

UNIVERSITÉ VICTOR SEGALÉN BORDEAUX 2

Année 2011

Thèse n°1810

Thèse pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX 2**

*Mention : Sciences, Technologies, Santé*

*Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie*

Présentée et soutenue publiquement le 16 mars 2011

par

**Annaïg OZIER**

Née le 30 mars 1974 à Paris

**ÉTUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE L'INFLAMMATION  
ET DU REMODELAGE BRONCHIQUE  
DANS L'ASTHME**

Membres du jury

<b>Jacques REGNARD</b>	PU-PH, Université de Besançon	<i>Président</i>
<b>Jorge BOCZKOWSKI</b>	DR INSERM, Université de Paris XII	<i>Rapporteur</i>
<b>Sylvie GAZZERI</b>	DR INSERM, Université de Grenoble	<i>Rapporteur</i>
<b>Roger MARTHAN</b>	PU-PH, Université de Bordeaux	<i>Examineur</i>
<b>Patrick BERGER</b>	PU-PH, Université de Bordeaux	<i>Directeur de thèse</i>

*À Frédéric*

# Sommaire

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>19</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>22</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>29</b>
<b>CHAPITRE I : GENERALITES .....</b>	<b>33</b>
<b>I-1. Physiopathologie de l’asthme .....</b>	<b>34</b>
A. Hyperréactivité bronchique .....	34
1. Définition.....	34
2. HRB non spécifique .....	34
3. HRB spécifique .....	38
B. Inflammation bronchique.....	39
1. Lymphocytes T .....	39
2. Mastocytes .....	43
3. Polynucléaires éosinophiles.....	46
4. Polynucléaires neutrophiles.....	46
C. Remodelage bronchique.....	47

1. Epithélium bronchique .....	48
2. Membrane basale et matrice extra-cellulaire.....	48
3. Glandes séro-muqueuses .....	49
4. Angiogenèse .....	49
5. Muscle lisse bronchique .....	50
<b>I-2. Explorations non invasives de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'asthme .....</b>	<b>52</b>
A. NO exhalé .....	52
1. Origine biologique du NO .....	52
2. Origine anatomique du NO.....	54
3. Intérêt de la mesure du NO exhalé dans l'asthme .....	56
B. Tomodensitométrie thoracique .....	58
1. Exploration des voies aériennes proximales.....	59
2. Exploration des voies aériennes distales .....	60
<b>I-3. Rôle central de la cellule musculaire lisse dans l'inflammation et le remodelage bronchique dans l'asthme .....</b>	<b>65</b>
A. Rôle de la CML dans l'inflammation bronchique .....	66
1. Médiateurs synthétisés par la CML .....	66
2. CML et chimiotactisme de cellules inflammatoires .....	69
3. CML et adhérence de cellules inflammatoires .....	69
4. Interaction CML / Mastocyte .....	70
B. Rôle de la CML dans le remodelage bronchique.....	72
<b>I-4. Les chitinases.....</b>	<b>74</b>
A. Classification des chitinases .....	76



B. Rôle biologique des chitinases.....	79
1. Généralités.....	79
2. YKL-40.....	80
C. Chitinases impliquées dans l’asthme .....	82
1. Chitinases enzymatiquement actives .....	83
2. Chitinase-like protéines .....	86
<b>I-5. La protéine p53 .....</b>	<b>89</b>
A. Structure de la protéine p53 .....	89
1. Région N-terminale .....	91
2. Région centrale .....	91
3. Région C-terminale .....	94
B. Contrôle de l’expression de la protéine p53 .....	94
1. Contrôle transcriptionnel .....	95
2. Contrôle traductionnel .....	95
3. Contrôle post-traductionnel .....	95
C. Principales fonctions de la protéine p53 .....	98
1. Rôle de p53 dans l’arrêt du cycle cellulaire .....	99
2. Rôle de p53 dans l’induction de l’apoptose.....	101
3. Rôle de p53 dans la biogenèse mitochondriale .....	106
4. Rôle de p53 dans le métabolisme énergétique .....	111
5. Rôle de p53 dans la régulation du stress oxydant.....	114
6. Rôle de p53 dans la défense anti-inflammatoire .....	115
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>117</b>
<b>II-1. Mesures du NO exhalé chez l’asthmatique.....</b>	<b>118</b>

A. Appareils de mesure du NO exhalé .....	118
B. Techniques de mesure du NO exhalé.....	118
1. Mesure par chimioluminescence .....	118
2. Mesure par électroluminescence .....	122
<b>II-2. Analyses <i>in vivo</i> chez la souris sensibilisée.....</b>	<b>123</b>
A. Modèles murins de sensibilisation allergique.....	123
B. Mesure de la réactivité bronchique par pléthysmographie .....	125
1. Pléthysmographie chez l'animal vigile.....	125
2. Mesure de la résistance chez l'animal trachéotomisé.....	126
C. Imagerie des voies aériennes par micro-scanner .....	126
D. Analyses cytologique et histologique des voies aériennes .....	127
<b>II-3. Analyses <i>in vitro</i> des CML bronchiques humaines .....</b>	<b>129</b>
A. Culture cellulaire .....	129
1. Culture primaire de CML bronchiques humaines .....	129
2. Immunophénotypage des cellules cultivées .....	131
3. Congélation des cellules cultivées.....	135
B. Interférence ARN lentivirale.....	135
1. Généralités .....	135
2. Structure des lentivirus .....	139
3. Production des particules lentivirales.....	142
4. Titration des particules lentivirales.....	144
5. Infection des CML.....	144
C. Expression protéique et transcriptionnelle.....	145
1. Cytométrie en flux .....	145

2. Western blot.....	146
3. ELISA.....	147
4. Immunocytochimie.....	149
5. Immunohistochimie.....	150
D. Étude de la prolifération cellulaire.....	155
1. Courbes de croissance cellulaire.....	155
2. Incorporation de BrdU.....	155
E. Étude de l’hypertrophie.....	156
1. Cytométrie en flux.....	156
2. Western blot.....	157
3. Immunocytochimie.....	157
F. Étude de la migration cellulaire.....	158
1. Conditions expérimentales de culture.....	158
2. Protocole expérimental.....	158
G. Étude de l’apoptose par cytométrie en flux.....	159
1. Conditions expérimentales de culture.....	159
2. Protocole expérimental.....	159
H. Liaison de p53 à l’ADN.....	160
1. Extraction des protéines nucléaires.....	160
2. TransAM <sup>TM</sup> p53.....	161
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>162</b>
<b>III-1. Intérêt du NO exhalé pour prédire la persistance du contrôle de l’asthme.....</b>	<b>163</b>
<b>III-2. Imagerie <i>in vivo</i> par micro-scanner de l’inflammation et/ou du remodelage bronchique dans des modèles murins d’asthme.....</b>	<b>166</b>

A. Intérêt du micro-scanner pour l'évaluation non invasive de l'inflammation et du remodelage bronchique dans un modèle murin d'asthme chronique .....	166
B. Évaluation du remodelage bronchique par micro-scanner dans différents modèles murins d'asthme .....	169
<b>III-3. Étude <i>in vitro</i> des mécanismes à l'origine du remodelage musculaire lisse bronchique chez l'asthmatique .....</b>	<b>172</b>
A. Étude du rôle de la chitinase YKL-40 dans le remodelage musculaire lisse chez l'asthmatique .....	173
B. Étude du rôle de la protéine p53 dans le remodelage musculaire lisse chez l'asthmatique .....	178
1. Caractéristiques cliniques et fonctionnelles respiratoires des patients.....	179
2. Hyperplasie des CML d'asthmatiques.....	181
3. Expression de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique .....	183
4. Fonction de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique .....	185
<b>CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>202</b>
<b>CHAPITRE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>207</b>

## **Avant-propos**

Le travail expérimental présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le Centre de Recherche Cardio-Thoracique de l'Université de Bordeaux 2 (INSERM, U1045).

Je tiens à remercier très chaleureusement Patrick BERGER, qui a assuré la direction scientifique de cette thèse. Tu m'as accueillie dans le laboratoire de physiopathologie respiratoire en tant qu'étudiante de maîtrise de sciences biologiques et médicales et m'a donné l'opportunité de m'ouvrir à la recherche. Ton soutien, ton enthousiasme et ta disponibilité constante m'ont aidé et guidé tout au long de ma formation. Sois assuré de ma profonde reconnaissance.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Jacques REGNARD de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur Jorge BOCZKOWSKI et Madame Sylvie GAZZERI pour l'honneur qu'ils me font de participer à ce jury et pour le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer en étant rapporteurs de ce travail.

Je remercie très chaleureusement Monsieur le Professeur Roger MARTHAN d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour vos nombreuses qualités humaines et scientifiques. Merci également pour votre soutien, vos conseils avisés et votre sens de l'humour. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier :

- Tous les membres du Centre de Recherche Cardio-Thoracique pour leur aide et leur bonne humeur : Mathieu LEDERLIN, Imane BARA, Emilie SHIPLEY, Benoit ALLARD, Diana DAHAN, Thomas TRIAN, Olga OUSOVA, Pierre-Olivier GIRODET, Marie BILLAUD, Élodie MARTIN, Émilie GIRAUD, Jennifer CATTIAUX, Mélanie WILLEM, Armelle DESVEAUX et Pierre TECHOUÉYRES.

- Les chercheurs de l'Université Bordeaux 2, qui m'ont accueilli et initié aux techniques expérimentales disponibles dans leur laboratoire, en particulier Vincent PITARD et Monsieur le Professeur Jean-François MOREAU (CNRS UMR 5164).

- Monsieur le Professeur Jean-François VELLY, chef de service de chirurgie thoracique, Mathieu THUMEREL, chef de clinique en chirurgie thoracique, Monsieur le Docteur Hugues BEGUERET, anatomopathologiste, et Monsieur le Docteur Jean-Marc VERNEJOUX, pneumologue, qui ont permis le prélèvement de tissu bronchique humain.

J'adresse enfin une pensée amicale à tous les membres du service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire de l'hôpital Haut-Lévêque et du service de Réanimation Médicale de l'hôpital Pellegrin, en particulier Monsieur le Professeur Didier GRUSON et Monsieur le Docteur Alexandre BOYER.

## Liste des abréviations

AA : Acide aminé

ACQ : Asthma control questionnaire

ADNc : ADN complémentaire

ADNmt : ADN mitochondrial

AEBSF : 4-2-amino-éthyl-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride

AIF : Apoptosis inducing factor

ALDH4 : Aldehyde dehydrogenase-4

AMCase : Acidic mammalian chitinase

AMPK : Adénosine monophosphate kinase

AMV : Avian myeloblastosis virus

AP1 : Activator protein 1

Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor-1

APC : Antigen-presenting cell

AS : Anti-sens

ATP/AMP : Adénosine (tri/mono) phosphate

Bad : Bcl-2-antagonist of cell death

Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B cell lymphoma-2

Bcl-xL : Bcl-2-like 1

BDP : Bécloéthasone

BH3 : Bcl-2 homology domain 3

Bid : BH3 interacting domain death agonist

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

BR : Basic region

BRP-39 : Breast regression protein 39

BSA : Bovine seric albumin

CaCl<sub>2</sub> : Dichlorure de calcium

CAK : Cdk-activating kinase

CamKIV : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV

CawNO : Concentration en NO de la paroi bronchique

CBP/p300 : CREB-binding protein/p300

CDK : Cycline-dependant kinase

C/EBP $\alpha$  : CCAAT enhancer-binding protein  $\alpha$

CGRP : Calcitonin gene related peptide

CHI3L1 : Chitinase 3 like-1

ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine

CML : Cellule musculaire lisse

COI : Sous-unité I de la cytochrome c oxidase

Cox-2 : Cyclooxygénase-2

cPPT : Centre polypurine track

CPT : Capacité pulmonaire totale

CREB : cAMP response element-binding

CVF : Capacité vitale forcée

Cyt b : Cytochrome b

DAB : Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DawNO : Diffusion du NO



DBD : DNA binding domain

DEMM<sub>25-75</sub> : Débit expiratoire maximal médian entre 25 et 75% de la CVF

Der f : Dermatophagoides farinae

Der p : Dermatophagoides pteronyssinus

DMEM : Dulbecco's modified eagles medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

dNTP : Désoxyribonucléotide

DR4 : Death receptor 4

ECP : Eosinophil cationic protein

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique

EF-1 $\alpha$  : Elongation factor-1 $\alpha$

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ENA-78 : Epithelial-derived neutrophil-activating protein-78

EndoG : Endonucléase G

Env : Enveloppe

eNOS : NOS endothéliale

F<sub>A</sub>NO : Fraction alvéolaire de NO

Fas-R : Fas-receptor

F<sub>E</sub>NO : Fraction exhalée de NO

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FIV : Feline immunodeficiency virus

FKN : Fraktalkine

FoxP3 : Forkhead box P3

FPRL-1 : Formyl peptide receptor-like 1

FSC : Forward scatter

GADD45 : Growth arrest and DNA-damage inducible 45

GFP : Green fluorescent protein

GH18 : Famille 18 des glycosides hydrolases

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor

GRO- $\alpha$  : Growth regulated oncogene- $\alpha$

G6P : Glucose-6-phosphate

HBSS : Hank's balanced salt solution

HC gp-39 : Human cartilage glycoprotein-39

Hdm2 : Human homolog of mouse double minute 2

HES : Hématoxyline-Éosine-Safran

HIV : Human immunodeficiency virus

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

HPRT-1 : Hypoxanthine phospho-ribosyl-transferase 1

HRB : Hyperréactivité bronchique

HRP : Horseradish peroxydase

HtrA2 : High-temperature requirement protein A2

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

ICAM-1 : Inter-cellular adhesion molecule-1

ICS : Corticothérapie inhalée

IFN- $\gamma$  : Interferon- $\gamma$

IKK : I $\kappa$ B kinase

IMC : Index de masse corporelle

iNOS : NOS inductible

IP-10 : Interferon- $\gamma$  inducible protein-10

I-TAC : Interferon-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant

J'awNO : NO bronchique

LABA : Bronchodilateur de longue durée d'action

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LTR : Long terminal repeat

LXA<sub>4</sub> : Lipoxine A<sub>4</sub>

MAC : Molécule d'adhérence cellulaire

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MBP : Major basic protein

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

MC<sub>T</sub> : Mastocyte de type T

MC<sub>TC</sub> : Mastocyte de type TC

Mdm2 : Mouse double minute 2

MEC : Matrice extra-cellulaire

MEK : MAPK Erk kinase

MIP-1 $\beta$  : Macrophage inflammatory protein-1

MMP9 : Métalloprotéinase 9

MnSOD : Manganese superoxyde dismutase

MPF : Maturation promoting factor

MRA : Mycoplasma removal agent

mtTFA : Mitochondrial transcription factor A

NANC : Non adrénérgique non cholinérgique

nDNA : ADN nucléaire

NDP : nucléoside diphosphate

NES : Nuclear export signal

NF-kB : Nuclear factor-kappa B

NK-T : Natural killer T cell

NLS : Nuclear localization signal

NO : Monoxyde d'azote

NO<sub>2</sub> : dioxyde d'azote

NOS : NO synthase

nNOS : NOS neuronale

NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

NRF : Nuclear respiratory factor

OD : Oligomerization domain

OCS : Corticothérapie orale

OVA : Ovalbumine

O<sub>3</sub> : Ozone

PA : Paquet-année

PAR2 : Récepteur activé par les protéases de type 2

PCR : Polymerase chain reaction

PBS : Phosphate buffered saline

P/CAF : p300/CPB-associated factor

PC20 : Provocative concentration

PDGF : Platelet derived growth factor

PE : Phycoérythrine

Penh : Enhanced pause

PET : Polyéthylène téréphtalate

PFA : Paraformaldéhyde

PGC1- $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1- $\alpha$

PGM : Phosphoglycerate mutase

PI : Propidium iodide

PIG3 : p53-inducible gene 3

PKA : Protéine kinase A

PKR : Protéine kinase R

PO : Human acidic ribosomal phosphoproteins

Pol : polymérase

Ppb : Part par billion

PrD : Prolin domain

PUMA : p53 up-regulated modulator of apoptosis

PVDF : Polyvinylidene fluoride

p53INP1 : p53-induced nuclear protein 1

RANTES : Regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted

Rb : Retinoblastoma protein

RD : Regulatory domain

RISC : RNA induced silencing complex

ROS : Espèces réactives dérivées de l'oxygène

RT : Reverse transcription

SCF : Stem cell factor

SCO2 : Synthesis cytochrome c oxydase 2

SDS : Sodium dodécyl sulphate

S : Sens

SEM : Écart standard à la moyenne

shRNA : Small hairpin RNA

siRNA : Small interfering RNA

SH3 : Src homology 3-like

SIN : Self inactivated

SMAC : Second mitochondria-derived activator of caspase

SNP : Single-nucleotide polymorphism

SVF : Sérum de veau foetal

TAD : Transactivation domain

TAF : TBP-associated factor

TBP : TATA box binding protein

TD : Tetramerization domain

TDM : Tomodensitométrie

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TEMED : N, N, N',N'-tétraméthylènediamine

TetO : Tet-opérateur

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor- $\beta$

TIGAR : *TP53*-induced glycolysis and apoptosis regulator

TIM : Triose phosphate isomérase

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase

TMB : Tetramethylbenzidine

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$

TNF-R : Tumor necrosis factor-receptor

TP : Tumor protein

TSLC-1 : Tumor suppressor in lung cancer-1

Treg : Regulatory T cell

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Tween : Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate

UH : Unités Hounsfield

UTR : Untranslated region

V': Débit expiratoire

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEMS : Volume expiratoire maximum en une seconde

VIP : Vasoactive intestinal peptide

V'NO : Débit de NO

VR : Volume résiduel

VSV-G : Virus de la stomatite vésiculeuse

WPRE : Woodchuck post-transcriptional regulatory element

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

YWHAZ : Tyrosine-3-mono-oxygenase/tryptophane 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide

## Liste des figures

Figure 1. Critères de sévérité de l'hyperréactivité bronchique. ....	37
Figure 2. Principales sous-populations lymphocytaires T et leurs cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'asthme. ....	40
Figure 3. Principales caractéristiques du remodelage musculaire lisse dans l'asthme.....	51
Figure 4. Relation entre la concentration de NO et le débit expiratoire.....	55
Figure 5. Modélisation en deux compartiments de l'origine de production du NO.....	55
Figure 6. Aspect de perfusion en mosaïque et de piégeage aérique sur des coupes scannographiques. ....	62
Figure 7. Mécanismes de la myosite mastocytaire dans l'asthme. ....	71
Figure 8. Structure de la chitine.....	75
Figure 9. Structure tridimensionnelle de la chitotriosidase mettant en évidence l'activité catalytique.....	78
Figure 10. Structure cristallographique d'YKL-40.....	81
Figure 11. Rôle de l'Acidic Mammalian Chitinase dans l'inflammation bronchique liée à l'asthme. ....	84
Figure 12. Structure du gène <i>TP53</i> .....	90
Figure 13. Structure des neufs isoformes de la protéine p53.....	90
Figure 14. Structure de la protéine p53. ....	92
Figure 15. Contrôle post-traductionnel de p53.....	96
Figure 16. Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire. ....	100
Figure 17. Voies de l'apoptose. ....	102
Figure 18. Les protéines de la famille Bcl-2. ....	104
Figure 19. Vue classique de la structure de la mitochondrie et de ses compartiments. ....	107



Figure 20. Complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale. ....	107
Figure 21. Organisation de l'ADN mitochondrial.....	108
Figure 22. Voies d'activation de la biogenèse mitochondriale. ....	110
Figure 23. Principales voies métaboliques cellulaires.....	112
Figure 24. Appareils de mesure du NO exhalé.....	119
Figure 25. Relation linéaire entre débit expiratoire et débit de NO. ....	121
Figure 26. 1 <sup>er</sup> modèle murin de sensibilisation à l'ovalbumine.....	124
Figure 27. 2 <sup>nd</sup> modèle murin de sensibilisation à l'ovalbumine.....	124
Figure 28. Phénotypage des cellules cultivées par immunocytochimie .....	133
Figure 29. Phénotypage des cellules cultivées par cytométrie en flux.....	134
Figure 30. Mécanismes d'interférence ARN par transfection de siRNA ou production lenticvirale de shRNA .....	138
Figure 31. Constructions plasmidiques des trois vecteurs utilisés pour la production des particules lenticvirales.....	140
Figure 32. Production de particules lenticvirales dans les cellules 293T.....	143
Figure 33. La prolifération des CML bronchiques induite par YKL-40 est médiée, en partie, par le PAR2. ....	177
Figure 34. Excès de prolifération et défaut d'apoptose des CML d'asthmatiques.....	182
Figure 35. Surexpression de la protéine p53, d'origine post-transcriptionnelle, dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique.....	184
Figure 36. La protéine p53 est majoritairement nucléaire dans les CML bronchiques humaines.....	186
Figure 37. Capacité de liaison à l'ADN de la protéine p53 dans les CML bronchiques humaines.....	188

Figure 38. Efficacité de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines. ....	190
Figure 39. Effet sur la prolifération cellulaire de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines.....	192
Figure 40. Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de p21, mtTFA, NRF1 et PGC1- $\alpha$ . ....	193
Figure 41. Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de Bax et Bcl-2.....	195
Figure 42. Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de Mdm2. ....	197
Figure 43. Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-mtTFA dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de p53, la prolifération cellulaire et l'expression de p21. ....	198
Figure 44. Rôle de p53 dans l'hyperplasie musculaire lisse chez l'asthmatique. ....	200

## Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux stimuli utilisés pour déclencher une hyperréactivité bronchique non spécifique.....	35
Tableau 2. Principales chimiokines et leurs récepteurs.....	42
Tableau 3. Médiateurs sécrétés par les cellules musculaires lisses bronchiques intervenant dans les processus inflammatoires.....	67
Tableau 4. Les chitinases de la famille GH18 chez l’homme et la souris.....	77
Tableau 5. Principaux gènes cibles de la protéine p53.....	93
Tableau 6. Récapitulatif des anticorps utilisés en Western blot.....	148
Tableau 7. Caractéristiques des amorces utilisées en RT-PCR quantitative. ....	153
Tableau 8. Caractéristiques cliniques et fonctionnelles respiratoires des patients.....	180

## Liste des publications et communications

### I. Articles originaux soumis à un comité de lecture

1. Airway remodelling in a mouse asthma model assessed by in-vivo respiratory-gated micro-computed tomography. Lederlin M, Ozier A, Montaudon M, Begueret H, Ousova O, Marthan R, Berger P, Laurent F. Eur Radiol 2010; 20 (1): 128-37.
2. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant. Girodet PO, Ozier A, Trian T, Begueret H, Ousova O, Vernejoux JM, Chanez P, Marthan R, Berger P, Tunon de Lara JM. Allergy 2010; 65(8): 1004-12.
3. Control maintenance can be predicted by exhaled NO monitoring in asthmatic patients. Ozier A, Girodet PO, Bara I, Tunon de Lara J, Marthan R, Berger P. Sous presse à Respir Medicine 2011.
4. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Cattiaux J, Begueret H, Kolbeck R, Coyle A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. En révision à l'Am J Respir Crit Care Med 2011.
5. *In vivo* micro-CT in various mouse asthma models: integrated assessment of airway remodelling. Lederlin M, Ozier A, Dournes G, Begueret H, Ousova O, Laurent F, Montaudon M, Berger P. Soumis à Radiology 2011.

## **II. Lettres et revues didactiques**

1. Multi-professional lung cancer disclosure to change anxiety and depression: an exploratory study. Cousson-Gélie F, Vernejoux JM, Bazex-Chanteloube H, Raheison C, Ozier A, Girodet PO, Taytard A. Thorax 2008; 63(7): 658.
2. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Eur Respir J 2010; 36: 1174-84.
3. Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention. Girodet PO, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Sous presse à Pharmacology & Therapeutics 2011.
4. Physiopathologie de l'asthme. Ozier A, Bara I, Girodet PO, Marthan R, Berger P. Sous presse à la Revue du Praticien 2011.

## **III. Communications et Posters à des réunions scientifiques**

### **A. Internationales**

1. Airway remodelling in a mouse asthma model assessed by in-vivo respiratory-gated micro computed tomography. Ozier A, Lederlin M, Montaudon M, Begueret H, Ousova O, Marthan R, Berger P, Laurent F. European Respiratory Society, 2009, Vienne. Eur Respir J 2009, 34: Suppl. 53, E2901.

2. Effect of the KCa3.1 K<sup>+</sup> channels blocker triarylmethane-34 in a murine model of chronic asthma. Girodet PO, Ozier A, Wulff H, Tunon de Lara M, Marthan R, Bradding P, Berger P. European Respiratory Society, 2009, Vienne. Eur Respir J 2009, 34: Suppl. 53, E4490.
3. *In vivo* micro-computed tomography in mouse asthma models: does it assess bronchial inflammation, remodelling, or both? Ozier A, Lederlin M, Dournes G, Ousova O, Begueret H, Montaudon M, Marthan R, Berger P, Laurent F. Eur Respir J 2010, 36: Suppl. 54, E5657.
4. Accuracy of exhaled nitric oxide to predict a loss of asthma control in well controlled patients. Ozier A, Girodet PO, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Eur Respir J 2010, 36: Suppl. 54, P4653.
5. Effect of chronic stimulation of protease activating receptor-2 in human bronchial smooth muscle cells. Bara I, Cattiaux J, Ozier A, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P. Eur Respir J 2010, 36: Suppl. 54, P1374.
6. The chitinase YKL-40 increases bronchial smooth muscle cell proliferation and size. Bara I, Ozier A, Cattiaux J, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P. Eur Respir J 2010, 36: Suppl. 54, P2363.

## **B. Nationales**

1. Étude des relations structure-fonction dans la bronche humaine. Ozier A, Berger P, Laurent F, Tunon de Lara JM, Taytard A. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2006, 46: 344. 1<sup>er</sup> Congrès Français d'Allergologie, 2006, Paris.
2. Expression et fonction de la protéine p53 dans la cellule musculaire lisse bronchique humaine. Ozier A, Berger P. Lungstorming, 2008, Lille.
3. Exploration des petites voies aériennes. Ozier A, Tunon de Lara JM. 3<sup>ème</sup> Congrès Français d'Allergologie, 2008, Paris.
4. Effect of liquid nitrogen cryopreservation on phenotype, proliferation and apoptosis of human asthmatic bronchial smooth muscle cells. Ozier A, Bara I, Girodet PO, Cattiaux J, Marthan R, Berger P. 5<sup>ème</sup> Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, 2010, Bordeaux.
5. Accuracy of exhaled nitric oxide to predict a loss of asthma control in well controlled patients. Ozier A, Girodet PO, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. 5<sup>ème</sup> Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, 2010, Bordeaux.
6. Role of Protease Activated Receptor-2 (PAR-2) in the pathophysiology of human bronchial smooth muscle cells. Bara I, Cattiaux J, Ozier A, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P. 5<sup>ème</sup> Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, 2010, Bordeaux.

7. Role of YKL-40 on human bronchial smooth muscle cells. Bara I, Ozier A, Cattiaux J, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P. 5<sup>ème</sup> Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, 2010, Bordeaux.
8. *In vivo* micro-computed tomography in mouse asthma models: does it assess bronchial inflammation, remodelling, or both? Ozier A, Lederlin M, Dournes G, Ousova O, Khamaev A, Begueret H, Montaudon M, Marthan R, Laurent F, Berger P. Journées de la Recherche Respiratoire, 2010, Nantes.
9. Effect of chronic stimulation of protease activating receptor-2 in human bronchial smooth muscle cells. Bara I, Ozier A, Cattiau J, Girodet PO, Marthan R, Tunon de Lara JM, Berger P. Journées de la Recherche Respiratoire, 2010, Nantes.

### **C. Locales**

1. Étude des relations structure-fonction dans la bronche humaine. Ozier A, Berger P, Laurent F, Tunon de Lara JM, Taytard A. Société de Pneumologie du Sud Ouest, 2005, Lacanau.
2. Rôle du récepteur activé par les protéases de type 2 dans la physiopathologie de la cellule musculaire lisse bronchique humaine. Bara I, Cattiaux J, Ozier A, Marthan R, Berger P. 9<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 2009, Arcachon.



3. Decreased susceptibility of human asthmatic smooth muscle cells to apoptosis. Ozier A, Bara I, Girodet PO, Cattiaux J, Marthan R, Berger P. 10<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 2010, Arcachon.
  
4. Imagerie de l'inflammation et du remodelage bronchique dans un modèle de souris asthmatique. Lederlin M, Ozier A, Dournes G, Begueret H, Ousova O, Laurent F, Berger P, Montaudon M, Laurent F. 10<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 2010, Arcachon.

# Introduction

L'asthme est une affection chronique des voies aériennes, d'expression hétérogène, dont l'incidence est en augmentation notamment en Europe (1). Sur le plan physiopathologique, elle se caractérise par une hyperréactivité (HRB), une inflammation et un remodelage bronchique. L'hyperréactivité bronchique se définit comme une réponse « excessive » ou « démesurée » des voies aériennes à une grande variété de stimuli, qu'ils soient physiques, chimiques ou pharmacologiques, par rapport à la réponse des sujets sains. L'inflammation bronchique correspond à une infiltration polymorphe de la paroi bronchique par différents types de cellules inflammatoires. Le remodelage bronchique se caractérise, quant à lui, par un ensemble de modifications anatomiques intéressant, à des degrés divers, toutes les structures de la paroi bronchique, et notamment le muscle lisse. Le remodelage musculaire lisse contribue à une évolution défavorable de l'asthme et à l'installation d'une obstruction bronchique fixée, peu réversible (2, 3), car il n'est pas sensible à la corticothérapie inhalée, pierre angulaire du traitement de fond de l'asthme (4). Parmi les différents types cellulaires impliqués dans la physiopathologie de l'asthme, les cellules musculaires lisses (CML) bronchiques jouent donc un rôle prépondérant. En effet, la CML est l'effecteur de la contraction et de la réactivité bronchique, mais participe également à l'inflammation et au remodelage des voies aériennes grâce à ses propriétés de synthèse de nombreux médiateurs et son aptitude à proliférer (5).

Face à l'hétérogénéité phénotypique de la maladie asthmatique, l'enjeu actuel est désormais de mieux caractériser les patients asthmatiques sur le plan clinique et physiopathologique, afin d'adapter la prise en charge thérapeutique. Une identification typologique de ces phénotypes démontre ainsi la sensibilité de l'asthme éosinophilique à la corticothérapie inhalée et, à l'inverse, le peu d'effet de celle-ci chez les asthmatiques sévères ayant une obstruction bronchique persistante (6, 7). Il est donc essentiel de préciser les mécanismes étiopathogéniques à l'origine du remodelage bronchique, et notamment du remodelage

musculaire lisse, afin de développer des thérapies ciblées. Des méthodes d'évaluation non invasive de l'inflammation et du remodelage bronchique, telles que les biomarqueurs inflammatoires et la tomographie de haute résolution, ont ainsi été développées pour améliorer cette caractérisation phénotypique de l'asthme.

C'est dans cette optique, que le travail exposé dans cette thèse s'est porté principalement sur les deux aspects physiopathologiques de l'asthme que sont l'inflammation et le remodelage bronchique. Ce travail repose sur une approche transversale et multidisciplinaire combinant, d'une part, une approche non invasive de l'inflammation bronchique chez le patient asthmatique et une imagerie *in vivo* de l'inflammation et du remodelage bronchique par micro-scanner dans des modèles murins d'asthme, et d'autre part, des études *in vitro* des mécanismes potentiels concourant à la genèse du remodelage musculaire lisse à partir de cultures primaires de CML bronchiques humaines d'asthmatiques.

Les travaux expérimentaux regroupés dans cette thèse ont été effectués dans cette perspective et sont présentés en trois chapitres. Le chapitre I résume l'état des connaissances actuelles concernant la physiopathologie de l'asthme et certaines des explorations permettant d'évaluer de façon non invasive l'inflammation et le remodelage bronchique. Il précise également le rôle central joué par la CML dans l'inflammation et le remodelage bronchique, et présente deux acteurs biologiques potentiellement impliqués dans la genèse du remodelage musculaire lisse, à savoir les chitinases et la protéine p53. Le chapitre II est une synthèse des matériels et méthodes utilisés. Les résultats des travaux expérimentaux sont présentés et discutés dans le chapitre III. Le premier d'entre eux étudie l'intérêt du NO exhalé pour prédire la persistance du contrôle chez des asthmatiques contrôlés sur le plan clinique et fonctionnel respiratoire. Les deux travaux expérimentaux suivants démontrent la faisabilité du micro-scanner pour imager les voies aériennes chez la souris sensibilisée et précisent son intérêt pour différencier l'inflammation du remodelage bronchique. Les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> travaux expérimentaux sont

consacrés aux mécanismes à l'origine du remodelage musculaire lisse *in vitro*, en déterminant l'implication de la chitinase YKL-40 et de la protéine p53.

# **Chapitre I :**

# **Généralités**

## **I-1. Physiopathologie de l'asthme**

L'asthme est une maladie multifactorielle, dont la physiopathologie est complexe et demeure encore controversée à l'heure actuelle. Classiquement, trois processus la caractérisent : l'hyperréactivité, l'inflammation et le remodelage bronchique, ceux-ci étant étroitement liés. La connaissance des mécanismes impliqués dans ces trois phénomènes est essentielle à la compréhension de la pathogénie de l'asthme et aux modalités de sa prise en charge thérapeutique.

### **A. Hyperréactivité bronchique**

#### 1. Définition

La réactivité bronchique physiologique traduit l'aptitude des voies aériennes de sujets sains à développer une obstruction bronchique limitée en réponse à une forte stimulation. L'hyperréactivité bronchique (HRB) se définit donc comme une réponse « excessive » ou « démesurée » des voies aériennes à une grande variété de stimuli, qu'ils soient physiques, chimiques ou pharmacologiques, par rapport à la réponse des sujets sains.

Il est habituel de faire le distinguo entre, d'une part, l'HRB non spécifique, anomalie constamment retrouvée dans l'asthme et, d'autre part, l'HRB spécifique d'un allergène, présente uniquement chez les asthmatiques allergiques.

#### 2. HRB non spécifique

Les stimuli susceptibles d'induire une HRB non spécifique peuvent être directs ou indirects (Tableau 1). Les stimuli directs agissent sans intermédiaire sur l'effecteur principal de la réponse bronchique, *i.e.* le muscle lisse, par la stimulation d'un récepteur membranaire de la

**Tableau 1.** Principaux stimuli utilisés pour déclencher une hyperréactivité bronchique non spécifique.

<b>Stimulus</b>		<b>Mécanisme d'action</b>
<b>Pharmacologiques</b>	Métacholine	Direct
	Histamine	Direct
<b>Physiques</b>	Exercice abrupte	Indirect
	Air froid	Indirect
	Hyperventilation	Indirect
	Solution hypo-osmolaire	Indirect
<b>Chimiques</b>	Adénosine monophosphate	Indirect
	Mannitol	Indirect

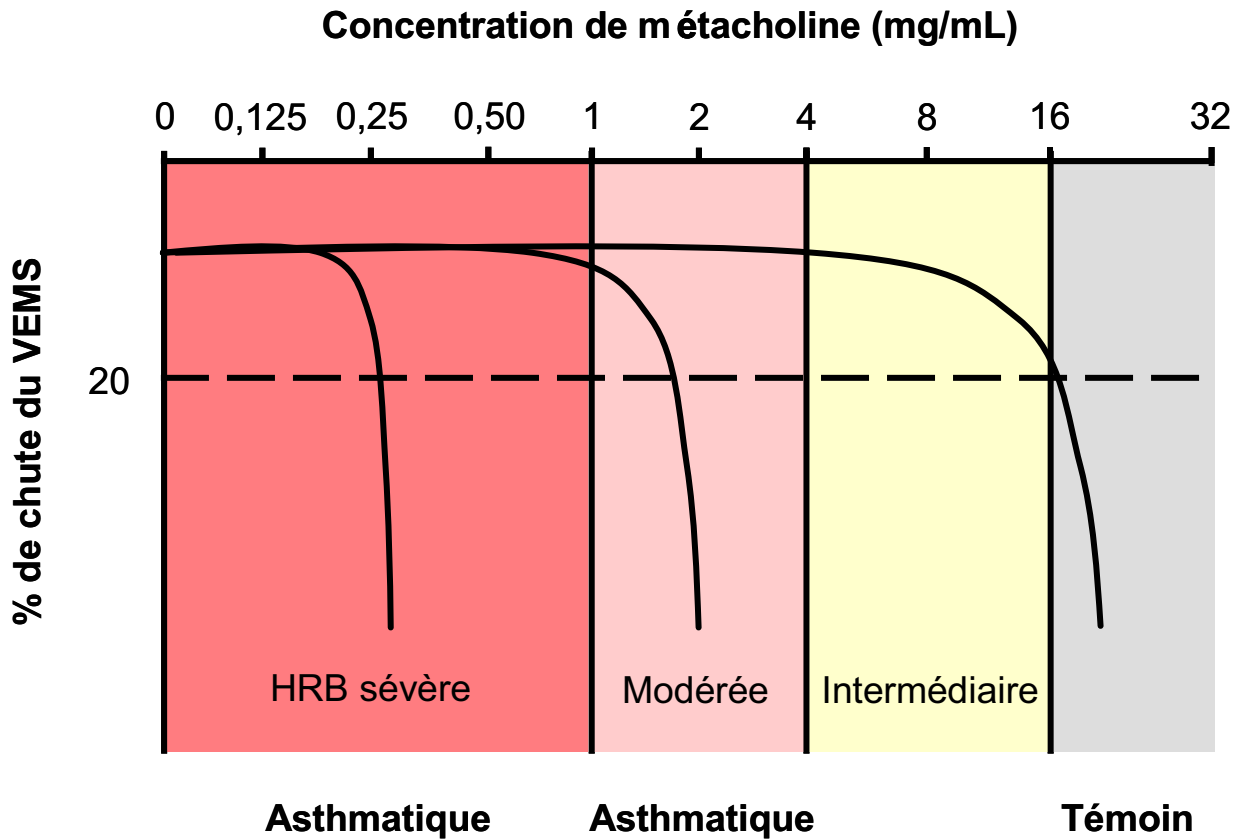


CML. Ainsi, la métacholine et l'histamine activent respectivement les récepteurs de type M3 et H1. Les stimuli indirects impliquent, quant à eux, une ou plusieurs voies intermédiaires, aboutissant, généralement, à la libération de médiateurs bronchoconstricteurs par les cellules inflammatoires, telles que le mastocyte (8). Ainsi, l'exercice physique ou l'hyperventilation isocapnique induisent une hyperosmolarité de la paroi bronchique due à la perte d'eau et/ou de chaleur des voies aériennes. Cette hyperosmolarité engendre, chez l'hyperréactif, une dégranulation mastocytaire et une contraction du muscle lisse bronchique, ainsi qu'une réaction inflammatoire œdémateuse (8).

Quelque soit le mécanisme impliqué, la réponse bronchique peut être mesurée et quantifiée *in vivo*, généralement par un index d'exploration fonctionnelle respiratoire. Selon les recommandations internationales, le principal indice d'obstruction bronchique est le VEMS (Volume expiratoire maximum en une seconde) (9). En pratique clinique, les tests de provocation pharmacologiques utilisent le plus souvent la métacholine (9). L'inhalation de concentrations croissantes d'agonistes permet ainsi de construire une courbe concentration-réponse (Figure 1). Un point caractéristique de cette courbe est la concentration d'agoniste nécessaire pour engendrer une chute de 20% du VEMS, ou PC20 (Provocative concentration). Pour la métacholine ou l'histamine, elle est supérieure ou égale à 16 mg/mL chez le sujet normal. Elle est, par contre, inférieure à 4 mg/mL dans les HRB modérées et inférieure à 1 mg/mL dans les HRB sévères (9) (Figure 1).

Sa valeur prédictive négative est de 100%. En revanche, si tous les asthmatiques ont une HRB non spécifique, elle se retrouve également chez certains patients atteints de rhinite ou de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (10). La mesure répétée de l'HRB a été proposée comme outil de suivi des patients asthmatiques, car elle serait corrélée à la sévérité de l'asthme et à son contrôle. Toutefois, les données actuelles, basées sur des études longitudinales, ne recommandent pas son utilisation dans cette application (11).

**Figure 1.** Critères de sévérité de l'hyperréactivité bronchique.



**Légendes :** Chute du VEMS lors d'un test de provocation à la métagoline.

**Abréviations :** HRB : Hyperréactivité bronchique ; VEMS : Volume expiratoire maximum en une seconde.

### 3. HRB spécifique

L'HRB spécifique est induite par l'inhalation de l'allergène contre lequel le patient est spécifiquement sensibilisé. Sa mesure n'est toutefois réservée qu'aux essais cliniques ou à la recherche de maladies professionnelles, car la stimulation spécifique par un allergène peut potentialiser l'HRB non spécifique, et donc majorer la sévérité de la maladie (12). Cette réponse spécifique comporte deux phases : une phase précoce et une phase retardée.

#### *Phase précoce*

Elle survient dans les minutes suivant la stimulation et résulte de la dégranulation IgE-dépendante des mastocytes. Ceux-ci libèrent des médiateurs bronchoconstricteurs tels que l'histamine, les prostaglandines ou les leucotriènes. L'amplitude de cette phase précoce est corrélée à la masse musculaire lisse bronchique (13), et, par conséquent, à l'intensité du remodelage bronchique.

#### *Phase tardive*

Elle survient 3 à 8h après la stimulation allergénique, chez environ 50% des asthmatiques (14), et peut perdurer au moins 7 jours (14-16). Elle semble plus liée aux processus inflammatoires qu'au remodelage bronchique. En effet, une corrélation positive a été retrouvée entre l'intensité de cette réponse obstructive bronchique tardive et le nombre de cellules inflammatoires, éosinophiles et mastocytes, dans les expectorations induites (17) ou la concentration d'éosinophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients asthmatiques (18). L'implication de l'inflammation dans la phase tardive de l'HRB spécifique est également confortée par des arguments d'ordre pharmacologique. En effet, différents traitements à visée anti-inflammatoire diminuent cette phase retardée. C'est le cas des corticoïdes (19), des bloqueurs de CD11a (20), ou d'anticorps anti-IL-4 bloquants (21), ces

deux dernières molécules étant impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires. En revanche, l'utilisation d'anticorps monoclonal bloquant l'IL-5 ne modifie pas l'amplitude de cette phase retardée (22).

## **B. Inflammation bronchique**

L'inflammation bronchique dans l'asthme se caractérise par une infiltration polymorphe de l'ensemble de la paroi bronchique par différentes cellules inflammatoires. Cette réaction inflammatoire implique une étape d'initiation, sous la dépendance des cellules dendritiques (23), qui ne sera pas détaillée dans cette thèse, et une étape effectrice impliquant la libération de multiples médiateurs par diverses cellules inflammatoires, en particulier les lymphocytes T, les mastocytes et les polynucléaires éosinophiles. Une infiltration neutrophile, à l'instar de celle observée dans la BPCO, semble également jouer un rôle important dans l'asthme sévère.

