was basically undetectable on SBE and ABE. Our results suggest that normal epithelium may inhibit immune cells, such as alveolar macrophages and dendritic cells, present in the lung. However, once the activation cascade has begun, the epithelium downregulates CD200 expression and allows the immune system to be activated. Thus, CD200 could be a useful marker to determine the status of the epithelium.

All these cellular modifications suggest that epithelial cells from naïve rats (NBE) contribute to lung homeostasis, whereas SBE and ABE actively participate in the orchestration of the inflammatory environment by attracting immune cells and reducing immunosuppression of resident cells.

In conclusion, epithelial cells from naïve, sensitized, and allergen-challenged rats conserved their distinct phenotypes *in vitro*. Furthermore, rodent asthmatic epithelial cells share many similarities with human counterparts and could be used as a representative model for studying their involvement in the pathogenesis of asthma. We demonstrated that the junctional apparatus of SBE and ABE is disorganised and that the profile of secreted mediators is distinct between the three cell cultures, with an increased production in remodelling and chemotatic factors in ABE. In addition, sensitization is sufficient to affect epithelial phenotype, as SBE are in an intermediated state between NBE and ABE. Finally, a new homeostatic molecule, CD200, is exclusively expressed by NBE and could contribute to the quiescent condition of immune cells in the lung, such as alveolar macrophages (15). This molecule could be of interest for novel therapeutic target in uncontrolled asthma.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research. J.F.L.J. has a studentship from the Centre de recherche de l'Institut de cardiologie et de pneumologie de Québec.

REFERENCES

1. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;38(6):872-897.
2. Suzuki T, Chow CW, Downey GP. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1348-1361.
3. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):C1213-1228.
4. Van Itallie CM, Anderson JM. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1(1):38-41.
5. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(6):1233-1244; quiz 1245-1236.
6. Janssen-Heininger YM, Persinger RL, Korn SH, Pantano C, McElhinney B, Reynaert NL, Langen RC, Ckless K, Shrivastava P, Poynter ME. Reactive nitrogen species and cell signaling: implications for death or survival of lung epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(12 Pt 2):S9-S16.
7. Allahverdian S, Harada N, Singhera GK, Knight DA, Dorscheid DR. Secretion of IL-13 by airway epithelial cells enhances epithelial repair via HB-EGF. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(2):153-160.
8. Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(1):23-34; quiz 35-26.
9. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur Respir J* 1994;7(12):2226-2233.
10. Rochman Y, Leonard WJ. Thymic stromal lymphopoietin: a new cytokine in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8(3):249-254.
11. Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 2006;533(1-3):277-288.
12. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, Gwyer E, Sedgwick JD, Barclay AN, Hussell T. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol* 2008;9(9):1074-1083.

13. Careau E, Sirois J, Bissonnette EY. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(5):579-586.
14. St-Laurent J, Boulet LP, Bissonnette E. Cigarette smoke differently alters normal and ovalbumin-sensitized bronchial epithelial cells from rat. *J Asthma* 2009;46(6):577-581.
15. Wissinger E, Goulding J, Hussell T. Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. *Semin Immunol* 2009;21(3):147-155.
16. Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, Van Den Heuvel R. Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro* 2008;22(6):1419-1431.
17. 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(3):312-318.
18. Nathan AT, Peterson EA, Chakir J, Wills-Karp M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(3):612-618.
19. Semlali A, Jacques E, Plante S, Biardel S, Milot J, Laviolette M, Boulet LP, Chakir J. TGF-beta suppresses EGF-induced MAPK signaling and proliferation in asthmatic epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(2):202-208.
20. Lordan JL, Bucchieri F, Richter A, Konstantinidis A, Holloway JW, Thornber M, Puddicombe SM, Buchanan D, Wilson SJ, Djukanovic R, et al. Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2002;169(1):407-414.
21. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006;368(9537):804-813.
22. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:113-120.
23. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol* 2009;10(8):235.
24. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156(6):1099-1111.
25. de Boer WI, Sharma HS, Baelemans SM, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Braunstahl GJ. Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86(3):105-112.
26. Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y. Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J Histochem Cytochem* 2009;57(3):187-195.
27. Ivanov S, Bozinovski S, Bossios A, Valadi H, Vlahos R, Malmhall C, Sjostrand M, Kolls JK, Anderson GP, Linden A. Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36(4):442-451.
28. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006;54(1):15-24.
29. Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H. Role of IL-23-Th17 cell axis in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149 Suppl 1:108-112.

30. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8(4):432-446.
31. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res* 2009.
32. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 2008;57(1):1-10.

TABLE 3.1: MEDIATORS NOT SIGNIFICANTLY MODULATED IN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS

	NBE	SBE	ABE
EGF (pg/10 ⁶ cells)	<15	<15	<15
GM-CSF (pg/10 ⁶ cells)	4.0 ± 1,8	8.4 ± 1.1	2.3 ± 0.9
IFN γ (pg/10 ⁶ cells)	<15	<15	<15
IL-10 (pg/10 ⁶ cells)	48.1 ± 37.4	14.7 ± 7.8	12.5 ± 9.9
IL-13 (pg/10 ⁶ cells)	12.3 ± 1.8	14.3 ± 0.8	9.3 ± 2.2
IL-1 α (pg/10 ⁶ cells)	156 ± 31	122 ± 45	4 ± 4
IL-1 β (pg/10 ⁶ cells)	<5	<5	<5
IL-6 (pg/10 ⁶ cells)	158 ± 157	151 ± 92	17 ± 9
VEGF (ng/10 ⁶ cells)	11.9 ± 0.3	11.2 ± 1.9	9.3 ± 1.4

Summary of not significantly modulated mediator production in NBE, SBE and ABE. Mean ± SEM of 4-7 experiments.