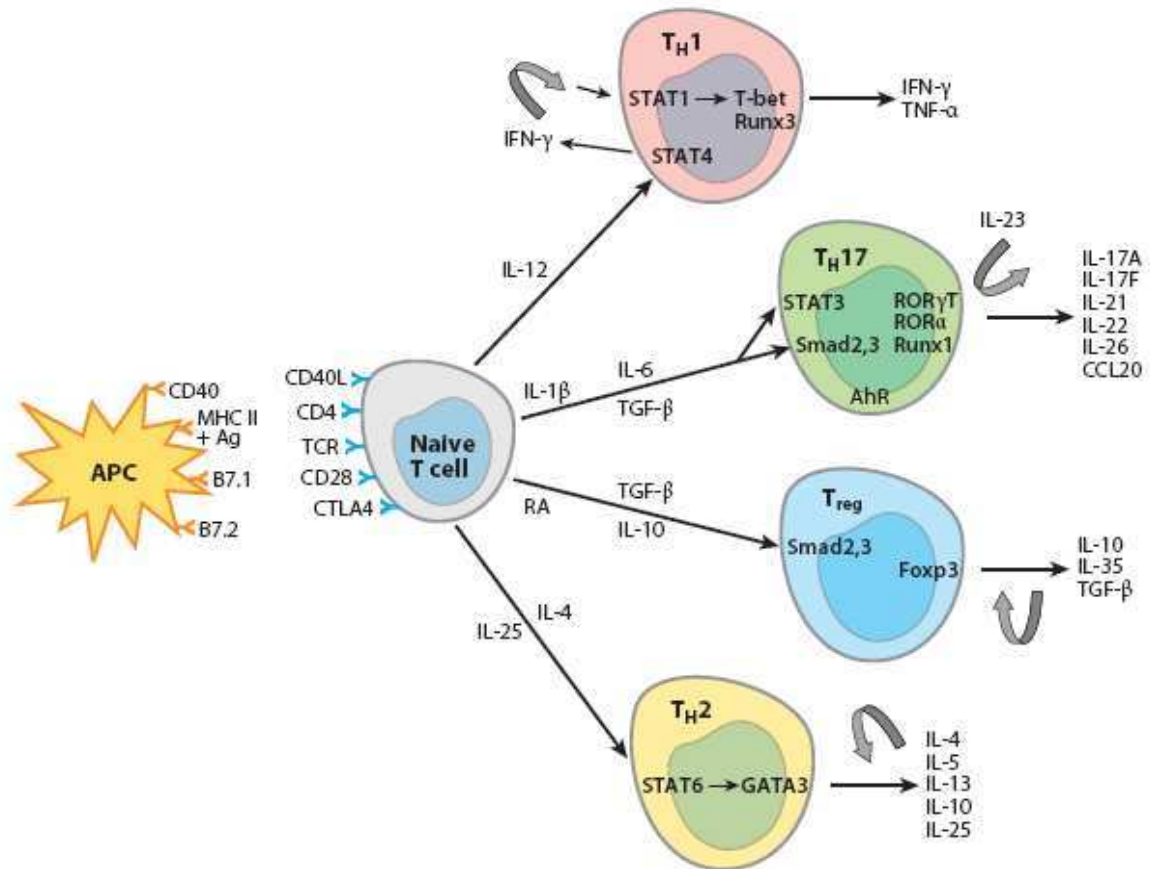
### 1. Lymphocytes T

Un important infiltrat de lymphocytes T est ainsi retrouvé dans la muqueuse bronchique des asthmatiques (24), mais également dans le muscle lisse (24, 25).

Les travaux menés suite à la découverte en 1986 des lymphocytes Th1 et Th2 chez la souris (26), puis chez l'homme (27), ont conduit à promouvoir, de prime abord, le paradigme Th2 dans l'immunopathologie de l'asthme. En effet, initialement identifiés parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes Th2 produisent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Figure 2). Ce profil particulier de sécrétion cytokinique a fait des lymphocytes Th2, majoritaires dans l'asthme, les cellules prévalentes dans l'organisation de la réponse allergique, puisque l'IL-4 et l'IL-13 sont responsables de la commutation isotypique des plasmocytes vers la synthèse d'IgE, tandis que l'IL-5 orchestre l'inflammation éosinophi-

**Figure 2.** Principales sous-populations lymphocytaires T et leurs cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'asthme.

(D'après Alcorn J.F. et al. ; *Annu Rev Physiol* 2010 (28))



**Abréviations :** APC : Antigen-presenting cell ; Treg : Regulatory T cell.

lique. Le recrutement des lymphocytes Th2 dans la paroi bronchique implique principalement les récepteurs CCR3 et CCR4 (29). La production des chimiokines CCL22 et CCL17, deux ligands de CCR4, est en effet augmentée chez l'asthmatique (Tableau 2).

La modulation de la balance Th1/Th2 en faveur d'une réponse inflammatoire de type Th2 est également étayée par le fait que les lymphocytes Th1, cellules notamment productrices d'IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), sont connus pour inhiber la prolifération des lymphocytes Th2 (26) (Figure 2). Par ailleurs, la réponse Th1 spécifique des infections virales ou bactériennes semble avoir un rôle protecteur dans l'asthme. En effet, les sujets sensibles aux infections bactériennes de type *Mycobacterium tuberculosis*, ayant une augmentation de la production de lymphocytes Th1, développent moins d'asthme (30). De façon similaire, l'incidence de l'asthme est plus faible chez les patients atteints de sclérose en plaque ou d'autres maladies auto-immunes caractérisées par une surexpression des lymphocytes Th1 et de leurs cytokines (31, 32). Cependant, certains travaux tendent également à démontrer l'existence d'une activation Th1 dans l'asthme (33). En effet, une population de lymphocytes T productrice d'IFN- $\gamma$  a été mise en évidence dans le sang périphérique chez l'asthmatique, atopique ou non, et est liée à l'HRB et à la sévérité de l'asthme (34). Dans les expectorations induites, le nombre de ces lymphocytes T producteurs d'IFN- $\gamma$  est, par ailleurs, d'autant plus important que les asthmatiques sont symptomatiques (35).

Toutefois, il serait réducteur de restreindre le rôle des lymphocytes T dans l'asthme au classique paradigme Th1/Th2. En effet, une autre sous-population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes T régulateurs (Treg), a également été impliquée plus récemment dans l'asthme et semblerait être garante d'un état non inflammatoire (36). Parmi ceux-ci, le rôle présumé des lymphocytes NK-T (Natural killer T cells) demeure controversé dans l'étiopathogénie de la maladie asthmatique (37, 38). En revanche, d'autres Treg caractérisés par l'expression à leur surface du CD4, du CD25 et du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3), sont capa-

**Tableau 2.** Principales chimiokines et leurs récepteurs.

Ligands		XCR1	Récepteurs CCR										Récepteurs CXCR					CX <sub>3</sub> CR1
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	
<b>Famille C</b>																		
XCL1	Lptn	X																
XCL2	SCM-1β	X																
<b>Famille CC</b>																		
CCL1	I-309									X								
CCL2	MCP-1			X														
CCL3	MIP-1α		X				X											
CCL4	MIP-1β						X											
CCL5	RANTES		X		X		X											
CCL7	MCP-3		X	X	X													
CCL8	MCP-2				X													
CCL11	Eotaxine				X													
CCL13	MCP-4			X	X													
CCL14	HCC-1		X															
CCL15	MIP-1δ		X		X													
CCL16	HCC-4		X															
CCL17	TARC					X				X								
CCL19	MIP-3β								X									
CCL20	MIP-3α							X										
CCL21	6Ckine								X									
CCL22	MDC					X												
CCL23	MPIF		X															
CCL24	Eotaxine-2				X													
CCL25	TECK									X								
CCL26	Eotaxine-3				X													
CCL27	CTACK										X							
<b>Famille CXC</b>																		
CXCL1	GROα											X	X					
CXCL2	GROβ											X	X					
CXCL3	GROγ											X	X					
CXCL5	ENA-78											X	X					
CXCL6	GCP-2											X	X					
CXCL7	NAP-2												X					
CXCL8	IL-8											X	X					
CXCL9	MIG													X				
CXCL10	IP-10													X				
CXCL11	I-TAC													X				
CXCL12	SDF-1α/β														X			
CXCL13	BCA-1															X		
<b>Famille CX<sub>3</sub>C</b>																		
CX <sub>3</sub> CL1	Fractalkine																X	

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

bles de diminuer la réponse inflammatoire Th2, et, par conséquent, l'activation des éosinophiles et la production d'IgE (39). Un déficit de ces Treg a ainsi été retrouvé dans le sang périphérique et les LBA de patients asthmatiques (40, 41). Le traitement par glucocorticoïdes augmente leur expression, par un mécanisme FoxP3 dépendant (42). Les mécanismes à l'origine de cet effet protecteur des Treg sont encore mal connus, mais pourraient être liés à leur stimulation par le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) et l'IL-10 (43) (Figure 2).

Plus récemment, l'implication d'une autre sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les Th17, a été mise en évidence et pourrait participer à l'inflammation neutrophilique observée dans l'asthme sévère (28) (Figure 2). En effet, la présence de cette sous-population lymphocytaire dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques est corrélée avec le degré de sévérité de la maladie (44).

Ainsi, la conception dichotomique où deux populations lymphocytaires antagonistes, les Th1 et Th2, se disputaient l'orientation de la réponse immune dans l'asthme, a fait place à une orchestration plus complexe de la réaction inflammatoire faisant également intervenir les lymphocytes Treg et Th17 (Figure 2).

## 2. Mastocytes

Les mastocytes infiltrent l'ensemble de la paroi bronchique dans l'asthme, notamment l'épithélium, le chorion muqueux et les glandes muqueuses. Ils infiltrent, en outre, de façon spécifique, la couche musculaire lisse chez l'asthmatique (45).

Les mastocytes sont originaires de la moelle osseuse, à partir d'un précurseur CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> et CD90<sup>+</sup>. Leur forme sanguine circulante est immature. Le recrutement des précurseurs mastocytaires dans la muqueuse bronchique se fait grâce à plusieurs chimiokines, telles que CCL5 (RANTES, Regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted), CXCL8



(IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL1 (GRO- $\alpha$ , Growth regulated oncogene- $\alpha$ ) et CX<sub>3</sub>CL1 (Fractalkine), qui se fixent respectivement sur les récepteurs aux chimiokines CCR3, CXCR1, CXCR3, CXCR2 et CX<sub>3</sub>CR1 (Tableau 2) (46 , 47 , 48). Le recrutement de ces précurseurs implique également des facteurs tels que le SCF (Stem cell factor) ou le TGF- $\beta$ . Ce dernier semble cependant être le facteur chimiotactique dont la sensibilité est la plus grande (49).

Une fois présents dans les tissus, les progéniteurs mastocytaires n'expriment plus le CD34, mais le récepteur aux IgE (Fc $\epsilon$ RI) et toujours le récepteur au SCF (CD117). Les IgE, par leur fragment Fc, peuvent se fixer avec une très haute affinité sur le Fc $\epsilon$ RI, entraînant alors la sensibilisation du mastocyte. Lorsqu'un mastocyte préalablement sensibilisé est mis en présence de l'allergène, la fixation des IgE spécifiques sur l'allergène entraîne une dimérisation du récepteur Fc $\epsilon$ RI, et son activation *via* une cascade de réactions intracellulaires, aboutissant *in fine* à la dégranulation mastocytaire. L'activation mastocytaire peut également être indépendante des IgE, comme être induite par des facteurs de croissance comme le SCF ou des cytokines.

La dégranulation des mastocytes entraîne la libération de nombreux médiateurs inflammatoires qui contractent le muscle lisse, majorent l'HRB, augmentent la masse musculaire lisse, mais stimulent également la production de mucus par les cellules épithéliales (50 , 51). Il est habituel de différencier les mastocytes en deux catégories, selon leur produit de dégranulation. Ainsi, les mastocytes de type T (MC<sub>T</sub>) ne contiennent qu'une seule protéase, la tryptase, tandis que les mastocytes de type TC (MC<sub>TC</sub>) sécrètent surtout de la tryptase, mais aussi de la chymase, de la carboxypeptidase et de la cathepsine G (52). Les mastocytes MC<sub>TC</sub> sont majoritaires dans l'épithélium et le chorion muqueux des asthmatiques sévères, alors que le type MC<sub>T</sub> est prépondérant dans la muqueuse bronchique des asthmatiques modérés (53).

La tryptase, sérine protéase de 135 kDa, représente donc le médiateur majoritaire synthétisé et sécrété par les mastocytes (54). Les substrats de la tryptase sont peu nombreux et sont représentés par des peptides, tels que le VIP (Vasoactive intestinal peptide), le CGRP (Calcitonin gene related peptide) ou la vasopressine. Des concentrations élevées de tryptase ont ainsi été mesurées dans le LBA de patients asthmatiques (55). Cette sérine protéase participe non seulement au contrôle du tonus et de la réactivité du muscle lisse des voies aériennes, mais également aux processus inflammatoires et de remodelage bronchique. En effet, elle potentialise la contraction induite par l'histamine sur des bronches canines (56) ou humaines (57), et peut induire un signal calcique transitoire (58). Elle peut également agir de manière indirecte sur le muscle lisse *via* le système non adrénérgique non cholinérgique (NANC), d'une part, en clivant et inactivant le VIP, neurotransmetteur bronchodilatateur, et, d'autre part, en n'inactivant pas les tachykinines, substances impliquées dans la bronchoconstriction (59). *In vivo*, l'inhalation de tryptase humaine provoque une bronchoconstriction et une HRB chez le mouton allergique (60). De plus, le traitement par des inhibiteurs de la tryptase avant une stimulation allergénique diminue la réponse précoce et retardée de l'HRB spécifique, l'HRB non spécifique et l'inflammation éosinophilique (61). La tryptase a également un rôle pro-inflammatoire par le recrutement de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (62). Par ailleurs, elle contribue aussi au remodelage bronchique en stimulant la prolifération des cellules épithéliales (63), des cellules endothéliales (64), des CML bronchiques humaines (65) et des fibroblastes (66). En outre, elle induit le chimiotactisme des fibroblastes et augmente la synthèse et la sécrétion de collagène de type I (67).

### 3. Polynucléaires éosinophiles

La très grande majorité des asthmatiques présente une infiltration bronchique à polynucléaires éosinophiles (68). Cependant, contrairement aux mastocytes et aux lymphocytes T, les éosinophiles n'infiltrant pas la couche musculaire lisse. En effet, la tryptase mastocytaire empêche leur recrutement par la CML, en clivant de manière sélective les chimiokines CCL11 (Eotaxine) et CCL5 (RANTES) (69) (Tableau 2).

Les polynucléaires éosinophiles sont originaires de la moelle osseuse hématopoïétique, dérivés de précurseurs CD34<sup>+</sup>. Leur maturation se déroule également dans la moelle osseuse, notamment sous l'effet de l'IL-5 (70, 71). L'essentiel de leur recrutement dans la muqueuse bronchique est dû à la production d'IL-5 par les lymphocytes Th2 et les mastocytes. L'IL-5 joue également un rôle essentiel dans la maturation, la différenciation et la survie des éosinophiles.

Les polynucléaires éosinophiles libèrent de nombreuses cytokines, comme l'IL-4 et l'IL-13, qui contribuent à la pérennisation de la réponse inflammatoire Th2 (72). Ils sécrètent également des médiateurs impliqués dans la contraction musculaire lisse, comme les prostaglandines ou les leucotriènes, mais également dans l'HRB, comme la MBP (Major basic protein). Ils produisent en outre du TGF- $\beta$  et de l'ECP (Eosinophil cationic protein), celle-ci contribuant à l'abrasion de l'épithélium bronchique (73), et, par conséquent au remodelage bronchique.

### 4. Polynucléaires neutrophiles

L'infiltration de la paroi bronchique par des polynucléaires neutrophiles semble être une caractéristique de l'asthme sévère (74, 75). L'implication des lymphocytes Th17 dans la régulation de cette inflammation neutrophilique dans l'asthme sévère a récemment été évoquée (28).

Les polynucléaires neutrophiles proviennent eux aussi de la moelle osseuse, où se fait leur maturation. Leur recrutement dans la paroi bronchique, à partir de leur forme sanguine déjà mature, nécessite la production locale de CXCL8 (IL-8) (76), qui se fixe sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 exprimés à la surface des neutrophiles (Tableau 2) (77).

Les polynucléaires neutrophiles sécrètent des protéases comme les métalloprotéinases 9 (MMP9) et l'élastase, qui vont dégrader la matrice extracellulaire (78). Ils libèrent également des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et des cytokines, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) et le TGF- $\beta$ , susceptibles d'agir sur la CML bronchique (79 , 80).

### **C. Remodelage bronchique**

Longtemps considéré comme un processus anormal de réparation de l'inflammation bronchique, le remodelage bronchique représente également un facteur de pérennisation de celle-ci. Il se caractérise par un ensemble de modifications anatomiques affectant, à des degrés divers, toutes les composantes de la paroi bronchique des voies aériennes proximales et distales, *i.e.* l'épithélium, la membrane basale, la matrice extra-cellulaire, les glandes séro-muqueuses, les vaisseaux et le muscle lisse bronchique (81). Ces altérations structurales, observées quelque soit le stade de sévérité de l'asthme, sont également susceptibles d'apparaître précocement dans l'histoire naturelle de la maladie, comme en témoignent les données histologiques issues de biopsies bronchiques chez des enfants asthmatiques (82, 83). Elles contribuent à l'installation d'une obstruction bronchique fixée, moins réversible, et correspondent donc à une évolution défavorable de la maladie (2, 3 ).

## 1. Epithélium bronchique

L'asthme se caractérise, classiquement, par une desquamation de l'épithélium bronchique et un renouvellement cellulaire plus important. L'importance de ces altérations épithéliales est corrélée à l'HRB (84).

Dans l'asthme sévère, en revanche, l'épithélium est hyperplasique, avec une augmentation du nombre de cellules caliciformes (85-87). Parmi les mécanismes à l'origine de cette hyperplasie, le rôle de la leptine, adipokine impliquée dans les processus inflammatoires et de réparation tissulaire, a été évoqué (88). En effet, une diminution de l'expression de la leptine et de son récepteur, a été mise en évidence *in vitro* et *ex vivo* dans l'épithélium des asthmatiques sévères. Elle est, en outre, corrélée négativement à certains aspects du remodelage bronchique, tels que l'épaisseur de la membrane basale (88). D'autre part, l'implication de la lipoxine A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) a également été suggérée dans les altérations épithéliales chez l'asthmatique sévère. En effet, sa concentration est diminuée dans le surnageant issu d'expectorations induites de patients asthmatiques sévères (89). La LXA<sub>4</sub> est un médiateur lipidique dérivé de l'acide arachidonique, aux propriétés anti-inflammatoires qui pourraient résulter de sa fixation sur son récepteur spécifique, le FPRL-1 (Formyl peptide receptor-like 1), dont l'expression dans l'épithélium de l'asthmatique sévère reste à préciser.

## 2. Membrane basale et matrice extra-cellulaire

Une fibrose sous-épithéliale intéressant la lamina reticularis est observée dans l'asthme, et est à l'origine d'un pseudo-épaississement de la membrane basale (81). Elle résulte de la combinaison de deux mécanismes. D'une part, le dépôt de protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène I, III, V, fibronectine, tenascine, protéoglycanes) par les fibroblastes, myofibroblastes et CML, est augmenté (90, 91). D'autre part, il existe un déséquilibre entre l'expression des métalloprotéinases qui dégradent ces protéines et celle de leurs inhibiteurs

endogènes, les TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinases) (92, 93).

### 3. Glandes séro-muqueuses

Une hypertrophie des glandes séro-muqueuses est retrouvée dans l'asthme et conduit à une hypersécrétion de mucus, qui majore l'obstruction bronchique et l'HRB (94). Les mécanismes responsables de cette hypertrophie sont imparfaitement connus à l'heure actuelle. Toutefois, l'implication de gènes responsables de la production de mucus comme MUC2 et MUC5AC (95) a été démontrée (96). Leur expression peut être induite par différentes cytokines Th2, comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9 ou l'IL-13 (94, 96-98). L'IL-1 $\beta$  (94), le TNF- $\alpha$  (99) ou l'IL-17A, via l'induction de l'IL-6 (100), semblent être également mises en jeu dans l'activation de ces gènes.

### 4. Angiogenèse

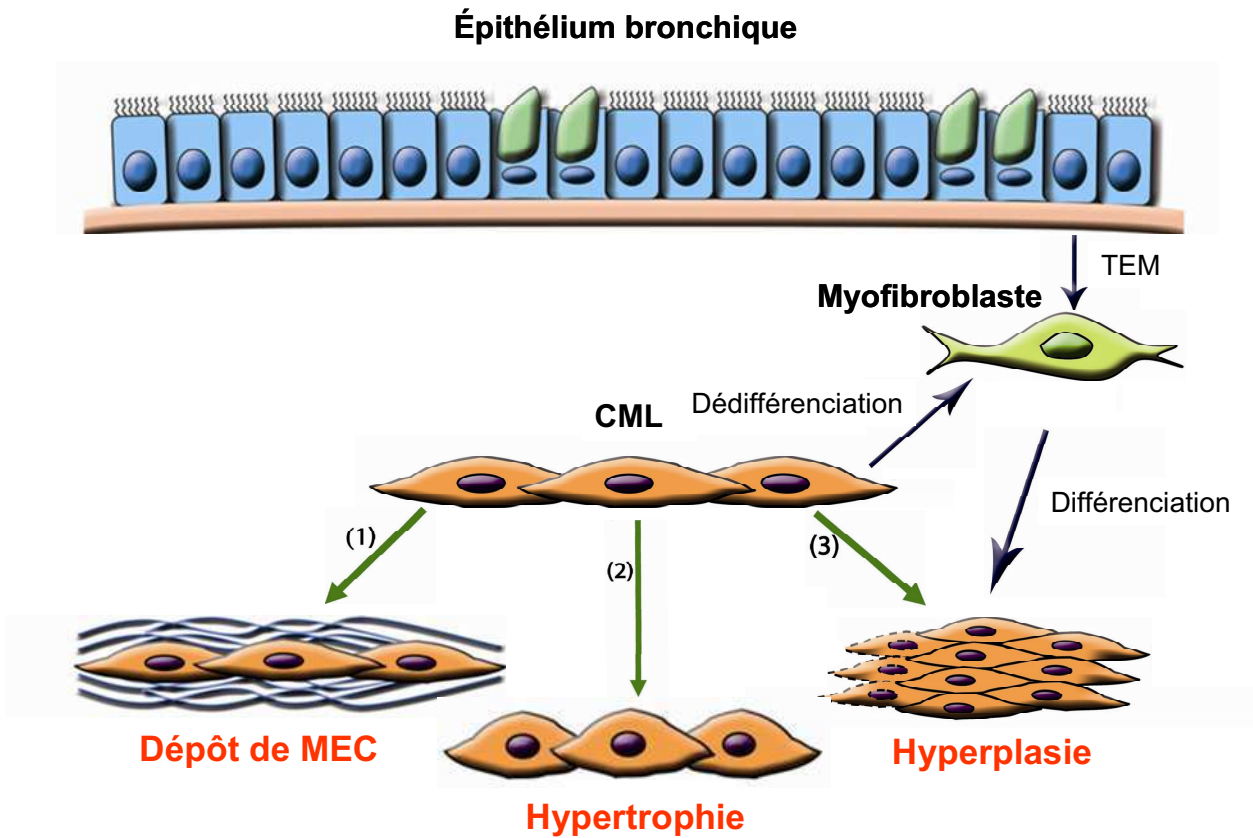
Le nombre des vaisseaux sanguins bronchiques est augmenté dans l'asthme, chez l'enfant et l'adulte, et est corrélé à la sévérité de la maladie (83, 101, 102). Bien que les mécanismes responsables de cette angiogenèse soient encore mal connus (103), plusieurs travaux suggèrent l'implication du VEGF (Vascular endothelial growth factor). En effet, l'expression de ce facteur de croissance de l'endothélium est augmentée dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques et est colocalisée avec les marqueurs des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes Th2, suggérant un possible rôle de l'inflammation dans l'angiogenèse (104, 105). En effet, dans un modèle de souris asthmatique, l'inhibition du VEGF conduit à une diminution de l'inflammation bronchique (106). A l'inverse, dans un modèle de souris transgénique surexprimant le VEGF au niveau épithélial, on observe une augmentation de l'angiogenèse et de l'inflammation bronchique (107).

## 5. Muscle lisse bronchique

L'augmentation de la masse du muscle lisse bronchique représente une composante essentielle du remodelage bronchique dans l'asthme (108). Elle est en effet corrélée à une dégradation non réversible de la fonction ventilatoire chez l'asthmatique (2, 3). Cette augmentation de la masse musculaire lisse résulte, non seulement, d'un dépôt accru de protéines de la matrice extra-cellulaire, mais aussi, d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des CML (Figure 3) (5). Les mécanismes à l'origine de ce remodelage musculaire lisse seront développés dans le chapitre I.3.B. de cette thèse.

**Figure 3.** Principales caractéristiques du remodelage musculaire lisse dans l’asthme.

(Adapté de Bara I. et al. ; Eur Respir J 2010 (5))



**Légendes :** L’augmentation de la masse musculaire lisse dans l’asthme résulte d’un dépôt accru de protéines de la matrice extra-cellulaire, d’une hypertrophie et d’une hyperplasie des cellules musculaires lisses.

**Abréviations :** CML : Cellule musculaire lisse ; MEC : Matrice extra-cellulaire ; TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse.



## **I-2. Explorations non invasives de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'asthme**

Auparavant, seule une étude anatomopathologique de prélèvements bronchiques obtenus à partir de biopsies per fibroscopiques (109), de pièces opératoires (110) ou autopsiques (111), permettait de préciser les caractéristiques de l'inflammation et du remodelage des voies aériennes, deux aspects fondamentaux de la physiopathologie de l'asthme. Approche invasive, les biopsies bronchiques ne sont toutefois pas contributives pour l'exploration des petites voies aériennes, dans la mesure où elles n'intéressent que les bronches segmentaires et sous-segmentaires. En outre, l'épaisseur des parois bronchiques, reflet indirect des processus inflammatoires et de remodelage, ne peut être appréciée sur des biopsies bronchiques, car celles-ci ne permettent pas de visualiser *ad integrum* toute la paroi bronchique.

En revanche, le développement de la mesure du NO (monoxyde d'azote) exhalé et les avancées techniques en terme d'imagerie médicale, avec en particulier l'avènement de la tomodensitométrie (TDM) thoracique de haute résolution, ont permis d'envisager une nouvelle approche *in vivo*, non invasive, de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'asthme.

### **A. NO exhalé**

#### 1. Origine biologique du NO

La réaction de biosynthèse du NO à partir de la L-arginine et de l'oxygène (O<sub>2</sub>) est sous la dépendance d'une famille d'enzymes (EC 1.14.13.39), les NO synthases (NOS) (112), dont il existe trois isoformes (NOS<sub>1</sub>, NOS<sub>2</sub>, NOS<sub>3</sub>), codées par des gènes distincts localisés

respectivement sur les chromosomes 17, 12 et 7 (113). Ces isoformes diffèrent par leurs localisations cellulaires, leurs fonctions et leurs caractéristiques biochimiques (113). Elles sont classiquement distinguées selon leur caractère constitutif ou inducible. Ainsi, les NOS constitutives, présentes à l'état physiologique, regroupent les NOS<sub>1</sub> (nNOS) et les NOS<sub>3</sub> (eNOS), ces isoformes ayant été initialement identifiées respectivement dans les cellules nerveuses et les cellules endothéliales (113). L'expression de la NOS<sub>2</sub> (iNOS), peut, quant à elle, être induite par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'INF- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  (114). Cette dernière isoforme est responsable d'une production de NO supérieure à celle fournie par les NOS constitutives (112). Cette distinction courante entre NOS constitutives et inducibles est toutefois sujette à controverses, dans la mesure où il existe vraisemblablement une expression constitutive de la NOS<sub>2</sub> dans le poumon (115, 116).

Les sources cellulaires et les mécanismes moléculaires à l'origine de la production du NO exhalé dans l'asthme sont imparfaitement connus à l'heure actuelle. Toutefois, plusieurs types cellulaires sont susceptibles d'être à l'origine de cette production de NO dans l'asthme, comme les CML vasculaires et bronchiques, les pneumocytes, les cellules endothéliales, épithéliales, nerveuses et les cellules inflammatoires (113, 116).

L'expression de la NOS<sub>2</sub>, isoforme majoritaire dans l'asthme, est ainsi augmentée dans les cellules épithéliales bronchiques d'asthmatiques (114, 117). Le mécanisme à l'origine de cette surexpression pourrait être une activation de la transcription de son gène, induite notamment par des cytokines pro-inflammatoires comme l'INF- $\gamma$  (117). Il est également vraisemblable que la NOS<sub>1</sub> et la NOS<sub>3</sub>, exprimées notamment dans les cellules épithéliales et les pneumocytes de type I, puissent contribuer à la production de NO par les voies aériennes (116).

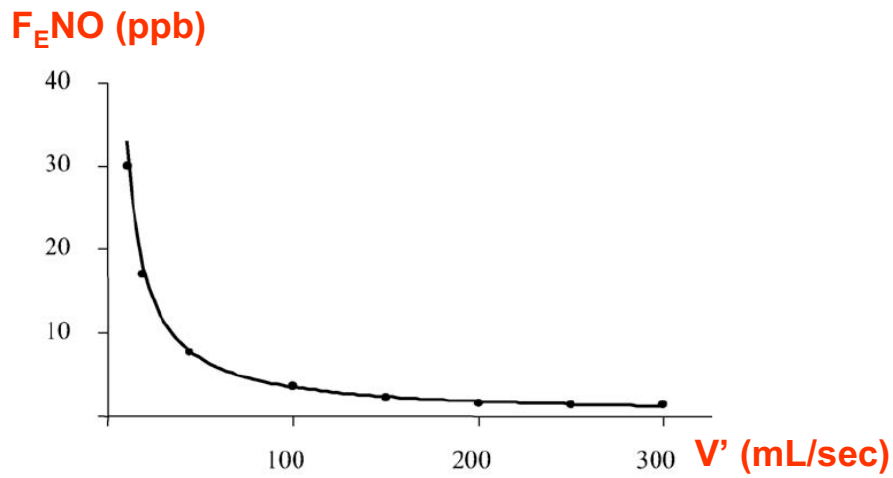
## 2. Origine anatomique du NO

La réalité d'une production de NO par les voies aériennes est une donnée empirique établie d'après des mesures perfibroscopiques (118) et la mise en évidence de NOS dans la paroi bronchique (116). Cependant, l'identification plus fine des différents sites de production du NO repose surtout sur le développement de modélisations mathématiques (119-122), validées expérimentalement chez le sujet sain, puis au cours de maladies alvéolaires et bronchiques.

Ainsi, le modèle bicompartimental, décrit initialement par Tsoukias et George (119, 120), est basé sur une donnée expérimentale, à savoir la dépendance inverse existant entre la concentration de NO et le débit ventilatoire (Figure 4). La production de NO est alors la résultante d'une double origine anatomique, alvéolaire et bronchique. De façon schématique, le NO produit par les voies aériennes est issu d'un 1<sup>er</sup> compartiment correspondant à l'espace alvéolaire et bronchiolaire distal, situé au-delà des bronches de 17<sup>ème</sup> génération, auquel s'additionne du NO fourni par le reste de l'arbre bronchique (Figure 5). Ce compartiment distal contient une certaine fraction de NO ( $F_{A\text{NO}}$ , ppb), conséquence d'une production épithéliale et/ou endothéliale et d'une diffusion vers le lit capillaire pulmonaire, à priori variable durant la ventilation, mais pouvant être considérée comme constante après quelques secondes d'apnée. Durant l'expiration, ce volume de gaz contenant du NO à une certaine fraction,  $F_{A\text{NO}}$ , va s'enrichir d'une certaine quantité de NO au cours de son passage dans les voies aériennes. Cet enrichissement progressif, qui a pour effet d'augmenter la fraction de NO dans la lumière bronchique jusqu'à la valeur finalement mesurée à la bouche ( $F_{E\text{NO}}$ , ppb), dépend donc du débit expiratoire ( $V'$ ) et du débit de NO maximal fourni par la bronche ( $J'_{aw\text{NO}}$ , nL/min) (Figure 5). Ainsi, à débit élevé, l'air du compartiment distal est rapidement expiré et la valeur de  $F_{E\text{NO}}$  se rapproche alors de celle de  $F_{A\text{NO}}$ . A l'inverse, un débit expiratoire lent permet un transfert plus important du NO produit par les voies aériennes vers la lumière bronchique, augmentant la concentration de NO mesurée à la bouche. Dans ces

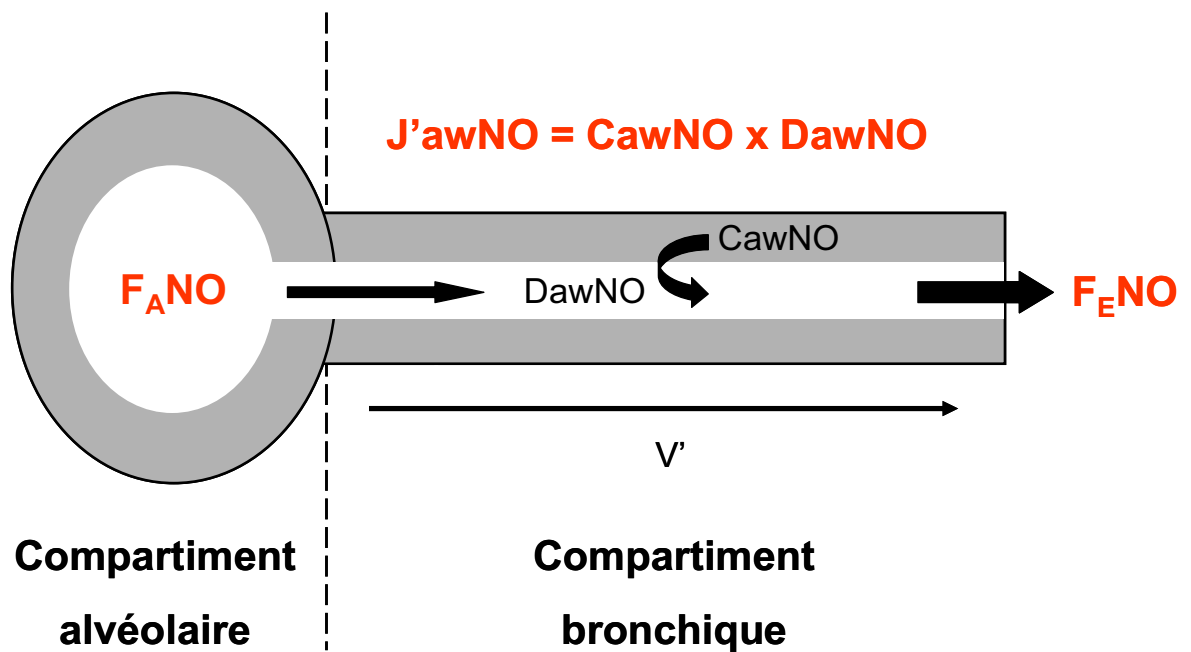
**Figure 4.** Relation entre la concentration de NO et le débit expiratoire.

(Adapté de Mahut B. et al. ; Rev Mal Respir 2006 ; (123))



**Figure 5.** Modélisation en deux compartiments de l'origine de production du NO.

(Adapté de George S.C. et al. ; J Appl Physiol 2004 (120))



**Légendes :**  $CawNO$  : Concentration en NO de la paroi bronchique ;  $DawNO$  : Diffusion du NO ;  $F_A NO$  : Fraction alvéolaire de NO ;  $F_E NO$  : Fraction exhalée de NO ;  $J'awNO$  : NO bronchique ; NO : monoxyde d'azote ;  $V'$  : Débit expiratoire.

conditions d'expiration lente, deux caractéristiques supplémentaires concernant les voies aériennes peuvent être précisées, *i.e.* la diffusion du NO (DawNO) et la concentration en NO de la paroi bronchique (CawNO) (Figure 5). Par conséquent, la façon dont se modifie la valeur de  $F_{E}NO$  à ces différents débits permet de préciser la participation respective de l'espace alvéolaire et du compartiment bronchique.

Toutefois, des travaux plus récents, ne remettant cependant en cause ni la validité de cette modélisation mathématique bicompartimentale, ni sa pertinence clinique, ont démontré l'existence d'une possible rétrodiffusion du NO bronchique, notamment en cas de production élevée, ce qui a pour effet d'augmenter artificiellement la concentration de NO alvéolaire (121, 122). De ce fait, plusieurs formules de correction du calcul du NO alvéolaire sont dorénavant utilisées (121, 122).

La sphère ORL produit également de grandes quantités de NO, environ cinq à dix fois supérieure à celles des voies aériennes. Par conséquent, pour mesurer le NO exhalé produit exclusivement par les voies aériennes, les recommandations internationales préconisent d'exclure de la mesure la 1<sup>ère</sup> partie du flux expiratoire et d'isoler la sphère ORL en faisant expirer le patient contre une pression positive, ce qui permet de relever le voile du palais (124).

### 3. Intérêt de la mesure du NO exhalé dans l'asthme

La possibilité d'une évaluation non invasive de l'inflammation bronchique est à l'origine de l'engouement qu'a suscité la mesure du NO exhalé dans l'asthme, le monoxyde d'azote étant en effet produit par les voies aériennes lors des processus inflammatoires. Ainsi, le NO exhalé est un biomarqueur de l'inflammation éosinophilique, de mesure simple, très reproductible, mais non spécifique (124). Il s'avère corrélé à des marqueurs inflammatoires, comme l'éosinophilie sanguine (125) et le nombre de polynucléaires éosinophiles dans les

expectorations induites (126, 127), le LBA (128) ou la muqueuse bronchique (129, 130). La valeur du NO exhalé diminue précocement sous corticothérapie inhalée (131, 132), de façon concomitante à une diminution de l'inflammation bronchique et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (133), bien que la corticothérapie soit, en revanche, sans effet sur l'expression de la NOS<sub>2</sub> (114). A l'inverse, sa valeur augmente chez l'asthmatique non traité et lorsque l'asthme n'est pas contrôlé, du fait des processus inflammatoires (134, 135). L'influence de la corticothérapie inhalée sur la valeur du NO exhalé permet donc, en l'occurrence, de vérifier l'observance du traitement de fond chez l'asthmatique (136). Il existe en effet une corrélation négative entre la valeur du NO exhalé chez l'asthmatique et la compliance thérapeutique (136, 137).

En se basant sur ces constatations, plusieurs algorithmes décisionnels ont été proposés pour évaluer l'intérêt de la mesure du NO exhalé dans l'adaptation du traitement de fond chez l'asthmatique (138-145) par rapport aux paramètres classiques d'évaluation clinique et fonctionnelle respiratoire préconisés par les recommandations internationales (146). Les critères de jugement de ces stratégies fondées sur la mesure du NO exhalé étaient la diminution du nombre d'exacerbation, l'épargne cortisonique et l'amélioration du contrôle de la maladie. Ainsi, une telle stratégie a permis de réduire significativement les doses de corticoïdes inhalés sans altérer le contrôle de la maladie asthmatique (142), bien que des résultats contradictoires aient, par la suite, été retrouvés (143-145).

Des valeurs élevées de NO exhalé ont également été considérées comme un facteur prédictif, avant même l'apparition d'une aggravation clinique ou fonctionnelle respiratoire, de la dégradation du contrôle de l'asthme (134, 147) ou de la survenue d'exacerbations (140, 148) après arrêt ou diminution de la corticothérapie inhalée, bien que sujettes à controverse (135, 149, 150). De façon similaire, des valeurs élevées de NO exhalé ont été considérées comme

un facteur prédictif de réponse à la corticothérapie inhalée ou orale (151-154), mais cette donnée est également controversée (134, 135).

Par conséquent, l'intérêt du NO exhalé dans la prise en charge de l'asthme demeure encore controversé à l'heure actuelle. C'est pourquoi, les recommandations internationales concernant les modalités de prise en charge thérapeutique de l'asthmatique n'intègrent pas ce biomarqueur dans l'algorithme décisionnel et se réfèrent encore uniquement à des paramètres d'évaluation clinique et fonctionnels respiratoires (146). La place du NO exhalé dans la prise en charge de la maladie asthmatique reste donc à définir. Il n'existe notamment pas de données dans la littérature précisant l'intérêt de la mesure du NO exhalé pour prédire la perte de contrôle de l'asthme, lorsque l'asthme est initialement contrôlé et que la charge thérapeutique n'a pas été diminuée.

## **B. Tomodensitométrie thoracique**

Le principe de l'examen tomodensitométrique repose sur la mesure de l'atténuation d'un faisceau de rayons X qui traverse un volume anatomique (155). L'émetteur de rayons X et les détecteurs tournent autour du volume à examiner, ce qui permet d'obtenir des profils d'atténuation à des angles différents. Après échantillonnage et numérisation de ces profils d'atténuation, les données sont rétro-projetées sur une matrice de reconstruction, puis transformées en images. La matrice de reconstruction est un tableau composé de n lignes et n colonnes, qui définissent un nombre de carrés ou pixels (155). À chaque pixel de cette matrice correspond donc une valeur d'atténuation ou de densité. En fonction de sa densité, chaque pixel est alors représenté sur l'image par une certaine valeur dans l'échelle des gris. La densité des différents tissus est exprimée en unités Hounsfield (UH), cette échelle variant de -1000 à +1000, avec le choix arbitraire d'une valeur de zéro pour l'eau, -1000 pour l'air et +1000 pour

l'os (155). Ce principe original a révolutionné la radiologie médicale en rendant possible pour la 1<sup>ère</sup> fois la réalisation de coupes du corps humain *in vivo*. Il a valu à ses concepteurs, A. MacLeod et G. Hounsfield, le prix Nobel de Médecine en 1979 (156).

Les processus inflammatoires et les remaniements structuraux des voies aériennes observés dans l'asthme concernent l'ensemble de l'arbre bronchique, y compris les voies aériennes distales, comme en témoigne l'analyse du tissu bronchique obtenu à partir de biopsies bronchiques perfibroscopiques (109), de pièces opératoires (110) ou autopsiques (111). Le développement des techniques d'imagerie, notamment scannographiques, a permis une évaluation non invasive, *in vivo*, des voies aériennes proximales et distales dans l'asthme.

### 1. Exploration des voies aériennes proximales

La mesure *in vivo* des dimensions des voies aériennes proximales grâce à la TDM thoracique a tout d'abord été décrite pour des modèles animaux (157), puis validée chez l'homme (158). Plusieurs méthodes ont ainsi été proposées pour déterminer l'épaisseur de la paroi bronchique lors des maladies obstructives (159, 160). L'appréciation visuelle de l'épaisseur des parois bronchiques demeure certes la méthode la plus simple, mais est sujette à une grande subjectivité et une faible reproductibilité. En conséquence, la délimitation manuelle des contours bronchiques et des algorithmes quantitatifs semi-automatiques ont été développés et validés sur des fantômes et/ou des études animales (160-164).

L'étude de l'épaisseur des parois bronchiques dans l'asthme a ainsi pu être évaluée sur une bronche unique, la bronche lobaire supérieure droite (165-168), ou un nombre limité de bronches (169, 170), le plus souvent perpendiculaires à la section transversale de la coupe scannographique, afin d'éviter la sur ou sous-estimation de l'épaisseur de la paroi bronchique liée à une section oblique. Plus récemment, des reconstructions orthogonales à l'axe principal



des bronches grâce à des méthodes de segmentation en trois dimensions ont été développées (161, 164), puis utilisées dans l'asthme (171, 172).

L'épaisseur de la paroi bronchique est ainsi augmentée dans l'asthme (165-172), du fait des processus inflammatoires et de remodelage bronchique. Par ailleurs, l'importance de cet épaissement de la paroi bronchique s'avère corrélée à la durée (165) et à la sévérité de la maladie asthmatique (165, 170, 171), mais aussi à des paramètres fonctionnels respiratoires témoignant de l'obstruction bronchique (165, 166, 168, 169, 171). En outre, elle est également corrélée d'une part, à des paramètres inflammatoires, comme le nombre de polynucléaires neutrophiles dans les expectorations induites chez l'asthmatique sévère (168) ou le nombre de mastocytes infiltrant le muscle lisse bronchique (172), et, d'autre part, à des paramètres pouvant refléter le remodelage bronchique, comme la surface du muscle lisse bronchique (172), l'épaisseur de la membrane basale (169, 172) ou la surface de l'épithélium chez l'asthmatique sévère (171).

Plusieurs paramètres ont été définis pour apprécier, de façon directe ou indirecte, l'épaisseur de la paroi bronchique chez l'asthmatique, comme la surface de la paroi bronchique (172), la différence entre le diamètre total de la bronche et son diamètre endoluminal (164, 171), ou divers ratio en découlant, tels que la surface de paroi ou l'épaisseur de paroi rapportées à la surface bronchique, à la surface corporelle totale ou à la surface endoluminale (165-168, 170-172). Toutefois, aucun de ces indices ne relève plus spécifiquement de l'inflammation ou du remodelage bronchique.

## 2. Exploration des voies aériennes distales

Les voies aériennes distales, dont le diamètre luminal est inférieur à 2 mm, incluent les bronches à compter de leur 8<sup>ème</sup> division jusqu'aux bronchioles terminales (173). Physiologiquement, elles ne sont pas visibles sur des coupes scannographiques, car

l'épaisseur de leur paroi est en deçà du seuil de résolution de la technique. Quelques signes directs, mais surtout des signes indirects, peuvent cependant témoigner d'une atteinte pathologique des voies aériennes distales.

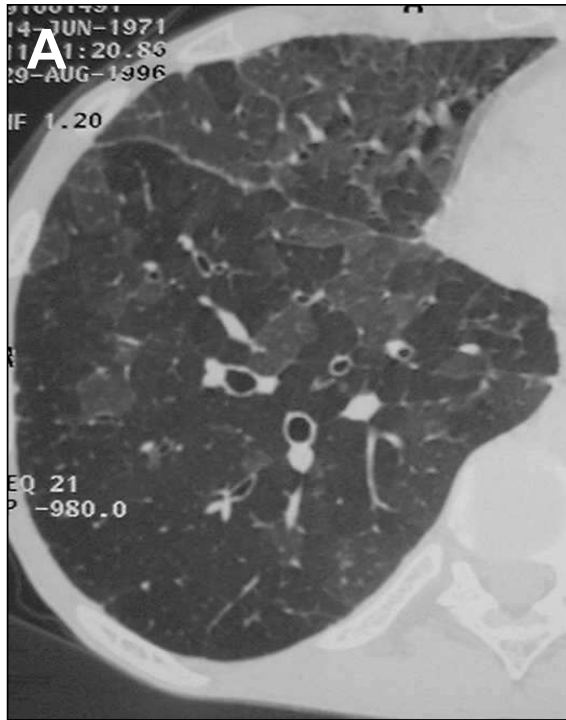
#### *Signes directs d'atteinte des voies aériennes distales*

Des micronodules centro-lobulaires peuvent ainsi traduire l'obstruction de bronchioles dilatées et pleines, ce que souligne également le caractère souvent ramifié de ces opacités (174). A la différence des opacités centrolobulaires, dont la fréquence augmente avec la sévérité de l'asthme (175), d'autres stigmates d'atteinte des voies aériennes distales, comme les impactions mucoïdes, les bronchiolectasies ou les atélectasies sous-segmentaires responsables d'opacités linéaires, ne sont pas corrélées avec la sévérité de l'asthme (174, 176). La fréquence de ces diverses anomalies dans l'asthme est très variable selon les séries (174).

#### *Signes indirects d'atteinte des voies aériennes distales*

Les signes indirects témoignant d'une atteinte des voies aériennes distales sont l'aspect de perfusion en mosaïque sur les coupes tomодensitométriques acquises en inspiration, qui se traduit par un piégeage aérique sur les coupes en expiration (177) (Figure 6). L'aspect de perfusion en mosaïque se définit par une hétérogénéité du parenchyme pulmonaire, comportant des zones discrètement hyperdenses juxtaposées avec des zones moins denses dans lesquelles la dimension des vaisseaux pulmonaires est réduite (174) (Figure 6A). Le renforcement sur les coupes en expiration de cette différence de densité constitue le piégeage aérique (174) (Figure 6B). La densité pulmonaire, mesurée en dehors des grosses bronches et des gros vaisseaux, est en effet la résultante de l'air intra-pulmonaire, du tissu pulmonaire et bronchiolaire, des parois capillaires et du sang intra-capillaire. Par conséquent, toute modifi-

**Figure 6.** Aspect de perfusion en mosaïque et de piégeage aérique sur des coupes scannographiques.



**Perfusion en mosaïque**



**Piégeage aérique distal**

**Légendes :** **A.** Aspect de perfusion en mosaïque sur les coupes tomodynamométriques acquises en inspiration. **B.** Aspect de piégeage aérique sur les coupes tomodynamométriques acquises en expiration.

cation de l'un de ces éléments est à l'origine de sa variation. Le gradient antéro-postérieur qui caractérise la densité du parenchyme en décubitus dorsal augmente en effet de façon significative lors d'une expiration, de façon pratiquement homogène, à l'exception de quelques lobules surtout basaux et déclives (178). Une absence d'augmentation de densité, qu'elle soit focale ou diffuse, reflète donc le degré d'obstruction des voies aériennes distales.

La fréquence d'un piégeage aérique sur les coupes scannographiques est très variable au cours de la maladie asthmatique selon les séries (179-181). Par ailleurs, cet aspect n'est pas spécifique de l'asthme et peut s'observer de façon physiologique ainsi que dans toutes les maladies susceptibles d'affecter les voies aériennes distales. Ainsi, un certain degré de piégeage aérique est présent chez environ 50% des sujets en l'absence de toute pathologie, d'autant plus fréquemment qu'ils sont âgés et/ou fumeurs (182). Il existe cependant des critères distinctifs entre le piégeage physiologique et celui observé au cours des maladies bronchiolaires, le 1<sup>er</sup> intéressant quelques lobules, plutôt situés dans les bases et dans les régions déclives du poumon, tandis que le 2<sup>nd</sup> est volontiers plurilobulaire, segmentaire ou lobaire et n'est pas limité aux seules régions déclives et basales (183).

Les aspects de perfusion en mosaïque et de piégeage aérique peuvent s'évaluer de façon visuelle. Toutefois, des méthodes d'évaluation quantitative, plus objectives et reproductibles, se sont développées, reposant alors sur la mesure des densités pulmonaires (184). Ainsi, après segmentation des contours du poumon, l'analyse des densités pulmonaires sous forme d'histogrammes permet l'extraction de différents indices, telles que la densité pulmonaire moyenne ou médiane ou la surface des zones de faible densité (184). La recherche et la quantification d'un piégeage reposant sur l'acquisition de coupes en expiration, l'analyse des densités peut être réalisée grâce à une synchronisation spirométrique, permettant de garantir la reproductibilité du volume pulmonaire (184). La TDM thoracique a ainsi permis d'objectiver des modifications spontanées de la densité pulmonaire chez l'asthmatique (185), mais

également au cours d'épreuves de bronchoconstriction à la métacholine (185, 186) ou de bronchodilatation au salbutamol (185, 187). La distribution des densités chez l'asthmatique est alors déplacée vers les basses densités, spontanément ou après métacholine, en dehors de toute crise (185, 186), et celle-ci s'oriente vers des densités plus élevées après bronchodilatation (185, 187). Par ailleurs, les modifications de la densité pulmonaire sont corrélées avec la sévérité de l'asthme (188) et les principaux indices fonctionnels témoignant d'une obstruction distale (188, 189). En outre, la sensibilité de la méthode est suffisante pour juger de l'effet de thérapeutiques. Plusieurs études ont ainsi utilisé la modification de la densité pulmonaire comme principal critère d'efficacité de traitements par corticoïdes inhalés (190-192) ou anti-leucotriènes (193). Dans certains cas, elle s'avèrerait supérieure aux paramètres d'évaluation clinique et fonctionnelle respiratoire (190). En effet, une étude randomisée comparant un corticoïde inhalé de particules fines *versus* une préparation conventionnelle chez des asthmatiques légers et modérés montre, en répétant le protocole après quatre semaines de traitement, une diminution du piégeage avant métacholine et une moindre augmentation après, avec la formulation en particules fines. De façon notable, ces différences significatives contrastaient avec l'absence de différence en terme de symptômes cliniques ou de données fonctionnelles respiratoires (190).

La mesure de la densité pulmonaire, permettant de quantifier l'importance du piégeage aérique et de l'obstruction distale, représente donc un indice scannographique corrélé à la sévérité de l'asthme et aux paramètres fonctionnels respiratoires, ainsi qu'un indice suffisamment sensible pour démontrer des effets thérapeutiques. Toutefois, la mesure de la densité bronchique et péri-bronchique en tant que potentiel marqueur des processus inflammatoires et de remodelage bronchique, n'a, jusqu'à présent, jamais été évaluée chez l'asthmatique.

### **I-3. Rôle central de la cellule musculaire lisse dans l'inflammation et le remodelage bronchique dans l'asthme**

La CML joue un rôle prépondérant dans la physiopathologie de l'asthme et, par conséquent, constitue une cible de choix pour les thérapeutiques innovantes (5, 194-196). En effet, elle est l'effecteur principal de la contraction et de la réactivité bronchique, aspect qui ne sera pas détaillé dans cette thèse. En outre, son rôle dans l'inflammation et le remodelage des voies aériennes est désormais établi, notamment grâce à ses propriétés de synthèse de nombreux médiateurs et son aptitude à proliférer (5, 49, 108, 197, 198).

Paradoxalement, autant l'implication du muscle lisse bronchique dans la physiopathologie de l'asthme est bien connue, autant son rôle physiologique demeure controversé. Il pourrait participer à la propulsion du mucus ou à la distribution des rapports ventilation-perfusion (199), bien que ces fonctions présumées n'aient pas été expérimentalement validées. Il a même été considéré comme une structure vestigiale, authentique « appendice du poumon » (199).

Présent dès le 53<sup>ème</sup> jour de gestation, le muscle lisse bronchique se caractérise par des bandes musculaires bien constituées et visibles au niveau des voies aériennes proximales, tandis que les cellules musculaires sont plus éparses au niveau des voies aériennes distales (200). Mature à la naissance (201), il se répartit le long de l'arbre trachéo-bronchique, depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales (202). Ainsi, au niveau de la trachée, le muscle lisse s'agence en faisceaux transversaux à la partie postérieure. A mesure des subdivisions de l'arbre bronchique, et plus le diamètre bronchique diminue, le tissu musculaire devient prépondérant par rapport aux autres structures de la paroi bronchique et les faisceaux musculaires s'organisent alors en hélice.

D'un point de vue morphologique, les CML des voies aériennes ont une forme allongée et présentent des invaginations de la membrane plasmique. Elles sont orientées parallèlement les unes aux autres, formant des faisceaux. Autour d'un noyau central, unique, s'agencent plusieurs organites intracellulaires, tels que les mitochondries, les lysosomes, l'appareil de Golgi et le réticulum sarcoplasmique. Par ailleurs, le cytosol se caractérise par la présence de filaments contractiles d'actine de 4 à 7 nm de diamètre, de myosine de 12 à 20 nm, et intermédiaires de 8 à 12 nm. Associées aux filaments fins d'actine, la caldesmone et la calponine sont des protéines inhibant l'activité ATPasique de la myosine. En revanche, lorsqu'elles sont phosphorylées, elles perdent cette propriété inhibitrice et participent ainsi à la sensibilisation de l'appareil contractile (203). Ces myofilaments contractiles sont arrimés à la membrane plasmique au niveau de régions denses aux électrons.

### **A. Rôle de la CML dans l'inflammation bronchique**

Longtemps considérée comme une cellule seulement effectrice, responsable de la contraction bronchique, la CML est également désormais reconnue comme une cellule inflammatoire à part entière. En effet, le plus souvent en réponse à des médiateurs inflammatoires, elle est capable d'adopter un profil sécrétant ou d'interagir directement avec des cellules inflammatoires, en induisant leur chimiotactisme et/ou leur adhérence.

#### 1. Médiateurs synthétisés par la CML

De façon constitutive ou induite, la CML bronchique peut ainsi synthétiser et sécréter de nombreux médiateurs, comme des cytokines, des facteurs de croissance, des chimiokines et des molécules d'adhérence (Tableau 3). Ainsi, par exemple, les CML en culture sont capables de produire des cytokines comme l'IL-5, l'IL-6 (204, 205), des facteurs de croissance comme

**Tableau 3.** Médiateurs sécrétés par les cellules musculaires lisses bronchiques intervenant dans les processus inflammatoires.

	Facteurs	Production constitutive	Production induite par
Cytokines	IL-2	+	Sérum d'asthmatique
	IL-5	+	Sérum d'asthmatique
	IL-6	-	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$
	IL-11	-	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , virus
	IL-12	+	Sérum d'asthmatique
Facteurs de croissance	GM-CSF	+	Sérum d'asthmatique, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$
	INF- $\gamma$	+	Sérum d'asthmatique
	SCF	+	-
	TGF- $\beta$ 1	+	Angiotensine II
	PGE <sub>2</sub>	+	IL-1 $\beta$
Chimiokines	CCL2	-	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$
	CCL5	-	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PAF
	CCL11	+	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$
	CXCL8	-	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , bradykinine
	CXCL9	+	-
	CXCL10	+	INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$
	CXCL11	+	-
	CXCL12	+	-
	CX <sub>3</sub> CL1	+	INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
Molécules d'adhérence	CD11a	+	-
	CD40	+	INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
	CD40L	+	-
	CD44	+	-
	CD80	+	-
	CD86	+	-
	ICAM-1	+	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, sérum d'asthmatique
	VCAM-1	+	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$



le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor), le TGF- $\beta$ 1, le SCF (206, 207) ou des chimiokines comme CCL5 (RANTES), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1, Monocyte chemotactic protein-1) ou CCL11 (Eotaxine) (208, 209). Cette production de cytokines peut être constitutive ou induite par certaines cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  (210).

Les CML bronchiques humaines sécrètent donc à la fois des cytokines de type Th1, telles que l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ , et Th2, comme l'IL-5 (204). Il existerait chez l'asthmatique une augmentation de la sécrétion de cytokines Th2 et une diminution concomitante de celle des Th1 par la CML. *In vitro*, la sensibilisation passive des CML avec du sérum de patient asthmatique entraîne, en effet, une augmentation précoce et importante des transcrits et des protéines des cytokines Th2 ainsi que de leurs récepteurs, suivie par une augmentation moindre et plus tardive de l'expression des cytokines Th1 (204).

La CML peut également synthétiser et sécréter des molécules d'adhérence cellulaires (MAC). Celles-ci sont composées de quatre grandes familles de molécules, incluant les MAC appartenant à la superfamille des immunoglobulines, les intégrines, les sélectines et les cadhérines. Elles permettent des adhérences intercellulaires ou entre les cellules et la matrice extra-cellulaire. Les CML synthétisent ainsi constitutivement les molécules d'adhérence CD11a, CD40, CD40L, CD44, CD80 et CD86 (211, 212). A un plus faible niveau, sont également synthétisées l'ICAM-1 (Inter-cellular adhesion molecule-1) et le VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), leur expression étant par ailleurs augmentée sous l'effet de certaines cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (211, 213). De même, l'expression du CD40 est accrue par le TNF- $\alpha$  ou l'INF- $\gamma$  (214).

## 2. CML et chimiotactisme de cellules inflammatoires

Grâce à certains médiateurs qu'elle synthétise, la CML est susceptible d'induire le chimiotactisme de cellules inflammatoires, comme les lymphocytes, les mastocytes ou les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (Tableau 3). Ainsi, le SCF, le TGF- $\beta$ 1, CCL5 (RANTES) et CXCL10 (IP-10, Interferon- $\gamma$  inducible protein-10) ont un pouvoir chimiotactique prononcé pour les mastocytes, tandis que CXCL8 (IL-8), CCL11 (Eotaxine) et CCL2 (MCP-1) induisent respectivement un chimiotactisme pour les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les monocytes. La production de ces facteurs chimiotactiques permet ainsi à la CML d'initier et d'entretenir la migration d'autres cellules inflammatoires, contribuant ainsi à l'entretien de la réaction inflammatoire (215).

## 3. CML et adhérence de cellules inflammatoires

La CML bronchique exprime donc, spontanément ou après stimulation par des médiateurs inflammatoires, certaines molécules d'adhérence (Tableau 3).

Ainsi, expérimentalement, les lymphocytes T, lorsqu'ils sont activés, sont capable d'adhérer aux CML, et d'autant plus que ces dernières sont stimulées par le TNF- $\alpha$  (211). En outre, une adhérence spontanée des lymphocytes T au repos a pu être objectivée lorsque les CML sont stimulées par des complexes immuns d'IgE (212). Cette adhérence cellulaire est partiellement bloquée lorsque les lymphocytes T sont traités par des anticorps bloquants spécifiques de l'intégrine  $\beta$ 1 et du CD11a. Un effet similaire a pu être reproduit quand les CML sont traitées par des anticorps anti-VCAM-1 et ICAM-1 (212). Par ailleurs, cette adhérence lymphocyte T – CML implique également l'interaction du CD44 avec l'acide hyaluronique de la matrice extra-cellulaire (212) et le CD40 avec son ligand, le CD40L. Cette interaction étroite CML – lymphocyte T a pour corollaire une activation bidirectionnelle de ces cellules. En effet, elle induit non seulement l'augmentation de la prolifération des CML et de la réactivité

muscarinique du muscle lisse, mais aussi une expression accrue du récepteur à l'IL-2 du lymphocyte T (212).

La CML est également capable d'adhérer au polynucléaire éosinophile, *via* les molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1. Elle est renforcée lorsque la CML est stimulée par le TNF- $\alpha$  (216). L'activité des CML semble aussi pouvoir augmenter la survie des éosinophiles (217). L'interaction entre CML et monocyte aboutit, quant à elle, à une dégradation plus importante du collagène dans un modèle de co-culture (218). Par ailleurs, les mastocytes peuvent également adhérer à la couche musculaire lisse par des interactions cellules – cellules médiées, en partie, par le TSLC-1 (Tumor suppressor in lung cancer-1) exprimé par les CML (219) ou, plus majoritairement, par des interactions cellules – matrice – cellules (220). Cette adhérence est augmentée avec des CML d'asthmatiques et lors de stimulations inflammatoires (220).

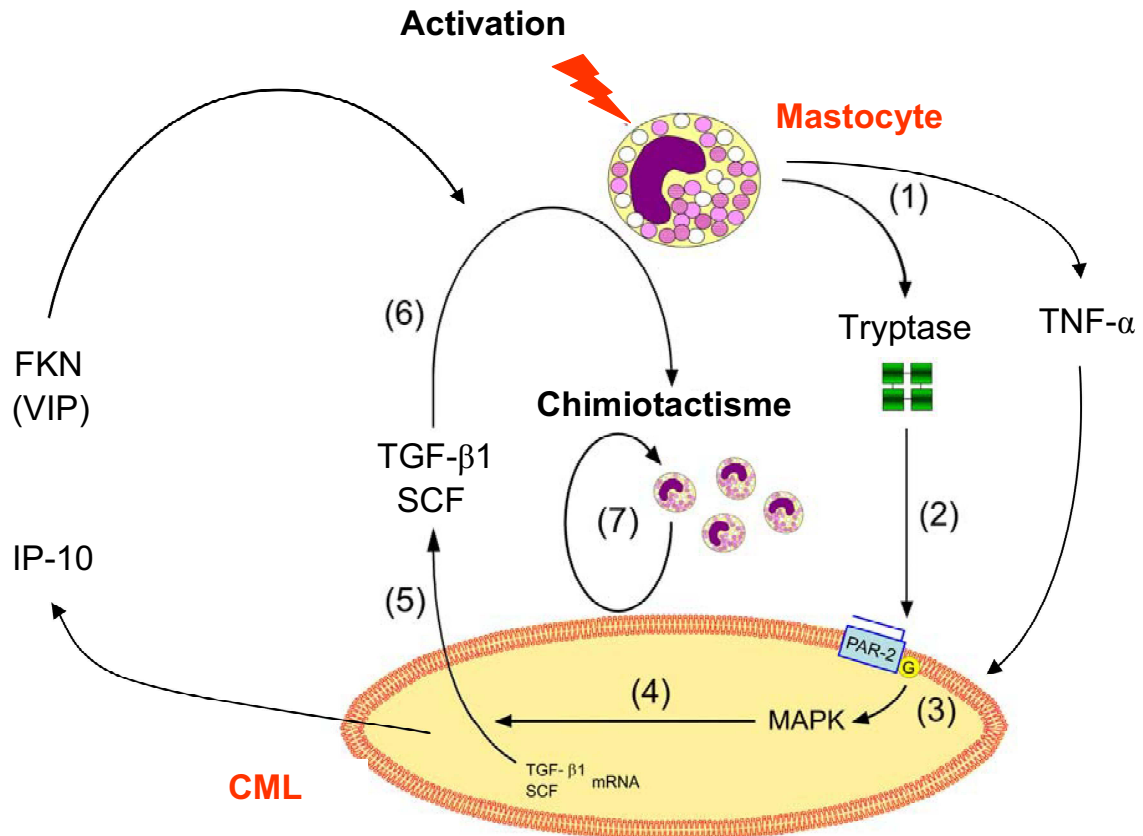
#### 4. Interaction CML / Mastocyte

L'interaction CML – mastocyte est un exemple d'interaction étroite entre la CML et des cellules inflammatoires, susceptible d'induire leur chimiotactisme et/ou leur adhérence. Cette interaction a fait naître le concept de myosite mastocytaire (45). En effet, l'infiltrat mastocytaire du muscle lisse bronchique est spécifique et caractéristique de l'asthme (221). Une dégranulation mastocytaire a en outre été objectivée *ex vivo* dans le muscle lisse bronchique en microscopie électronique, témoignant de l'activation mastocytaire (25). Il existe par ailleurs une adhérence des mastocytes aux CML et un chimiotactisme des mastocytes induit par les CML, *via* une boucle d'auto-activation positive (49) (Figure 7).

Ainsi, lors de la dégranulation mastocytaire, la tryptase et le TNF- $\alpha$  libérés stimulent la CML. Celle-ci synthétise en retour du TGF- $\beta$ 1 et du SCF, qui exercent un pouvoir chimiotactique pour de nouveaux mastocytes, ce qui a pour effet d'amplifier cette interaction (45, 49). Cette

**Figure 7.** Mécanismes de la myosite mastocytaire dans l'asthme.

(Adapté de Berger P. et al. ; *FasebJ* 2003(49) )



**Abréviations :** CML : Cellule musculaire lisse ; FKN : Fraktalkine ; IP-10 : Interferon inducible protein-10 ; MAPK : Mitogen activated protein kinase ; PAR2 : Récepteur activé par les protéases de type 2 ; SCF : Stem cell factor ; TGF- $\beta$ 1 : Transforming growth factor- $\beta$ 1 ; TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$  ; VIP : Vasoactive intestinal peptide.

boucle d'auto-activation fait également intervenir d'autres acteurs, comme CXCL10 (IP-10) (47) et CX<sub>3</sub>CL1 (Fractalkine) (48). En effet, la CML synthétise aussi ces deux chimiokines et le mastocyte exprime leur récepteur, respectivement CXCR3 et CX<sub>3</sub>CR1. Cependant, pour la Fractalkine, la présence de VIP est nécessaire pour que le muscle lisse puisse exercer son pouvoir chimiotactique (48) (Figure 7).

Le récepteur activé par les protéases de type 2 (PAR2), présent à la surface des CML bronchiques humaines (222), est une cible particulièrement intéressante dans cette boucle d'auto-activation (49). En effet, la tryptase, produit de sécrétion majoritaire du mastocyte, est connue pour activer le PAR2 (49). De plus, la stimulation directe du PAR2 musculaire lisse induit la même migration mastocytaire (49).

## **B. Rôle de la CML dans le remodelage bronchique**

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue en 2<sup>ème</sup> auteur, publiée dans l'European Respiratory Journal. Depuis la rédaction de cette revue, deux articles sont venus conforter la présence d'un excès de prolifération musculaire lisse *ex vivo* chez l'asthmatique (24, 223).

**Article n°1**

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

Eur Respir J 2010; 36: 1174-84

Imane Bara, Annaïg Ozier, José-Manuel Tunon de Lara, Roger

Marthan, Patrick Berger



## REVIEW

# Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma

I. Bara<sup>\*,#</sup>, A. Ozier<sup>\*,#,†</sup>, J-M. Tunon de Lara<sup>\*,#,†</sup>, R. Marthan<sup>\*,#,†</sup> and P. Berger<sup>\*,#,†</sup>

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

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

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

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

suggested that BSM is vestigial and has no physiological function, stating that BSM is “the appendix of the lung”. Paradoxically, the pathophysiological role of BSM in asthma is well established. BSM is the main effector of bronchial contraction in response to various stimuli, including inflammatory mediators. Moreover, BSM has also been considered as an inflammatory cell *per se* [16]. It can contribute to an auto-activation loop involving mast cells and implicating the production of cytokines [17]. Upon stimulation, BSM cells produce a wide range of cytokines and chemokines including CXCL10 (IP-10) and CX<sub>3</sub>CL1 (Fraktalkine), which participate in this auto-activation loop [18, 19]. As a result, mast cells are attracted by BSM and preferentially infiltrate the BSM layer of both fatal and nonfatal asthmatics [20, 21]. As part of this auto-activation loop, mast cells can adhere to BSM cells [2, 22, 23], promoting both survival and proliferation of mast cells [24]. Mast cell activation and degranulation can be allergen dependent or independent [25–28], and can be responsible for an important extracellular deposition of inflammatory products that may facilitate the increase in BSM mass, as well as bronchial hyperresponsiveness [16, 29, 30]. T-lymphocytes may also participate in BSM remodelling. LAZAAR *et al.* [31] demonstrated that the adhesion of T-lymphocytes to BSM cells induced BSM cell DNA synthesis. More recently, this increased BSM proliferation was related to a direct contact between activated

### AFFILIATIONS

\*Université de Bordeaux, UB2, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, #INSERM, U885, and †CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

### CORRESPONDENCE

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

Received:

Feb 04 2010

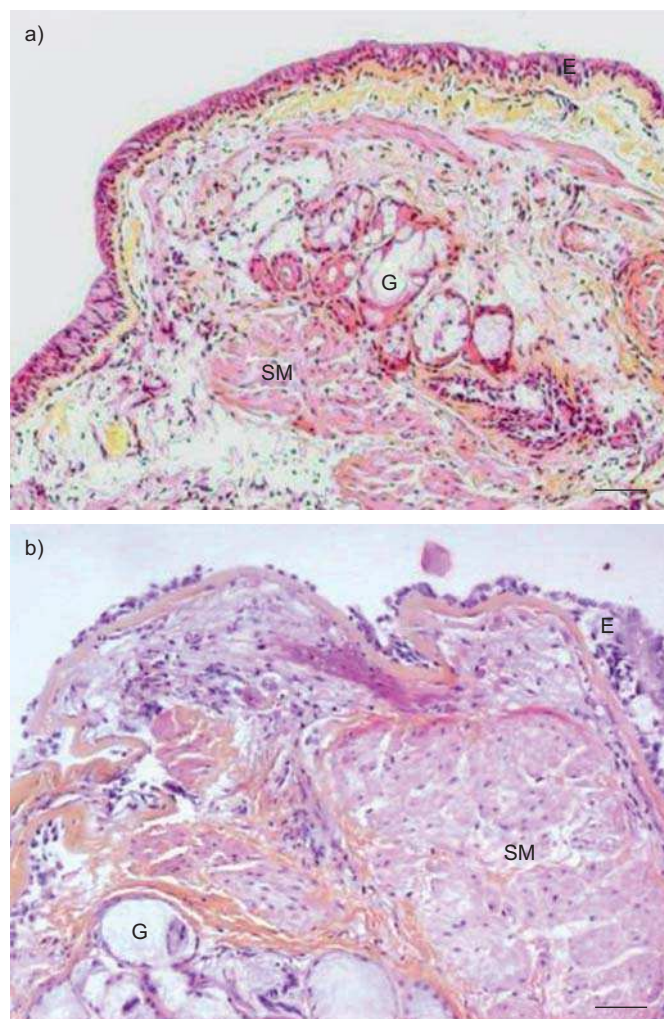
Accepted after revision:

March 13 2010

European Respiratory Journal

Print ISSN 0903-1936

Online ISSN 1399-3003



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

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

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

#### ALTERED ECM WITHIN THE SMOOTH MUSCLE LAYER

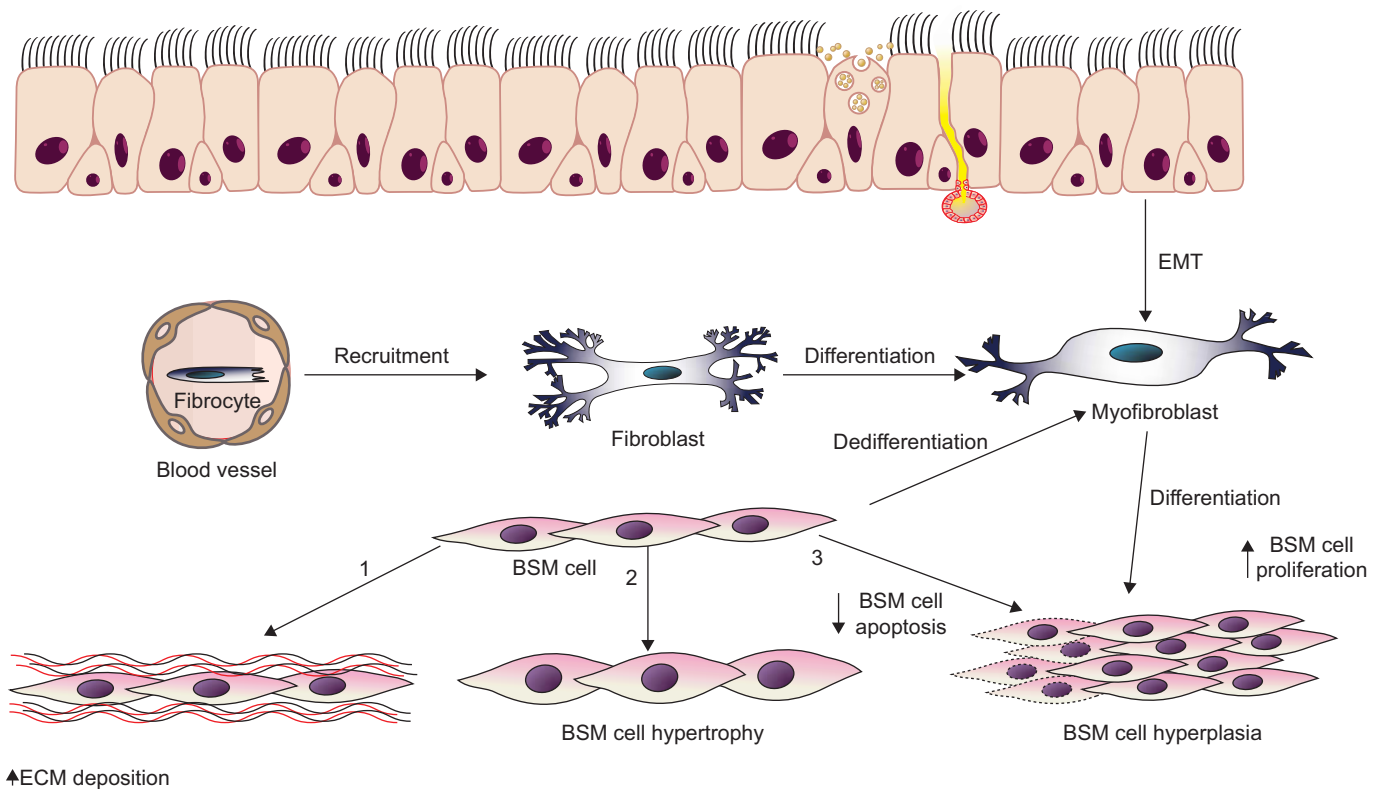
There is a growing body of evidence indicating that the BSM ECM is altered in asthma [29, 37–39]. Indeed, ECM is increased

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

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

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





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

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

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

### BSM HYPERTROPHY

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

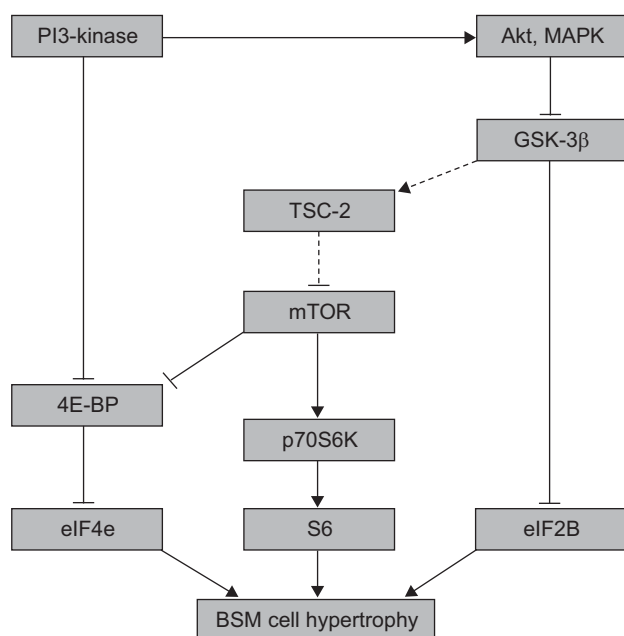
the bronchial tree. More recently, BENAYOUN *et al.* [65] studied bronchial biopsies and found that patients with asthma had larger BSM cell diameter compared to control subjects. Furthermore, severe asthmatics presented the highest BSM cell size [65]. Interestingly, it has also been shown that asthmatic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

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

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

### BSM HYPERPLASIA

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



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

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

### BSM cell proliferation

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

**TABLE 1** Mitogenic factors of human BSM cells

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

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

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

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

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

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

transcription of PGC-1 $\alpha$  [81]. Such an altered calcium homeostasis has also been observed very recently in nonsevere asthmatics [118], although the mechanism appeared to be different according to asthma severity. In severe asthmatic BSM cells, the proliferation has been related to an abnormal calcium influx [81], whereas in nonsevere asthmatic BSM cells, a diminished expression of SERCA2 has been demonstrated [118]. In addition, knocking down SERCA2 in healthy BSM cells reproduced this enhanced proliferation rate [118]. Thus, transduction pathways leading to the proliferation of asthmatic BSM cells seems to depend on the severity of the disease. However, further studies need to address whether or not the increased mitochondrial biogenesis and altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis can be related to exogenous factors such as those secreted by inflammatory cells.

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

#### **BSM cell apoptosis**

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

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

#### **Migration of BSM cells**

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

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

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

#### **Migration of myofibroblasts**

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

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



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

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

### BSM-EPITHELIUM INTERACTIONS

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

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

### CONCLUSION

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

### STATEMENT OF INTEREST

A statement of interest for P. Berger can be found at [www. erj.ersjournals.com/site/misc/statements.xhtml](http://www.erj.ersjournals.com/site/misc/statements.xhtml)

### ACKNOWLEDGEMENTS

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

### REFERENCES

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

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

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



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



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

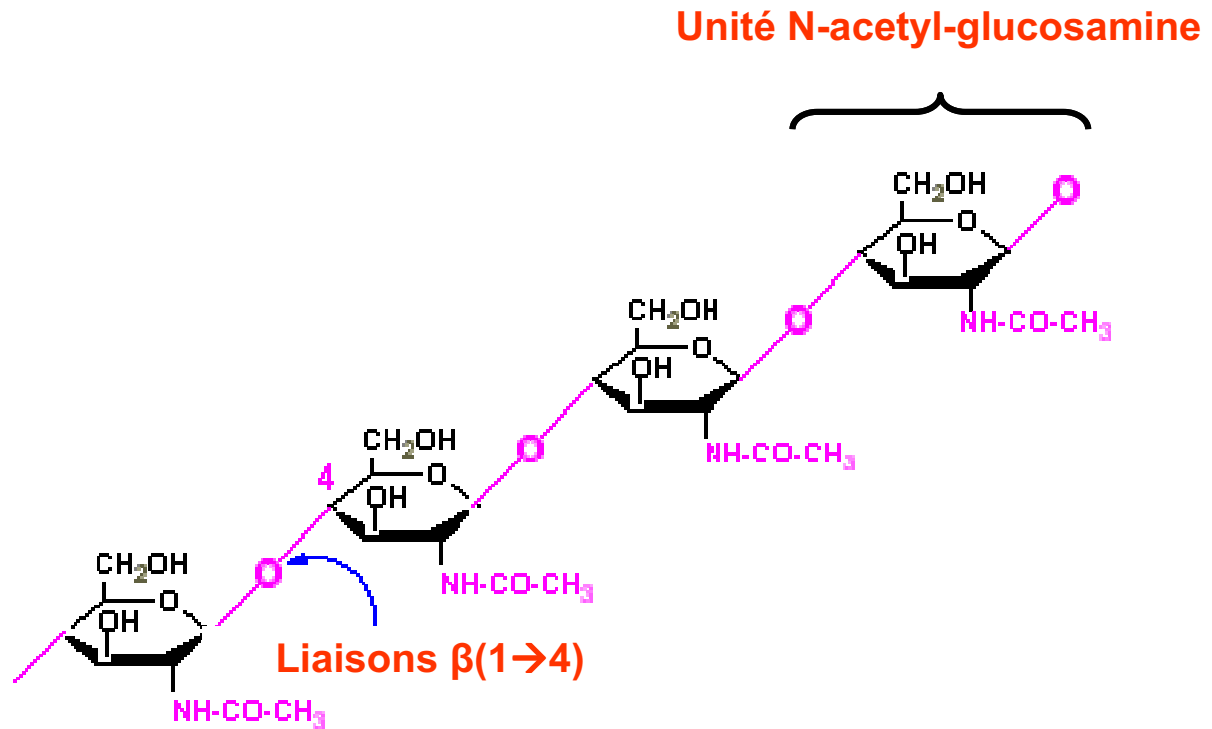
## I-4. Les chitinases

La CML bronchique joue donc un rôle central dans la physiopathologie de l'asthme, notamment dans l'inflammation et le remodelage des voies aériennes. Cependant, une abondante littérature souligne également l'importance de la cellule épithéliale bronchique dans ces processus d'inflammation et de remodelage (85). Ainsi, parmi les médiateurs épithéliaux susceptibles d'être impliqués dans le remodelage bronchique lié à l'asthme, le rôle d'YKL-40, une glycoprotéine appartenant à la famille des chitinases, a récemment été démontré (224).

Les chitinases sont une famille d'enzymes (EC 3.2.1.14) très conservées au cours de l'évolution phylogénétique, caractérisées par leur capacité à catalyser l'hydrolyse de la chitine. Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (225), la chitine est le 2<sup>nd</sup> polysaccharide le plus abondant dans la nature, après la cellulose. Isolée et décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1823 par M. Odier à partir de cuticules d'insectes, elle est composée d'unités N-acetyl-glucosamine, liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1 → 4) (Figure 8). Le groupe hydroxyle de chaque D-glucose est remplacé par un groupe acetylamine pour former le N-acetyl-D-glucosamine. Cette substitution confère à la chitine des propriétés de résistance et de flexibilité (226, 227), qui justifient ses diverses applications, notamment en médecine ou en cosmétologie. Alors que la cellulose apporte un support structural à la paroi des cellules végétales, la chitine, absente du règne végétal, représente le principal composant de la paroi des champignons et de l'exosquelette des insectes et des crustacés.

Bien que les mammifères ne produisent pas de chitine, l'existence de chitinases a toutefois été authentifiée chez l'homme. Elles sont par ailleurs également présentes dans de nombreux autres organismes, telles que les bactéries, les plantes, les vertébrés (228-231)...

**Figure 8.** Structure de la chitine.



**Légendes :** La chitine est composée d'unités N-acetyl-glucosamine, liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1  $\rightarrow$  4).

## A. Classification des chitinases

Les chitinases sont des glycoprotéines assurant la dégradation des liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glycosidiques de la chitine. Elles sont regroupées en deux familles distinctes, en fonction de leur localisation ou de leurs propriétés biochimiques. Ainsi, les chitinases appartenant à la famille 18 des glycosides hydrolases (GH18) rassemblent plus de 180 enzymes présentes chez les mammifères. La famille 19 regroupe, quant à elle, plus de 130 enzymes essentiellement d'origine végétale (232, 233).

Chez les mammifères, les chitinases membres de la famille GH18 peuvent être distinguées en chitinases enzymatiquement actives ou "vraies chitinases" et en "chitinase-like protéines", dépourvues d'activité enzymatique, mais conservant cependant leur aptitude à se lier à la chitine (232, 233) (Tableau 4). Le domaine N-catalytique des chitinases de la famille GH18 adopte une structure en tonneau triose phosphate isomérase (TIM), caractérisée par la présence de 8 feuillets  $\beta$  et 8 hélices  $\alpha$  parallèles (Figure 9). Dans ce tonneau, le feuillet  $\beta_4$  contient un motif conservé (DXXDXDXE, où D correspond à l'asparagine, E à l'acide glutamique et X à tout autre acide aminé). Ce motif forme le site actif de l'enzyme (234). En effet, l'acide glutamique est un donneur de proton, qui est nécessaire à l'hydrolyse de la liaison glycosidique  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) de la chitine (235). Dans les chitinase-like protéines, en revanche, la substitution de cet acide aminé essentiel en leucine, isoleucine ou glutamine, est à l'origine de la perte de l'activité chitinolytique. Néanmoins, ces dernières demeurent capables de se lier à la chitine avec une forte affinité, car les résidus aromatiques contenus dans le tonneau TIM ne sont pas affectés (236, 237).

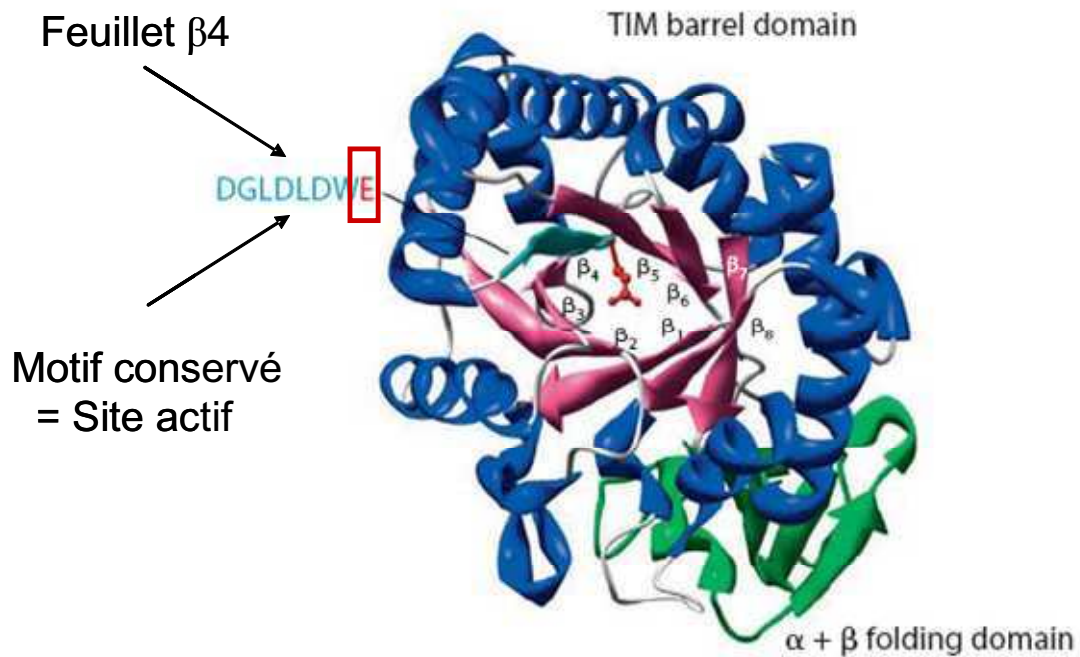
Chez l'homme, deux chitinases enzymatiquement actives ont ainsi été identifiées, la chitotriosidase, 1<sup>ère</sup> chitinase identifiée chez les mammifères et surexprimée dans le sérum de patients atteints de la maladie de Gaucher (238-240) d'une part, et, d'autre part, l'Acidic

**Tableau 4.** Les chitinases de la famille GH18 chez l'homme et la souris.

<b>Chitinases de la famille GH18</b>	<b>Homme</b>	<b>Souris</b>
<b>Vraies chitinases</b>		
Chitotriosidase	X	X
AMCase	X	X
<b>Chitinase-like protéines</b>		
YKL-39	X	
YKL-40	X	X (BRP-39)
Oviductine	X	X
Ym1		X
Ym2		X
Ym3		X
Bclp2		X
Bym		X

**Figure 9.** Structure tridimensionnelle de la chitotriosidase mettant en évidence l'activité catalytique.

(D'après Shuhui L. et al. ; *Int Arch Allergy Immunol* 2009 (241))



**Légendes :** La séquence conservée du site actif, présente dans le feuillet  $\beta_4$ , contient l'acide glutamique, résidu clé de l'activité catalytique de la chitotriosidase.