FIGURES

Figure 3.1: Junction molecules disregulated in ABE. Epithelial cells were harvested and whole cell extracts were analysed by Western blot. Graphs represent mean protein levels normalized with tubulin. E-Cad (A) and ZO-1 (B) levels were significantly higher in NBE cells compared with SBE and ABE (# $p < 0.001$ and ** $p < 0.02$, respectively). C) Cldn-1 levels were significantly higher in ABE compared with SBE and ABE (** $p < 0.02$). Mean \pm SEM of 3-4 experiments.

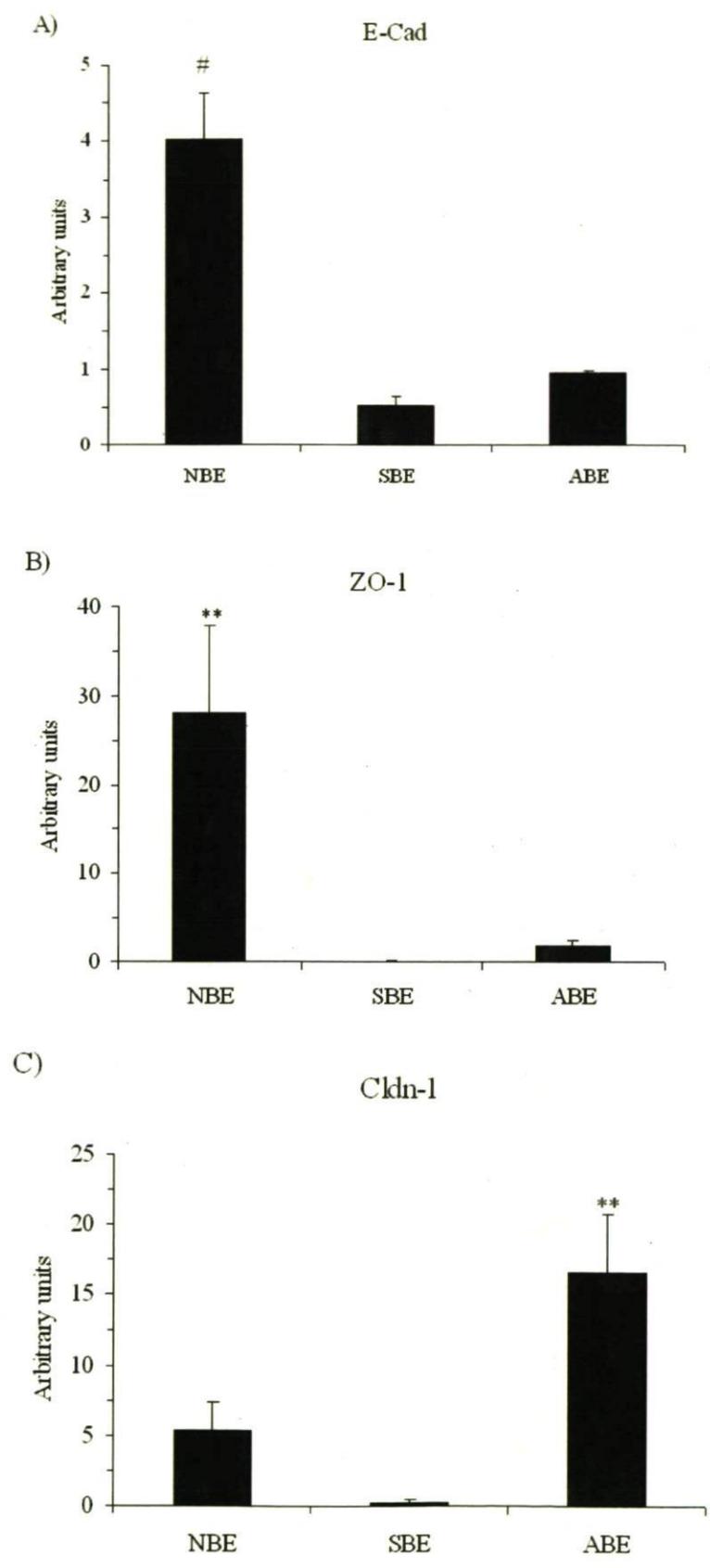
Figure 3.2: Overproduction of TGF- β by ABE. Supernatants from epithelial cells culture 24 h after their confluence were harvested and TGF- β levels were measured by ELISA. Total TGF- β levels were similar between all cell lines, but active TGF- β levels were significantly higher in ABE cells compared with NBE and SBE (# $p < 0.001$). Mean \pm SEM of 4-7 experiments.

Figure 3.3: Inhibition of TNF production in ABE. Supernatants from epithelial cells culture 24 h after their confluence were harvested and TNF levels were measured by ELISA. TNF levels were significantly lower in ABE cells compared with NBE and SBE (# $p < 0.001$). Mean \pm SEM of 4-6 experiments.