**Abréviations :** D : Asparagine ; E : Acide glutamique ; G : Glycine ; L : Leucine ; TIM : Triose phosphate isomerase ; W : Tryptophane.

Mammalian Chitinase (AMCase), fortement exprimée dans le tractus gastro-intestinal et, à moindre degré, dans le poumon (242, 243). On distingue par ailleurs chez l'homme trois chitinase-like protéines, YKL-40, YKL-39 et l'oviductine (232, 233) (Tableau 4). Chez la souris ont été identifiées les deux mêmes chitinases enzymatiquement actives que chez l'homme et sept chitinase-like protéines, dont BRP-39 (Breast regression protein 39), homologue murin d'YKL-40, Ym1 et Ym2 (232, 233) (Tableau 4).

## **B. Rôle biologique des chitinases**

### 1. Généralités

Une activité chitinolytique peut être requise par différents organismes pour des effets distincts (241). D'une part, les bactéries produisent la chitinase pour décomposer la chitine, afin de l'utiliser comme source d'énergie. D'autre part, les plantes en produisent pour se défendre contre les organismes pathogènes contenant de la chitine comme composant structural. De plus, les chitinases peuvent également participer au processus de croissance et de développement. En outre, chez les mammifères, elles sont impliquées dans le métabolisme digestif, par la dégradation de la cuticule des proies ingérées (244). Par ailleurs, les chitinases de la famille GH18 sont localisées sur le chromosome 1, à proximité des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, ce qui suggère leur rôle potentiel dans les mécanismes de défense immunitaire. Ainsi, par exemple, une déficience en chitotriosidase chez l'homme favorise les infections parasitaires (245), ce qui souligne de nouveau l'importance de l'activité enzymatique dans la dégradation de la chitine, composant majeur des pathogènes. Toutefois, les chitinases non enzymatiquement actives sont également des effecteurs potentiels de la défense de l'hôte grâce à leur capacité à se lier à la chitine, comme l'indique leur rôle dans la

fonction de reconnaissance du pathogène et du signal d'alarme transmis à la cellule hôte (246).

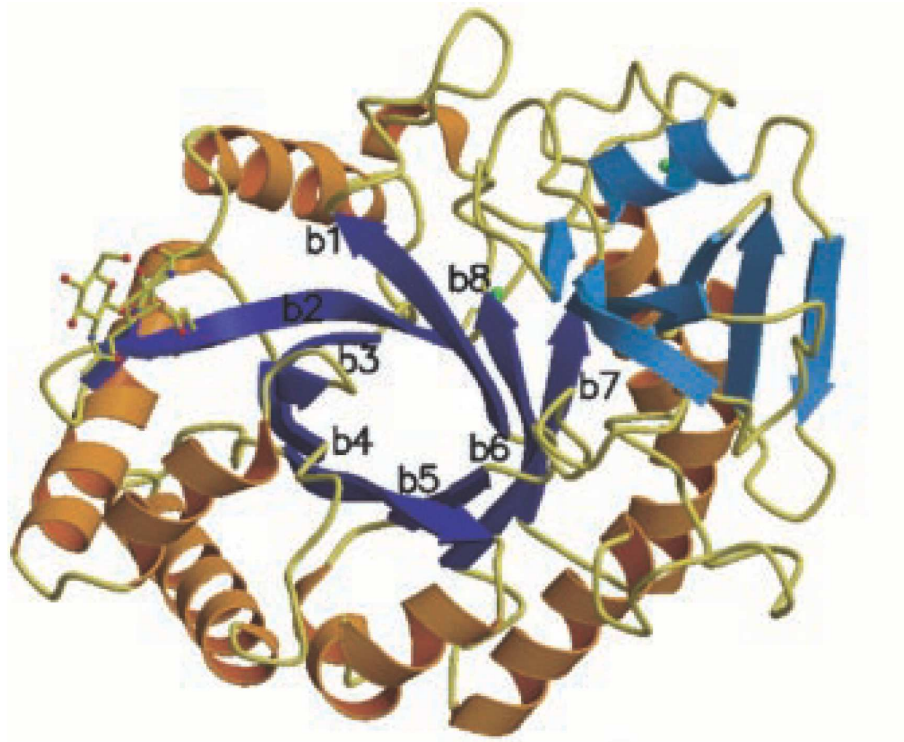
## 2. YKL-40

La chitinase YKL-40 est codée par le gène CHI3L1 (Chitinase 3 like-1), constitué de dix exons et situé sur le chromosome 1. YKL-40 est dépourvue d'activité chitinolytique, comme en témoigne sa structure cristallographique (236, 247) (Figure 10). Sa dénomination résulte des 3<sup>ers</sup> premiers acides aminés de sa séquence protéique, Tyrosine (Y), Lysine (K) et Leucine (L), suivis de son poids moléculaire approximatif. Elle a été identifiée en 1991 dans une lignée humaine d'ostéosarcome (248), puis dans les chondrocytes articulaires humains en 1993, lui conférant son autre nom, HC gp-39 (Human cartilage glycoprotein-39) (249). Outre les chondrocytes, YKL-40 est également produite par les cellules synoviales, les ostéoblastes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les hépatocytes, les CML vasculaires et les cellules épithéliales bronchiques (224, 247, 250). Dans la plupart de ces cellules, l'expression d'YKL-40 est accrue lors de la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , le GM-CSF, l'IL-4, l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  ou lors de l'exposition à des facteurs de stress cellulaire, tels l'hypoxie, l'irradiation, les lésions mécaniques ou l'appauvrissement du milieu de culture en sérum (251-253). Dans la mesure où YKL-40 peut être détectée dans le sérum par des techniques radio- ou enzymo-immunologiques (254, 255), une augmentation de sa concentration sérique a ainsi pu être mise en évidence dans de nombreuses maladies inflammatoires caractérisées par un remodelage tissulaire, comme l'asthme, la BPCO, l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la fibrose hépatique et certains cancers solides, dont le cancer du sein, du côlon, de l'ovaire et le cancer pulmonaire à petites cellules (224, 251, 256-262). Une concentration sérique élevée d'YKL-40 serait, par



**Figure 10.** Structure cristallographique d'YKL-40.

(D'après Fusetti F. et al. ; *J Biol Chem* 2003 (236))



**Légendes :** YKL-40 est une chitinase-like protéine et est dépourvue d'activité chitinolytique en raison de la substitution de l'acide glutamique en leucine au niveau du feuillet  $\beta_4$  de son tonneau triose phosphate isomérase.

ailleurs, un marqueur pronostique défavorable dans plusieurs types de cancers solides (251, 262).

Si les principales sources cellulaires à l'origine d'une production d'YKL-40 et les facteurs environnementaux responsables d'une élévation de sa concentration ont été, en grande partie, identifiés, les cibles cellulaires, les voies de transduction du signal et les effets biologiques autocrines et/ou paracrines de cette glycoprotéine sont en revanche peu connus. YKL-40 serait ainsi impliquée dans la prolifération, l'adhérence, la migration cellulaire et dans la synthèse de protéines de la matrice extra-cellulaire. Dans ce contexte, il a par exemple été montré qu'elle peut agir *in vitro* comme un facteur de croissance des chondrocytes, des cellules synoviales ou des fibroblastes d'origine cutanée ou pulmonaire, par une voie dépendante des MAP (Mitogen-activated protein) kinases et d'Akt (263, 264). D'autre part, elle favorise l'adhérence des CML vasculaires (265). YKL-40 exerce également un pouvoir chimiotactique sur les cellules endothéliales et les CML vasculaires (265, 266). En outre, elle induit la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire par les chondrocytes, comme les protéoglycanes, le collagène de type I et II (263, 267, 268). Ces différents effets, ainsi que l'expression préférentielle d'YKL-40 au niveau des sites siège d'une fibrogenèse active et de remaniements de la matrice extracellulaire, suggèrent donc sa possible implication dans les processus de remodelage tissulaire.

### **C. Chitinases impliquées dans l'asthme**

L'implication de plusieurs chitinases a été démontrée dans l'asthme, non seulement dans des modèles murins d'asthme allergique, mais également chez l'homme (241).

## 1. Chitinases enzymatiquement actives

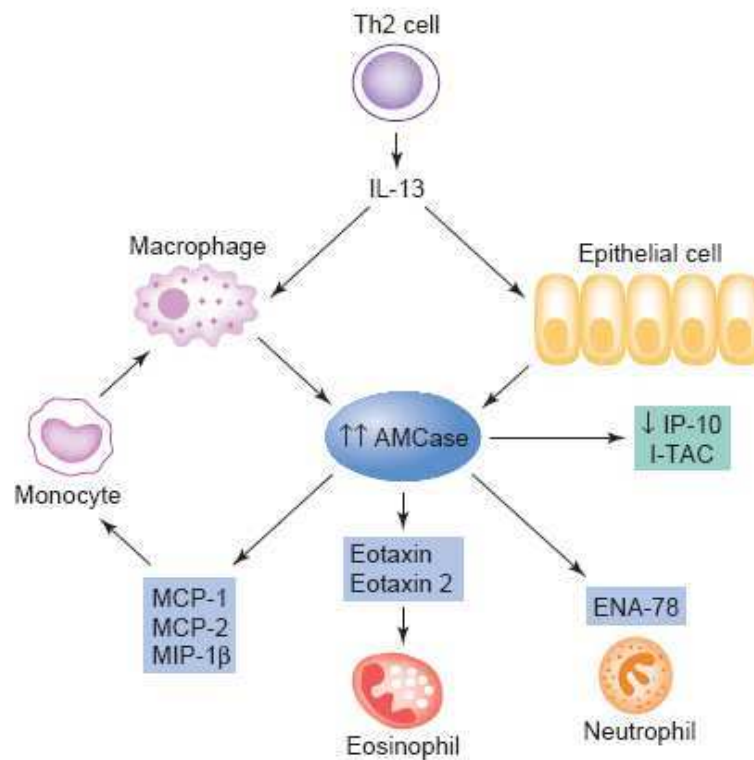
### *AMCase*

L'AMCase est ainsi exprimée de façon importante dans les cellules épithéliales et les macrophages bronchiques sur des prélèvements histologiques *post-mortem* issus de patients asthmatiques par rapport à des patients décédés d'autres maladies (269). Il s'agit de la 1<sup>ère</sup> implication clinique des chitinases dans l'asthme chez l'homme. Des polymorphismes dans le gène codant pour l'AMCase ont également été mis en évidence et associés à l'existence d'un asthme atopique (270, 271), ce qui conforte le rôle de cette chitinase dans l'asthme. Cependant, il n'existe pas de données liant ces polymorphismes à une modulation d'expression et/ou de fonction d'AMCase.

Parallèlement, l'expression d'AMCase est augmentée dans les poumons et les LBA dans un modèle de souris sensibilisées à l'ovalbumine et l'inhibition de cette chitinase par l'allosamidine diminue significativement l'HRB et le nombre de cellules inflammatoires dans le LBA (269). Dans ce même modèle, l'IL-13 apparaît nécessaire et suffisante pour induire cette augmentation d'AMCase, en cas d'inflammation médiée par les lymphocytes Th2 (269) (Figure 11). L'AMCase favorise alors la production de différents facteurs chimiotactiques pour les monocytes-macrophages (CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL4 (MIP-1 $\beta$ , Macrophage inflammatory protein-1)), les polynucléaires éosinophiles (CCL11 (Eotaxin), CCL24 (Eotaxin 2)) et les polynucléaires neutrophiles (CXCL5 (ENA-78, Epithelial-derived neutrophil-activating protein-78)) (Figure 11, Tableau 2). Elle inhibe également l'expression de plusieurs chimiokines Th1 comme CXCL-10 (IP-10) et CXCL11 (I-TAC, Interferon-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant), ce qui favorise donc une réponse inflammatoire de type Th2 par modulation de la balance Th1/Th2 (269, 272) (Figure 11, Tableau 2). Cette induction d'AMCase *via* l'IL-13 pourrait impliquer l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) (273), bien que cette voie de transduction du signal reste à confirmer chez l'asthmatique. Par

**Figure 11.** Rôle de l'Acidic Mammalian Chitinase dans l'inflammation bronchique liée à l'asthme.

(D'après Donnelly L.E. et al. ; Trends Pharmacol Sci 2004 (272))



**Légendes :** Lors d'une inflammation médiée par les lymphocytes Th2, il existe une production d'IL-13 responsable d'une augmentation d'AMCase dans les macrophages et les cellules épithéliales. L'AMCase favorise la production de facteurs chimiotactiques pour les monocytes-macrophages, les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires neutrophiles, tout en inhibant l'expression de plusieurs chimiokines Th1.

**Abréviations :** AMCase : Acidic mammalian chitinase ; ENA-78 : Epithelial-derived neutrophil-activating protein-78 ; IP-10 : Interferon- $\gamma$  inducible protein-10 ; I-TAC : Interferon-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant ; MCP : Monocyte chemotactic protein ; MIP-1 $\beta$  : Macrophage inflammatory protein-1.

ailleurs, l'AMCase produite exerce un effet autocrine et/ou paracrine protecteur sur l'apoptose des cellules épithéliales (274). Cet effet anti-apoptotique est médié par la voie PI3K/Akt et est indépendant de l'activité chitinolytique de l'AMCase (274). Bien que restant à démontrer chez l'homme, il n'est cependant pas exclu que l'AMCase puisse potentiellement contribuer à l'hyperplasie épithéliale observée dans l'asthme sévère.

Par ailleurs, les corticostéroïdes diminuent l'expression de cette chitinase dans les LBA de souris sensibilisées à l'ovalbumine, de manière concomitante à la diminution de l'inflammation broncho-alvéolaire et pulmonaire (275). Cet effet bénéfique pourrait être, en partie, lié à l'augmentation du pH des voies aériennes induite par les corticostéroïdes, ce qui a pour conséquence de diminuer les effets de l'AMCase, dont l'activité optimale se situe à un pH de 2 (269, 272).

#### *Chitotriosidase*

Une étude préliminaire rapporte également une augmentation de la concentration sérique de chitotriosidase chez les asthmatiques, atopiques ou non (276). Par ailleurs, en cas d'exposition fongique importante, source environnementale reconnue de chitine, certains polymorphismes dans le gène codant pour la chitotriosidase ont été retrouvés associés à la survenue d'exacerbations sévères d'asthme (277). L'existence d'une association entre ces polymorphismes et certains aspects phénotypiques de l'asthme est cependant controversée (277, 278), bien que cette discordance puisse, en partie, être explicitée par le contexte environnemental et un niveau d'exposition variable aux sources potentielles de chitine.

## 2. Chitinase-like protéines

### *Ym1, Ym2*

Une surexpression des chitinase-like protéines Ym1 et Ym2 est aussi retrouvée dans les LBA et les poumons de souris sensibilisées à l'ovalbumine (279, 280) ou après instillation intratrachéale d'IL-13 (237). De même, une surexpression d'Ym2 a été mise en évidence dans les poumons de souris sensibilisées en réponse à l'IL-4 et à l'IL-13 (237). Plus récemment, il a été montré que l'IL-33 agissait de façon synergique avec l'IL-13 et l'IL-4 pour augmenter l'expression d'Ym1 dans les macrophages alvéolaires de souris sensibilisées à l'ovalbumine (281).

Par ailleurs, les corticostéroïdes diminuent l'expression d'Ym1 et Ym2 dans les LBA et les poumons de souris sensibilisées (275, 280). En outre, l'injection intrapéritonéale de N-acétylcystéine avant la sensibilisation allergénique diminue l'expression de ces chitinases dans le LBA et les poumons, suggérant leur rôle potentiel de marqueurs du stress oxydatif (279).

### *YKL-40*

Chez les asthmatiques sévères, comparativement aux patients atteints d'asthme modéré et aux sujets sains, a également été mise en évidence une augmentation de la concentration sérique d'YKL-40 ainsi qu'une surexpression de cette glycoprotéine à la fois dans les cellules épithéliales bronchiques et les polynucléaires neutrophiles et macrophages issus de LBA (224). Cette surexpression est corrélée positivement à la sévérité de la maladie et à la détérioration de la fonction ventilatoire, mais aussi à des stigmates de remodelage bronchique, comme le pseudo-épaississement de la membrane basale (224). Ces résultats suggèrent donc la participation d'YKL-40 dans la pathogénie de l'asthme et en font un potentiel biomarqueur sérique de l'asthme sévère et de la présence d'un remodelage bronchique (224).

La concentration sérique d'YKL-40 est, par ailleurs, plus élevée lorsque les asthmatiques sont en exacerbation (282), bien qu'il n'existe pas encore d'études prospectives démontrant une diminution de cette concentration lorsque l'asthme est contrôlé. Le stress mécanique, comme celui observé lors des phénomènes de bronchoconstriction, est en effet à l'origine d'une production accrue d'YKL-40 par les cellules épithéliales bronchiques, cet effet observé *in vitro* étant médié par la voie EGFR/MEK1/2 (MAPK Erk kinase) (283). Par ailleurs, l'expression de BRP-39, homologue murin d'YKL-40, est augmentée dans l'épithélium bronchique et les macrophages alvéolaires de souris sensibilisées, en cas d'inflammation Th2 médiée par l'IL-13. Comme pour l'AMCase, il est possible que cette induction de BRP-39 *via* l'IL-13 implique l'EGFR (283), bien que cette voie de transduction du signal reste à confirmer chez le patient asthmatique. Par ailleurs, la BRP-39 produite exerce également un effet anti-apoptotique, dépendant d'Akt, sur les cellules CD4<sup>+</sup>, les macrophages et les éosinophiles, ce qui pourrait contribuer à l'entretien de la réaction inflammatoire (284).

D'autre part, les tests de provocation allergénique par voie inhalée induisent une augmentation de la concentration d'YKL-40 dans le sérum et le LBA de patients asthmatiques sensibilisés (285). Le rôle causal d'YKL-40 a, de plus, été suggéré par l'étude de polymorphismes dans la région promotrice du gène codant pour YKL-40, CHI3L1. En effet, l'allèle C du SNP (Single-nucleotide polymorphism) (-131C→G) est fortement associé, d'une part, à une concentration élevée d'YKL-40 et, d'autre part, à la présence d'une HRB, d'une altération de la fonction ventilatoire et d'un asthme (286).

Par conséquent, cette capacité des épithéliums pathologiques à synthétiser YKL-40 pourrait refléter un état d'activation anormale, secondaire à une réparation incomplète ou anarchique, et serait susceptible de participer au processus de remodelage bronchique. En effet, les anomalies de la réparation épithéliale contribuent au remodelage bronchique, en particulier la fibrose sous-épithéliale (287). Toutefois, les cibles cellulaires, les voies de transduction du

signal et les effets biologiques de cette glycoprotéine sont encore inconnus dans la pathogénie de l'asthme, et notamment la capacité d'YKL-40 de modifier les fonctions d'autres types cellulaires qui concourent au remodelage bronchique, comme les CML (288).



## I-5. La protéine p53

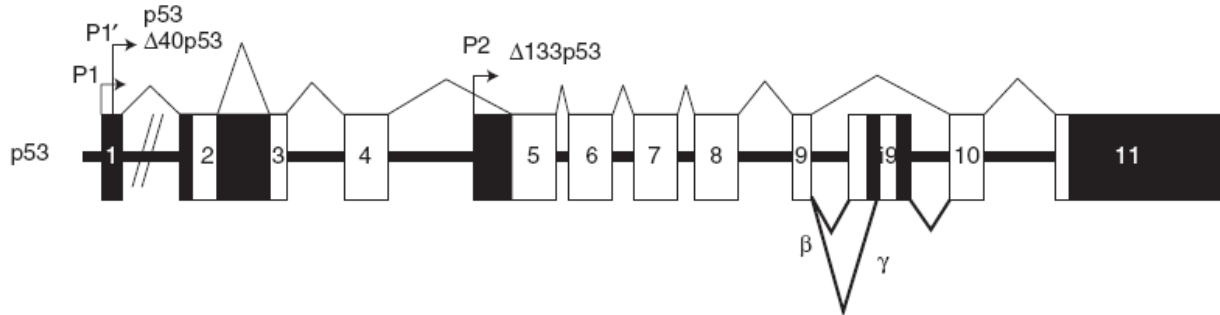
Outre ses rôles classiques dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, la protéine p53 a été également impliquée, de façon plus récente, dans la régulation du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale, mais également, du stress oxydant et de la défense anti-inflammatoire. Toutefois, son rôle dans la physiopathologie de l'asthme, et notamment dans l'étiopathogénie du remodelage musculaire lisse, demeure inconnu à ce jour.

### A. Structure de la protéine p53

Découverte en 1979 (289), la protéine p53 fait partie d'une famille multigénique comprenant p63 et p73, dont les gènes respectifs, *TP63* (Tumor protein 63) et *TP73* (Tumor protein 73), possèdent plusieurs séquences homologues au gène *TP53* (Tumor protein 53) (290). Chez l'homme, le gène *TP53* est situé sur le bras court du chromosome 17, au locus 17p13.1 (291). Très conservé au cours de l'évolution phylogénétique, il s'étend sur 23 kb et comporte 11 exons et 10 introns (291) (Figure 12). Sa région promotrice est particulière, puisque dépourvue des séquences consensus classiques d'initiation de la transcription (CAAT, TATA, séquences riches en GC) retrouvées dans la plupart des promoteurs eucaryotes (291). Grâce à un épissage alternatif, le gène *TP53* est capable de coder pour neuf isoformes de la protéine p53 (p53, p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53  $\gamma$ ) (290) (Figure 13), qui diffèrent par leur structure, leur poids moléculaire et leur fonction biologique. Seules la structure et la fonction de la protéine p53 seront abordées dans cette thèse. Chez l'homme, p53 est ainsi une protéine de 393 acides aminés (AA), de poids moléculaire 53 kDa, qui comporte

**Figure 12.** Structure du gène *TP53*.

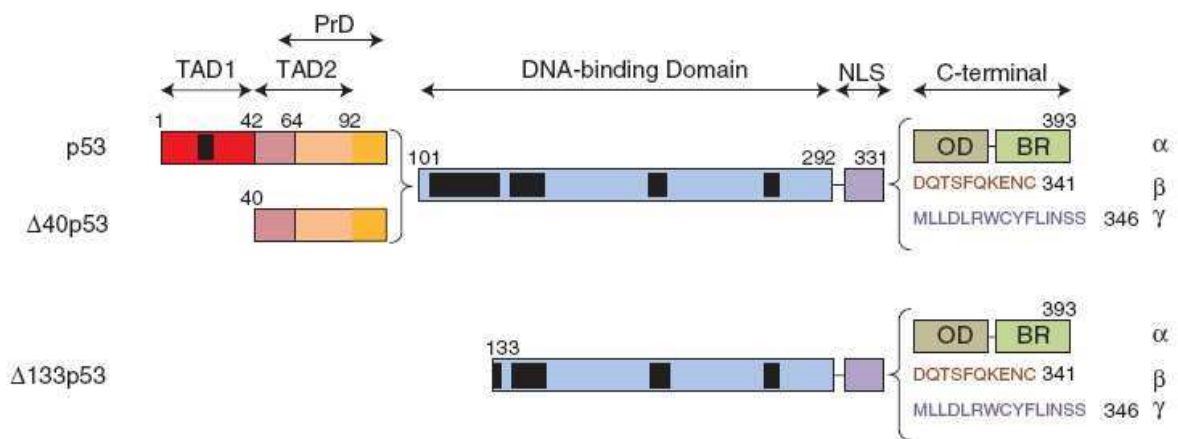
(D'après Khouri M.P. et al. ; Cold Spring Harb Perspect Biol 2010 (290))



**Légendes :** Le gène *TP53* comporte 11 exons et 10 introns. Les exons non codants sont représentés en noir et les exons codants, en blanc. P1, P1' et P2 représentent les régions promotrices.

**Figure 13.** Structure des neuf isoformes de la protéine p53.

(D'après Khouri M.P. et al. ; Cold Spring Harb Perspect Biol 2010 (290))



**Légendes :** Les neuf isoformes de p53 sont représentées. Les rectangles noirs représentent les domaines très conservés au cours de l'évolution.

**Abréviations :** BR : Basic region ; NLS : Nuclear localization signal ; OD : Oligomerization domain ; PrD : Proline domain ; TAD : Transactivation domain.

plusieurs domaines fonctionnels (292) (Figure 14).

### 1. Région N-terminale

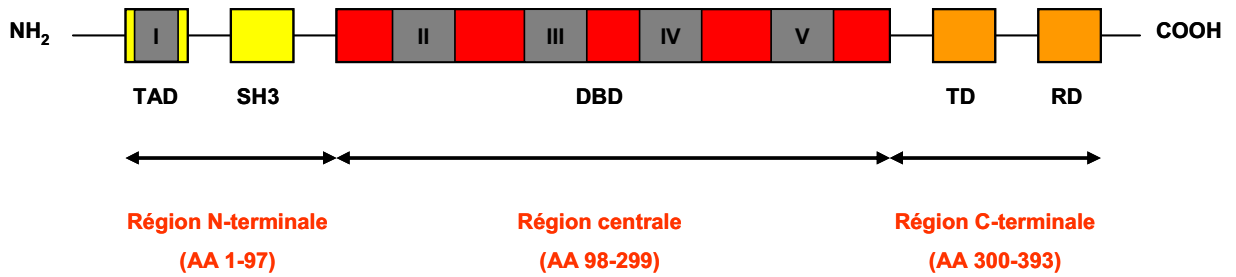
Du côté N-terminal, le domaine de transactivation (TAD : Transactivation domain) permet à p53 d'activer ou de réprimer la transcription d'un grand nombre de gènes cibles (Tableau 5, Figure 14). Pour cela, p53 coopère avec différents composants de la machinerie cellulaire transcriptionnelle, comme la sous-unité TBP (TATA box binding protein) ou les protéines TAFII40 et TAFII60 (TBP-associated factors), sous-unités du facteur de transcription TFIID (292). Ces protéines se fixent sur le domaine de transactivation de p53 et contribuent à moduler son activité.

Le domaine suivant, SH3 (Src homology 3-like), riche en proline, contenant cinq copies du motif PXXP, interviendrait dans l'apoptose et la suppression de la croissance cellulaire (292) (Figure 14). Toutefois, son rôle précis est encore mal défini à l'heure actuelle.

### 2. Région centrale

La région centrale (DBD : DNA binding domain) comporte le domaine de liaison spécifique à l'ADN (Figure 14). Il s'agit d'une région très structurée qui se fixe spécifiquement à une séquence palindromique de l'ADN, comportant deux motifs de dix paires de bases (5'-RRRCWWGYYY-3', où R correspond à une arginine ou une guanine, W, à une adénine ou une thymine, et Y, à une cytosine ou une thymine), ceux-ci étant séparés par moins de treize paires de bases (292). La liaison de p53 à l'ADN dépend des conditions d'oxydo-réduction, puisque cette liaison fait intervenir un atome de zinc. Cette région possède également une activité 3'-5'exonucléasique, qui est impliquée dans les phénomènes de réplication et de réparation de l'ADN (292).

**Figure 14.** Structure de la protéine p53.



**Légendes :** Principaux domaines de la protéine p53. Les rectangles gris représentent les 5 parties de p53 hautement conservées dans les organismes multicellulaires : I (AA 13-26), II (AA 117-142), III (AA 171-181), IV (AA 234-250), V (AA 270-286).

**Abréviations :** DBD : DNA binding domain ; RD : Regulatory domain ; SH3 : Src homology 3-like (domaine riche en proline) ; TAD : Transactivation domain ; TD : Tetramerization domain.

**Tableau 5.** Principaux gènes cibles de la protéine p53.

<b>Autorégulation</b>	<b>Arrêt du cycle cellulaire</b>	<b>Apoptose</b>
Mdm2 (+)	p21 (+) GADD45 (+) 14-3-3 (+) cdc25 (-)	<b>Voie extrinsèque</b> FasR (+) DR4, DR5 (+) <b>Voie intrinsèque</b> Bax (+) Bid (+) NOXA (+) PUMA (+) AIF (+) Apaf-1 (+) Bcl-2 (-) Bcl-xL (-) Survivine (-)
<b>Biogenèse mitochondriale</b>	<b>Métabolisme énergétique</b>	<b>Réponse au stress oxydant</b>
p53R2 (+) mtTFA (+)	<b>Glycolyse aérobie</b> SCO2 (+) COI (+) Glutaminase (+) <b>Glycolyse anaérobie</b> TIGAR (+) GLUT1 (-) GLUT4 (-) PGM (-)	<b>Anti-oxydants</b> TIGAR (+) Sestrines (+) p53INP1 (+) ALDH4 (+) MnSOD (+) <b>Pro-oxydants</b> NOXA (+) PUMA (+) PIG3 (+)

**Légendes :** Les gènes (+) représentent les gènes transactivés et les gènes (-), ceux réprimés par la protéine p53. La définition des abréviations est précisée au début de cette thèse.

### 3. Région C-terminale

La région C-terminale peut être subdivisée en trois parties. Elle comporte ainsi un domaine flexible, puis un domaine de tétramérisation (TD : Tetramerization domain) et un domaine de régulation (RD : Regulatory domain) (292) (Figure 14).

Le domaine de tétramérisation permet la fixation spécifique de p53 à l'ADN sous forme d'un tétramère. Quant au domaine de régulation, riche en résidus basiques, il participe à la régulation de l'activité de p53.

Seul le domaine central de p53 résiste à la protéolyse enzymatique du fait de sa structure globulaire et hydrophobe, alors que les extrémités N- et C-terminales, linéaires et hydrophiles, sont plus sensibles à la protéolyse.

Par ailleurs, la présence aux extrémités N- et C-terminales de séquences d'exportation vers le cytoplasme (NES : Nuclear export signal) et de séquences de localisation nucléaire (NLS : Nuclear localization signal), permet plusieurs localisations subcellulaires de p53, dont le site majoritaire est le noyau (293).

### **B. Contrôle de l'expression de la protéine p53**

La protéine p53 est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme à l'état latent, inactif. Sa quantité intracellulaire est faible car sa  $\frac{1}{2}$  vie est courte, de l'ordre de cinq à quarante minutes (294). Il est toutefois possible de la détecter, de façon constitutive, dans certaines cellules comme les cellules épithéliales mammaires saines (295) ou les cellules synoviales chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de rhumatisme psoriasique (296). Son niveau d'expression dans la CML bronchique humaine est toutefois inconnu à l'heure actuelle.

Le contrôle du niveau d'expression de p53 peut s'exercer à trois échelons : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (297).

### 1. Contrôle transcriptionnel

Un contrôle transcriptionnel a été proposé durant le développement de certains tissus, comme au cours de la spermatogénèse (298) ou en réponse à un signal mitotique (299). Le promoteur du gène codant pour p53 contient en effet des sites de liaison pour plusieurs facteurs inductibles, dont AP1 (Activator protein 1), NF-kB (Nuclear factor-kappa B) ou Myc/Max (291). Cependant, les données de la littérature sont contradictoires (297). En effet, il a également été montré qu'en réponse à un dommage de l'ADN, la quantité d'ARNm de p53 ne changeait pas en dépit d'une expression accrue de la protéine p53 (297).

### 2. Contrôle traductionnel

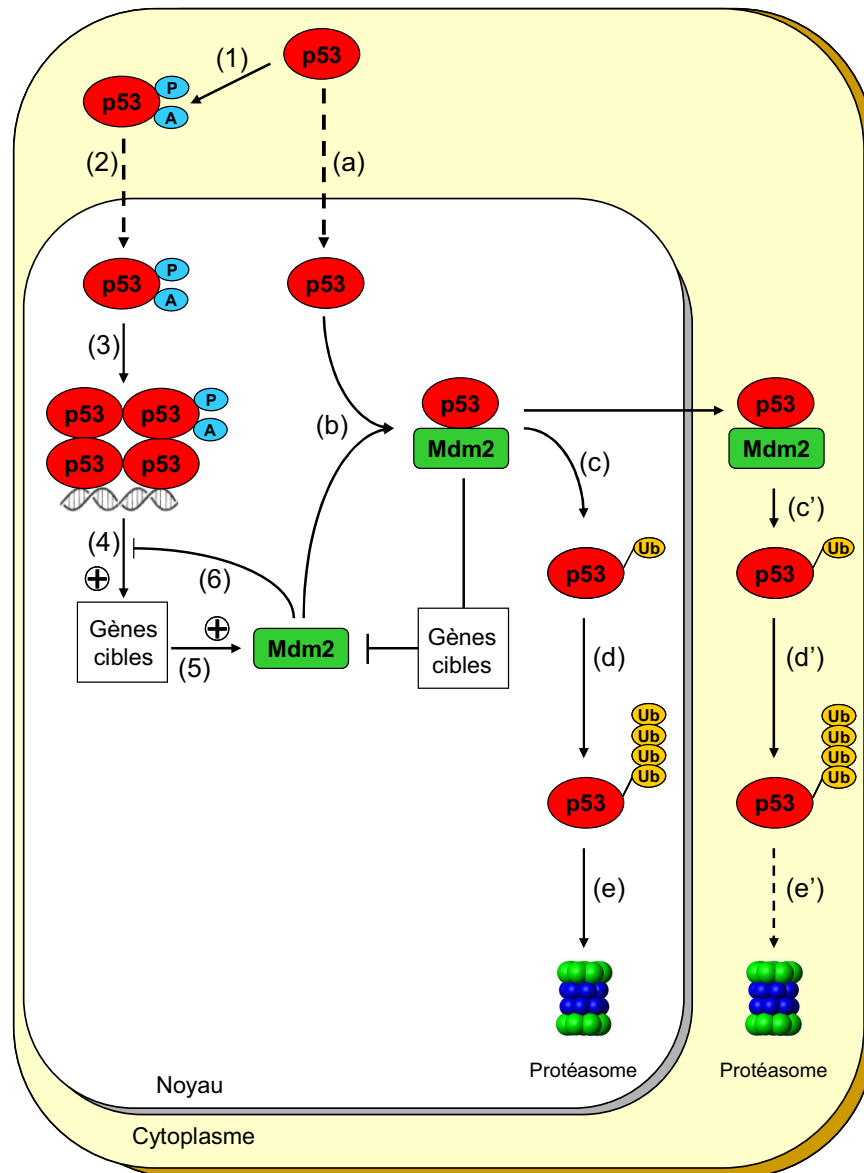
Au niveau traductionnel, les mécanismes de contrôle de p53 sont encore mal connus. Les extrémités 5' et 3' UTR (Untranslated regions) de l'ARNm de p53 sont des sites de régulation de la traduction de p53 (299). La protéine p53 peut ainsi se lier à l'extrémité 5'-UTR de son propre ARNm et inhiber sa propre traduction (300). Par ailleurs, l'extrémité 3'-UTR de p53 contient une séquence Alu-like susceptible de former une structure secondaire capable d'inhiber la traduction de p53 (299).

### 3. Contrôle post-traductionnel

Le contrôle post-traductionnel demeure néanmoins le mécanisme majeur modulant l'expression et l'activité de p53, celle-ci devant être associée en tétramère dans le noyau pour être active.

À l'état normal, p53 est ainsi exprimée en faible quantité, dans un état inactif et est constitutivement instable du fait d'une dégradation rapide *via* la voie ubiquitine/protéasome (301), médiée majoritairement par l'ubiquitine-ligase Mdm2 (Mouse double minute 2), aussi connue sous le nom de Hdm2 (Human homolog of mouse double minute 2) (302) (Figure 15).

**Figure 15.** Contrôle post-traductionnel de p53.



**Légendes :** À l'état normal, p53 est transloquée dans le noyau (a), où elle s'associe à la protéine Mdm2 (b) pour être soit mono-ubiquitinée (c) puis poly-ubiquitinée (d) pour être dégradée dans le noyau par le protéasome (e), soit mono-ubiquitinée puis poly-ubiquitinée après translocation dans le cytoplasme (c', d') avant dégradation par le protéasome (e'). En réponse à un stress, p53 subit des modifications post-traductionnelles (1) et est transloquée dans le noyau (2). Elle est alors stabilisée et son activation sous forme d'un tétramère (3) permet la transactivation de gènes cibles (4), dont Mdm2 (5). La liaison Mdm2-p53 inhibe ( $\perp$ ) la transactivation des gènes cibles de p53, ce qui génère une boucle de rétrocontrôle négatif (6).



Schématiquement, Mdm2 se lie à p53 au niveau de son domaine N-terminal et entraîne la fixation d'un résidu ubiquitine, ou mono-ubiquitination, sur un ou plusieurs résidus lysines de son extrémité C-terminale ou, plus rarement de son domaine de liaison à l'ADN (303). La fixation d'au moins quatre résidus ubiquitine sur le même résidu lysine, ou poly-ubiquitination, permet à p53 d'être dégradée dans le noyau par le protéasome (303, 304). Cependant, la possibilité d'une dégradation protéasomale de p53 dans le cytoplasme a également été évoquée, sans toutefois être confirmée expérimentalement (303, 305). Elle nécessiterait alors la translocation première du complexe p53-Mdm2 hors du noyau, la mono-ubiquitination de p53 par Mdm2, puis sa poly-ubiquitination (303, 304).

De plus, la liaison de Mdm2 avec p53 inhibe l'activité de transactivation de p53. En effet, le site de fixation de Mdm2 recoupe les sites de fixation de facteurs de transcription ubiquitaires ainsi que ceux des histones acétyltransférases, CBP/p300 (CREB-binding protein/p300) et P/CAF (p300/CPB-associated factor) (301). Ces cofacteurs, en s'associant au domaine de transactivation de p53, induisent l'acétylation de son extrémité C-terminale et favorisent son activité transactivatrice. Ainsi, en masquant les sites de fixation de ces cofacteurs, Mdm2 intervient négativement dans la transactivation des gènes cibles de p53 (Tableau 5). Enfin, p53 stimule l'expression de Mdm2 en transactivant son gène, ce qui permet un rétrocontrôle négatif post-traductionnel de Mdm2 sur p53 (Figure 15) (301).

La protéine p53 est inductible par une grande variété de stress cellulaires. Il peut s'agir, d'une part, d'inducteurs génotoxiques, telles que des lésions de l'ADN secondaires par exemple à une irradiation X ou gamma, aux ultraviolets, à un stress oxydant, aux inhibiteurs des topoisomérases, à des carcinogènes chimiques, au monoxyde d'azote, à un dysfonctionnement télomérique ou, d'autre part, d'inducteurs non génotoxiques tels que l'hypoxie, l'hyperthermie, l'épuisement en ribonucléotides et microtubules, la perte d'adhérence cellulaire, la privation en facteurs de croissance (294, 306)...

Lorsque la cellule est confrontée à un stress cellulaire, p53 subit des modifications post-traductionnelles, dont la nature varie selon le type cellulaire, l'origine et l'intensité du stress (307, 308). Ces modifications peuvent être covalentes à type de phosphorylation, méthylation, acétylation, ubiquitination, neddylation, glycosylation ou sumoylation des extrémités N- et/ou C-terminales de p53 (309), ou non covalentes, comme l'association à des cofacteurs ou d'autres protéines cellulaires. Elles contribuent à moduler la stabilité et la conformation de p53 (310). En effet, en augmentant la concentration nucléaire de p53 et en favorisant une configuration en tétramère, ces modifications augmentent l'activité de la protéine.

### **C. Principales fonctions de la protéine p53**

Pour assurer ses multiples fonctions qui en ont fait le « gardien du génome » (311), le tétramère de p53 interagit avec plusieurs familles de cibles moléculaires. En tant que facteur de transcription, p53 va ainsi activer ou réprimer la transcription d'un grand nombre de gènes cibles (Tableau 5) en se fixant sur une séquence spécifique présente, soit dans le promoteur, soit dans une séquence intronique de ces gènes (307). Elle peut également exercer ses diverses fonctions par le biais d'une interaction directe protéine – protéine (312).

Outre ses rôles classiques dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, les fonctions émergentes de p53 dans la régulation de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique, mais aussi du stress oxydant et de la défense anti-inflammatoire seront également détaillées dans cette thèse. La fonction de la protéine p53 dans la CML bronchique humaine de l'asthmatique demeure toutefois inconnue à ce jour.

## 1. Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire

### *Généralités*

Le cycle cellulaire se compose de quatre phases successives, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M. La phase G<sub>1</sub>, la plus longue, est une phase au cours de laquelle la cellule croît. Puis, la cellule entre en phase S, synthétise l'ADN et les histones. Enfin, la phase G<sub>2</sub>, la plus courte, précède la mitose ou division cellulaire, aboutissant à la multiplication par deux du nombre de cellules. Les cellules proliférantes suivent ce cycle de manière asynchrone, indépendamment les unes des autres. Trois points de contrôle ou "check point" régissent la progression dans le cycle cellulaire (313, 314). La protéine p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire en intervenant au niveau de ces points de restriction, principalement en fin de G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> (Figure 16).

### *Arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub>*

Les complexes cycline D-cdk4/6 (Cycline-dépendant kinase 4/6) et cycline E-cdk2 sont nécessaires pour passer le point de restriction en G<sub>1</sub>/S en phosphorylant la protéine Rb (Retinoblastoma protein), ce qui aboutit à une dissociation du complexe Rb-E2F. Le facteur de transcription E2F, ainsi activé, peut alors transactiver des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (313, 314).

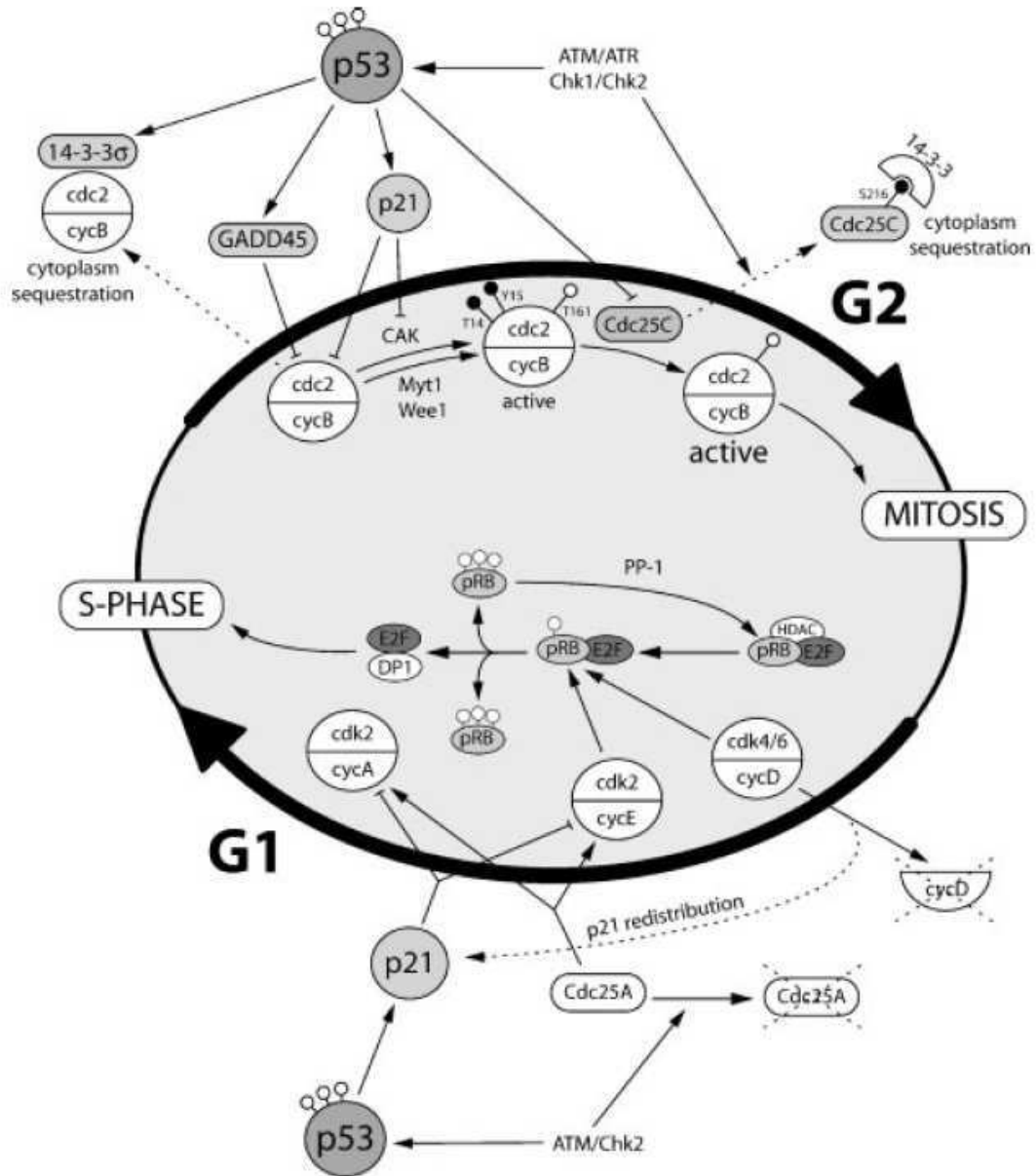
La protéine p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub>, par la transactivation de p21, un inhibiteur des complexes cycline E-cdk2 et cycline A-cdk2 (313, 314) (Tableau 5, Figure 16).