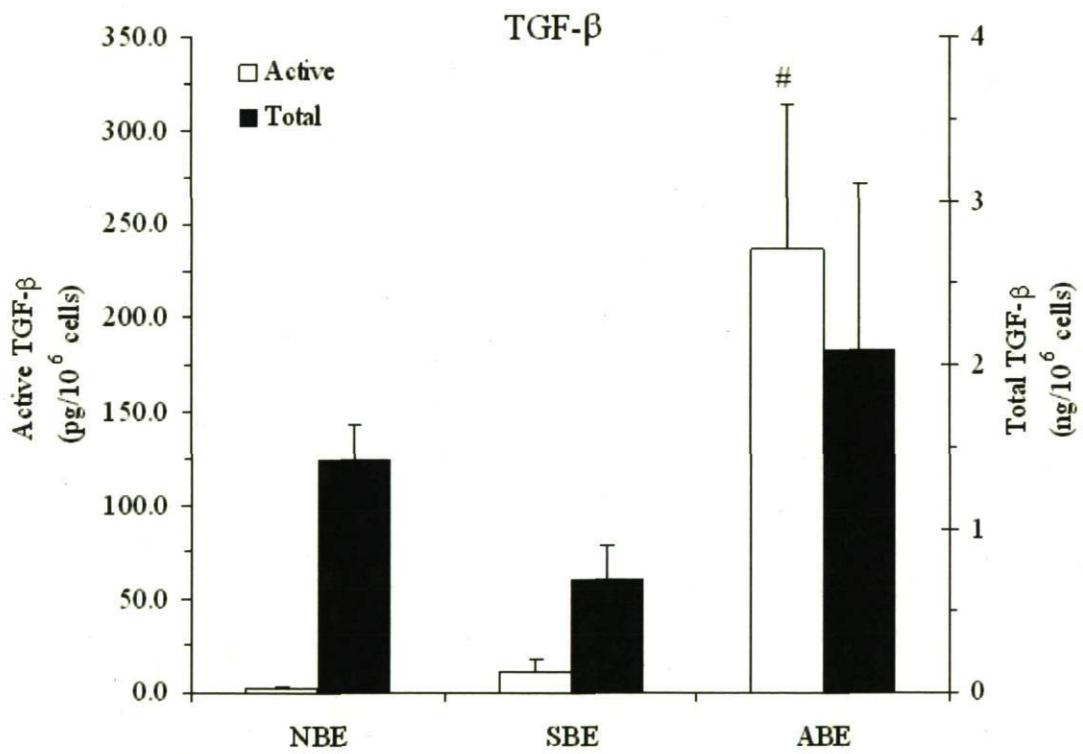
Figure 3.4: Expression of IL-23 mRNA by epithelial cells. Epithelial cells culture 4 h after their confluence were harvested and total RNA was quantified for the presence of IL-23 transcript. mRNA levels were normalized with GNB2L1. SBE expressed significantly more IL-23 transcript compared with NBE and ABE (* $p < 0.05$). Mean \pm SEM of 6-9 experiments.

Figure 3.5: Increased production of chemokines in ABE. Supernatants from control (Ctrl) or TNF stimulated [25 ng/ml] (TNF) epithelial cells culture 24 h after their confluence were harvested and cytokines released were measured by ELISA. A) MCP-1 levels were significantly higher in TNF stimulated SBE and ABE cells compared with NBE ($p < 0.05$) and ABE produced significantly more MCP-1 than SBE ($p < 0.05$). Significant differences between groups are represented by different letters (a, b and c). B) Eotaxin-1 (Eo-1) levels were significantly higher in TNF stimulated ABE cells compared with NBE and SBE (* $p < 0.05$). Mean \pm SEM of 4-6 experiments.

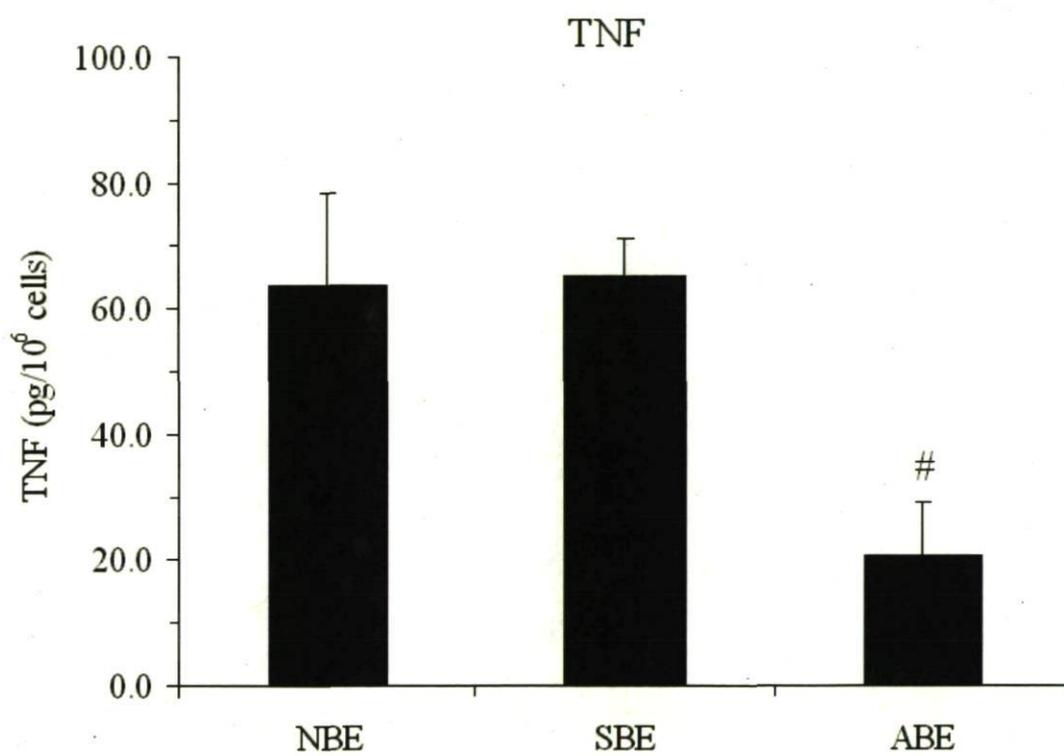
Figure 3.6: Expression of CD200 in NBE. Epithelial cells were harvested and CD200 expression was determined. A) Cytospins were prepared and CD200 expression was analysed by immunocytochemistry. B) Cells were marked for CD200 and percentage of cells expressing CD200 was analysed by flow cytometry. NBE expressed significantly more CD200 than SBE and ABE (* $p < 0.05$). Mean \pm SEM of 4-5 experiments.



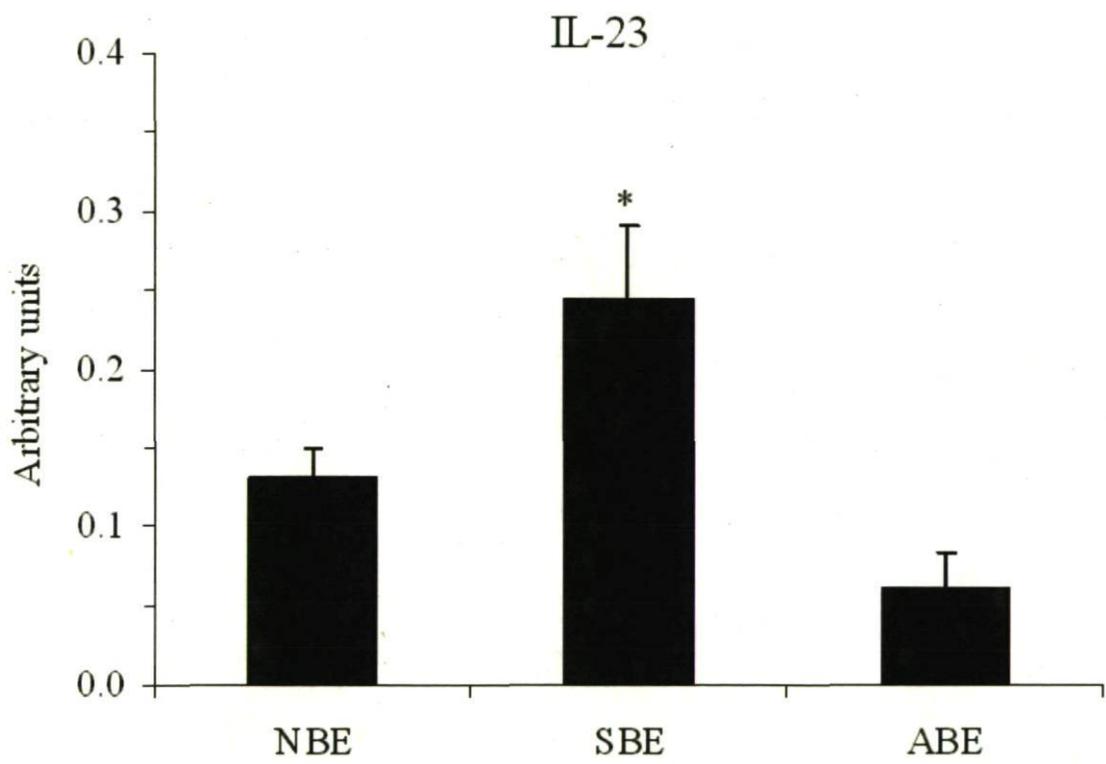
Lauzon-Joset et al. Fig. 3.1



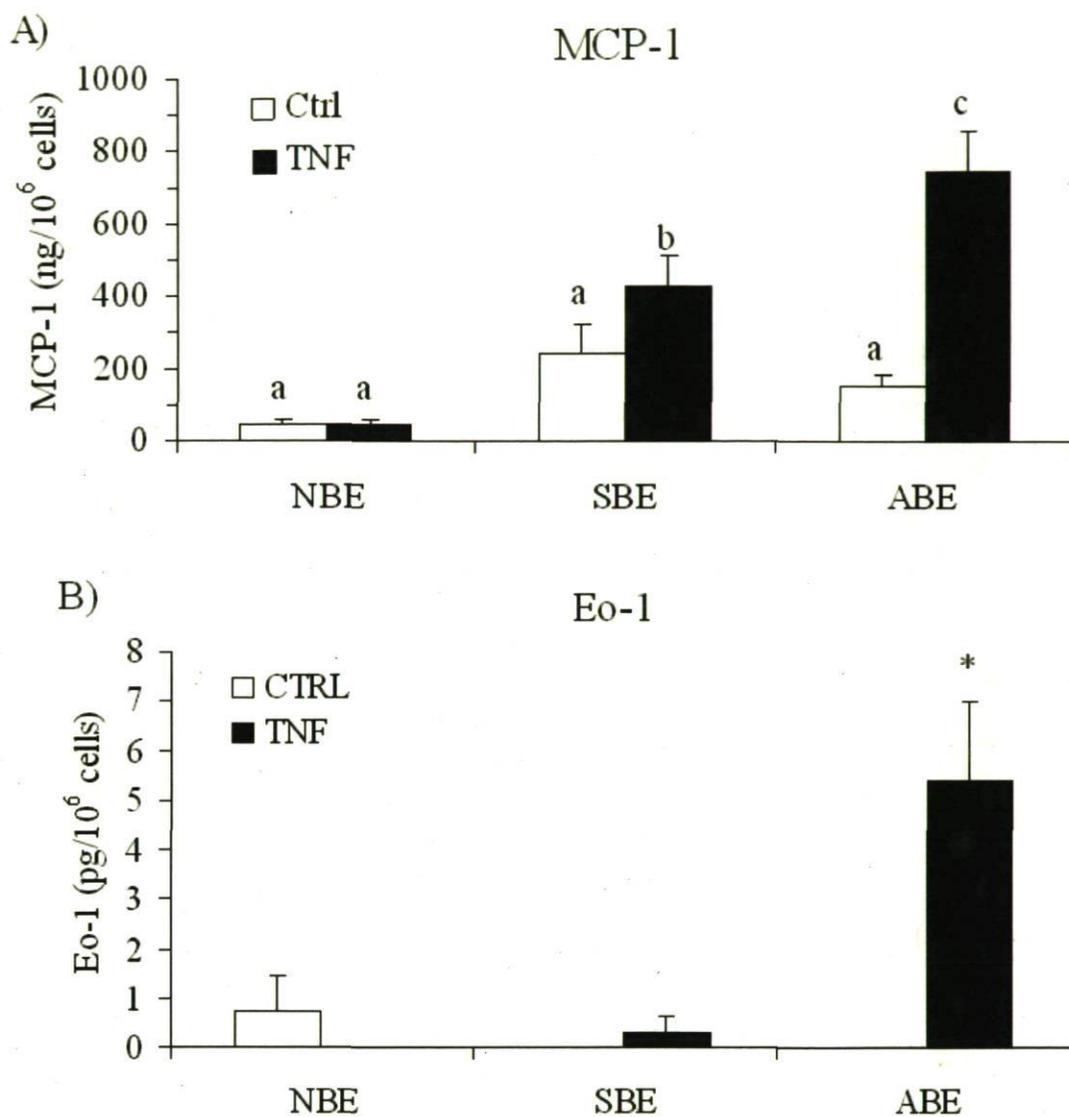
Lauzon-Joset et al. Fig. 3.2



Lauzon-Joset et al. Fig. 3.3

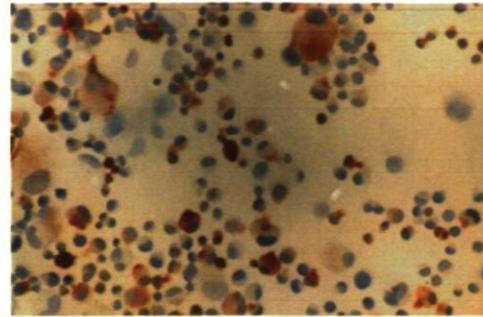