### *Arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub>*

La transition entre les phases G<sub>2</sub> et M du cycle cellulaire nécessite le complexe cycline B1-cdk1, aussi appelé cycline B1-cdc2 ou MPF (Maturation promoting factor). Ce complexe est gardé sous forme inactive dans le cytoplasme par la phosphorylation de la thréonine 14 et de

**Figure 16.** Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire.

(D'après Giono L.E. et al. ; *J Cell Physiol* 2006 (314))



**Légendes :** Le cycle cellulaire se compose de quatre phases successives, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M. La protéine p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire en intervenant au niveau des points de restriction régissant la progression dans le cycle cellulaire, principalement en fin de G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>.

la tyrosine 15 de la cdk1. L'entrée en mitose nécessite la translocation de ce complexe dans le noyau, la déphosphorylation de la cdk1 par la phosphatase Cdc25, et, secondairement, sa phosphorylation sur la thréonine 161 grâce à la CAK (Cdk-activating kinase).

La protéine p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub> de plusieurs façons (Figure 16). En effet, GADD45 (Growth arrest and DNA-damage inducible 45), gène transactivé par p53 (Tableau 5), inhibe l'activité kinase de cdc2. De même, p21 inhibe le complexe cycline B1-cdc2 et l'activité de la CAK. Lorsqu'elle est phosphorylée, la phosphatase Cdc25 est séquestrée dans le cytoplasme par 14-3-3, gène également transactivé par p53 (Tableau 5). 14-3-3 $\sigma$ , une isoforme de 14-3-3, favorise de plus la séquestration cytoplasmique du complexe cycline B1-cdk1. Par ailleurs, p53 transréprime également le gène codant pour la phosphatase Cdc25 (313-315) (Tableau 5).

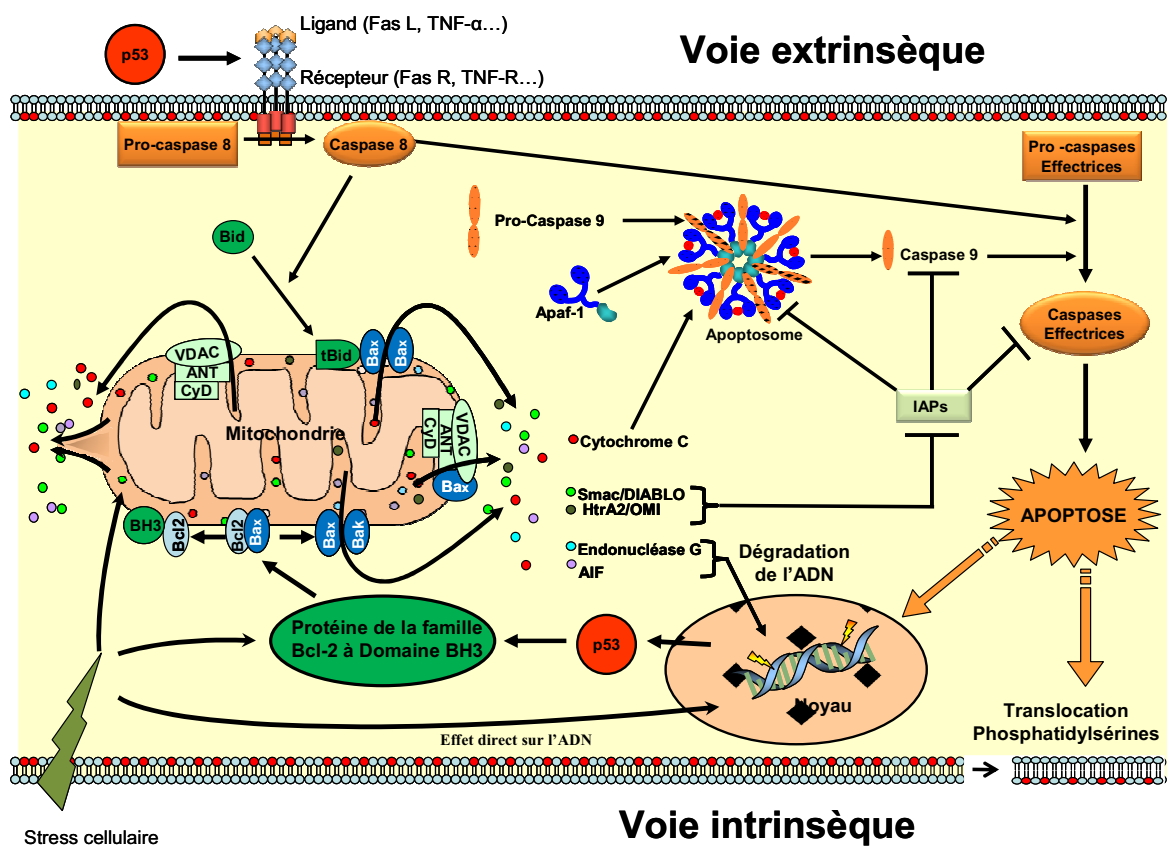
## 2. Rôle de p53 dans l'induction de l'apoptose

### *Généralités*

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, résulte principalement de l'activation de deux voies : la voie extrinsèque, médiée par les récepteurs à domaine de mort, et la voie intrinsèque, voie majoritaire, impliquant la mitochondrie (316) (Figure 17). Ces deux voies de signalisation aboutissent *in fine* à l'activation des caspases, la translocation des phosphatidylsérines vers la face extracellulaire de la membrane plasmique, la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, et la formation de corps apoptotiques voués à la phagocytose.

La voie extrinsèque implique ainsi l'activation des récepteurs cytoplasmiques à domaine de mort, comme le Fas-R (Fas-receptor) ou le TNF-R (Tumor necrosis factor-receptor), et une famille de protéases à cystéine, les caspases. Présentes sous forme de pro-caspases inactives dans le cytoplasme, les caspases doivent être clivées pour être activées (317). On distingue

**Figure 17.** Voies de l'apoptose.



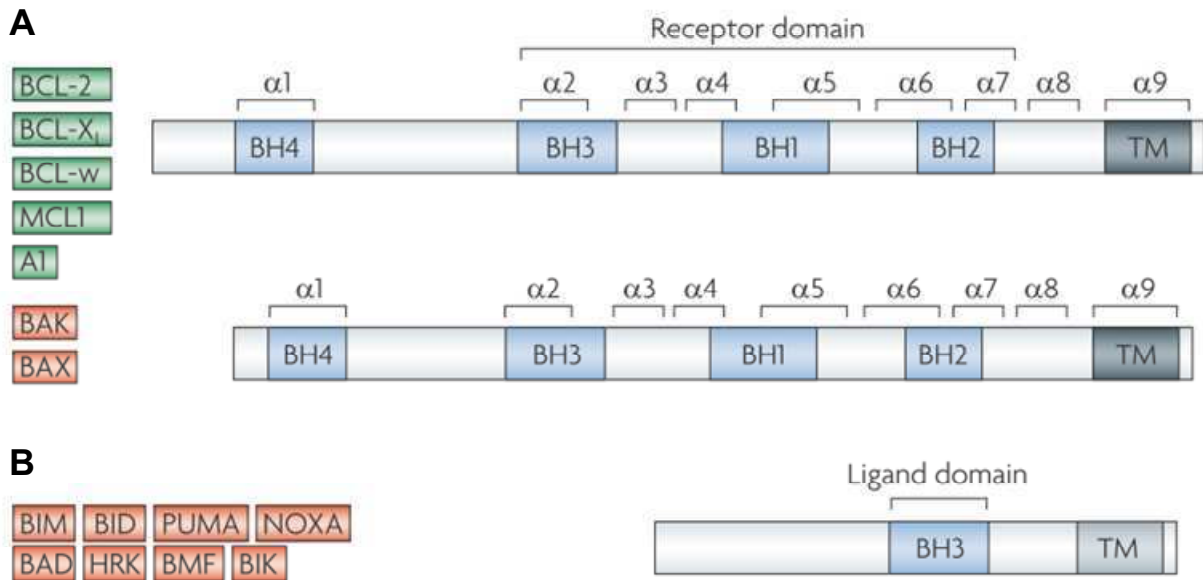
**Légendes :** La voie extrinsèque est activée par la trimérisation des récepteurs cytoplasmiques à domaine de mort, permettant le clivage de la pro-caspase 8 en caspase 8. La voie intrinsèque peut être activée par un stress cellulaire ou par l'activation de la protéine Bid par la caspase 8. Il en résulte une libération des facteurs mitochondriaux dans le cytoplasme. L'AIF et l'endonucléase G vont dégrader l'ADN dans le noyau. Smac/DIABLO et HtrA2/OMI séquestrent les IAP. Le cytochrome C s'associe à Apaf-1 et à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome, qui va activer la caspase 9. Les caspases 8 et 9 vont activer les caspases effectrices, ce qui aboutit à l'apoptose. La définition des abréviations est précisée au début de cette thèse.

d'une part, les caspases initiatrices, comme les caspases 8 et 9, et d'autre part, les caspases effectrices, comme les caspases 3, 6 et 7, activées par les caspases initiatrices (317). Suite à la liaison du ligand à son récepteur, la trimérisation des récepteurs cytoplasmiques à domaine de mort permet le clivage de la pro-caspase 8 en caspase 8. Celle-ci peut alors initier l'activation des caspases effectrices. La caspase 8 peut également cliver la protéine pro-apoptotique Bid (BH3 interacting domain death agonist), membre de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma-2), en tBid, activant ainsi la voie intrinsèque (Figure 17).

La voie intrinsèque est induite, quant à elle, par un stress cellulaire, comme les ROS ou la privation en facteurs de croissance. Ce stress, ressenti au niveau cytosquelettique, nucléaire et mitochondrial, a pour effet d'activer les protéines de la famille Bcl-2 à domaine BH3 (Bcl-2 homology domain 3). Cette famille comporte d'une part, des membres à quatre domaines d'homologie avec Bcl-2, comme les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL (ou Bcl-2-L1, Bcl-2-Like 1), ou les facteurs pro-apoptotiques Bax (Bcl-2-associated X protein), Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer), Bad (Bcl-2-antagonist of cell death), PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) (Figure 18A), et, d'autre part, des membres possédant uniquement le domaine d'homologie BH3, comme Bid (Figure 18B) (318). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xL empêchent normalement l'oligomérisation de Bax, initialement présente dans le cytosol, et de Bak, protéine de la membrane externe de la mitochondrie. En revanche, lors de l'apoptose, tBid ou d'autres protéines à domaine BH3, entraînent l'oligomérisation de Bax et Bak, en levant l'inhibition de Bcl-2 ou Bcl-xL sur celles-ci. Il en résulte la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et la libération dans le cytosol des facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'espace intermembranaire, tels que le cytochrome C, Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase), HtrA2/OMI (High-temperature requirement protein A2), AIF (Apoptosis inducing factor) et EndoG (Endonucléase G). Le

**Figure 18.** Les protéines de la famille Bcl-2.

(D'après Lessene G. et al. ; *Nat Rev Drug Discov* 2008 (318))



**Légendes :** Les différentes protéines de la famille Bcl-2 sont représentées, en vert, les protéines anti-apoptotiques et en rouge, les protéines pro-apoptotiques. **A.** Membres de la famille Bcl-2 possédant quatre domaines d'homologie avec Bcl-2 (BH). **B.** Membres de la famille Bcl-2 possédant uniquement un domaine d'homologie avec Bcl-2, le domaine BH3.

La définition des abréviations est précisée au début de cette thèse.



cytochrome C libéré s'associe à la partie C-terminale d'Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1), celui s'associant alors à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome, qui déclenche l'activation de la caspase 9, puis des caspases effectrices. Smac/DIABLO et HtrA2/OMI séquestrent les IAP (Inhibitor of apoptosis protein), tels que XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), et permettent ainsi à la caspase 9 de cliver la pro-caspase 3, déclenchant alors l'activation des autres caspases effectrices. AIF est transloquée dans le noyau pour dégrader l'ADN au niveau des régions inter-nucléosomales. De même, après translocation dans le noyau, EndoG coopère avec des endonucléases, comme la DNase I, pour dégrader l'ADN (Figure 17).

### *Rôle de p53*

L'induction de l'apoptose par p53 peut résulter de sa fonction de transactivation ou de transrépression, mais également d'interactions protéine - protéine spécifiques (319, 320). La protéine p53 intervient majoritairement au niveau de la voie intrinsèque de l'apoptose, et, à moindre degré, au niveau de la voie extrinsèque.

Elle transactive ainsi plusieurs gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques, comme Bax, Bid, PUMA, ou des récepteurs à domaine de mort, tels DR4 (Death receptor 4), DR5 ou FasR...(Tableau 5). Elle réprime également la transcription de certains gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-xL ou survivine (Tableau 5).

D'autre part, en réponse à un stress cellulaire, p53 peut aussi se localiser à la mitochondrie, la majorité de la protéine étant alors située sur sa membrane externe, tandis qu'une petite fraction peut se complexer avec les protéines mitochondriales hsp70 et hsp60 au niveau de la matrice mitochondriale (321). La protéine p53 peut alors se lier aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, cette interaction levant leur inhibition sur Bax et Bak (320). Elle peut également se lier directement aux protéines Bax et Bak, ce qui les libère des

protéines anti-apoptotiques (320). Enfin, p53 peut être séquestrée et maintenue inactive dans le cytoplasme par liaison à la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (320, 322). Dans ce cas, une autre protéine à domaine BH3, comme PUMA, est nécessaire pour libérer p53 et lui permettre d'interagir avec Bax/Bak (320, 322). Ces différents modes d'interaction protéine – protéine conduisent à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et à la libération des facteurs apoptogènes.

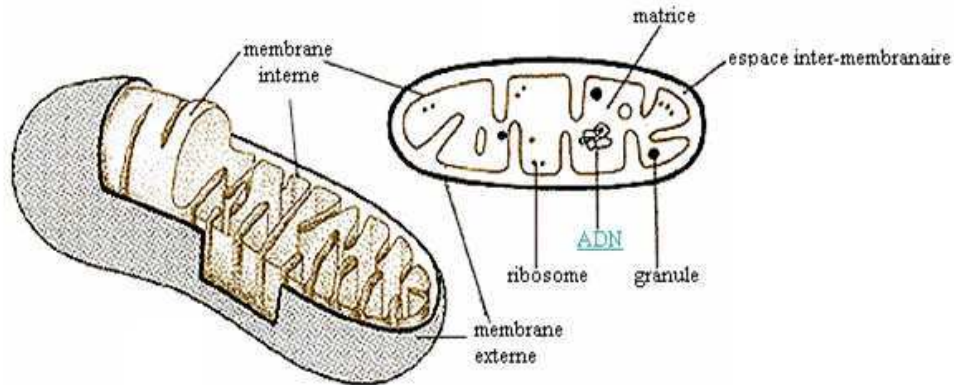
### 3. Rôle de p53 dans la biogenèse mitochondriale

#### *Généralités*

La mitochondrie est un organite intracellulaire, présent dans les cellules eucaryotes. Elle est composée de deux membranes, externe et interne, délimitant l'espace inter-membranaire et la matrice (Figure 19). La mitochondrie contient dans sa matrice son propre ADN, l'ADN mitochondrial (ADNmt), présent sous la forme d'un double brin circulaire de 16568 pb (323). On estime à plusieurs milliers, le nombre de molécules d'ADNmt par cellule, ce nombre pouvant varier en fonction du type cellulaire et de la demande énergétique (323). L'ADNmt code pour treize sous-unités des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire (Figure 20), siège des oxydations phosphorylantes, ainsi que pour vingt-deux ARNt et deux ARNr (Figure 21) (323). Les autres protéines mitochondriales sont, quant à elles, codées par l'ADN nucléaire.

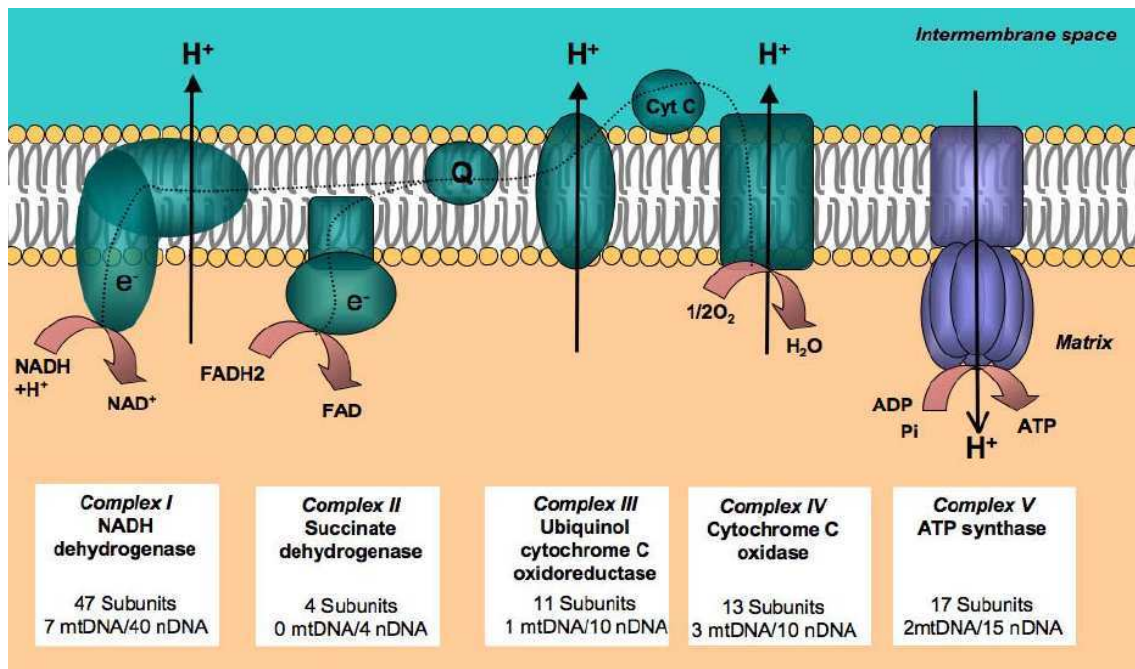
La biogenèse mitochondriale est un processus dynamique coordonnant la synthèse et l'importation des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire, l'assemblage des treize sous-unités de la chaîne respiratoire codées par l'ADNmt, ainsi que la croissance du réseau mitochondrial par des mécanismes de fusion et fission membranaire (324). Au centre de la régulation de la biogenèse mitochondriale se trouvent des co-activateurs transcriptionnels, tels PGC1- $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactiva-

**Figure 19.** Vue classique de la structure de la mitochondrie et de ses compartiments.



**Figure 20.** Complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale.

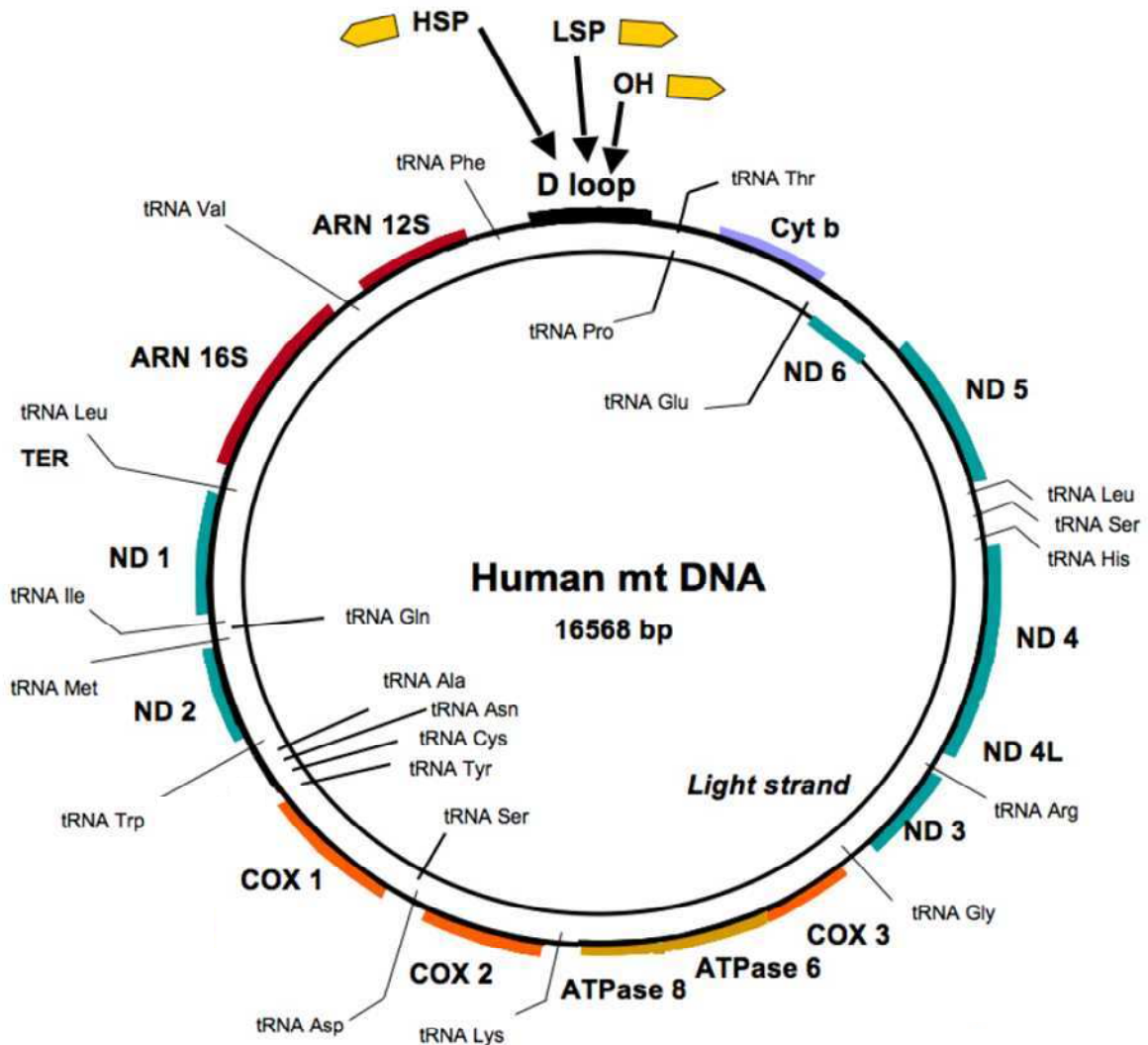
(D'après Bellance N. et al. ; Front Biosci 2009 (323))



**Légendes :** La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de quatre complexes enzymatiques (I-IV) et de deux substrats intermédiaires, le coenzyme Q et le cytochrome C. Le  $NADPH^+ + H^+$  et le  $FADH_2$  produits sont oxydés par la chaîne respiratoire, ce qui établit un gradient électrochimique de protons, qui sert à l'ATP synthase (complexe V) pour produire de l'ATP. **Abréviations :** mtDNA : ADN mitochondrial ; nDNA : ADN nucléaire.

**Figure 21.** Organisation de l'ADN mitochondrial.

(D'après Bellance N. et al. ; *Front Biosci* 2009 (323))



**Légendes :** L'ADN mitochondrial code pour 22ARNt, 2 ARNr (12S et 16S) et 13 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

**Abréviations :** ATPase 6 et 8 : Sous-unités de l'ATP synthase ; Cyt b : Cytochrome b ; COX1-3 : Sous-unités de la Cytochrome c oxydase ; HSP et LSP : Promoteurs de la réplication ; OH : Origine de la transcription ; ND1-6 : Sous-unités de la NADPH deshydrogénase.

tor 1- $\alpha$ ), qui ordonnent la réponse biogénique suite à différents stimuli. La biogenèse mitochondriale peut ainsi être activée par l'exercice physique, le froid ou l'existence d'un stress mitochondrial (325) (Figure 22). PGC1- $\alpha$  active alors de nombreux facteurs de transcription, comme NRF1 (Nuclear respiratory factor 1) ou NRF2 (Nuclear respiratory factor 2), qui permettent l'activation de la transcription de gènes codant pour des protéines mitochondriales, notamment mtTFA (Mitochondrial transcription factor A). Celui-ci est impliqué dans la transcription et la réplication de l'ADNmt (324, 326).

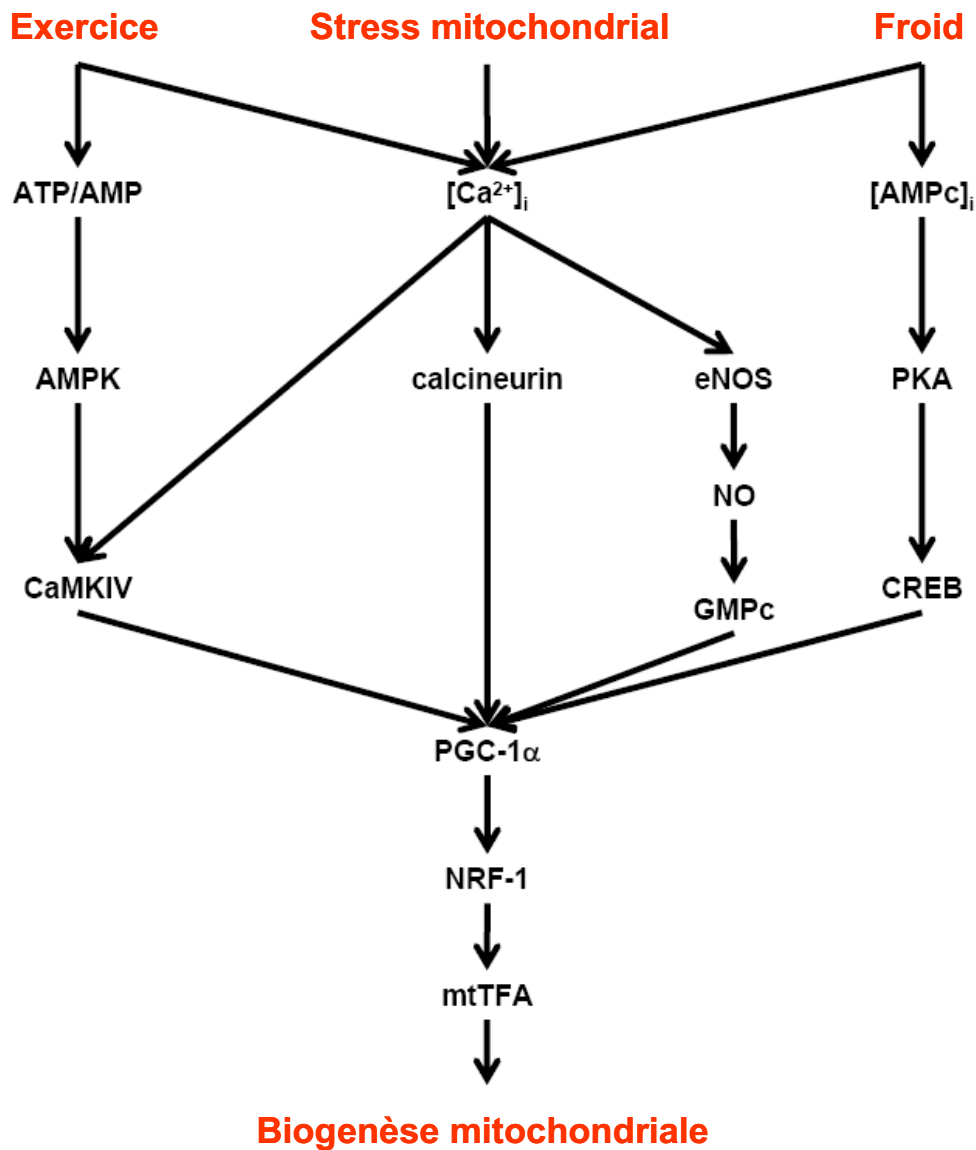
Une augmentation de la biogenèse mitochondriale dans les CML d'asthmatiques sévères a ainsi été retrouvée et résulte d'une perturbation initiale de l'homéostasie calcique (327). Celle-ci engendre l'activation successive de PGC1- $\alpha$ , NRF1, mtTFA et a pour conséquence, un excès de prolifération cellulaire (327).

### *Rôle de p53*

La protéine p53 est essentielle pour le maintien du nombre de copies de l'ADNmt (328-330), comme en témoigne, par exemple, la diminution d'environ 50% du nombre de copies d'ADNmt retrouvée dans des fibroblastes issus de souris KO pour p53 (329). Il est possible que cet effet résulte notamment de la fonction transactivatrice de p53 sur p53R2, cette ribonucléotide réductase ayant été impliquée dans le maintien de l'ADNmt dans le muscle strié (331) (Tableau 5). Cette enzyme cytoplasmique, homodimère constituée de deux sous-unités R1 et deux sous-unités R2, ces dernières étant transactivées par p53, catalyse en effet la réduction des nucléosides diphosphates (NDP) en dDNP, étape limitante dans la synthèse d'ADN (332). De plus, une interaction physique directe entre l'extrémité C-terminale de la protéine p53 et le facteur de transcription mtTFA a été démontrée dans des cellules de cancer épidermoïde, et contribue également à la transcription et la réplication de l'ADNmt (333). Par ailleurs, la protéine p53 joue également un rôle central dans la stabilité et la répara-

**Figure 22.** Voies d'activation de la biogenèse mitochondriale.

(Adapté de Lee H.C. et al. ; *Int J Biochem Cell Biol* 2005 (325))



**Abréviations :** AMPK : Adénosine monophosphate kinase ; ATP/AMP : Adénosine (tri/mono) phosphate ; CamKIV : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV ; CREB : cAMP response element-binding ; mtTFA : Mitochondrial transcription factor A ; NO : Monoxyde d'azote ; NOS : NO synthase ; PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-α ; NRF1 : nuclear respiratory factor 1 ; PKA : Protéine kinase A.

tion de l'ADNmt, d'une part grâce à son activité 3'-5' exonucléasique (334) et, d'autre part, en favorisant l'activité de la mtDNA polymérase  $\gamma$  (335).

Dans le muscle, strié uniquement, un lien entre p53 et biogenèse mitochondriale a pour la 1<sup>ère</sup> fois été établi dans un modèle murin de souris KO pour p53 (336). Dans ce modèle, l'inactivation de p53 conduisait à une diminution d'expression protéique de PGC1- $\alpha$  et de la densité mitochondriale en microscopie électronique, sans cependant que le mécanisme déterminant cette réponse soit explicité. Une séquence consensus de p53 a toutefois été identifiée dans le promoteur du gène codant pour PGC1- $\alpha$  (337), suggérant un potentiel rôle de p53 dans la régulation de l'expression de cette protéine. En revanche, p53 est également capable de transactiver directement mtTFA dans le muscle strié (330) (Tableau 5). Dans ce modèle murin de souris KO pour p53, l'inactivation de p53 était ainsi associée à une diminution d'expression de mtTFA au niveau protéique et transcriptionnel, sans modification de celles de PGC1- $\alpha$  ou de NRF1 (330). Il en résultait une diminution de la densité mitochondriale (330). Par conséquent, ces différents travaux démontrent que la protéine p53 stimule la biogenèse mitochondriale dans le muscle strié. Toutefois, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune donnée concernant le rôle de p53 dans la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique.

#### 4. Rôle de p53 dans le métabolisme énergétique

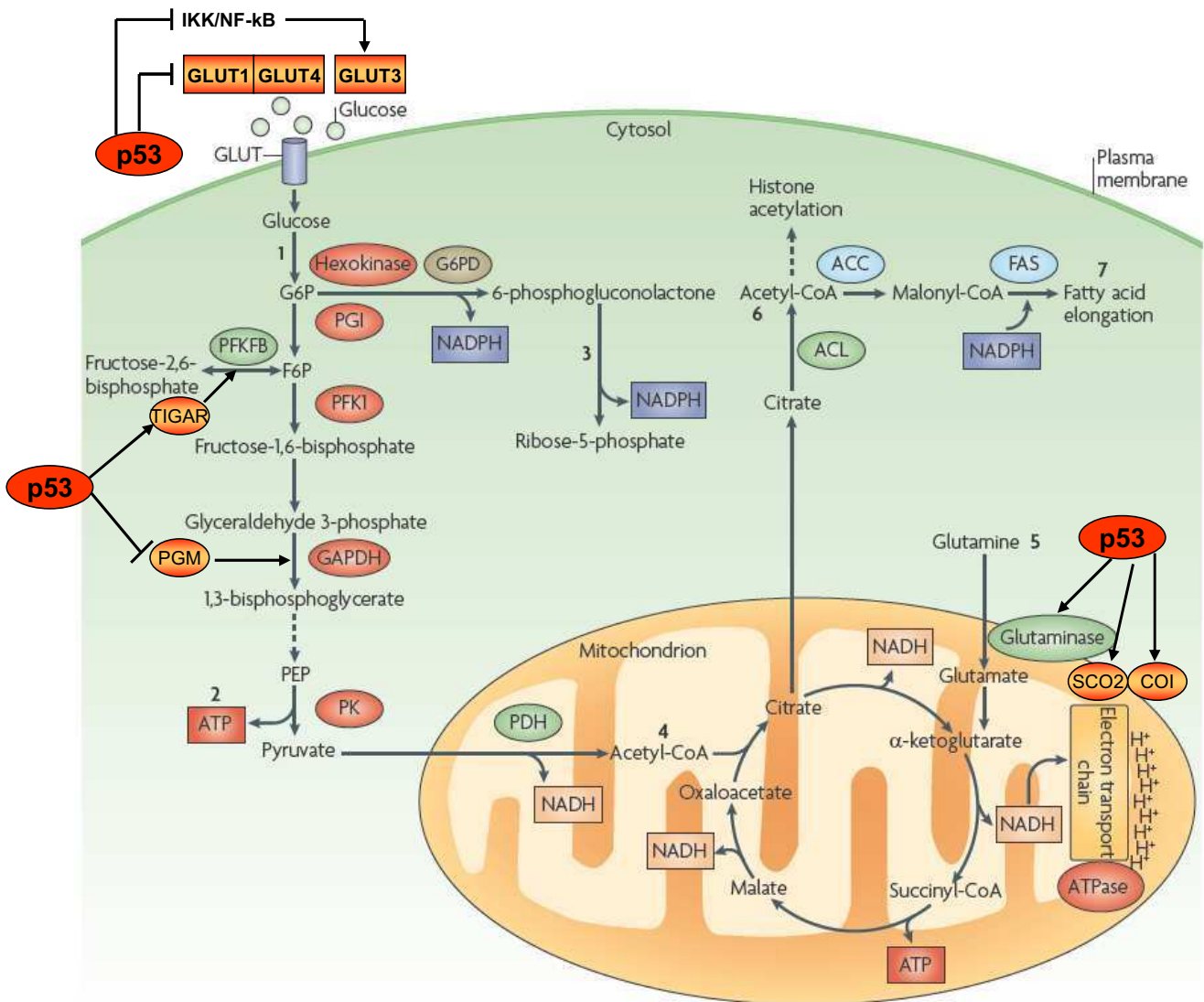
##### *Généralités*

Pour produire de l'énergie, les cellules utilisent trois voies métaboliques principales, à savoir la glycolyse anaérobie, la glycolyse aérobie et la voie des pentoses phosphates (Figure 23). Brièvement, le glucose pénètre dans la cellule grâce à des transporteurs du glucose (GLUT), puis est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par l'hexokinase (338). Après plusieurs intermédiaires métaboliques, le G6P peut, d'une part, être métabolisé en ATP et pyruvate par

**Figure 23.** Principales voies métaboliques cellulaires.

(Adapté de Buchakjian M. R. et al. ; Nat Rev Mol Cell Biol 2010 (338))

## Anaerobic glycolysis



## Aerobic glycolysis

**Légendes :** Les principales voies métaboliques de la cellule sont représentées : glycolyse anaérobie (1, 2), voie des pentoses phosphates (3) et glycolyse aérobie (4, 5). La protéine p53 oriente le métabolisme énergétique vers la glycolyse aérobie, en favorisant les phosphorylations oxydatives au détriment de la glycolyse anaérobie.



la voie de la glycolyse anaérobie, ou d'autre part, produire du ribose-5-phosphate et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) par la voie des pentoses phosphates. Le pyruvate produit lors de la glycolyse anaérobie peut également être métabolisé en acétyl-CoA, utilisé dans le cycle de Krebs pour produire deux molécules d'ATP et six molécules de NADH par molécule de glucose. Cet apport de NADH est nécessaire au déroulement des phosphorylations oxydatives mitochondriales, aboutissant à la production d'ATP. D'autres acides aminés peuvent aussi être utilisés par le cycle de Krebs, comme la glutamine, transformée en glutamate par la glutaminase.

La protéine p53 peut agir à plusieurs niveaux de ces différentes voies métaboliques, pour, *in fine*, orienter le métabolisme énergétique vers la glycolyse aérobie, en favorisant les phosphorylations oxydatives au détriment de la glycolyse anaérobie.

#### *Glycolyse aérobie*

La protéine p53 favorise ainsi les phosphorylations oxydatives (339, 340). En effet, elle transactive le gène SCO2 (Synthesis cytochrome c oxydase 2) (341) qui permet l'assemblage de la cytochrome c oxydase au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire des électrons (Figures 20, 23), ainsi que le gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome c oxydase, COI (342) (Figure 23, Tableau 5). Il existe par ailleurs une régulation post-transcriptionnelle de la sous-unité COXII de la cytochrome c oxydase par p53 (343). En outre, p53 transactive aussi la glutaminase, permettant la métabolisation de la glutamine en glutamate, et son entrée dans le cycle de Krebs (344) (Figure 23, Tableau 5).

#### *Glycolyse anaérobie*

A l'inverse, p53 réduit le rendement de la glycolyse anaérobie (338-340). En effet, elle diminue l'expression de plusieurs transporteurs du glucose, par transrépression directe des

gènes GLUT1 et 4 (345) (Tableau 5), ou en diminuant, de façon indirecte, l'expression de GLUT3 via *une* inhibition de la voie IKK (IkB kinase)/NF-kB (346) (Figure 23). Par ailleurs, p53 diminue aussi l'expression de l'enzyme glycolytique PGM (Phosphoglycerate mutase) (347), qui catalyse la transformation du 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate (Figure 23). La protéine p53 peut également transactiver le gène TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*), qui déphosphoryle le fructose-2,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate, celui-ci étant alors redirigé vers la voie des pentoses phosphates (305, 348) (Figure 23, Tableau 5).

#### 5. Rôle de p53 dans la régulation du stress oxydant

Selon le niveau et la durée d'exposition à un stress cellulaire, p53 peut également exercer une fonction pro- ou anti-oxydante (349). Ainsi, lorsque le stress cellulaire est faible, elle peut diminuer la concentration des ROS en transactivant plusieurs gènes anti-oxydants, tels que TIGAR (305), les sestrines (350), p53INP1 (p53-induced nuclear protein 1) (351), ALDH4 (Aldehyde dehydrogenase-4) (352) ou la MnSOD (Manganese superoxyde dismutase) (353) (Tableau 5). En effet, par exemple, la transactivation de TIGAR oriente le fructose-6-phosphate vers la voie des pentoses phosphates et favorise la production de NADPH, essentiel à l'activité anti-oxydante de la glutathion (305). De même, les sestrines permettent de restaurer l'activité peroxydase des peroxyredoxines (350). La MnSOD, enzyme localisée dans la matrice mitochondriale, permet, quant à elle, la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. De façon indirecte, la protéine p53 peut également diminuer le stress oxydant par la transactivation de p21, qui stabilise le facteur de transcription NRF2 et favorise ainsi son activité (354), NRF2 transactivant plusieurs gènes anti-oxydants (355).

A l'inverse, notamment quand la cellule est exposée à un stress important, p53 peut également exercer un effet pro-oxydant, conduisant alors à la mort cellulaire, en transactivant certains

gènes, comme NOXA (ou PMAIP1, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), PUMA et PIG3 (p53-inducible gene 3) (339) (Tableau 5).

#### 6. Rôle de p53 dans la défense anti-inflammatoire

Il y a également de plus en plus d'arguments qui semblent suggérer un rôle de la protéine p53 en tant que potentiel inhibiteur de l'inflammation (308). Ainsi, dans des modèles murins, il a été montré que les manifestations de maladies auto-immunes, comme l'arthrite rhumatoïde ou l'encéphalomyélite auto-immune, étaient plus sévères chez les souris KO pour p53 par rapport aux souris sauvages (356, 357), vraisemblablement par majoration de la production de cytokines pro-inflammatoires. De même, l'infiltrat inflammatoire pulmonaire, et notamment l'infiltrat éosinophilique (358), observé dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, est considérablement accru dans des souris KO pour p53 ou transgéniques exprimant une forme mutée de p53 (358, 359). Par ailleurs, la croissance des plaques d'athérosclérose est accélérée, associée à une augmentation du nombre de macrophages activés au sein des plaques, dans des souris KO pour p53 (308, 360).

Ces différents éléments suggèrent donc un possible défaut d'activation du système immunitaire en cas d'inactivation ou de perte de fonction de la protéine p53 (361). Une des hypothèses mécanistiques avancées pour expliquer ce rôle anti-inflammatoire de p53 serait son effet inhibiteur sur la voie NF-kB (361). En effet, NF-kB est un facteur de transcription favorisant la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, telles le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 ou l'IL-6 (361). Or, l'expression de ces cytokines est augmentée dans le thymus de souris KO pour p53 (361), suggérant une possible modulation de la voie NF-kB par p53 dans les processus inflammatoires. En effet, p53 est connue pour réprimer la transcription de plusieurs gènes dépendants de NF-kB (362), comme l'IL6 (363) ou la Cox-2

(Cyclooxygénase-2), isoforme inductible de la Cox qui catalyse la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (364).

# **Chapitre II :**

# **Matériel et méthodes**

## II-1. Mesures du NO exhalé chez l'asthmatique

### A. Appareils de mesure du NO exhalé

La mesure du NO exhalé chez l'asthmatique est réalisée au moyen de deux appareils, EndoNO (SERES, France) et NIOX MINO<sup>®</sup> (Aerocrine AB, Suède), dont le principe repose respectivement sur la chimioluminescence et l'électroluminescence (Figure 24).

La technique de référence est celle de la chimioluminescence, qui consiste à compter le nombre de photons émis lors du retour à l'état stable des molécules de dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) produites par la réaction du NO en présence d'excès d'ozone (O<sub>3</sub>), selon les formules suivantes :  $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$  et  $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{photon}$ . Le signal lumineux mesuré est alors proportionnel à la concentration de NO dans le milieu étudié et l'appareil indique une concentration en ppb (10<sup>-9</sup> : part par milliard ou billion, en terminologie anglo-saxonne, exprimant un rapport de volumes). Cette technique nécessite un appareillage volumineux et onéreux, dont l'utilisation est réservée à certains services d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires. La mesure du NO exhalé par des procédés électrochimiques, quant à elle, est basée sur la réduction du NO en métabolites dosables en phase aqueuse. Son utilisation très simple et son coût considérablement moindre en font une technologie plus propre à l'utilisation ambulatoire.