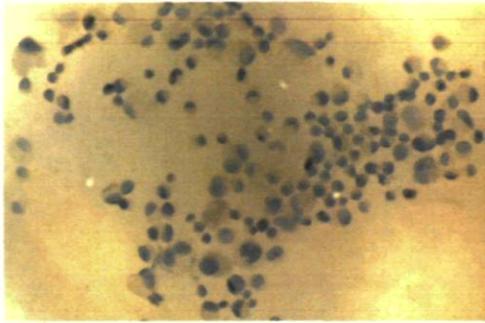


Lauzon-Joset et al. Fig. 3.4



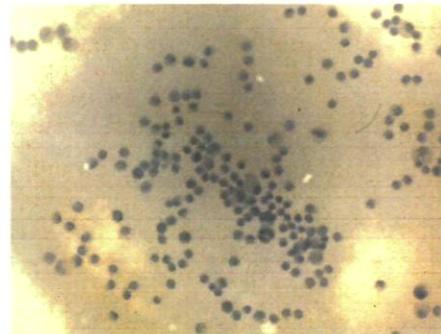
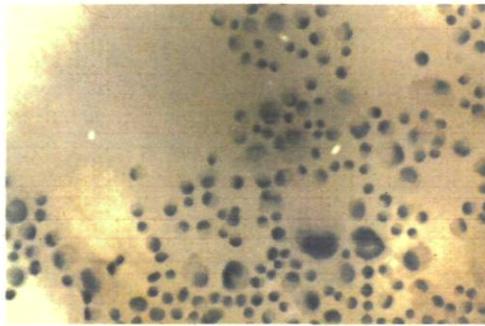
A) Negative control