### B. Techniques de mesure du NO exhalé

#### 1. Mesure par chimioluminescence

La mesure du NO exhalé est effectuée avant les mesures pléthysmographiques susceptibles de modifier la valeur du NO exhalé, en respectant les critères définis par les recommandations

**Figure 24.** Appareils de mesure du NO exhalé.



**EndoNO (Seres)**



**NIOX MINO® (Aerocrine AB)**

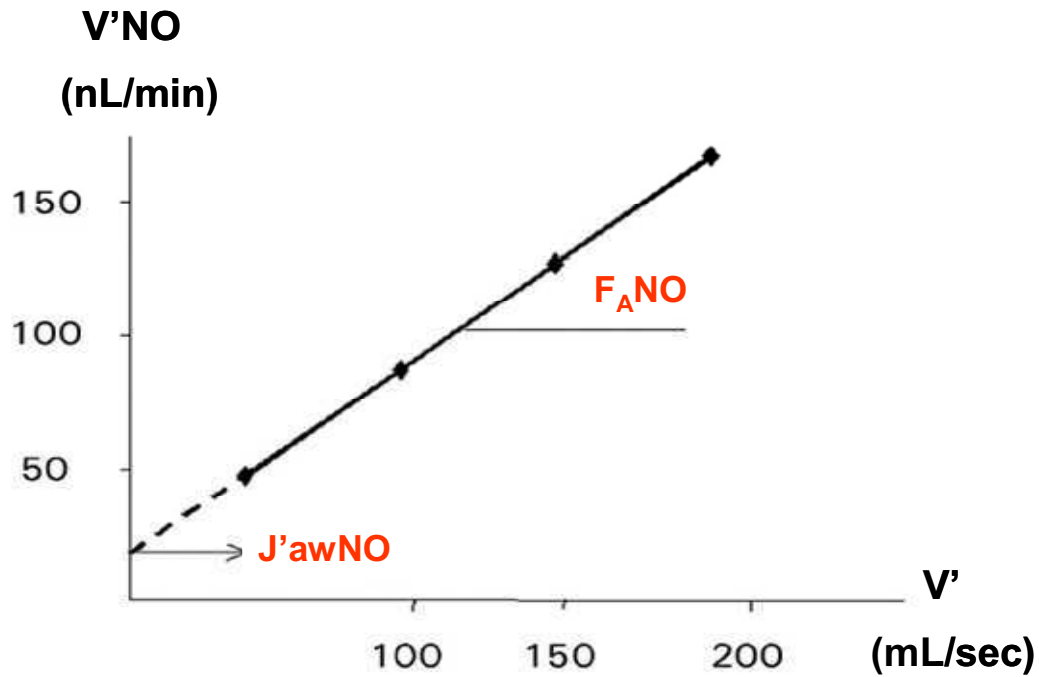
internationales de l'American Thoracic Society (124). Ainsi, l'expiration est réalisée dans un embout buccal à partir de la capacité vitale contre une résistance de 10 cmH<sub>2</sub>O, ce qui a pour effet de relever le voile du palais et d'isoler les fosses nasales (124). La 1<sup>ère</sup> partie de l'expiration est exclue, car elle dépend non seulement du NO ambiant, mais aussi de la nature de l'inspiration, nasale ou buccale, et de la durée de l'apnée (124). La variation du débit expiratoire doit être inférieure à 10% et la durée de l'expiration doit être supérieure à six secondes, afin d'obtenir un plateau de NO d'au moins dix secondes (124). L'appareil de mesure est par ailleurs calibré de façon journalière.

D'après le modèle bicompartimental décrit par Tsoukias et George (119, 120), l'étude de la variation du F<sub>E</sub>NO en fonction du débit expiratoire a permis de calculer les participations respectives du compartiment distal, *i.e.* la fraction de NO alvéolaire ou F<sub>A</sub>NO, et du secteur bronchique ou J'<sub>aw</sub>NO, selon la relation linéaire existant entre le débit de NO (V'<sub>NO</sub>) et le débit expiratoire (V'). Chaque point de cette droite répond donc à l'équation :  $V'_{NO} = F_{A}NO \times V' + J'_{aw}NO$ , où la pente correspond à la fraction alvéolaire de NO (F<sub>A</sub>NO) et l'intersection sur l'axe des ordonnées, à la quantité maximale de NO que peut fournir la bronche (J'<sub>aw</sub>NO) (Figure 25). La répétition des mesures à différents débits permet, par ailleurs, d'accroître la fiabilité des résultats. En pratique, quatre à six mesures à différents débits ventilatoires compris entre 45 et 170 mL/sec, ont été effectuées pour déterminer de façon fiable F<sub>A</sub>NO et J'<sub>aw</sub>NO. Par ailleurs, la possible augmentation artificielle de la fraction alvéolaire de NO, liée à une rétrodiffusion du NO bronchique dans l'espace alvéolaire, a été corrigée selon la formule de P. Condorelli (122), d'après l'équation suivante :  $F_{A}NO^{corr} = F_{A}NO - J'_{aw}NO/740$ .



**Figure 25.** Relation linéaire entre débit expiratoire et débit de NO.

(Adpaté de Mahut B. ; Rev Mal Respir 2006 (123))



$$V'NO = F_A'NO \times V' + J'awNO$$

**Légende :**  $F_A'NO$  : Fraction alvéolaire de NO ;  $J'awNO$  : NO bronchique ; NO : Monoxyde d'azote ;  $V'$  : Débit expiratoire ;  $V'NO$  : Débit de NO.

## 2. Mesure par électroluminescence

Comme précédemment, la mesure du NO exhalée précède la réalisation des mesures pléthysmographiques. Cette approche ne permet qu'une analyse à un débit unique, fixé par le constructeur, *i.e.* 50 mL/sec. De ce fait, l'estimation des composantes alvéolaire et bronchique du NO exhalé n'est pas possible.

## **II-2. Analyses *in vivo* chez la souris sensibilisée**

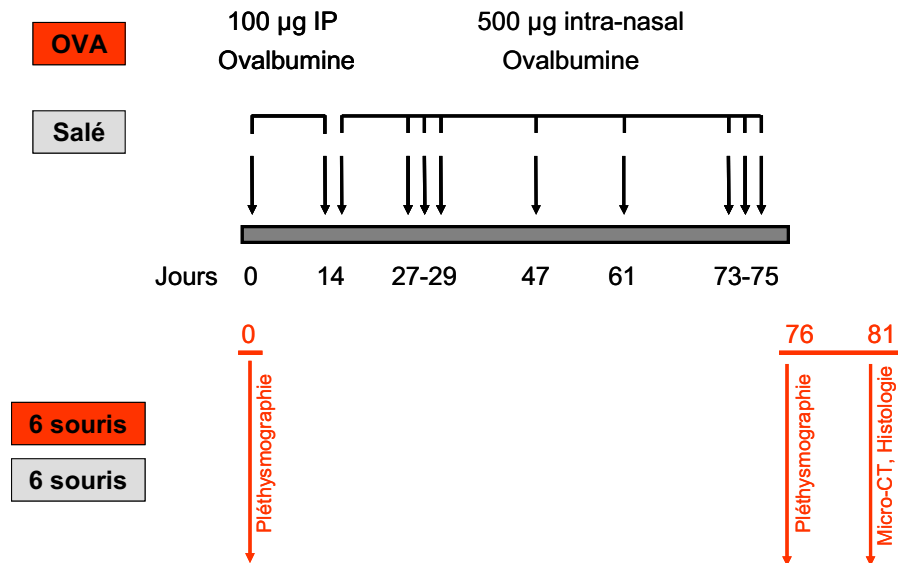
### **A. Modèles murins de sensibilisation allergique**

Les souris BALB/c proviennent de l'élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). L'ensemble des procédures concernant les modèles murins de sensibilisation allergique a au préalable été approuvé par le Comité d'éthique sur l'expérimentation animale pour la région Aquitaine.

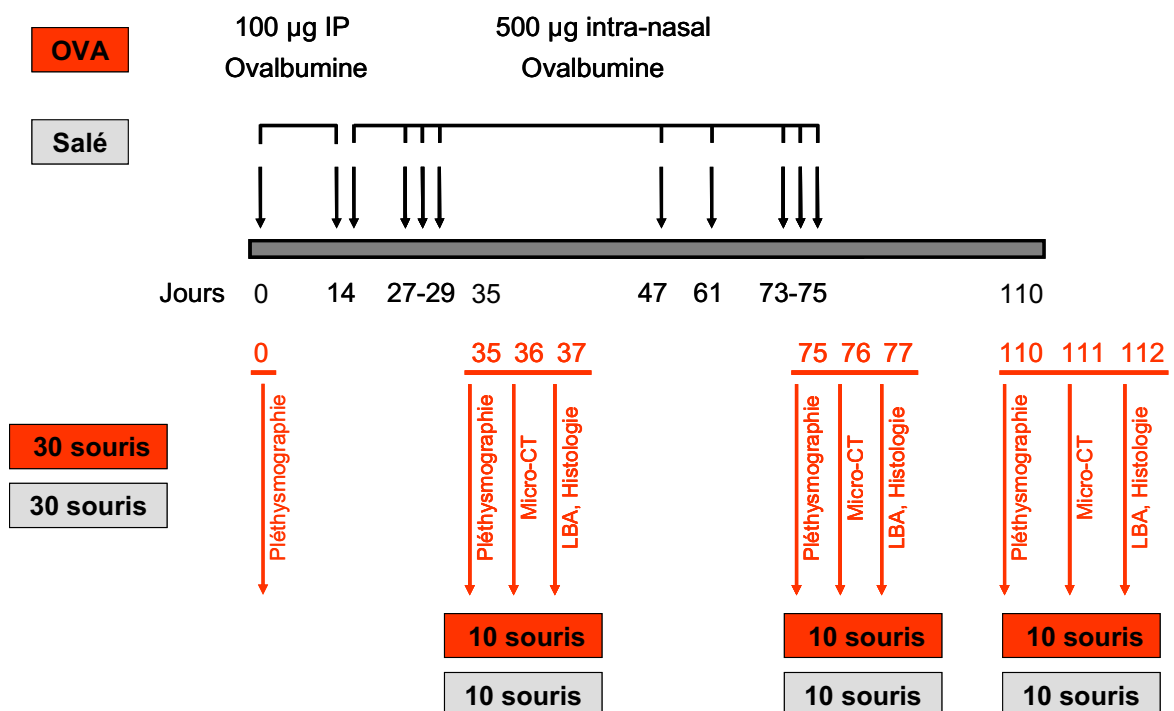
Le 1<sup>er</sup> modèle de sensibilisation est un modèle murin de remodelage et d'inflammation des voies aériennes chez les souris BALB/c, validé dans la littérature (365). Ce modèle de sensibilisation chronique est en effet connu pour induire une HRB, un infiltrat inflammatoire des voies aériennes et une hyperplasie musculaire lisse bronchique (365). L'allergène utilisé est l'ovalbumine (OVA, Sigma-Aldrich), sans hydroxyde d'aluminium, diluée dans une solution de sérum salé isotonique. La 1<sup>ère</sup> phase de la sensibilisation consiste en deux injections intra-péritonéales de 100 µg d'OVA, à J0 et J14, suivies d'instillations intra-nasales de 500 µg d'OVA, à J14, J27, J28, J29, J47, J61, J73, J74 et J75 (Figure 26). Les injections intra-nasales sont administrées au cours d'une courte anesthésie générale de 15 minutes par une solution de kétamine (Panpharma) à 50 µg/g de poids et de xylazine (Sigma-Aldrich) à 5 µg/g de poids. Les souris témoins bénéficient, quant à elles, d'administrations de sérum salé isotonique, sans hydroxyde d'aluminium, par voies intra-péritonéale et intra-nasale selon un calendrier identique aux animaux sensibilisés. Ce 1<sup>er</sup> modèle de sensibilisation est réalisé sur 12 souris femelles âgées de 5 semaines, avec 6 animaux témoins et 6 animaux sensibilisés. Dans le 2<sup>nd</sup> travail exposé dans le Chapitre III-2.B. de cette thèse, 3 modèles murins de sensibilisation à l'OVA ont par la suite été utilisés (Figure 27), chaque groupe étant constitué de 20 souris femelles âgées de 5

**Figure 26.** 1<sup>er</sup> modèle murin de sensibilisation à l'ovalbumine.

(Adapté de Henderson W. R. et al. ; *Am J Respir Crit Care Med* 2002 (365))



**Figure 27.** 2<sup>nd</sup> modèle murin de sensibilisation à l'ovalbumine.



semaines, avec 10 animaux témoins et 10 animaux sensibilisés. Le 1<sup>er</sup> modèle de sensibilisation correspond à celui de Henderson et coll. (365), décrit ci-dessus. Le 2<sup>nd</sup> modèle est un modèle de sensibilisation plus court, comportant deux injections intra-péritonéales de 100 µg d'OVA, à J0 et J14, suivies d'instillations intra-nasales de 500 µg d'OVA, à J14, J27, J28, J29. Enfin, le 3<sup>ème</sup> modèle de sensibilisation est basé sur le même schéma de sensibilisation que le 1<sup>ème</sup> modèle, mais avec un arrêt de la sensibilisation de 5 semaines avant l'analyse de la réactivité bronchique, l'imagerie des voies aériennes par micro-scanner et l'étude cytologique et histologique des bronches. Les jours où sont réalisées ces différentes analyses sont spécifiés sur les Figures 26 et 27.

## **B. Mesure de la réactivité bronchique par pléthysmographie**

### 1. Pléthysmographie chez l'animal vigile

La fonction respiratoire est évaluée, de façon non invasive, par un pléthysmographe corporel total (Emka Technologies, France) pour animal vigile (366). L'animal est placé dans une cage sans contrainte et peut boire *ad libitum*. Le test de provocation ventilatoire consiste en l'administration par voie nébulisée de métacholine (Sigma-Aldrich), à concentrations croissantes (1-32 mg/mL). La réactivité bronchique non spécifique est exprimée par le paramètre Penh (Enhanced pause) (366). A la fin du test, une inhalation de bronchodilatateur de courte durée d'action (salbutamol) est effectuée, afin de soulager la dyspnée le cas échéant.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio de Penh mesuré en réponse à 8 mg/mL de métacholine par rapport à la réponse obtenue avec du sérum salé isotonique.

## 2. Mesure de la résistance chez l'animal trachéotomisé

Dans la mesure où l'utilisation du Penh reste encore controversée à l'heure actuelle (367, 368), la réactivité bronchique a également été évaluée par la mesure des résistances pulmonaires totales (EMKA Technologies, France). Brièvement, l'animal est anesthésié par injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine (Panpharma) à 50  $\mu\text{g/g}$  de poids et de xylazine (Sigma-Aldrich) à 5  $\mu\text{g/g}$  de poids, puis curarisé par du bromure de rocuronium à 0,8 mg/kg de poids. La souris est alors trachéotomisée et ventilée mécaniquement sur un respirateur dédié (MiniVent Type 845, Harvard Apparatus), à une fréquence respiratoire de 250/min et un volume courant de 150  $\mu\text{L}$ . Comme précédemment, le test de provocation ventilatoire consiste en l'administration par voie nébulisée de métacholine (Sigma-Aldrich), à concentrations croissantes (1-32 mg/mL).

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio des résistances pulmonaires totales mesurées en réponse à 8 mg/mL de métacholine par rapport à la réponse obtenue avec du sérum salé isotonique.

### **C. Imagerie des voies aériennes par micro-scanner**

L'analyse des voies aériennes par micro-scanner (GE Healthcare eXplore locus) est effectuée sur des souris anesthésiées, intubées et ventilées sur un respirateur dédié (Alphalab, Minerve, France). L'acquisition des images est réalisée à la fin de l'expiration grâce à un outil de synchronisation spirométrique, sans injection de produit de contraste.

Brièvement, le principe de l'imagerie des voies aériennes chez la souris, exposé en détail dans le Chapitre III-2.A. de cette thèse, consiste à réaliser une reconstruction orthogonale à l'axe principal des bronches, pour laquelle 12 bronches sont analysées, identiques pour toutes les souris. Sur cette reconstruction orthogonale, la lumière bronchique est manuellement

délimitée et, dans la mesure où la limite externe de la paroi bronchique n'est pas clairement individualisable chez la souris, une nouvelle région circulaire est circonscrite, également de façon manuelle, afin de mesurer la densité péri-bronchique.

Dans le 2<sup>nd</sup> travail exposé dans le Chapitre III-2.B. de cette thèse, l'analyse des voies aériennes par micro-scanner est réalisée selon une méthode différente, semi-automatique. Le traitement des images post-acquisition se déroule en effet en 4 étapes avec, tout d'abord, une segmentation automatique des voies aériennes, suivie d'une dilatation de 8 voxels. Puis, est effectuée une nouvelle segmentation des voies aériennes, et finalement, une soustraction manuelle de la lumière bronchique, permettant de déterminer la densité péribronchique. Le principal avantage de cette nouvelle méthode de détermination de la densité péribronchique réside dans le temps nécessaire à l'analyse des coupes scannographiques, de 6 à 8 minutes pour la méthode semi-automatique *versus* 40 minutes pour la méthode manuelle. En outre, elle permet une analyse globale et tridimensionnelle de l'arbre bronchique chez la souris.

#### **D. Analyses cytologique et histologique des voies aériennes**

Un LBA est réalisé après sacrifice des animaux dans les 6h suivant le micro-scanner, après injection intra-péritonéale de kétamine (Panpharma) et de xylazine (Sigma-Aldrich). Il permet le compte des cellules inflammatoires infiltrant les voies aériennes.

Les poumons sont ensuite prélevés, fixés, puis inclus en paraffine. Les analyses histologiques sont pratiquées sur des coupes de 4 µm d'épaisseur, grâce, d'une part, aux colorations par l'HES (Hématoxyline-Éosine-Safran) ou le trichrome de Masson (Sigma-Aldrich), et, d'autre part, à un marquage à l' $\alpha$ -actine musculaire lisse (clone 1A4, Dako). Ces colorations et marquage immunologiques permettent respectivement d'étudier l'infiltrat inflammatoire au sein de l'espace

péri-broncho-vasculaire et de mesurer la surface des fibres de collagène dans les voies aériennes et celle des fibres musculaires lisses.

Ces différents paramètres témoignant de l'inflammation ou du remodelage bronchique sont évalués à différents grossissements (x 100 ou x 400), grâce au logiciel de reconnaissance de l'image Quancoul<sup>®</sup> (Bordeaux, France) (369), basé sur l'analyse des couleurs. Ce système d'analyse associe un microscope Optiphot (Nikon), sur lequel est montée une caméra vidéo couleur (Sony). L'originalité de ce procédé est de traiter des images en couleur, par l'intermédiaire de trois paramètres, à partir d'une acquisition classique en rouge, vert et bleu. La densité optique correspond à une vision en noir et blanc de l'image colorée. Les deux autres paramètres sont la teinte et la densité de teinte. Ce système présente l'avantage de diminuer fortement les variations de couleurs liées à des différences d'intensité d'éclairage de la lame, ou d'intensité de coloration d'une expérimentation à l'autre. A partir des images numérisées, l'analyse compartimentale de la paroi bronchique permet ainsi de délimiter l'épithélium, le chorion muqueux et le muscle lisse, ainsi que leur surface.

Les paramètres d'intérêt relevant de l'inflammation et/ou du remodelage bronchique sont le nombre de cellules inflammatoires infiltrant l'espace péri-broncho-vasculaire, la surface du mur bronchique normalisée à la longueur de la membrane basale, la surface musculaire lisse également normalisée, l'épaisseur de la membrane basale et la surface de la fibrose péri-bronchique.



## II-3. Analyses *in vitro* des CML bronchiques humaines

### A. Culture cellulaire

#### 1. Culture primaire de CML bronchiques humaines

Les différentes expérimentations *in vitro* ont été réalisées à partir de prélèvements broncho-pulmonaires issus de 3 groupes de patients : i) des sujets ayant une fonction respiratoire normale, qu'ils soient fumeurs ou non, ii) des patients présentant une BPCO post-tabagique d'après la classification GOLD (370), et iii), des asthmatiques, de différents stades de sévérité selon la classification GINA (146). Les deux premiers groupes de patients sont utilisés à titre de groupes témoins par rapport au groupe des asthmatiques au cours des diverses expérimentations.

Les spécimens broncho-pulmonaires humains proviennent ainsi, pour les sujets témoins ou BPCO, de zones macroscopiquement saines de pièces opératoires de pneumonectomie ou de lobectomie, pratiquées le plus souvent pour carcinome bronchique primitif (65). Quant aux patients asthmatiques, les prélèvements sont issus de biopsies bronchiques perfibroscopiques. Après recueil, les spécimens bronchiques sont placés dans un milieu de culture stérile (DMEM, Dulbecco's modified eagles medium, Invitrogen) contenant 0,5 U/mL de pénicilline, 0,5 mg/mL de streptomycine et 0,25 µg/mL d'amphotéricine B (Invitrogen). Ils sont ensuite disséqués sous microscope binoculaire afin d'extraire les tissus non désirés, *i.e.* épithélium, chorion muqueux, tissus adipeux et pulmonaire. Chaque faisceau de muscle lisse est rincé avec ce même milieu et découpé en fragments de 2 à 3 mm<sup>2</sup> de surface. Les explants musculaires lisses sont déposés dans des plaques de culture à 6 puits et cultivés avec 2 mL de milieu DMEM, contenant les antibiotiques et antimycotique sus-cités, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 1% d'acides aminés non essentiels (Sigma-

Aldrich) et 1mM de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich). Par ailleurs, le risque de contamination par les mycoplasmes est prévenu de façon systématique par l'adjonction au milieu de culture d'un antibiotique dérivé de la famille des quinolones (MRA, Mycoplasma removal agent, MP Biomedicals), à la concentration de 0,5 µg/mL. Celui-ci a pour effet d'inhiber l'ADN gyrase des mycoplasmes, cette enzyme étant essentielle à la réplication de leur ADN. Les mycoplasmes sont en effet des bactéries ubiquitaires, appartenant à la classe des Mollicutes, dont on recense près d'une centaine d'espèces, susceptibles d'altérer le métabolisme cellulaire (371). Ils peuvent être pathogènes, mais également commensaux, et notamment des voies aériennes. En culture cellulaire, les sources de contamination habituelles sont la flore orale humaine, le sérum ou l'explant lui-même.

Les plaques de culture sont alors placées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère enrichie avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé toutes les 48 à 72 h. L'état des cellules est apprécié quotidiennement sous microscope par la bonne croissance cellulaire et l'absence de contamination bactérienne. L'aspect des CML est caractéristique par leur forme allongée et leur orientation, parallèles les unes aux autres, formant des faisceaux.

Après 8 à 10 semaines de culture, les cellules dont la confluence est supérieure à 80% sont rincées avec une solution salée de Hank's (HBSS, Hank's balanced salt solution, Invitrogen) et soumises à un 1<sup>er</sup> passage grâce à une solution contenant 0,5 g/L de trypsine et 0,2 g/L d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA, Invitrogen), puis placées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> de surface. Après une à deux semaines de culture, lorsque la confluence est de nouveau supérieure à 80%, les cellules sont soumises à un 2<sup>ème</sup> passage à la trypsine et réparties sur différents supports selon les expérimentations : plaques de culture (6, 24 ou 96 puits), flacons de culture de 25 ou 75 cm<sup>2</sup>, ou lames de culture à 8 puits.

Seuls les passages 2 à 5 sont utilisés pour éviter la différenciation des CML en fibroblastes ou en myofibroblastes. Par ailleurs, préalablement à toute expérimentation, les cellules sont

rendues quiescentes par une incubation de 24h avec un milieu de culture non supplémenté en SVF, permettant la synchronisation des cellules.

## 2. Immunophénotypage des cellules cultivées

Préalablement à toute expérimentation, la pureté des populations cellulaires ainsi cultivées est vérifiée par immunocytochimie et cytométrie en flux.

### *Immunocytochimie*

Après rinçage avec un tampon phosphaté (PBS, Phosphate buffered saline, Invitrogen), les cellules sont fixées et perméabilisées avec du méthanol (Sigma-Aldrich) à -20°C pendant 20 minutes. La saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution d'albumine bovine sérique à 3% (BSA, Bovine seric albumin, Sigma-Aldrich) diluée dans du PBS, pendant 30 minutes, à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont un anticorps monoclonal de souris anti- $\alpha$ -actine du muscle lisse humain (clone 1A4, Sigma-Aldrich) et un anticorps polyclonal de lapin anti-calponine du muscle lisse humain (clone FL-297, Santa Cruz). Ceux-ci sont dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution de PBS-BSA à 1% et incubés pendant 1h à température ambiante. Des témoins négatifs sont réalisés avec un anticorps polyclonal irrelevant de type IgG1 kappa de souris (lignée MOPC-21, Sigma-Aldrich) ou de lapin (Dako) et un anticorps monoclonal de souris anti-cytokératine 18 humaine (clone KS-B17.2, Sigma-Aldrich). Après rinçage avec une solution contenant du PBS et du polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (Tween 20 à 0,05%, Sigma-Aldrich), les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris ou de lapin, dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans une solution de PBS-BSA à 1%, et couplé à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen). Après rinçage avec du PBS, et contre-coloration des noyaux au 4',6-diamidino-2-phenylindole

dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes, les lames sont ensuite montées avec un milieu de montage dédié (Fluorescent mounting medium, Dako).

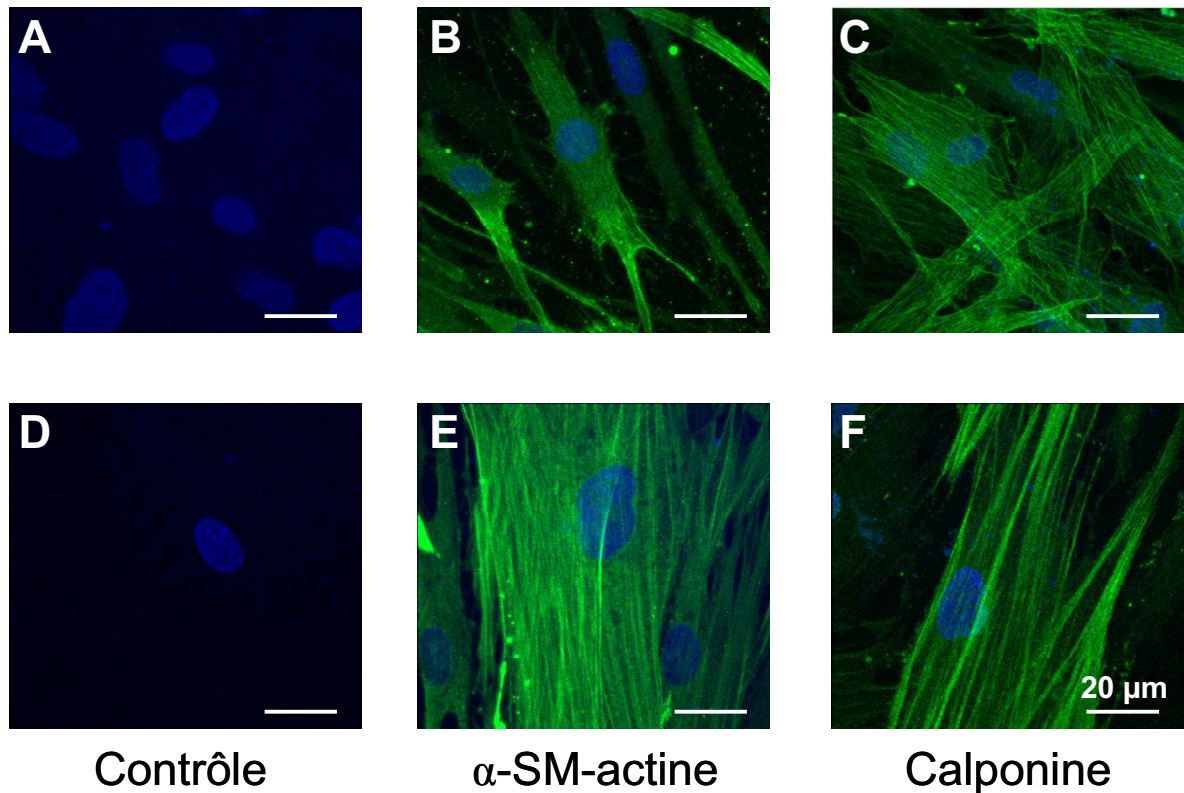
L'analyse des lames est réalisée au microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en 3 dimensions. Le phénotype musculaire lisse est confirmé si les cellules sont, d'une part, positives pour les anticorps anti- $\alpha$ -actine et anti-calponine du muscle lisse humain, et, d'autre part, négatives pour l'anticorps anti-cytokératine 18 humaine, marqueur épithélial, et les anticorps irrelevant de même isotype (Figure 28). Outre l'analyse morphologique et phénotypique des cellules, l'immunocytochimie permet également de vérifier l'absence de contamination par les mycoplasmes (371).

#### *Cytométrie en flux*

Après fixation et perméabilisation des cellules au paraformaldéhyde (PFA, Sigma-Aldrich) à 4% et saponine (Sigma-Aldrich) à 0,1%, la saturation des sites de fixation membranaire non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution de PBS-BSA à 1%. Les anticorps primaires, identiques à ceux utilisés en immunocytochimie, sont dilués dans une solution de PBS-BSA à 1% et incubés pendant 1h à 4°C. Des témoins négatifs sont réalisés avec un anticorps polyclonal irrelevant de type IgG1 kappa de souris (lignée MOPC-21, Sigma-Aldrich) ou de lapin (Dako). Après rinçage dans une solution de PBS-BSA à 1%, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris ou de lapin, couplé à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen), pendant 1h à 4°C, à l'abri de la lumière.

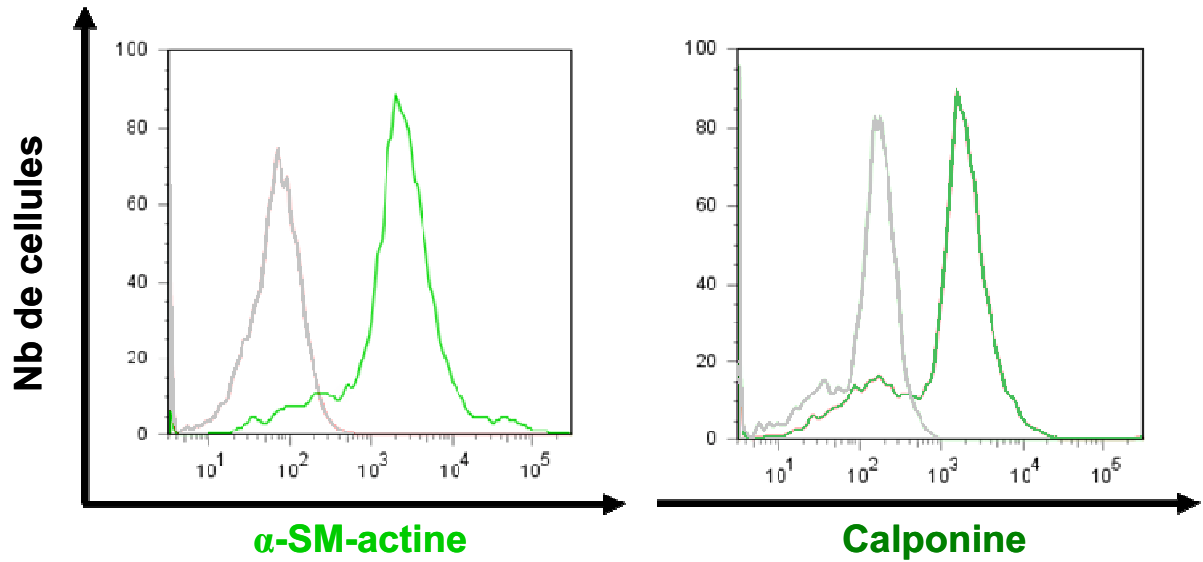
Pour chaque condition expérimentale, 5000 cellules sont analysées par le cytomètre en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson), grâce à l'utilisation du logiciel Diva<sup>®</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives. Le phénotype musculaire lisse est confirmé si les cellules ont un pourcentage de cellules positives pour l' $\alpha$ -actine musculaire lisse et la calponine supérieur à 75% (Figure 29).

**Figure 28.** Phénotypage des cellules cultivées par immunocytochimie.



**Légende :** Photographies réalisées au grossissement x60 sous microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en 3 dimensions de 20 coupes de 0,25  $\mu$ m d'épaisseur. Les cellules proviennent d'un sujet témoin (A, B, C) et d'un patient asthmatique (D, E, F). Les lames sont marquées par un anticorps anti- $\alpha$ -actine musculaire lisse (B, E), anti-calponine (C, F) ou anti-cytokératine (A, D), puis par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488<sup>®</sup>. Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.

**Figure 29.** Phénotypage des cellules cultivées par cytométrie en flux.



**Légende :** Histogrammes de distribution de la fluorescence représentant en vert l'expression de l' $\alpha$ -actine musculaire lisse ou de la calponine, et en gris, la fluorescence des cellules incubées avec l'anticorps irrelevant.

### 3. Congélation des cellules cultivées

Après confirmation du phénotype musculaire lisse et amplification des cellules, celles-ci sont utilisées à l'état frais ou congelées dans l'azote liquide. Pour cela, le culot cellulaire obtenu à partir d'un flacon de 75 cm<sup>2</sup> après centrifugation des cellules à 1500 tours/min, pendant 5 minutes à 4°C, est remis en suspension dans une solution constituée de SVF (Invitrogen) et de 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Dutscher), ce dernier étant un cryoprotecteur cellulaire. La congélation est effectuée selon un gradient de température de façon à éviter le choc thermique, par une 1<sup>ère</sup> étape de 2h à -20 °C, suivie de 12h à -80 °C, avant transfert dans l'azote liquide. La décongélation, quant à elle, est réalisée rapidement, en remettant en suspension les cellules congelées dans 1 mL de milieu de culture, avant de les remettre dans l'incubateur à 37°C dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup>. Le phénotype de ces cellules décongelées est de nouveau vérifié comme précédemment.

## **B. Interférence ARN lentivirale**

### 1. Généralités

L'étude *in vitro* des fonctions biologiques de la protéine p53 pourrait, en théorie, être envisagée grâce à l'utilisation d'agents pharmacologiques susceptibles d'inhiber p53, tel que la pifithrin- $\alpha$ . Toutefois, plusieurs arguments plaident en faveur de la non-spécificité de cet inhibiteur pharmacologique (372, 373). C'est pourquoi, le choix d'une stratégie lentivirale a été privilégié pour inhiber son expression, grâce à une expression stable au cours du temps de petits ARN interférents. En effet, l'infection d'une cellule par un lentivirus conduit à l'intégration du génome viral dans la cellule infectée (374, 375).

L'utilisation d'une telle stratégie d'interférence ARN lentivirale n'avait jamais été testée sur des cultures primaires de CML bronchiques humaines d'asthmatiques, bien que l'inhibition

d'expression du PAR2 par de petits ARN double brins interférent de 21 nucléotides (siRNA) ait déjà été objectivée dans ce type cellulaire (376). Cependant, l'effet transitoire des siRNA dans la CML bronchique constitue un facteur limitant pour l'étude *in vitro* de certaines de leurs propriétés, telles que leur aptitude à proliférer.

### *Principe des siRNA*

L'histoire de l'interférence ARN, initialement nommée "gene silencing", remonte au début des années 90 par la découverte chez la plante, puis chez *C.elegans*, d'un phénomène particulier de défense cellulaire (377-379), permettant aux cellules eucaryotes infectées par des virus à ARN de les éliminer par un mécanisme d'interférence ARN. La cellule répondait en effet à l'entrée de matériel génétique de type ARN double brin (dsRNA), par l'activation d'une cascade de signalisation aboutissant à la dégradation de l'ARN viral.

Les 1<sup>ers</sup> essais visant à réactiver la voie de l'interférence ARN dans des cellules de mammifères se sont initialement soldés par un échec. L'introduction de dsRNA de plus de 30 nucléotides activait en effet une réponse antivirale, qui conduisait à la dégradation non spécifique des transcrits d'ARN et à une extinction générale de la traduction dans les cellules hôtes. Ces effets non spécifiques impliquaient notamment l'activation de la protéine kinase R (PKR) et de l'IFN- $\gamma$ , qui engendraient des réponses cytotoxiques aboutissant *in fine* à l'apoptose de la cellule (380).

En 2001, Elbashir et coll. ont démontré que des fragments de 21 à 23 nucléotides de duplex d'ARN (siRNA) activaient efficacement l'interférence ARN *in vitro* (381). En effet, ces siRNA supprimaient l'expression de gènes dans différentes lignées cellulaires humaines, comme les HEK293 ou les cellules HeLa. Cette technique a donc permis de détruire, par coupure, les ARNm issus de la transcription d'un gène, et cela, de façon spécifique (381-385). Cette découverte a marqué l'avènement et le développement de l'interférence ARN dans



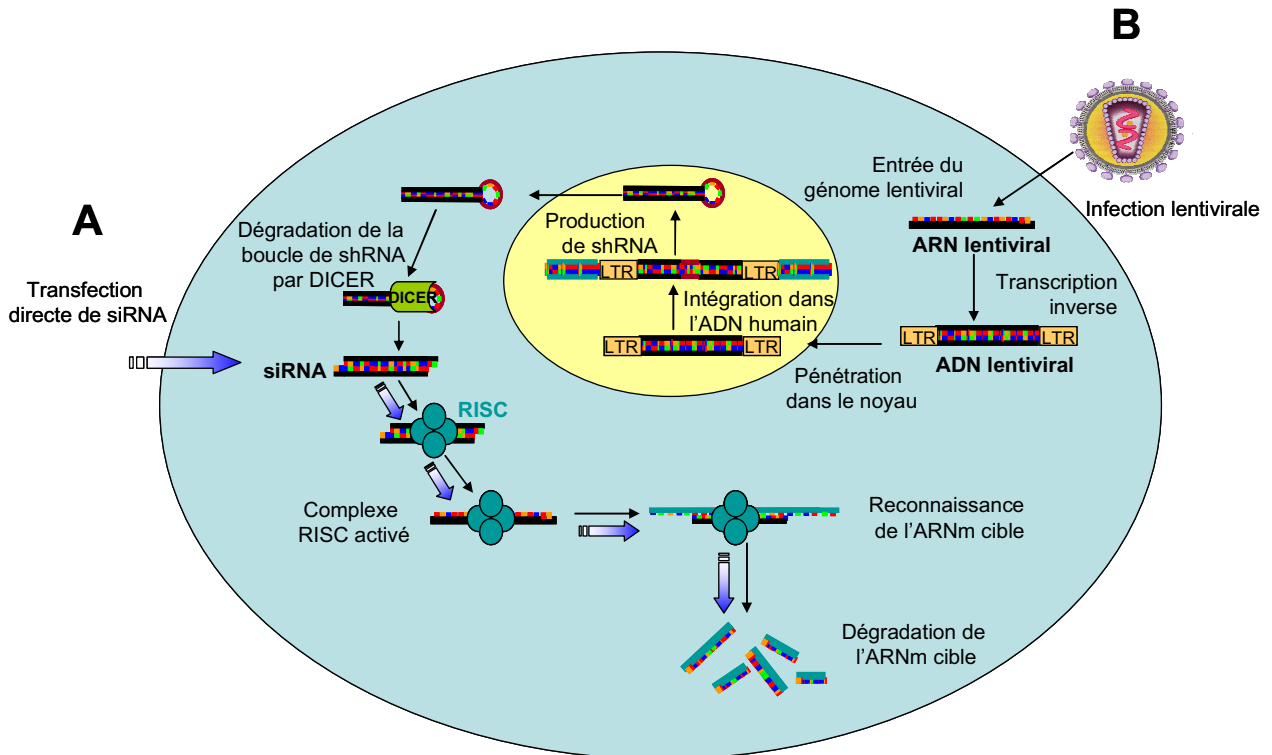
plusieurs domaines de la biologie moléculaire, de la génétique ou de la recherche sur le cancer.

Ainsi, les siRNA vont être pris en charge par un complexe multi-protéique RISC (RNA induced silencing complex), lequel va guider le brin antisens du siRNA vers l'ARNm cible (386) (Figure 30). Il en résulte une hybridation du brin anti-sens du siRNA sur l'ARNm, par complémentarité de bases. Cette hybridation va activer des nucléases contenues dans le complexe RISC (Figure 30). Celles-ci vont alors cliver l'ARNm, rendant sa traduction impossible.

#### *Principe des shRNA*

Cependant, l'effet transitoire des siRNA dans la cellule de mammifère constitue un facteur limitant pour l'étude *in vitro* de certaines fonctions biologiques, telles que la prolifération cellulaire. Pour y pallier, l'équipe d'Agamo a développé en 2002 le 1<sup>er</sup> vecteur d'expression permettant de produire *in situ* des séquences siRNA par la cellule (387). Ainsi, des vecteurs possédant les promoteurs U6 ou H1 peuvent recruter l'ARN polymérase III et permettent la transcription de petites séquences en forme d'épingle à cheveux, ou small hairpin RNA (shRNA), qui sont des duplex de 19 à 21 nucléotides. Cette stratégie consiste donc à faire produire un ARN simple brin contenant 2 séquences complémentaires et équivalentes à une séquence siRNA, ces 2 séquences complémentaires étant séparées par une courte séquence de 8 à 9 nucléotides. Lors de la transcription de cet ARN au sein de la cellule, les 2 séquences complémentaires vont s'hybrider et créer une boucle nucléotidique, correspondant à la courte séquence séparant les 2 séquences complémentaires (Figure 30). Cette boucle d'ARN s'avère être un très bon substrat pour une endonucléase nommée Dicer. Celle-ci va alors cliver la boucle nucléotidique et produire ainsi des siRNA au sein même de la cellule (Figure 30).

**Figure 30.** Mécanismes d'interférence ARN par transfection de siRNA ou production lentivirale de shRNA.



**Légende :** **A.** Le couplage du siRNA avec le complexe RISC permet la reconnaissance de l'ARNm cible ainsi que sa dégradation par les nucléases présentes au sein de ce complexe. La transfection directe de siRNA (flèche bleue) conduit également à une dégradation de l'ARNm cible, mais de façon transitoire. **B.** Après entrée du génome lentiviral dans la cellule, la transcriptase inverse permet de convertir l'ARN en ADN en dupliquant la séquence LTR en 3' aux deux extrémités de l'ADN lentiviral (représenté en noir). Après intégration dans le génome humain (représenté en bleu), il s'ensuit la production durable de shRNA qui, dans le cytosol, sont maturés en siRNA par la Dicer. **Abréviations :** LTR : Long terminal repeat ; RISC : RNA induced silencing complex ; shRNA : Small hairpin RNA ; siRNA : Small interfering RNA.

Comme décrit précédemment, ces siRNA sont pris en charge par le complexe RISC, qui entraîne la dégradation de l'ARNm cible.

En parallèle, des vecteurs viraux ont été développés, essentiellement dérivés des adénovirus ou des lentivirus, pour imposer une interférence ARN dans des cellules difficilement transfectables ou dans des approches chez l'animal (388).

## 2. Structure des lentivirus

### *Généralités*

Les lentivirus sont des virus de la famille des rétrovirus, à période d'incubation longue, responsables de maladies à évolution lente, notamment du système immunitaire. Ils sont dérivés le plus souvent du HIV (Human immunodeficiency virus) ou de son équivalent chez le félin, le FIV (Feline immunodeficiency virus).

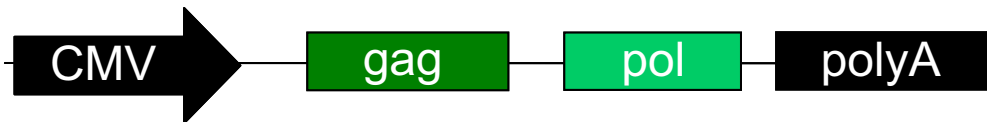
La construction des particules lentivirales se fait par l'intermédiaire de 3 plasmides différents, de façon à produire des particules virales non répliquantes capables d'infecter les cellules et d'intégrer leur matériel génétique. Pour cela, ces particules lentivirales doivent contenir les protéines virales nécessaires à leur intégration dans la cellule, tout en étant dépourvues des séquences codantes de ces protéines dans leur génome. C'est le cas des protéines de structure et des protéines d'enveloppe.