NBE



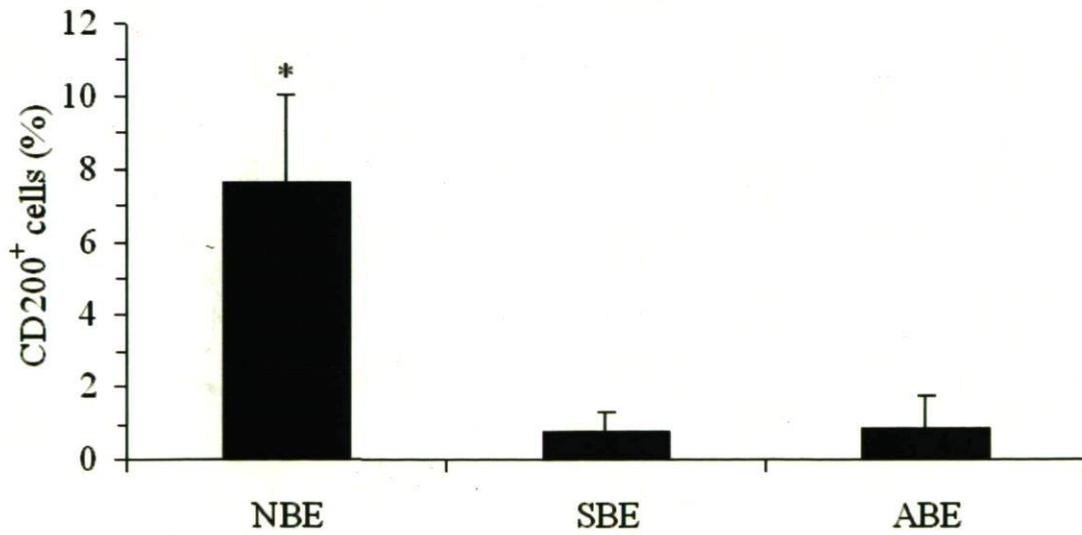
SBE

ABE



B)

CD200



CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

Le rôle des CE dans l'asthme est de plus en plus évident et les modifications présentées dans cet ouvrage supportent ce rôle. En effet, en plus de présenter des modifications structurales, les CE participent activement à l'établissement de la cascade inflammatoire, soit directement soit indirectement (2, 43, 44). De plus, les résultats obtenus à l'aide des CE isolées de rats semblent démontrer qu'elles conservent bien un phénotype distinct tout au long de leur culture *in vitro* et qu'elles sont un modèle efficace pour l'étude de l'asthme.

Le premier rôle étudié est la formation d'une barrière physique. Tout comme les études à l'aide de biopsies humaines, l'appareil de jonctions cellulaires (ZO-1 et E-Cad) est altéré chez les ABE (54). Il est intéressant de noter une surexpression de la protéine de jonction cellulaire Cldn-1. Malgré le nombre limité d'études sur cette protéine dans le poumon (et l'asthme) (56), son rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale est sans équivoque (57). Puisque chez les ABE, il y a une faible expression de l'E-Cad et la ZO, deux molécules impliquées dans les étapes précoces de la formation des jonctions, la surexpression Cldn-1 semble être une tentative de compensation pour restaurer l'intégrité épithéliale. Il serait intéressant d'approfondir l'étude des Cldn chez les CE asthmatiques en étudiant leur localisation en plus de leur patron d'expression (cytoplasmique ou membranaire et apicale ou diffuse).

Le présent modèle permet également d'étudier une étape intermédiaire difficilement observable chez l'humain, l'effet de la sensibilisation (avec les SBE). En effet, il est virtuellement impossible de trouver un humain qui n'a pas été exposé de façon chronique à un allergène. Il est intéressant de noter que même les SBE exprimaient moins de protéines de jonctions, même si elles n'avaient jamais été en contact directement avec l'allergène. Cela suggère donc que lors de la phase de sensibilisation, des médiateurs circulants (IL-4, IgE, etc.) peuvent affecter localement dans le poumon les fonctions des CE. De plus, l'expression de la Cldn-1 est augmentée chez les ABE comparativement aux SBE. Cela suggère que les ABE réagissent à l'exposition allergénique (peut-être via les FcεRII) et tente de contrer la diffusion de l'allergène en augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées. Ces résultats suggèrent que l'imperméabilité de l'épithélium aussi bien

chez les rats sensibilisés que ceux stimulés à l'allergène soit compromise, tel qu'observé chez les sujets asthmatiques (3).

Les CE asthmatiques participent à l'inflammation, au recrutement cellulaire et au remodelage bronchique (4, 43, 50, 51, 58). Les ABE ont présenté un profil similaire avec une augmentation de la production basale de TGF- β actif et une induction de l'expression de chimiokines lorsque stimulé. En effet, lors de stimulation suboptimale, la production par les NBE resté inchangée, mais pas chez les SBE et les ABE. Cette différence de sensibilité au stress inflammatoire a également été observée chez les CE humaines (43).

De façon surprenante, une diminution de la production de médiateurs inflammatoires (TNF, IL-6 et TSLP) a été observée chez les ABE. Cette divergence avec les résultats obtenus chez les CE humaines peut s'expliquer en partie par la présence d'autres stimuli inflammatoires ou d'autres pathogènes chez les humains. Par exemple, le LPS, qui est pratiquement absent dans l'environnement stérile des rats, mais très présent chez l'humain, pourrait agir en synergie avec l'allergène pour augmenter la production de médiateurs inflammatoires. En résumé, les CE favoriseraient une réponse inflammatoire principalement par le recrutement accru de cellules inflammatoires, mais ne participeraient pas aux étapes initiales de l'environnement inflammatoire.

Même si aucune modulation des médiateurs impliqués dans les voies Th1 et Th2 n'a été remarquée, la détection de production d'IL-23 est surprenante. En effet, cette cytokine est impliquée dans le maintien et la survie des lymphocytes Th17 (26, 27), mais sa production n'a jamais été documentée chez CE. Même si un niveau d'IL-23 a été détecté chez tous les groupes, ce sont les SBE qui en produisent le plus. L'explication exacte de la surproduction d'IL-23 par les SBE nécessite davantage d'investigation, mais cela suggère à tout le moins que les CE sont impliquées dans le maintien d'une réponse Th17 dans le poumon et que celle-ci n'est pas abolie, voir peut-être même augmentée, lors du développement de l'asthme.