3 types de plasmides (Trono Lab, Lausanne) sont ainsi utilisés pour générer des lentivirus HIV pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) (389). Il s'agit du vecteur de structure (pCMV $\Delta$ P8.91), du vecteur d'enveloppe de VSV-G (pMD2G-VSVG), et d'un vecteur de transfert permettant le clonage de l'ADNc d'intérêt et/ou produisant le shRNA (pLVTHM). Les constructions plasmidiques de ces trois vecteurs sont présentées dans la Figure 31.

Des considérations de sécurité et d'éthique doivent naturellement être prises en considération

**Figure 31.** Constructions plasmidiques des trois vecteurs utilisés pour la production des particules lentivirales.

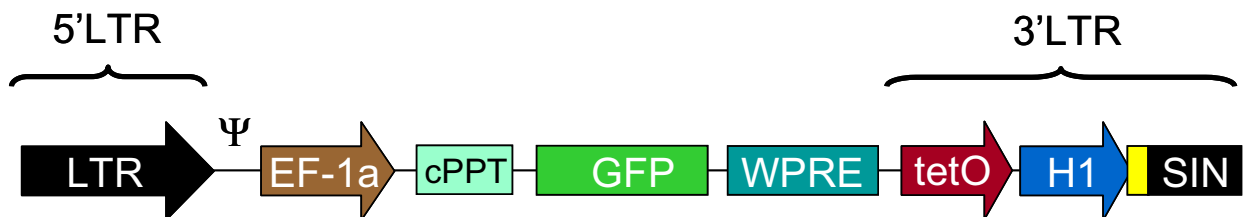
**1. Vecteur de Structure (pCMV $\Delta$ P8.91)**



**2. Vecteur d'enveloppe (pMD2G-VSVG)**



**3. Vecteur de transfert (pLVTHM)**



**Légende :** Le vecteur de structure est dépourvu du gène d'enveloppe ( $\Delta$ Env) et du signal de packaging ( $\Delta$  $\Psi$ ). Le vecteur d'enveloppe est dépourvu du gène de structure ( $\Delta$ Gag-Pol) et du signal de packaging ( $\Delta$  $\Psi$ ). Le vecteur de transfert est dépourvu du gène de structure ( $\Delta$ Gag-Pol) et du gène d'enveloppe ( $\Delta$ Env).

**Abréviations :** cPPT : Centre polypurine track ; EF-1 $\alpha$  : Elongation factor-1 $\alpha$  ; Env : Enveloppe ; GFP : Green fluorescent protein ; H1 : Promoteur spécifique de la pol II ; LTR : Long terminal repeat ; Pol : Polymérase ;  $\Psi$  : Signal d'encapsidation ; shRNA : Small hairpin RNA ; SIN : Self inactivated ; TetO : Tet-opérateur ; VSVG : Virus de la stomatite vésiculeuse ; WPRE : Woodchuck post-transcriptional regulatory element.

pour l'utilisation de l'interférence ARN lentivirale.

#### *Vecteur de structure*

Le vecteur pCMV $\Delta$ P8.91 est un vecteur de structure issu du HIV. Il est pourvu d'un promoteur CMV, codant pour les protéines de structure Gag, Pol, Tat et Rev. Il est dépourvu du gène d'enveloppe ( $\Delta$ Env) et du signal de packaging ( $\Delta$  $\psi$ ).

#### *Vecteur d'enveloppe*

Le vecteur pMD2G-VSVG est un vecteur d'enveloppe codant pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse. Le promoteur CMV nécessite un signal de terminaison polyA en aval de la séquence codant pour l'enveloppe. Cette enveloppe permet l'entrée du lentivirus dans la plupart des cellules eucaryotes, avec toutefois une efficacité supérieure à celle de l'enveloppe du HIV qui nécessite l'expression d'un récepteur spécifique. Il est dépourvu du gène de structure ( $\Delta$ Gag-Pol) et du signal de packaging ( $\Delta$  $\psi$ ).

#### *Vecteur de transfert*

Le plasmide pLVTHM est un vecteur de transfert dédié à l'expression de shRNA et d'un gène marqueur. Il s'agit d'un vecteur de transfert de 2<sup>nd</sup>e génération de type SIN (Self inactivated)  $\Delta$ U3 (390). Il est pourvu non seulement d'un cPPT (Central oypurine tract), qui va permettre une meilleure translocation nucléaire du génome lentiviral, mais aussi, d'une protéine marqueur fluorescente, la E-GFP, qui est sous la dépendance du promoteur eucaryote EF1- $\alpha$  (Elongation factor 1- $\alpha$ ). A la place de la région U3 du LTR (Long terminal repeat) en 3', se trouvent un promoteur spécifique de la pol II (H1) et une séquence shRNA dirigée contre l'ARNm de la protéine ciblée. Ce vecteur ne contient pas de gène de structure ( $\Delta$ Gag-Pol) ni

d'enveloppe ( $\Delta$ Env). Il contient par contre le signal de packaging ( $\Psi$ ), qui permettra à la particule lentivirale d'inclure cet ARN lentiviral.

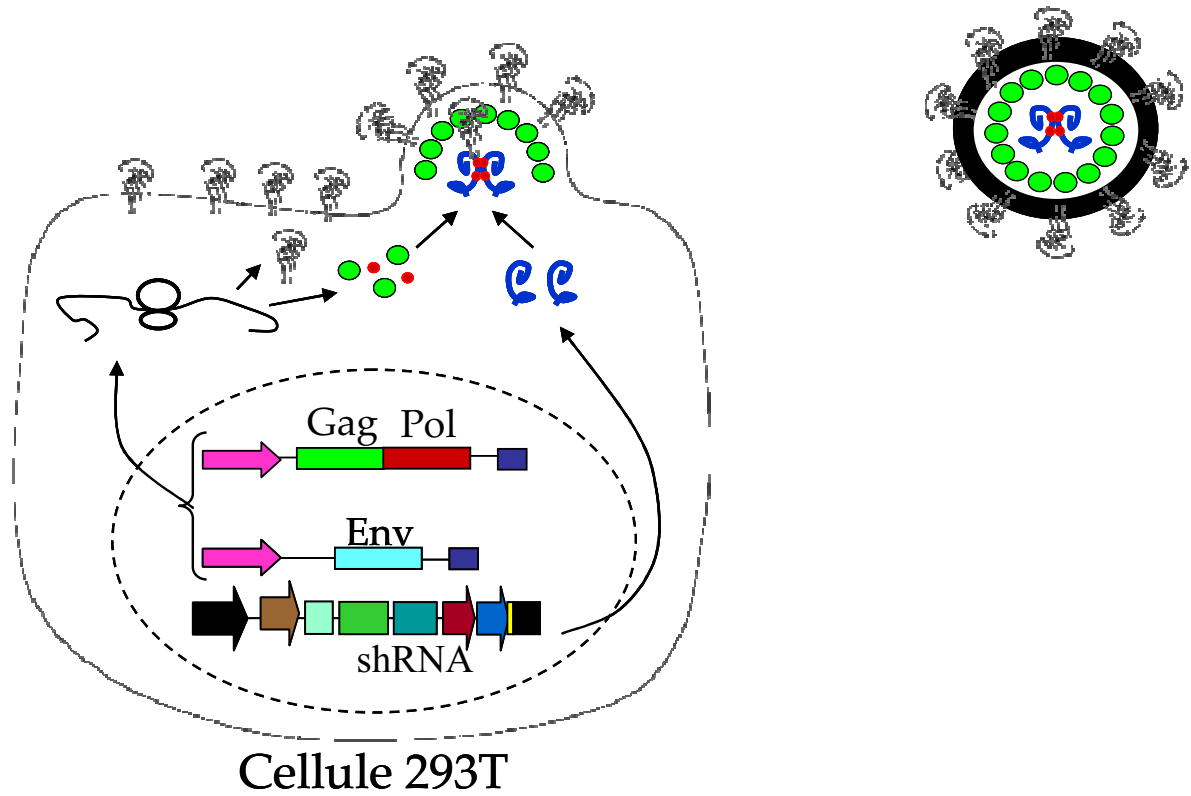
Le plasmide pLVTHM contenant le shRNA anti-mtTFA a été entièrement conçu et construit dans le laboratoire à partir du pLVTHM natif du laboratoire Trono (Lausanne). Le plasmide pLVTHM contenant le shRNA anti-p53 est disponible dans le commerce (Addgene).

### 3. Production des particules lentivirales

Le plasmide pLVTHM est transfecté dans des bactéries compétentes (MAX Efficiency Stbl2, Invitrogen). Celles-ci sont étalées sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB (10 g de Tryptone (BD), 5 g de Bacto Yeast (BD), 10 g de NaCl, 0,2 mL de NaOH 5 M dans 1L d'eau bidistillée), auquel on ajoute 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline, afin d'induire une pression de sélection permettant la croissance des seules bactéries transfectées. Après purification de plusieurs clones bactériens à l'aide du Kit Miniprep (Qiagen), la présence de la séquence shRNA est contrôlée par séquençage, à l'aide d'une amorce anti-sens (5'-CAGGAAGATGGCTGTGAGG-3') et du Kit Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). Une purification à partir d'un nombre plus important de clones bactériens est alors réalisée à l'aide du Kit Maxiprep (Qiagen) et un nouveau contrôle de la présence effective de l'insert est effectué. Parallèlement, à titre de contrôle pour les expérimentations ultérieures, un plasmide pLVTHM vide (*i.e.* sans shRNA) est produit de façon similaire.

La production des particules virales est, à ce niveau, prise en charge par la Plateforme de vectorologie (INSERM U876). Elle nécessite la transfection de cellules appartenant à la lignée 293T par les trois plasmides lentiviraux : plasmides de structure (10  $\mu$ g), d'enveloppe VSV-G (4  $\mu$ g) et de transfert (10  $\mu$ g) (Figure 32). Après filtration et ajout de 50  $\mu$ L de dichlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$  à 2,5 M), les plasmides sont incubés 3 à 5 min avant d'être transfectés dans les 293T, dans un milieu de culture sans sérum, à 37°C pendant 8h. Après

**Figure 32.** Production de particules lentivirales dans les cellules 293T.



**Légende :** Après transfection des 3 plasmides, les cellules 293T produisent les protéines de structure (Gag, Pol), d'enveloppe (Env), et l'ARN lentiviral contenant la séquence shRNA. Grâce au signal d'encapsidation, les cellules vont produire des particules lentivirales.

**Abréviation :** shRNA : Small hairpin RNA.

lavage et incubation de 48h dans un milieu adapté riche en sérum, le surnageant de culture est prélevé, centrifugé à 2500 tours/min, à 4°C, pendant 5 minutes, puis ultracentrifugé à 35000 tours/min, à 4°C, pendant 4h, afin de recueillir les particules lentivirales.

#### 4. Titration des particules lentivirales

La titration des particules lentivirales est réalisée sur les cellules 293T. Pour ce faire, les particules lentivirales, diluées dans une gamme de concentrations décroissantes, ont permis l'infection de  $5 \times 10^4$  cellules/mL en suspension avec du sulfate de protamine (Sigma), ce dernier permettant, par son apport de charges ioniques, de rapprocher les membranes virales et cellulaires. Après 5 jours, le pourcentage de cellules positives pour la GFP (Green fluorescent protein) en cytométrie en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson) permet de déterminer le nombre de particules infectieuses/mL pour chaque lot de particules virales produit. Les particules lentivirales sont alors aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

#### 5. Infection des CML

Les CML sont recueillies par une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen), avant d'être comptabilisées grâce à une cellule de Neubauer. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des plaques 6 puits (100000 cellules/puit) ou 96 puits (2000 cellules/puit) pour les expériences de cytométrie en flux, Western blot, RT-PCR quantitative ou de BrdU respectivement. Les infections sont réalisées avec le pLVTHM vide ou contenant le shRNA anti-p53 ou anti-mtTFA à une MOI (Multiplicity of infection) de 20, correspondant à une transfection théorique de 20 particules lentivirales/cellule. Afin d'augmenter les probabilités d'infection, les volumes finaux d'infection ont été adaptés à 750 µL pour les plaques 6 puits et 100 µL pour les plaques 96 puits.



## 6. Vérification de l'efficacité de la transduction lentivirale

7 jours après la transfection lentivirale, l'efficacité de la transduction est vérifiée en cytométrie en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson), par l'analyse de la fluorescence de la GFP. Par ailleurs, le nombre de copies d'ADN viral (gène WPRE, Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) intégré dans l'ADN de la cellule hôte a également été évalué par PCR quantitative par la Plateforme de vectorologie.

En outre, l'efficacité de l'interférence ARN lentivirale est déterminée par l'analyse de l'expression de la cible (p53 ou mtTFA) au niveau protéique et transcriptionnel.

## **C. Expression protéique et transcriptionnelle**

### 1. Cytométrie en flux

Le décollement des cellules à la trypsine-EDTA (Invitrogen) suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 1500 tours/min à 4°C permettent l'obtention d'un culot cellulaire, rincé secondairement dans 1 mL de PBS/BSA à 0,5%. Après centrifugation, les cellules sont fixées et perméabilisées à 4°C pendant 14-16h dans 500 µL de solution de fixation/perméabilisation (eBioscience). Deux rinçages grâce à un tampon de perméabilisation (eBioscience) sont alors effectués et l'anticorps primaire monoclonal de souris anti- $\alpha$ -actine du muscle lisse humain (clone 1A4, Sigma) ou l'anticorps polyclonal irrelevant de type IgG1 kappa de souris (lignée MOPC-21, Sigma) sont appliqués pendant 30 minutes à 4°C. Un rinçage avec 1 mL de tampon de perméabilisation permet ensuite d'éliminer l'excès d'anticorps primaire. La même opération est réalisée avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris, couplé au FITC (Fluorescein isothiocyanate, Beckman Coulter), incubé pendant 30 minutes à 4°C. Après un nouveau rinçage, les cellules sont incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-p53 humaine (clone DO-7, BD Pharmingen) couplé à la phycoérythrine (PE) ou

l'anticorps monoclonal irrelevant de type IgG<sub>2b</sub> de souris (clone 27-35, BD Pharmingen) couplé au PE. Après rinçage et centrifugation, le culot cellulaire est suspendu dans 300 µL de PBS (Invitrogen).

Pour chaque condition expérimentale, 5000 cellules sont analysées par le cytomètre en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson), grâce à l'utilisation du logiciel Diva<sup>®</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives pour p53.

## 2. Western blot

### *Extraction des protéines totales*

Les cellules sont recueillies par une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen), puis lysées dans 150 µL d'une solution composée d'inhibiteurs de protéases (0,25 mg/mL d'AEBSF (4-2-amino-éthyl-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), 10 µg/mL d'aprotinine, 16 µg/mL de leupeptine, 0,37 mg/mL de sodium orthovanadate), d'1,4-dithiothreitol (DTT) et de détergent (Triton x-100), tous provenant de Sigma. La concentration des protéines est ensuite mesurée selon la méthode de Lowry en comparaison à une gamme étalon, après lecture à 750 nm.

Les protéines sont alors dénaturées dans un tampon contenant 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 20% de glycérol, 20 mM de Tris-HCl, 2 mM d'EDTA, 80 mM de β-mercapto-éthanol et 1% bleu de Bromophénol, puis chauffées à 90°C pendant 5 minutes (327).

### *Western blot*

20 µg de protéines sont déposées sur un gel dénaturant à 10% d'acrylamide ((Acrylamide/bis-Acrylamide, SDS (Carlo Erba), persulfate d'ammonium et N, N, N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED, Qbiogene)). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose PVDF (Polyvinylidene fluoride, Immobilon<sup>TM</sup>-P). Les sites de fixation non spécifiques sont alors bloqués pendant 1h à température ambiante dans une solution de PBS-

Tween 0,1% et BSA 5%, puis les membranes sont incubées 14-16h à 4°C avec différents anticorps primaires, dont la nature et la concentration sont spécifiées dans le Tableau 6. Après trois lavages dans du PBS-Tween 0,1%, un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris (Bio-Rad) couplé à l'enzyme « horseradish peroxydase » (HRP) est alors appliqué pendant 90 minutes à température ambiante sur les membranes. Après trois autres lavages, les membranes sont révélées en chambre noire au moyen du kit Uptilight (Interchim) contenant un substrat chimioluminescent de la peroxydase. Un film radiographique est ensuite apposé sur les membranes afin de récupérer une empreinte de chimioluminescence. La densité des bandes est appréciée grâce au logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Pour permettre la normalisation des résultats, la quantité de  $\beta$ -actine présente sur la membrane est mesurée, sa quantité étant stable dans les CML (327). Cependant, le poids moléculaire de la  $\beta$ -actine étant proche de certaines des protéines étudiées, les membranes sont incubées, après la révélation de la protéine d'intérêt, dans du Stripping buffer (Restore<sup>TM</sup> Western Blot, Pierce), pendant 15 minutes afin d'éliminer le marquage de la protéine. Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la  $\beta$ -actine (Sigma) pendant 14-16h à 4°C. Comme précédemment, les mêmes protocoles de révélation et d'analyse sont utilisés.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio de la densité des bandes de la protéine d'intérêt normalisée par rapport à celle des bandes de  $\beta$ -actine.

### 3. ELISA

#### *Conditions expérimentales de culture*

Pour l'étude de la synthèse de différentes cytokines par les CML, 20000 cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits. A confluence, les CML sont rendues quiescentes, puis stimulées pendant 48h avec 300 ng/mL d'YKL-40 (MedImmune) ou 30 ng/mL de TNF- $\alpha$  (R&D Systems) utilisé comme contrôle positif. Les surnageants sont ensuite stockés à -80°C

**Tableau 6.** Récapitulatif des anticorps utilisés en Western blot.

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Poids moléculaires</b>	<b>Concentrations finales</b>	<b>Anticorps secondaire</b>	<b>Dilutions</b>
<b><math>\alpha</math>-actine</b> (Santa Cruz)	40 kDa	2 $\mu$ g/mL	Anti-IgG de souris couplé HRP (Biorad)	1/2000
<b>Collagène 1A</b> (Santa Cruz)	70 kDa	0,25 $\mu$ g/mL		1/1000
<b><math>\beta</math>-actine</b> (Sigma-Aldrich)	42 kDa	0,3 $\mu$ g/mL		1/5000
<b>p53</b> (BD Pharmingen)	53 kDa	1 $\mu$ g/mL		1/2500

jusqu'à la réalisation du dosage.

#### *Protocole expérimental*

La synthèse de plusieurs cytokines, *i.e.* TGF- $\beta$ 1, IP-10, IL-8 ou SCF, par les CML est ainsi mesurée sur les surnageants, grâce à l'utilisation de kits ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Quantikine ELISA Kits, R&D Systems).

Brièvement, les surnageants sont ajoutés aux microplaques pré-coatées avec un anticorps monoclonal spécifique pour les différentes cytokines. Après lavage, un anticorps secondaire lié à une peroxydase est ensuite ajouté. Enfin, une solution substrat de l'enzyme permet une révélation colorimétrique grâce à un lecteur de microplaques à 450 nm, avec une correction à 570 nm.

#### 4. Immunocytochimie

Pour préciser la localisation subcellulaire de la protéine p53, un marquage de la protéine est réalisé en immunocytochimie. Après rinçage avec un tampon phosphaté (PBS, Invitrogen), les cellules sont fixées et perméabilisées avec du méthanol (Sigma-Aldrich) à -20°C pendant 20 minutes. La saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution d'albumine bovine sérique à 3% (BSA, Sigma-Aldrich) diluée dans du PBS, pendant 30 minutes, à température ambiante. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps monoclonal de souris anti-p53 (clone DO-7, BD Pharmingen), dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution de PBS-BSA à 1% et incubé pendant 1h à température ambiante. Un témoin négatif est réalisé avec un anticorps polyclonal irrelevant de type IgG1 de souris (Dako). Après rinçage avec une solution contenant du PBS et du polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (Tween 20 à 0,05%, Sigma), les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris, dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans une

solution de PBS-BSA à 1%, et couplé à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen). Après rinçage au PBS (Invitrogen), et contre-coloration des noyaux au DAPI (Sigma) pendant 5 minutes, les lames sont ensuite montées avec un milieu de montage dédié (Fluorescent mounting medium, Dako). L'analyse des lames est réalisée au microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en trois dimensions.

## 5. Immunohistochimie

### *Inclusion*

L'inclusion dans la paraffine a été réalisée par le service d'anatomopathologie de l'hôpital Haut-Lévêque (CHU de Bordeaux). Brièvement, les échantillons biopsiques sont fixés dans du formol tamponné à 10%, puis inclus en paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome.

### *Coloration immunohistochimique*

L'étape première consiste en un déparaffinage des coupes au moyen de trois bains de toluène de 3 minutes chacun, suivie d'une réhydratation par passage des sections dans des bains d'alcools décroissants (absolu, 95°, 70°), puis d'eau. S'ensuit une étape de démasquage antigénique par la chaleur dans un tampon citrate à pH 6, à la cocotte minute, pendant 10 minutes. Une inhibition des peroxydases endogènes est alors effectuée par l'azide de sodium à 0,1% (Sigma-Aldrich) en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 0,3%, pendant 30 minutes. Après lavage au PBS (Invitrogen), la saturation des sites de fixation membranaires non spécifiques est réalisée par l'ajout de BSA à 10% (Dako), pendant 30 min. On procède ensuite à la fixation des anticorps primaires de souris ou de rat dirigés respectivement contre l' $\alpha$ -actine musculaire lisse (Sigma-Aldrich) et YKL-40 (MedImmune). Les anticorps irrelevant de même isotype sont également utilisés comme témoins négatifs, par une

incubation de 30 minutes à température ambiante. Après rinçage, selon la méthode du complexe avidine-biotine, un anticorps secondaire biotinylé de lapin anti-souris ou anti-rat (Dako) est ajouté pendant 30 minutes, puis un complexe streptavidine-péroxydase biotinylée (Dako) est appliqué pendant 30 minutes. La réaction est révélée par l'ajout d'un chromogène (DAB, Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako), se colorant en brun lors de la présence d'un donneur d'électron, l' $H_2O_2$ , pendant 5 minutes. Enfin, une contre-coloration à l'Hématoxyline-Meyer permet de colorer les noyaux en bleu.

#### *Analyse des résultats*

L'intensité du marquage YKL-40 et la surface du muscle lisse sont évalués à l'aide du logiciel Quancoul<sup>®</sup> (369). La surface du muscle lisse bronchique est normalisée à la surface totale du tissu correspondant et représentée en pourcentage de surface totale. L'intensité de coloration pour chaque anticorps est exprimée en pourcentage de surface tissulaire positive pour l'anticorps anti-YKL-40.

## 6. RT-PCR quantitative en temps réel

### *Extraction des ARN totaux*

Afin de déterminer l'expression des différentes protéines au niveau transcriptionnel, les cellules sont rincées 2 fois à l'HBSS (Invitrogen) et les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNase II (Macherey-Nagel). Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon permettant d'inactiver les RNases, auquel est ajouté du  $\beta$ -mercapto-éthanol afin de réduire les ponts disulfures. Les lysats sont ensuite filtrés sur des colonnes spécifiques, qui permettent de diminuer leur viscosité. Un traitement des cellules à l'éthanol à 70%, suivi d'une centrifugation à 11000 g pendant 30 secondes, permet la fixation de l'ARN sur la membrane de la colonne. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15 minutes à température

ambiante en présence de DNase, afin d'éliminer une éventuelle contamination par l'ADN. Après 3 lavages successifs, l'ARN pur est finalement élué dans de l'eau RNase-free.

La concentration en acides nucléiques est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm et rapportée à la concentration en protéines mesurée à 280 nm. Le ratio des densités optiques  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  permet d'apprécier la pureté des échantillons.

#### *Reverse Transcription (RT)*

Les ARNm extraits sont transformés en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse. Pour cela, 1 µg d'ARN totaux est mis en présence d'amorces d'oligo-dT (Promega), de 10 mM de désoxyribonucléotides (dNTP, Promega), d'un inhibiteur de ribonucléases (RNasin, Promega) et de 20 U/µL de transcriptase inverse AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega). Les amorces d'oligo-dT permettent de rétrotranscrire les ARNm, via une hybridation avec les queues poly-A, et non les ARN ribosomiaux qui en sont dépourvus. Cette transcription inverse s'effectue pendant 1h à 42°C, suivie de 5 minutes à 94°C pour inactiver l'enzyme.

#### *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

La quantification des ADNc par PCR en temps réel est réalisée par la méthodologie SYBR-Green I (Molecular Probes), un agent intercalant non spécifique de l'ADN double-brin émettant une fluorescence à 585 nm lorsqu'il est excité à 470 nm. Ainsi, il est possible d'apprécier indirectement la quantité d'ARNm, grâce à l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle. La spécificité du signal analysé dépend des amorces et de la température d'acquisition choisie. Les paires d'amorces spécifiques, délivrées par Sigma-Genosys, sont conçues grâce au logiciel Oligo 6.6 (Molecular Biology Insights), après avoir vérifié l'absence de complémentarité significative de ces amorces avec d'autres gènes humains par une recherche de type BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 7.



**Tableau 7.** Caractéristiques des amorces utilisées en RT-PCR quantitative.

Gènes (Numéro d'accession)	Concentration des amorces	Hybridation	Élongation	Acquisition	Séquences des amorces
<b>p53</b> (NM_000546)	100 nM	70°C - 28 sec	70°C - 28 sec	86°C	S : 5'-ATGTTCCGAGAGCTGAATGAG-3' AS : 5'-GCTTCTGACGCACACCTATTG-3'
<b>p21</b> (NM_000389)	100 nM	70°C - 23 sec	70°C - 23 sec	85°C	S : 5'-TGATTAGCAGCGGAACAAGG-3' AS : 5'-GAGCCGAGAGAAAACAGTCC-3'
<b>Bax</b> (NM_004324)	200 nM	60°C - 13 sec	70°C - 23 sec	85°C	S : 5'-AGTGGCAGCTGACATGTTTT-3' AS : 5'-GAGGAAGTTCCAATGTCCAGC-3'
<b>Mdm2</b> (NM_002392)	200 nM	60°C - 13 sec	70°C - 23 sec	85°C	S : 5'-TGAAGGAAACTGGGGAGTCT-3' AS : 5'-GCTTTGGTCTAACCAGGGTC-3'
<b>Bcl-2</b> (NM_000633)	200 nM	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	85°C	S : 5'-GGATGCCTTTGTGGAAGTGT-3' AS : 5'-GCAGCTTTGTTTCATGGTACAT-3'
<b>mtTFA</b> (NM_003201)	100 nM	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	82°C	S : 5'-GAAGTCGACTGCGCTCCC-3' AS : 5'-ACTCCGCCCTATAAGCATC-3'
<b>NRF-1</b> (NM_005011)	100 nM	70°C - 35 sec	70°C - 35 sec	82°C	S : 5'-AAGATCAGCAAACGCAAACAC-3' AS : 5'-CCCGTACCAACCTGGATAAGT-3'
<b>PGC1-<math>\alpha</math></b> (NM_013261)	200 nM	64°C - 20 sec	70°C - 25 sec	84°C	S : 5'-GTCACCACCCAAATCCTTATT-3' AS : 5'-GGCGATCTTGAACGTGAT-3'
<b>PO</b> (NM_001002)	200 nM	70°C - 28 sec	70°C - 28 sec	85°C	S : 5'-CAACGGGTACAAACGAGTC-3' AS : 5'-CTTCCTTGGCTTCAACCTTAG-3'
<b>HPRT-1</b> (NM_000194)	100 nM	64°C - 13 sec	70°C - 23 sec	79°C	S : 5'-TGTTGGATATGCCCTTGACTA-3' AS : 5'-AGATGGCCACAGGACTAGAAC-3'
<b>YWHAZ</b> (NM_003406)	100 nM	68°C - 13 sec	70°C - 23 sec	80°C	S : 5'-GGGGATGTGGAATTTTTATACAAG-3' AS : 5'-CGCCAGGACAAACCAGTATGTAG-3'

**Abréviations :** AS : Anti-sens ; Bax : Bcl-2-associated X protein ; Bcl-2 : B cell lymphoma-2 ; HPRT-1 : Hypoxanthine phospho-ribosyl-transferase 1 ; Mdm2 : Mouse double minute 2 ; mtTFA : Mitochondrial transcription factor A ; NRF1 : Nuclear respiratory factor 1 ; PGC1- $\alpha$  : Peroxisome-proliferator activated receptor gamma co-activator 1- $\alpha$  ; PO : Human acidic ribosomal phosphoproteins ; S : Sens ; YWHAZ : Tyrosine-3-mono-oxygenase/tryptophane 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

Pour chaque PCR, le milieu réactionnel (10  $\mu$ L) contient l'ADNc, l'enzyme Titanium™ « Taq DNA Polymerase », le tampon de PCR (Clontech), 1 mM de dNTP, 100 ou 200 nM de chaque amorce et l'agent intercalant SYBR Green I.

La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur à rotor multi-canaux, de type Rotor-Gene™ 2000 (Corbett Research), permettant la quantification en temps réel des transcrits. Après 60 secondes initiales à 95°C d'activation de la Taq, chaque cycle de PCR comprend successivement une dénaturation de 15 secondes à 95°C, une hybridation et une élongation, dont la température et la durée varie selon les amorces (Tableau 7). Pour éliminer les signaux de fluorescence non spécifiques, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation à une température d'acquisition inférieure de 3,5°C par rapport à la température de fusion de l'amplicon. Les témoins négatifs (eau stérile) sont systématiquement effectués lors des étapes de transcription inverse et de PCR. L'efficacité des réactions de PCR est toujours supérieure à 90%. La spécificité des produits de PCR est analysée avec les courbes de fusion et sur gel d'agarose à 2%.

La normalisation des données de RT-PCR nécessite la moyenne géométrique de 3 gènes domestiques, dont l'expression est constitutive. L'expression des résultats est donc présentée en ratio des ARNm des protéines d'intérêt par rapport à des références endogènes (human acidic ribosomal phosphoproteins (PO) ; hypoxanthine phospho-ribosyl-transferase 1 (HPRT-1) ; tyrosine-3-mono-oxygenase/tryptophane 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ)) selon une analyse geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

## **D. Étude de la prolifération cellulaire**

### 1. Courbes de croissance cellulaire

#### *Conditions expérimentales de culture*

Pour l'étude de l'effet de la chitinase YKL-40 sur la prolifération cellulaire, 20000 cellules/puit sont déposées sur une plaque de culture à 6 puits. Après 72h d'adhésion, suivie de 24h de synchronisation, les CML sont stimulées par 300 ng/mL d'YKL-40 (MedImmune) pendant 24 à 48h.

Concernant l'effet de la protéine p53 sur la prolifération cellulaire, 50000 cellules/puit sont déposées sur une plaque de culture à 6 puits. Après 24h de synchronisation, les CML sont stimulées par du SVF à 10%. Le comptage cellulaire est alors effectué au 7<sup>ème</sup> jour.

#### *Protocole expérimental*

Après rinçage à l'HBSS (Invitrogen), les cellules sont décollées par une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen). Après centrifugation à 1500 tours/min pendant 5 minutes, le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 mL de milieu de culture et les cellules sont comptées avec une cellule de Neubauer.

### 2. Incorporation de BrdU

#### *Conditions expérimentales de culture*

Pour l'étude de l'effet de la chitinase YKL-40 sur l'incorporation de BrdU, 2000 cellules/puit sont déposées sur une plaque de culture à 96 puits. Après 24h d'adhésion suivie de 24h de synchronisation, les cellules sont stimulées par la chitinase YKL-40 (MedImmune) diluée dans du milieu DMEM (Invitrogen) de façon dose (0,3 à 300 ng/mL, pendant 24h) et temps-dépendants (300 ng/mL, pendant 24 à 48h). Par ailleurs, le PDGF (Platelet derived growth

factor, R&D Systems), dont l'effet est connu pour favoriser la prolifération des CML (391), est utilisée à 10 ng/mL, à titre de témoin positif. Le milieu DMEM sans SVF sert de condition témoin. Toutes les conditions expérimentales sont réalisées en quadruplicat.

### *Protocole expérimental*

La synthèse d'ADN est mesurée à l'aide d'un kit d'incorporation de BrdU (Roche Diagnostic). 10  $\mu$ M de BrdU sont ainsi ajoutés à chaque puit pendant 24h. Les cellules sont alors fixées et dénaturées par une solution alcoolisée (Solution Fix-denat, Roche Diagnostic) pendant 30 minutes, à température ambiante. Le BrdU incorporé est révélé par un anticorps anti-BrdU couplé à la peroxydase pendant 2h, à température ambiante. Après trois rinçages au PBS (Invitrogen), une solution substrat de la peroxydase (Tetramethylbenzidine, TMB, Roche Diagnostic) permet une révélation colorimétrique de l'anti-BrdU grâce à un lecteur de microplaque à 370 nm.

Les résultats sont exprimés en ratio par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non stimulées.

## **E. Étude de l'hypertrophie**

### 1. Cytométrie en flux

#### *Conditions expérimentales de culture*

Les CML sont synchronisées pendant 24h, puis stimulées de manière répétée avec 300 ng/mL d'YKL-40 (MedImmune) pendant 48h, 1 ng/mL d'endothéline-1 (Sigma-Aldrich) pendant 72h.

### *Protocole expérimental*

La taille cellulaire est mesurée par cytométrie en flux (392). Après décollement à la trypsine-EDTA (Invitrogen), les cellules sont fixées et perméabilisées avec 300  $\mu$ L d'éthanol froid à 70 %. Un lavage avec 3 mL de PBS (Invitrogen), suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 1500 tours/min, sont alors effectués, puis les cellules sont marquées pendant 15 minutes à température ambiante au PI (Propidium iodide)/RNase (BD Pharmingen). L'adjonction de RNase permet de catalyser la dégradation de l'ARN, le PI étant un agent intercalant non spécifique des acides nucléiques (ADN ou ARN).

Pour chaque condition expérimentale, 5000 cellules sont analysées par le cytomètre en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson), grâce à l'utilisation du logiciel Diva<sup>®</sup>. La taille cellulaire des cellules non proliférantes en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> est déterminée en mesurant le paramètre forward scatter (FSC) du cytomètre.

### 2. Western blot

La mesure de l'hypertrophie cellulaire est également appréciée par la quantification de l'expression de l' $\alpha$ -actine par Western blot. En effet, l'hypertrophie musculaire est associée à un phénotype contractile, qui se manifeste par une augmentation du contenu en protéines contractiles.

### 3. Immunocytochimie

De la même façon, l'expression de l' $\alpha$ -actine est également appréciée par immunocytochimie, comme décrit précédemment (III-3.C.4), l'analyse des lames étant réalisée au microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en trois dimensions.

## **F. Étude de la migration cellulaire**

### 1. Conditions expérimentales de culture

Après synchronisation des CML pendant 24h, les cellules sont stimulées par différents agonistes, YKL-40 (MedImmune) à 300 ng/mL ou PDGF (R&D Systems) à 10 ng/mL.

### 2. Protocole expérimental

La migration des CML est étudiée grâce aux inserts de type Transwell (BD Pharmingen). Elle consiste en une migration des cellules à travers une membrane en polyéthylène téréphtalate (PET) présentant des pores de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre (393). Pour cela, 20000 cellules sontensemencées dans la partie supérieure des inserts, préalablement recouverts de collagène à 50  $\mu\text{g/mL}$  pendant 1h à température ambiante, afin de favoriser l'adhérence des cellules. Les inserts sont eux-mêmes déposés dans des plaques 24 puits. Les agonistes, YKL-40 (MedImmune) ou PDGF (R&D Systems), sont alors placés dans la partie inférieure et/ou supérieure de l'insert afin de différencier deux phénomènes importants de la migration : le chimiotactisme d'une part, et la chimiokinésie, d'autre part, définis respectivement par l'attraction des cellules selon un gradient de concentration d'un composé donné et un déplacement non orienté sous l'action d'un composé donné. Au terme de 6 à 24h de migration, les inserts sont rincés dans des puits contenant du PBS (Invitrogen) préchauffé à 37°C. Les CML n'ayant pas migré, présentes dans la partie supérieure de l'insert, sont enlevées par grattage. Les inserts sont alors rincés à 3 reprises au PBS (Invitrogen) afin d'éliminer les cellules grattées, puis séchés pendant 10 minutes. Après fixation des cellules par du méthanol (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes, les inserts sont séchés de nouveau pendant 5 minutes. Les noyaux sont colorés en bleu avec de l'hématoxyline pendant 20 minutes, puis les inserts sont finalement rincés à l'eau bidistillée.

L'observation au microscope optique au grossissement x10 est suivie de l'acquisition informatique des images par le logiciel Quancoul<sup>®</sup> (57), à raison de 15 images, correspondant à 15 champs/puit. La migration cellulaire est exprimée en nombre de cellules/mm<sup>2</sup>. Pour chaque condition expérimentale, les expériences sont réalisées en duplicata.

## **G. Étude de l'apoptose par cytométrie en flux**

### 1. Conditions expérimentales de culture

L'apoptose spontanée est étudiée sur des cellules cultivées dans du SVF à 10%.

### 2. Protocole expérimental

L'apoptose des CML est mesurée à l'aide d'un kit annexine V-FITC (BD Biosciences) en cytométrie en flux. L'apoptose se traduit en effet par la perte de polarité de la membrane plasmique en résidus phosphatidylsérine. A l'état normal, ceux-ci sont situés uniquement sur le versant intracellulaire de la membrane plasmique. En revanche, lors de l'apoptose, ils sont précocement exprimés sur son versant extracellulaire et, en conséquence, peuvent être marqués par l'annexine V. Les cellules nécrotiques, ou en phase tardive d'apoptose, sont également marquées au PI. En effet, ces deux états cellulaires présentent des discontinuités membranaires qui vont permettre à l'iodure de propidium de pénétrer dans la cellule et de s'intercaler dans l'ADN. Ainsi, lors de l'apoptose précoce, les CML présentent un marquage positif à l'annexine V et négatif pour le PI. Les cellules en apoptose tardive sont caractérisées, quant à elles, par un marquage positif pour l'annexine V et le PI, tandis que les cellules nécrotiques ont uniquement un marquage positif pour le PI.

Ainsi, après décollement des cellules à la trypsine-EDTA (Invitrogen) et centrifugation à 1500 tours/min pendant 5 minutes, le culot cellulaire est délicatement remis en suspension dans 100

$\mu\text{L}$  de tampon (BD Bioscience) contenant 2  $\mu\text{L}$  d'annexine V couplée au FITC et 5  $\mu\text{L}$  d'iodure de propidium, pendant 15 minutes, à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Pour chaque condition expérimentale, 5000 cellules sont analysées par le cytomètre en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson), grâce à l'utilisation du logiciel Diva<sup>®</sup>. Les résultats sont exprimés à la fois en pourcentage de cellules vivantes, de cellules en apoptose précoce ou tardive, et en pourcentage de cellules nécrotiques.

## **H. Liaison de p53 à l'ADN**

Pour assurer la plupart de ses fonctions, la protéine p53, lorsqu'elle est activée, doit se lier à l'ADN en tant que facteur de transcription. Le kit TransAM<sup>™</sup> p53 (Active Motif) permet de quantifier la liaison de p53 à l'ADN à partir d'extraits de protéines nucléaires.

### 1. Extraction des protéines nucléaires

Elle est réalisée grâce à un kit d'extraction nucléaire (Active Motif) au moyen de centrifugations différentielles. Les cellules sont rincées deux fois par une solution de PBS (Invitrogen) à 4°C et d'inhibiteurs de phosphatases, puis décollées mécaniquement avant d'être centrifugées à 1500 tours/min pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est alors suspendu dans un tampon hypotonique et laissé 15 minutes dans la glace. 25  $\mu\text{L}$  de détergent sont ensuite ajoutés, puis une 2<sup>ème</sup> centrifugation à 13000 tours/min pendant 5 min est effectuée. Le culot cellulaire est suspendu dans un tampon de lyse additionné de DTT et d'inhibiteurs de protéases, puis laissé dans la glace pendant 30 minutes sous agitation. Une dernière centrifugation de 10 minutes à 13000 tours/min permet de récupérer la fraction nucléaire, qui correspond au surnageant. La concentration protéique est mesurée, comme précédemment, selon la méthode de Lowry.



## 2. TransAM™ p53

Un oligonucléotide contenant la séquence consensus de liaison à l'ADN de p53 (5'-GGACAT GCCCGGGCATGTCC-3') tapisse le fond des puits d'une plaque ELISA (Active Motif). 6 µg d'extraits nucléaires sont ajoutés dans chaque puit. Si la protéine p53 contenue dans l'extrait nucléaire de CML étudié peut se lier spécifiquement à cette séquence ADN, elle sera détectée par un anticorps anti-p53 spécifique de la forme active de p53. L'adjonction d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et d'un chromogène génère une réaction colorée, dont l'absorbance est quantifiable à 450 nm par un lecteur de microplaque EL808 (Biotek). Des puits sans anticorps serviront de témoins négatifs. Une droite standard est construite grâce à des puits contenant des dilutions croissantes d'extraits nucléaires de cellules de la lignée MCF-7, traitées par le peroxyde d'hydrogène, car elles produisent une forme active de p53.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de p53 produite par 6 µg d'extraits nucléaires de MCF-7.

# **Chapitre III :**

## **Résultats et discussion**

### **III-1. Intérêt du NO exhalé pour prédire la persistance du contrôle de l'asthme**

Face à l'expression hétérogène de la maladie asthmatique, des méthodes d'évaluation non invasive de l'inflammation bronchique se sont développées afin de mieux en préciser les caractéristiques phénotypiques. Ainsi, l'inflammation bronchique peut être évaluée de façon non invasive chez l'asthmatique par la mesure du NO exhalé, le monoxyde d'azote étant en effet produit par les voies aériennes lors des processus inflammatoires. L'engouement qu'a suscité la mesure du NO exhalé dans l'asthme au cours de ces dernières années résulte, non seulement, de la simplicité de sa mesure, mais aussi de sa corrélation avec l'inflammation éosinophilique. Néanmoins, l'intérêt de la mesure du NO exhalé dans l'asthme demeure controversé à l'heure actuelle. C'est pourquoi, les recommandations internationales concernant les modalités de prise en charge thérapeutique de l'asthme n'intègrent pas ce biomarqueur dans l'algorithme décisionnel et restent exclusivement basées sur des paramètres d'évaluation clinique et fonctionnels respiratoires (146). La place du NO exhalé dans la prise en charge de l'asthme demeure donc à définir.

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer la pertinence du NO exhalé pour prédire (i) le contrôle et, surtout, (ii) la perte de contrôle de l'asthme chez des asthmatiques initialement contrôlés sur le plan clinique et fonctionnel respiratoire, dont le traitement de fond est stable. Cette étude a été conduite sur 90 patients asthmatiques de sévérité variable. Le contrôle de l'asthme a été apprécié par l'ACQ (Asthma control questionnaire) ou questionnaire de Juniper (394). La mesure du NO exhalé a été réalisée au moyen de deux appareils, l'EndoNO (SERES, France), technique de référence, et le NIOX MINO<sup>®</sup> (Aerocrine AB, Suède), appareil portatif, suivie par les mesures pléthysmographiques.

Ainsi, l'évaluation de la pertinence de ces deux techniques de mesure du NO exhalé pour prédire un asthme non contrôlé montre que, pour un seuil supérieur à 22 ppb pour l'EndoNO et supérieur à 31 ppb pour le NIOX MINO<sup>®</sup>, les valeurs prédictives positive et négative sont respectivement d'environ 45% et 80%. En revanche, leur pertinence pour prédire une dégradation du contrôle de l'asthme dans un sous-groupe de patients initialement bien contrôlés et dont le traitement de fond est stable, s'avère supérieure. En effet, dans ce cas, les valeurs prédictives positive et négative sont respectivement d'environ 60% et 95%, pour un seuil de 31 ppb pour l'EndoNO et de 40 ppb pour le NIOX MINO<sup>®</sup>. Autrement dit, ces résultats suggèrent qu'un pourcentage non négligeable de patients dont l'asthme est contrôlé sur le plan clinique, mais ayant une valeur du NO exhalé au-dessus de ces seuils, a un risque de dégradation du contrôle de sa maladie dans les semaines à venir. Or, les recommandations internationales actuelles préconisent une diminution de la charge thérapeutique si l'asthme est contrôlé sur le plan clinique et fonctionnel respiratoire, indépendamment de la valeur du NO exhalé (146). Ces résultats sont donc susceptibles de modifier les modalités de prise en charge au quotidien de la maladie asthmatique.