Le dernier rôle observé est le maintien de l'homéostasie pulmonaire (1). Plusieurs molécules ou médiateurs sont impliqués, mais un de ceux-ci est l'expression de CD200

(Fig. 4.1). Même si son expression n'est pas documentée dans l'asthme, les CE humains, tout comme les NBE, expriment CD200 (52). Il est intéressant de noter que, tout comme lors d'une réaction inflammatoire (1), les SBE et ABE perdent l'expression du CD200 (Fig. 4.1). Cette observation met en lumière une altération des CE lors des étapes primaires de la réaction asthmatique. Cette perte d'inhibition des cellules myéloïdes pourrait être à l'origine de l'initiation de la cascade inflammatoire asthmatique, ou à tout le moins, l'une des premières étapes. En effet, si des cellules immunitaires, telles que les macrophages alvéolaires ou les cellules dendritiques, ne sont plus inhibées, elles vont pouvoir s'activer face à des stimuli bénins. La modulation de l'expression de CD200 pourrait être un biomarqueur des étapes précoces du développement de la réaction asthmatique.

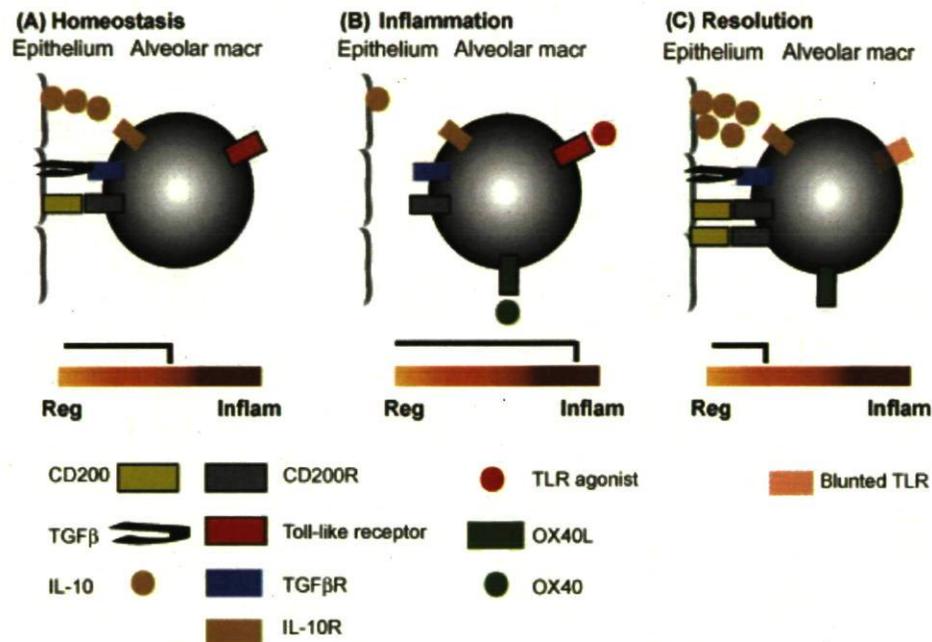


Figure 14.1 : Implication des cellules épithéliales dans l'homéostasie pulmonaire

Interaction entre les CE (Epithelium) et les macrophages alvéolaires (Alveolar macr) lors d'une situation normale (A), inflammatoire (B) ou durant la phase de résolution (C).

Tiré de Wissinger, 2009 (1) avec la permission de le reproduire.

En conclusion, le modèle de CE isolées de rats naïfs, sensibilisés et asthmatiques représentent bien les observations produites chez l'humain et pourrait permettre de mieux comprendre le rôle des CE dans le développement de l'asthme. De plus, la sensibilisation

est un stimulus suffisant pour moduler les fonctions des CE bronchiques, mais celles-ci n'acquièrent pas le phénotype complet des ABE.

Des études subséquentes quant à l'effet de l'interaction entre CD200 et son récepteur chez différentes cellules résidentes du poumon, telles les cellules dendritiques, les mastocytes et les macrophages alvéolaires, pourraient éclairer l'importance de cette molécule de surface. De plus, il pourrait être intéressant de vérifier si l'asthme est associé avec un ou plusieurs polymorphismes de ce gène.

L'observation d'une production d'IL-23 par les CE ouvre un horizon de possibilités. En effet, le rôle des Th17 dans l'asthme est très mal compris et la source des médiateurs responsables de la mise en place de cette réponse l'est encore davantage. Il serait intéressant de cultiver des lymphocytes en présence de surnageant de CE ou de surexprimer ce médiateur *in vivo*.

Finalement, l'isolation des NBE, SBE et ABE va permettre de mieux comprendre l'évolution des CE dans l'asthme ainsi que leur interaction avec les autres cellules pulmonaires. Ces nouvelles informations pourraient permettre de développer des stratégies thérapeutiques novatrices dirigées contre les fonctions altérées des CE.

CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES

1. Wissinger E, Goulding J, Hussell T. Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. *Semin Immunol* 2009;21(3):147-155.
2. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(6):1233-1244.
3. Hudson TJ. Skin barrier function and allergic risk. *Nat Genet* 2006;38(4):399-400.
4. Rochman Y, Leonard WJ. Thymic stromal lymphopoietin: A new cytokine in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8(3):249-254.
5. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;38(6):872-897.
6. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(5):997-1008.
7. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: Executive summary of the gina dissemination committee report. *Allergy* 2004;59(5):469-478.
8. Bateman ED, Jithoo A. Asthma and allergy - a global perspective. *Allergy* 2007;62(3):213-215.
9. Braman SS. The global burden of asthma. *Chest* 2006;130(1 Suppl):4S-12S.
10. GINA GfA-. Global strategy for asthma management and prevention. 2008.
11. Boulet LP, Becker A, Berube D, Beveridge R, Ernst P. Canadian asthma consensus report, 1999. Canadian asthma consensus group. *CMAJ* 1999;161(11 Suppl):S1-61.
12. van den Berge M, Arshad SH, Ind PW, Magnussen H, Hamelmann E, Kanniess F, Postma DS. Similar efficacy of ciclesonide versus prednisolone to treat asthma worsening after steroid tapering. *Respir Med* 2009;103(8):1216-1223.
13. Peters SP, Ferguson G, Deniz Y, Reisner C. Uncontrolled asthma: A review of the prevalence, disease burden and options for treatment. *Respir Med* 2006;100(7):1139-1151.
14. McIvor RA, Boulet LP, FitzGerald JM, Zimmerman S, Chapman KR. Asthma control in Canada: No improvement since we last looked in 1999. *Can Fam Physician* 2007;53(4):673-677, 672.
15. Wenzel SE. Asthma: Defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006;368(9537):804-813.
16. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(5):1720-1745.
17. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999;17:255-281.
18. Smith H. Asthma, inflammation, eosinophils and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 1992;22(2):187-197.
19. Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, Van Den Heuvel R. Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro* 2008;22(6):1419-1431.
20. Lanier LL. Back to the future--defining nk cells and t cells. *Eur J Immunol* 2007;37(6):1424-1426.
21. Diaz M, Klinman NR. Relative roles of somatic and darwinian evolution in shaping the antibody response. *Immunol Res* 2000;21(2-3):89-102.
22. Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett* 2007;113(1):6-18.

23. Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: A tale of many T cells. *Clin Exp Allergy* 2008;38(12):1847-1857.
24. Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T regulatory cells and their counterparts: Masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 2009;39(5):626-639.
25. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper t-cell response? *Immunology* 2008;123(3):326-338.
26. Jin D, Zhang L, Zheng J, Zhao Y. The inflammatory Th 17 subset in immunity against self and non-self antigens. *Autoimmunity* 2008;41(2):154-162.
27. Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H. Role of il-23-th17 cell axis in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149 Suppl 1:108-112.
28. Suzuki T, Chow CW, Downey GP. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1348-1361.
29. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005;11(4):148-152.
30. Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 2009;71:489-507.
31. Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: Dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2003;3(12):994-1003.
32. van Rijt LS, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma: A function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005;35(9):1125-1134.
33. Prussin C, Metcalfe DD. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S450-456.
34. Conrad DH. Fc epsilon RII/CD23: The low affinity receptor for IgE. *Annu Rev Immunol* 1990;8:623-645.
35. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): From physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931-972.
36. Cruse G, Cockerill S, Bradding P. IgE alone promotes human lung mast cell survival through the autocrine production of IL-6. *BMC Immunol* 2008;9:2.
37. Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen JE, Zhang J, Siraganian RP, Krystal G. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 2001;14(6):801-811.
38. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res* 2009.
39. Robinson DS. The role of the mast cell in asthma: Induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(1):58-65.
40. Bosse Y, Hudson TJ. Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. *Annu Rev Med* 2007;58:171-184.
41. James A. Remodelling of airway smooth muscle in asthma: What sort do you have? *Clin Exp Allergy* 2005;35(6):703-707.
42. Zhang S, Smartt H, Holgate ST, Roche WR. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: An in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest* 1999;79(4):395-405.
43. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8(4):432-446.
44. Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: Identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(1):23-34; quiz 35-26.

45. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:113-120.
46. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: A multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):C1213-1228.
47. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(5):L1166-1178.
48. de Boer WI, Sharma HS, Baelemans SM, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Braunstahl GJ. Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: Possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86(3):105-112.
49. Puddicombe SM, Torres-Lozano C, Richter A, Bucchieri F, Lordan JL, Howarth PH, Vrugt B, Albers R, Djukanovic R, Holgate ST, et al. Increased expression of p21(waf) cyclin-dependent kinase inhibitor in asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(1):61-68.
50. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur Respir J* 1994;7(12):2226-2233.
51. Semlali A, Jacques E, Plante S, Biardel S, Milot J, Laviolette M, Boulet LP, Chakir J. TGF-beta suppresses EGF-induced MAPK signaling and proliferation in asthmatic epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(2):202-208.
52. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, Gwyer E, Sedgwick JD, Barclay AN, Hussell T. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol* 2008;9(9):1074-1083.
53. 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(3):312-318.
54. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 2008;57(1):1-10.
55. St-Laurent J, Boulet LP, Bissonnette E. Cigarette smoke differently alters normal and ovalbumin-sensitized bronchial epithelial cells from rat. *J Asthma* 2009;46(6):577-581.
56. Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y. Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J Histochem Cytochem* 2009;57(3):187-195.
57. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156(6):1099-1111.
58. Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 2006;533(1-3):277-288.