**Article n°2**

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

Sous presse à Respir Medicine 2011

Annaïg Ozier, Pierre-Olivier Girodet, Imane Bara, José-Manuel

Tunon de Lara, Roger Marthan, Patrick Berger

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rmed](http://www.elsevier.com/locate/rmed)

# Control maintenance can be predicted by exhaled NO monitoring in asthmatic patients

Annaïg Ozier<sup>a,b,c</sup>, Pierre-Olivier Girodet<sup>a,b,c</sup>, Imane Bara<sup>a,b</sup>,  
José-Manuel Tunon de Lara<sup>a,b,c</sup>, Roger Marthan<sup>a,b,c</sup>,  
Patrick Berger<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Bordeaux, UB2, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, CIC 0005, F-33076 Bordeaux, France

<sup>b</sup> INSERM, U1045, CIC 0005, F-33076 Bordeaux, France

<sup>c</sup> CHU de Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Service des Maladies Respiratoires, CIC 0005, F-33604 Pessac, France

Received 6 September 2010; accepted 10 January 2011

## KEYWORDS

Asthma;  
Control;  
Exhaled nitric oxide;  
Inflammation

## Summary

**Background:** Fractional exhaled nitric oxide ( $F_{E}NO$ ) is a marker of airway inflammation in asthma. Monitoring of such inflammation is currently not included in asthma guidelines and remains controversial. The hypothesis underlying the present study was that,  $F_{E}NO$  could help assessing asthma control and, therefore, improve its management, by predicting loss of control in asthmatics.

**Methods:** A total of 90 adult asthmatics were included in the study. Asthma control was evaluated according to ACQ. All patients underwent  $F_{E}NO$  by chemiluminescent (EndoNO) and hand-held (MINO) devices, followed by lung function testing.

**Results:** MINO was accurate as compared to EndoNO.  $F_{E}NO$  was significantly increased in uncontrolled as compared to controlled asthmatics using both devices.  $F_{E}NO$  measurement was able to predict control maintenance in controlled asthmatics in the absence of any change in their treatment. Indeed, using cut-off values of 31 and 40 ppb, the negative predictive values were 95 and 97% for EndoNO and MINO, respectively. EndoNO and MINO were also able to assess asthma control, although to a lesser extent.

\* Corresponding author. Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Hôpital du Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Avenue de Magellan, F-33604 Pessac, France. Tel.: +33 5 57 65 65 13; fax: +33 5 57 65 60.

E-mail addresses: [annaig.ozier@u-bordeaux2.fr](mailto:annaig.ozier@u-bordeaux2.fr) (A. Ozier), [pierre-olivier.girodet@pharmaco.u-bordeaux2.fr](mailto:pierre-olivier.girodet@pharmaco.u-bordeaux2.fr) (P.-O. Girodet), [imane\\_bara@hotmail.com](mailto:imane_bara@hotmail.com) (I. Bara), [manuel.tunondelara@chu-bordeaux.fr](mailto:manuel.tunondelara@chu-bordeaux.fr) (J.-M. Tunon de Lara), [roger.marthan@u-bordeaux2.fr](mailto:roger.marthan@u-bordeaux2.fr) (R. Marthan), [patrick.berger@u-bordeaux2.fr](mailto:patrick.berger@u-bordeaux2.fr) (P. Berger).

0954-6111/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.rmed.2011.01.006

Please cite this article in press as: Ozier A, et al., Control maintenance can be predicted by exhaled NO monitoring in asthmatic patients, Respiratory Medicine (2011), doi:10.1016/j.rmed.2011.01.006

**Conclusions:** These findings suggest that  $F_{E}NO$  can predict the persistence of asthma control in controlled patients and may now be used in asthma management since it can accurately be measured by means of hand-held devices.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Asthma is an increasingly prevalent disease characterised by bronchial hyperresponsiveness, bronchial inflammation and remodelling.<sup>1,2</sup> Since airway inflammation is a key feature of asthma,<sup>3</sup> a wide range of inflammatory biomarkers has been actively examined. Airway inflammation can be assessed noninvasively, by means of various techniques including collecting exhaled breath condensate, counting the sputum eosinophils or measuring fractional exhaled nitric oxide ( $F_{E}NO$ ).<sup>4</sup> Assessed initially by means of chemiluminescence devices,  $F_{E}NO$  is considered as a surrogate marker of eosinophilic airway inflammation that correlates well with sputum eosinophils.<sup>5</sup>  $F_{E}NO$  is noninvasively measured, provides immediate and reproducible results and is associated with a high degree of acceptance by patients. However, stationary chemiluminescence devices are not widely used in clinical practice because of high cost, bulky equipment, requirement for daily calibration and technical maintenance, and are restricted to specialised laboratories and secondary care institutions. The development of hand-held  $F_{E}NO$  monitors based on an electrochemical technique now allows clinicians to more easily monitor  $F_{E}NO$ . Indeed, such measurements were found reproducible and in agreement with chemiluminescence devices.<sup>6,7</sup>

In asthma,  $F_{E}NO$  has been proposed not only to assess inflammation, but also to verify adherence therapy<sup>8</sup> and to guide and monitor response to steroids.<sup>9–11</sup> Nevertheless,  $F_{E}NO$  monitoring is not yet included in current asthma guidelines<sup>12</sup> and its interest remains controversial. Doses of inhaled corticosteroids (ICS) have been successfully reduced without compromising asthma control, when the main treatment strategy was based on  $F_{E}NO$  in one study,<sup>9</sup> although such an effect has not been confirmed.<sup>13–15</sup> These conflicting results may be related to the discordance between symptoms and airway inflammation in some patients as shown by cluster analysis.<sup>16</sup> Furthermore, elevated  $F_{E}NO$  has been shown to correlate with subsequent deterioration in asthma control,<sup>17,18</sup> but controversial results have also been reported on this issue.<sup>19–21</sup> For instance, a correlation between  $F_{E}NO$  and asthma control appeared to be limited to steroid naïve patients.<sup>20</sup> Indeed, prediction of steroid withdrawal failure by  $F_{E}NO$  is controversial.<sup>17,19</sup> By contrast, in uncontrolled difficult-to-treat asthmatics,  $F_{E}NO$  seemed to predict the response to corticosteroids.<sup>11</sup> Anyhow, there is no available information in controlled asthmatic population, regarding the interest of  $F_{E}NO$  in predicting a loss of control.

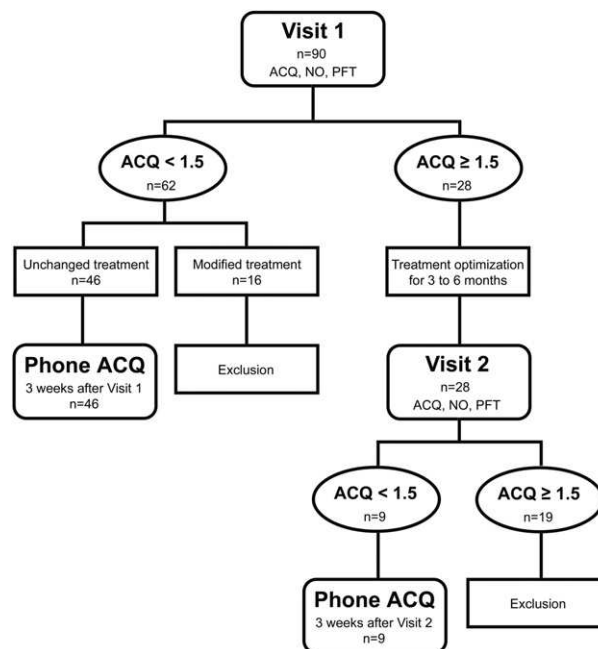
The hypothesis addressed in the present study was that,  $F_{E}NO$  measurement could help assessing asthma control and improve its management, by predicting loss of control in controlled asthmatics in clinical practice. Therefore, the aims of this study were, (i) to appraise the potential of MINO device as compared to another established laboratory chemiluminescence analyser, as a tool for assessing asthma

control and (ii) to predict loss of control in a cohort of controlled adult asthmatic patients.

## Material and methods

### Study population

A total of 90 adult asthmatic patients were prospectively recruited from January 2009 to January 2010 as outpatients in the "Centre Hospitalier Universitaire, Service des Maladies Respiratoires" of Bordeaux (Visit 1, Fig. 1). Asthmatics were enrolled using the following inclusion criteria: patients >18 years had to exhibit characteristic symptoms (*i.e.*, wheezing and breathlessness), as well as a history of bronchial hyperresponsiveness confirmed within the 2 previous years either by a significant improvement by >12% in the forced expiratory volume in 1 s ( $FEV_1$ ) 10 min after the inhalation of 200  $\mu$ g of salbutamol,<sup>12</sup> or a provocative concentration of methacholine required to lower the  $FEV_1$  by 20% (PC20) of <4 mg/ml according to the American Thoracic Society (ATS) criteria.<sup>22</sup> Non-inclusion criteria were not applied in patients' selection.



**Figure 1** Flow-chart of study design. Visits 1 and 2 included the assessment of asthma control questionnaire (ACQ), fraction of exhaled NO ( $F_{E}NO$ ) and pulmonary function test (PFT). Phone ACQ was only assessed in controlled patients with stable treatment 3 weeks after visit 1 or 2.

For each patient, age, body mass index (BMI), tobacco, atopic status, mean duration of the disease, asthma control questionnaire (ACQ<sup>23</sup>), treatments and lung function testing data using body plethysmography, were collected at Visit 1. Regarding the ACQ, the 6 clinical items and the functional item (each quoted from 0 to 6) were equally weighted and averaged. Patients were graded according to their level of asthma control as controlled (*i.e.* ACQ < 1.5) or uncontrolled patients (*i.e.* ACQ ≥ 1.5).<sup>23</sup> Patients were also graded as severe or non severe asthma according to the ATS Guidelines.<sup>24</sup>

Since the study was focused on controlled asthmatics and in order to avoid the effect of change in asthma medication, we excluded the 16 controlled asthmatics with change in their asthma treatment (Fig. 1). For the 46 controlled patients at Visit 1 without any change in their asthma treatment, loss of control was systematically evaluated 3 weeks after the inclusion, by phone using the following criteria: an increase of more than 0.5<sup>18</sup> in the mean 6 clinical ACQ items as used by Mahut et al.,<sup>21</sup> the need for a course of oral corticosteroid, the presence of unscheduled visit or hospitalisation for asthma.

The 28 uncontrolled patients at Visit 1 were reassessed identically 3–6 months later (Visit 2, Fig. 1), after treatment adjustment according to Global Initiative for Asthma's (GINA) guidelines.<sup>12</sup> The 19 patients who remained uncontrolled after six months were excluded, whereas the 9 finally controlled patients were then followed for 3 weeks without any change in their asthma

treatment. As for the previous group, loss of control was assessed by a phone ACQ.

All patients gave their informed consent to participate in the study, after the nature of the procedure had been fully explained. The study followed recommendations outlined in the Helsinki Declaration and received approval from the local ethics committee.

### Exhaled nitric oxide measurement

F<sub>E</sub>NO was measured before plethysmography using the chemiluminescence device EndoNO (SERES, France) on-line at a flow rate of 50 ml/s and a pressure of 10 cm H<sub>2</sub>O according to the European Respiratory Society/American Thoracic Society recommendations.<sup>25</sup> For each patient, 3 technically adequate measurements were performed with a sustained plateau of at least 10 s, and the arithmetic mean F<sub>E</sub>NO was calculated with a coefficient of variation of less than 10%. Alveolar NO concentrations (F<sub>A</sub>NO) and bronchial NO flux (J'aw) were calculated using various expiratory flow rates according to Tsoukias and George model.<sup>26</sup> Since F<sub>A</sub>NO can be artificially increased by bronchial NO back-diffusion into the alveolar space, we applied the correction proposed by P. Condorelli et al.<sup>27</sup> The analyser was calibrated daily.

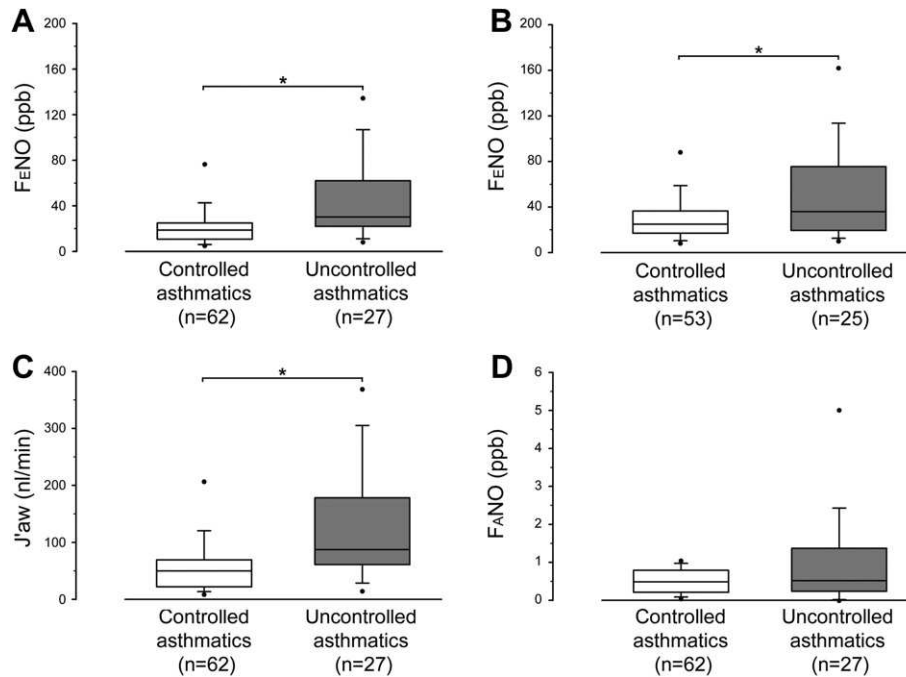
Similarly, F<sub>E</sub>NO was also measured before plethysmography using the electrochemical device NIOX MINO<sup>®</sup> (Aerocrine AB, Sweden). As previously described, a single measurement was acquired according to the manufacturer's instruction

**Table 1** Patients' characteristics according to asthma control.

	Controlled asthma (ACQ < 1.5)	Uncontrolled asthma (ACQ ≥ 1.5)	<i>p</i> values (Wilcoxon)
Subjects (n)	62	28	
F/M	42/20	15/13	0.20
Age (yr)	38.5 ± 2.1	44.8 ± 3.2	0.06
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.7 ± 0.7	26.8 ± 1.4	0.18
Atopic, n (%)	48 (77.4)	23 (82.1)	0.61
Disease duration (yr)	19 ± 1.5	22 ± 3.2	0.52
Current/ex/non-smokers (n)	8/6/48	3/6/19	
Pack years	2.5 ± 1.0	3.0 ± 1.1	0.29
Current ICS dose, n (µg eq BDP/day)	48 (964 ± 131.4)	17 (789 ± 179.8)	0.34
Oral steroid, n (mg/day)	3 (30.0 ± 15.3)	3 (23.3 ± 8.8)	0.82
LABA, n (%)	31 (50.0)	14 (50.0)	1.00
ACQ score	0.62 ± 0.06	2.48 ± 0.17	< 0.001
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	92.1 ± 2.1	75.2 ± 4.3	< 0.001
FEV <sub>1</sub> (L)	2.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.007
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	78.0 ± 1.3	68.5 ± 2.3	0.001
FEF <sub>25–75</sub> (% predicted)	71.9 ± 3.4	49.8 ± 5.1	< 0.001
FEF <sub>25–75</sub> (L)	2.8 ± 0.2	1.9 ± 0.2	0.003
RV (% predicted)	104.0 ± 3.3	107.4 ± 4.7	0.73
RV (L)	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	0.20
TLC (% predicted)	101.6 ± 1.9	96.7 ± 2.8	0.31
TLC (L)	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.2	0.94

Values are presented as mean ± SEM. Abbreviations: ACQ: asthma control questionnaire; BDP: beclomethasone dipropionate; BMI: body mass index; FEF<sub>25–75</sub>: forced midexpiratory flow rate; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in 1 s; F/M: female/male; FVC: forced vital capacity; ICS: inhaled corticosteroids; LABA: long-acting β<sub>2</sub>-agonist; RV: residual volume; TLC: total lung capacity; yr: years; % predicted: from the normative references of pulmonary function tests (Quanjer et al., *Eur Respir J Suppl.* 1993; 16: 5–40). *P* values were obtained when comparing controlled versus uncontrolled asthmatics, using Wilcoxon rank-sum tests.





**Figure 2** Exhaled nitric oxide is increased in uncontrolled asthmatics. Box plots show nitric oxide (NO) measurements assessed using EndoNO (A, C, D) and MINO (B). Box plots summarise medians with 25% and 75% interquartiles. Error bars represent 5th and 95th percentiles. Circles represent upper and lower outliers. \* $p < 0.05$  using Wilcoxon rank-sum tests. ppb: parts per billion.

with identical mouth flow rate and pressure settings.<sup>7</sup> The sensor of the MINO device was not change during the course of the study.

### Statistical analysis

Comparisons of clinical, functional and  $F_E\text{NO}$  data between groups were performed by means of Wilcoxon rank-sum tests.

Inter-devices agreement of NO measurement was evaluated on log-transformed data in order to normalise the distribution. According to Bland and Altman analysis,<sup>28</sup> we

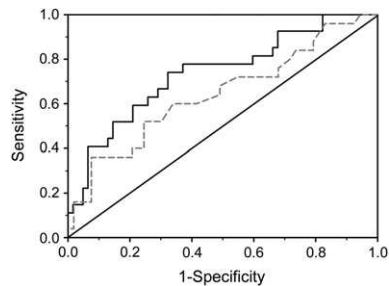
analysed (i) Pearson's correlation coefficient, (ii) means of both measurements plotted against their differences, (iii) lack of agreement (*i.e.* bias estimated by the mean difference and the standard deviation of the mean), and (iv) error measurement between the two devices (*i.e.* defined by  $S_w$  = within subject standard deviation). Log-transformed  $F_E\text{NO}$  data from the 2 devices were compared by paired Student's *t*-tests.

Correlations between log-transformed  $F_E\text{NO}$  data and clinical functional parameters were assessed using Pearson's correlation coefficients.

**Table 2** Correlation between NO measurements and clinical or functional parameters.

	EndoNO			MINO
	$F_E\text{NO}$	Jaw	$F_A\text{NO}$	$F_E\text{NO}$
Age (yr)	-0.06 (0.60)	-0.07 (0.47)	0.02 (0.88)	0.02 (0.89)
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	0.002 (0.98)	0.03 (0.76)	-0.08 (0.48)	0.07 (0.54)
Disease duration (yr)	0.03 (0.77)	-0.01 (0.93)	0.10 (0.35)	0.16 (0.16)
ICS dose ( $\mu\text{g}$ eq BDP/day)	0.02 (0.86)	-0.07 (0.56)	0.19 (0.09)	0.04 (0.75)
Oral steroid (mg/day)	-0.12 (0.26)	-0.18 (0.09)	0.09 (0.40)	0.04 (0.71)
ACQ score	0.10 (0.38)	0.10 (0.38)	<0.01 (0.99)	0.07 (0.54)
$\text{FEV}_1$ (% predicted)	0.03 (0.77)	0.06 (0.59)	0.06 (0.59)	0.07 (0.52)
$\text{FEV}_1/\text{FVC}$ (%)	-0.04 (0.75)	-0.02 (0.90)	0.10 (0.38)	-0.05 (0.67)
$\text{FEF}_{25-75}$ (% predicted)	0.06 (0.63)	0.09 (0.46)	0.07 (0.54)	0.07 (0.57)
RV (% predicted)	0.03 (0.81)	-0.01 (0.93)	0.04 (0.76)	0.06 (0.59)
TLC (% predicted)	-0.06 (0.59)	-0.15 (0.21)	0.12 (0.31)	-0.05 (0.63)

Values are Pearson correlation coefficients (with *p* values *in parentheses*) using log-transformed NO measurements. Abbreviations: ACQ: asthma control questionnaire; BDP: beclomethasone dipropionate; BMI: body mass index;  $F_A\text{NO}$ : fraction of alveolar nitric oxide;  $\text{FEF}_{25-75}$ : forced midexpiratory flow rate;  $F_E\text{NO}$ : fraction of exhaled nitric oxide;  $\text{FEV}_1$ : forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; Jaw: bronchial flow of NO; ICS: inhaled corticosteroids; LABA: long-acting  $\beta_2$ -agonist; RV: residual volume; TLC: total lung capacity.



**Figure 3** Receiver-operator characteristic (ROC) curve analysis for EndoNO and MINO's exhaled nitric oxide measurements to assess asthma control. ROC curves determine the effectiveness of EndoNO ( $n = 89$ , black solid line) and MINO ( $n = 78$ , grey dashed-dotted line) to assess uncontrolled asthma according to asthma control questionnaire ( $ACQ \geq 1.5$ ).

Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed using both the raw  $F_{E}NO$  data and asthma control or loss of control. The area under the curve (AUC) for each device was compared to 0.5. A positive likelihood ratio [LR(+)] was calculated as sensitivity/(1-specificity). A negative likelihood ratio [LR(-)] was calculated as  $(1 - \text{sensitivity})/\text{specificity}$ .

Chi square tests were used to compare the percentage of loss of control between patients with  $F_{E}NO$  above and below the threshold. All analyses were performed using NCSS software (NCSS 2001, Kaysville, UT, USA). Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Interest of NO measurement in the assessment of asthma control

Clinical and functional characteristics of all patients are shown in Table 1 (See also Supplemental Fig. 1 and Supplemental Table 1).  $F_{E}NO$  was significantly increased in uncontrolled as compared to controlled asthmatics using either EndoNO or MINO (Fig. 2A and B). Similar results were obtained when measuring bronchial NO (Fig. 2C), whereas no significant difference was found in terms of  $F_{A}NO$  (Fig. 2D).

There was no correlation between NO measurements and ACQ scores, or any other clinical or functional parameters (Table 2). We then performed a ROC curve analysis to determine the effectiveness of both EndoNO

and MINO in assessing asthma control according to ACQ (Fig. 3). Both devices were indeed effective since the area under the curve was significantly different from 0.5 (Table 3). The highest sum of sensitivity and specificity for EndoNO was obtained using a threshold value of 22 ppb. For MINO, the cut-off value had to be increased up to 31 ppb to obtain the best control assessment (Table 3). Since the positive predictive value of both EndoNO and MINO to predict uncontrolled asthma was lower than 50%, we thus hypothesised that,  $F_{E}NO$  would be more effective to predict a loss of asthma control in already controlled patients.

### NO measurement predicted the persistence of asthma control in controlled patients

We followed up the 55 controlled patients without any change in their asthma treatment and reassessed asthma control after 3 weeks. We then performed new ROC curve analyses to determine the effectiveness of both EndoNO and MINO to predict loss of asthma control (Fig. 4A). Both devices were more effective to predict a loss of asthma control (Table 4). Indeed, using the new best thresholds for both EndoNO and MINO (*i.e.* 31 ppb and 40 ppb respectively), we were able to predict a loss of asthma control in 67% and 60% of controlled asthmatics, respectively. More interestingly, the negative predictive values were higher than 95% with relevant likelihood ratios for both devices (Table 4). That is patients below the thresholds remained controlled without any change in their treatment. The proportion of patients that turned to be not controlled was significantly lower when  $F_{E}NO$  was below the thresholds than when  $F_{E}NO$  was above the thresholds (Fig. 4B).

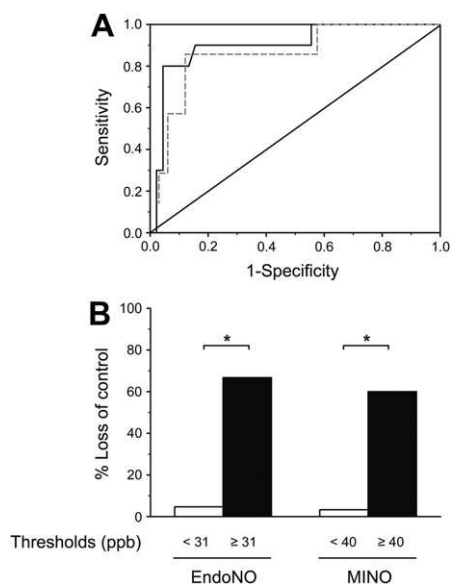
### Accuracy of MINO measurements

We analysed the accuracy of MINO according to Bland and Altman analysis (Supplemental Fig. 2). There was a strong correlation between the 2 devices (Supplemental Fig. 2A). However,  $F_{E}NO$  values measured by MINO device were significantly higher than those by EndoNO ( $p < 0.0001$ , paired *t*-test). As a consequence, the mean difference between MINO and EndoNO measurements was positive (Supplemental Fig. 2B) and the error measurement  $S_w$  was estimated to be 9 ppb. However, there was no correlation between the mean and the difference between the 2 devices providing that MINO device was accurate (Supplemental Fig. 2B).

**Table 3** Effectiveness of NO measurements in the assessment of uncontrolled asthma.

	Prevalence	Se	Sp	PPV	NPV	LR(+)	LR(-)	AUC ( $p$ values)
EndoNO	30.3	77.7	62.9	47.7	86.7	2.10	0.35	0.74 (<0.001)
MINO	32.1	60.0	66.0	45.4	77.8	1.77	0.61	0.64 (0.021)

Effectiveness of NO measurements was determined in 89 subjects (EndoNO) and 78 subjects (MINO) using thresholds of exhaled nitric oxide fraction of 22 ppb and 31 ppb for EndoNO and MINO, respectively. A positive case was defined as an uncontrolled asthma according to ACQ (*i.e.*  $ACQ \geq 1.5$ ). Values are presented as percentages, unless for both LR and AUC. Abbreviations: AUC: area under the curve; LR (+): positive likelihood ratio; LR(-): negative likelihood ratio; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value; Se: sensitivity; Sp: specificity.  $p$  values represented the statistical significance of rejecting the  $AUC = 0.5$ .



**Figure 4** Effectiveness of exhaled nitric oxide measurements to predict a loss of asthma control. A: Receiver-operator characteristic (ROC) curves determine the effectiveness of EndoNO ( $n = 55$ , black solid line) and MINO ( $n = 40$ , grey dashed-dotted line) to predict a loss of asthma control in controlled asthmatics ( $ACQ < 1.5$ ). B: Bars represent the percentages of a loss of control within 3 weeks in controlled asthmatics.  $*p < 0.05$  using chi square tests.

## Discussion

This study demonstrates, for the first time, that,  $F_{E}NO$  measurement performed with either EndoNO or MINO, allows predicting the persistence of control in already controlled asthmatics. MINO was accurate as compared to EndoNO, a referenced electrochemical device and may thus be used in asthma management in clinical practice.

We hypothesised that  $F_{E}NO$  would be useful to predict a loss of control in controlled asthmatics. In this study, we demonstrated that more than 60% of patients lost their control when  $F_{E}NO$  was above a defined threshold. However,  $F_{E}NO$  was even better to predict control maintenance in this population. Jones et al. previously aimed at predicting a loss of control after steroid withdrawal using  $F_{E}NO$  measurement.<sup>17</sup> Whereas their positive predictive value was adequate (*i.e.* 88%), their sensitivity and negative predictive values were poor (*i.e.* 25% for both).<sup>17</sup> Conversely, in our study, the positive predictive value was

indeed lower (*i.e.* 67% using EndoNO and 60% using MINO) but both the sensitivity (*i.e.* 80% with EndoNO and 86% with MINO) and the negative predictive values (*i.e.* 95% with EndoNO and 97% with MINO) were dramatically higher. However, steroid treatment was unchanged in our patients, in agreement with recent GINA guidelines in controlled patients.<sup>12</sup> Michils et al. also aimed at predicting loss of asthma control.<sup>18</sup> However, they used an amplitude of  $F_{E}NO$  change of more than 30% as a marker of worsening asthma.<sup>18</sup> In our study, we were able to predict a loss of control using a single measurement, which may prove more relevant in clinical practice. Perez de Llano et al. very recently described a cut-off value of 30 ppb for MINO to predict a positive response to oral steroid in difficult-to-treat asthmatics.<sup>11</sup> Collectively, these results suggest that  $F_{E}NO$  could be useful for monitoring asthma treatment. Besides, asthma management based on MINO  $F_{E}NO$  measurements alone was found less costly than that based on standard guidelines and seemed to provide similar health benefits.<sup>29</sup> On another way, the ability of  $F_{A}NO$  to predict loss of asthma control within the same population was not statistically significant (data not shown). Conversely,  $F_{A}NO$  was significantly increased in severe asthmatics as compared to non severe asthmatics, as previously demonstrated earlier.<sup>18,30</sup>

When assessing the accuracy of MINO as compared to EndoNO, data obtained by both devices were highly correlated. According to Bland and Altman analysis, the mean of both devices was not correlated with the difference suggesting that MINO was accurate. Similar findings have been previously obtained using other chemiluminescent devices.<sup>6,7</sup> However, in these studies, the chemiluminescent device was from the same manufacturer (*i.e.* Aerocrine).<sup>6,7</sup> In addition, we determined the error measurement (*i.e.* Sw) according to Bland and Altman analysis. As compared to EndoNO, we found that MINO overestimated  $F_{E}NO$  by 9 ppb.

We also test the ability of both EndoNO and MINO to predict asthma control. A first result was that,  $F_{E}NO$  was significantly increased in uncontrolled as compared to controlled asthmatics and this finding deserves further discussion. Indeed, very recently, Mahut et al. evaluated  $F_{E}NO$  using EndoNO in controlled and uncontrolled asthmatic patients using the same cut-off ACQ scores,<sup>21</sup> but they failed to show any difference between these 2 groups. However, in our study, only adult asthmatics were enrolled, whereas in that of Mahut et al., both children and adults were followed up.<sup>21</sup> Moreover, uncontrolled asthmatics from our study presented higher ACQ scores, and therefore

**Table 4** Effectiveness of NO measurements in the assessment of a loss of optimal asthma control.

	Prevalence	Se	Sp	PPV	NPV	LR(+)	LR(-)	AUC ( $p$ values)
EndoNO	18.2	80.0	91.1	66.7	95.3	9.00	0.21	0.90 (<0.001)
MINO	17.5	85.7	87.8	60.0	96.7	7.07	0.16	0.86 (<0.001)

Effectiveness of NO measurements was determined in 55 and 40 controlled asthmatics using thresholds of exhaled nitric oxide fraction of 31 ppb and 40 ppb for EndoNO and MINO, respectively. A positive case was defined as a loss of optimal asthma control. Values are presented as percentages, unless for both LR and AUC. Abbreviations: AUC: area under the curve; LR(+): positive likelihood ratio; LR(-): negative likelihood ratio; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value; Se: sensitivity; Sp: specificity.  $p$  values represented the statistical significance of rejecting the  $AUC = 0.5$ .

more symptoms. Regarding now asthma control, Michils et al. previously addressed this issue based on ACQ.<sup>18</sup> Using ROC curve analyses, they proposed a relatively high cut-off value of 45 ppb to exclude well-controlled asthma with a predictive value of 88%.<sup>18</sup> In the present study, we proposed a lower cut-off  $F_{E}NO$  value of 22 and 31 ppb for EndoNO and MINO, respectively to discriminate between controlled and uncontrolled asthma using the best sum of sensitivity and specificity. However, population from the Michils' study was different with only persistent asthmatics and more atopics. Anyhow, positive and negative predictive values were more satisfactory to predict the persistence of control in controlled patients than to assess asthma control per se. In addition, assessing control using ACQ is more obvious and cheaper than using NO measurement.

In conclusion, our study has demonstrated that  $F_{E}NO$  measured by either EndoNO or MINO and analysed, taking into account specific cut-off values, can predict the persistence of asthma control in controlled patients. From the present results, it may thus be suggested that controlled asthmatics exhibiting a  $F_{E}NO$  value above the threshold (*i.e.* 31 ppb using EndoNO, or 40 ppb using MINO), should be reassessed within the 3<sup>rd</sup> week with, at least, no decrease in corticosteroids doses, whereas a decreased in corticosteroids treatment could be undertaken in those whose  $F_{E}NO$  value is below the threshold. Since  $F_{E}NO$  can now be accurately measured by means of hand-held devices, complementary studies are required to evaluate the interest of this strategy in clinical practice.

## Acknowledgements

The authors thank the staff of the outpatients unit from the "Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire" and the "Service des Maladies Respiratoires". Phadia provided us with the MINO exhaled nitric oxide analyser, but did not participate in the collection, analysis and interpretation of the data or in the writing of the manuscript.

## Conflict of interest statement

AO has received fees for speaking GlaxoSmithKline and AstraZeneca. POG, IB, JMTL and RM have no conflicts of interest to disclose. PB has received fees for speaking or consulting from Novartis, GlaxoSmithKline, AstraZeneca, and Chiesi. Travels to the ERS and ATS congress were funded by Novartis, GlaxoSmithKline and AstraZeneca.

## List of abbreviations used

ACQ	asthma control questionnaire
ATS	American Thoracic Society
AUC	area under the curve
BDP	beclomethasone dipropionate
BMI	body mass index
$F_{A}NO$	alveolar nitric oxide concentration
FVC	forced vital capacity

FEF <sub>25-75</sub>	forced midexpiratory flow rate
$F_{E}NO$	fractional exhaled nitric oxide
FEV <sub>1</sub>	forced expiratory volume in 1 s
GINA	Global Initiative for Asthma
ICS	inhaled corticosteroids
J'aw	bronchial nitric oxide flux
LABA	long-acting $\beta_2$ -agonist
LR(-)	negative likelihood ratio
LR(+)	positive likelihood ratio
Ppb	parts per billion
ROC	receiver operating characteristic
RV	residual volume
Sw	within subject standard deviation
TLC	total lung capacity

## Supplementary material

The supplementary data associated with this article can be found in the on-line version at [doi:10.1016/j.rmed.2011.01.006](https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.01.006).

## References

- Girodet PO, Ozier A, Trian T, et al. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 2010;**65**:1004–12.
- Trian T, Benard G, Begueret H, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;**204**:3173–81.
- Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, et al. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 2007;**62**:8–15.
- Magnussen H, Holz O, Sterk PJ, Hargreave FE. Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations. *Eur Respir J* 2000;**16**:1175–9.
- Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;**53**:91–5.
- Khalili B, Boggs PB, Bahna SL. Reliability of a new hand-held device for the measurement of exhaled nitric oxide. *Allergy* 2007;**62**:1171–4.
- Menzies D, Nair A, Lipworth BJ. Portable exhaled nitric oxide measurement: comparison with the "gold standard" technique. *Chest* 2007;**131**:410–4.
- Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996;**9**:196–201.
- Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005;**352**:2163–73.
- Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, et al. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax* 2002;**57**:889–96.
- Perez de Llano LA, Gonzalez FC, Anon OC, et al. Exhaled nitric oxide predicts control in patients with difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J* 2009;**35**:1221–7.
- Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention*. Available from, [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com); 2008 [accessed June 2008].

13. Shaw DE, Berry MA, Thomas M, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**176**:231–7.
14. Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008;**372**:1065–72.
15. de Jongste JC, Carraro S, Hop WC, Baraldi E. Daily telemonitoring of exhaled nitric oxide and symptoms in the treatment of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;**179**:93–7.
16. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**178**: 218–24.
17. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**164**:738–43.
18. Michils A, Baldassarre S, Van Muylem A. Exhaled nitric oxide and asthma control: a longitudinal study in unselected patients. *Eur Respir J* 2008;**31**:539–46.
19. Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**163**:406–12.
20. Piacentini GL, Peroni DG, Bodini A, et al. Childhood Asthma Control Test and airway inflammation evaluation in asthmatic children. *Allergy* 2009;**64**:1753–7.
21. Mahut B, Trinquart L, Le Bourgeois M, et al. Multicentre trial evaluating alveolar NO fraction as a marker of asthma control and severity. *Allergy* 2010;**65**:636–44.
22. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**:309–29.
23. Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED. Identifying 'well-controlled' and 'not well-controlled' asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respir Med* 2006;**100**:616–21.
24. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**162**:2341–51.
25. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**:912–30.
26. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 1998;**85**:653–66.
27. Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, Silkoff PE, George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol* 2007;**102**:417–25.
28. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;**1**:307–10.
29. Price D, Berg J, Lindgren P. An economic evaluation of NIOX MINO airway inflammation monitor in the United Kingdom. *Allergy* 2009;**64**:431–8.
30. Berry M, Hargadon B, Morgan A, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J* 2005;**25**:986–91.



## **III-2. Imagerie *in vivo* par micro-scanner de l'inflammation et/ou du remodelage bronchique dans des modèles murins d'asthme**

### **A. Intérêt du micro-scanner pour l'évaluation non invasive de l'inflammation et du remodelage bronchique dans un modèle murin d'asthme chronique**

L'inflammation bronchique éosinophilique peut donc être évaluée de façon non invasive chez l'asthmatique par la mesure du NO exhalé. De même, la tomodensitométrie thoracique de haute résolution permet d'explorer, également de façon non invasive, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi bronchique chez le patient asthmatique en rapport avec les processus inflammatoires et de remodelage bronchique (172). Elle s'avère, par ailleurs, corrélée à des paramètres fonctionnels respiratoires reflétant l'obstruction bronchique, mais aussi, à des paramètres histologiques inflammatoires et de remodelage bronchique (172). En revanche, une telle évaluation de l'épaisseur de la paroi bronchique est impossible chez la souris, hormis lors d'études histologiques après sacrifice de l'animal. Chez la souris, le micro-scanner permet cependant d'imager, *in vivo*, diverses maladies broncho-pulmonaires, comme le cancer bronchique, la fibrose pulmonaire ou l'emphysème (395-397). Néanmoins, une telle technique n'avait jamais été appliquée à l'étude de l'inflammation et du remodelage bronchique dans un modèle murin d'asthme.

En émettant l'hypothèse que les processus inflammatoires et de remodelage bronchique sont susceptibles de modifier les valeurs d'atténuation de la paroi bronchique, les objectifs de ce travail étaient (i) de comparer la densité péri-bronchique déterminée par micro-scanner chez des souris contrôles et des souris sensibilisées à l'ovalbumine et (ii) de corrélérer ce paramètre

aux données pléthysmographiques et histologiques témoignant de l'inflammation et du remodelage bronchique.

Cette étude a été menée sur 12 souris femelles BALB/C, âgées de 5 semaines, avec 6 animaux sensibilisés à l'ovalbumine au moyen de deux injections intra-péritonéales, suivies d'instillations intra-nasales répétées jusqu'au 75<sup>ème</sup> jour, tandis que les 6 animaux contrôles ont bénéficié d'administration de sérum salé isotonique selon un calendrier identique. La réactivité bronchique a été déterminée avant et après sensibilisation. Au 81<sup>ème</sup> jour ont été effectués l'imagerie des voies aériennes par micro-scanner et le sacrifice des animaux pour l'étude histologique des bronches. Le principe de l'imagerie des voies aériennes consistait à réaliser une reconstruction orthogonale à l'axe principal des bronches, pour laquelle 12 bronches ont été analysées, identiques pour toutes les souris. Sur cette reconstruction orthogonale, la lumière bronchique était manuellement délimitée et, dans la mesure où la limite externe de la paroi bronchique n'est pas clairement individualisable chez la souris, une nouvelle région circulaire a été circonscrite, également de façon manuelle, afin de mesurer la densité péri-bronchique.

Ce modèle murin de sensibilisation a tout d'abord permis de reproduire les trois caractéristiques physiopathologiques fondamentales de l'asthme, à savoir une HRB, une inflammation et un remodelage bronchique. La densité péri-bronchique est augmentée chez les souris sensibilisées par rapport aux souris contrôles et s'avère corrélée positivement, non seulement, avec l'HRB, mais aussi, à des paramètres histologiques témoignant de l'inflammation et du remodelage bronchique.

Par conséquent, ce travail expérimental démontre, pour la 1<sup>ère</sup> fois, la faisabilité du micro-scanner pour évaluer, de façon non invasive, l'inflammation et le remodelage bronchique chez la souris sensibilisée, grâce à la détermination de la densité péri-bronchique par une analyse en deux dimensions des voies aériennes.

**Article n°3**

**Airway remodelling in a mouse asthma model assessed by in-vivo  
respiratory-gated micro-computed tomography**

Eur Radiol 2010; 20(1): 128-137

Mathieu Lederlin, Annaïg Ozier, Michel Montaudon, Hugues  
Begueret, Olga Ousova, Roger Marthan, Patrick Berger, François  
Laurent



Mathieu Lederlin  
Annaïg Ozier  
Michel Montaudon  
Hugues Begueret  
Olga Ousova  
Roger Marthan  
Patrick Berger  
François Laurent

## Airway remodeling in a mouse asthma model assessed by in-vivo respiratory-gated micro-computed tomography

Received: 14 March 2009  
Revised: 27 May 2009  
Accepted: 1 July 2009  
Published online: 14 August 2009  
© European Society of Radiology 2009

M. Lederlin · A. Ozier ·  
M. Montaudon · H. Begueret ·  
O. Ousova · R. Marthan · P. Berger ·  
F. Laurent  
Laboratoire de Physiologie Cellulaire  
Respiratoire, Université Bordeaux 2,  
Bordeaux, France

M. Lederlin · A. Ozier ·  
M. Montaudon · H. Begueret ·  
O. Ousova · R. Marthan · P. Berger ·  
F. Laurent  
Institut National de la Santé et de la  
Recherche Médicale (INSERM), U885,  
Bordeaux, France

M. Lederlin · M. Montaudon ·  
F. Laurent  
Unité d'Imagerie Thoracique, CHU  
Bordeaux,  
Pessac, France

F. Laurent (✉)  
Unité d'Imagerie Thoracique et  
Cardiovasculaire, CHU de Bordeaux,  
Hôpital du Haut-Lévêque, Hôpital  
Cardiologique,  
avenue de Magellan,  
33604 Pessac, France  
e-mail: francois.laurent@chu-bordeaux.fr  
Tel.: +33-5-57656542  
Fax: +33-5-57656880

**Abstract** The aim of our study was to evaluate the feasibility of non-invasive respiratory-gated micro-computed tomography (micro-CT) for assessment of airway remodelling in a mouse asthma model. Six female BALB/c mice were challenged intranasally with ovalbumin. A control group of six mice received saline inhalation. All mice underwent plethysmographic study and micro-CT. For each mouse, peribronchial attenuation values of 12 bronchi were

measured, from which a peribronchial density index (PBDI) was computed. Mice were then sacrificed and lungs examined histologically. Final analysis involved 10 out of 12 mice. Agreement of measurements across observers and over time was very good (intraclass correlation coefficients: 0.94–0.98). There was a significant difference in PBDI between asthmatic and control mice (–210 vs. –338.9 HU,  $P=0.008$ ). PBDI values were correlated to bronchial muscle area ( $r=0.72$ ,  $P=0.018$ ). This study shows that respiratory-gated micro-CT may allow non-invasive monitoring of bronchial remodelling in asthmatic mice and evaluation of innovative treatment effects.

**Keywords** Asthma · Remodelling · Small animal imaging · Micro-CT · In vivo

### Introduction

Asthma is an increasingly prevalent disease characterised by bronchial hyperresponsiveness (BHR), chronic bronchial inflammation, and remodelling [1]. This latter is thought to be an excessive repair process of the airways that has been characterised histologically by several features including an increase in smooth muscle mass [2]. Such remodelling has been associated with a decrease in lung function and partly reversible airway obstruction leading to a more severe asthma phenotype [3]. Both inflammation and remodelling of the asthmatic airways increase the wall thickness, which can be assessed in vivo using thin-section computed tomography (CT) [4–7].

For pathophysiological purposes, several asthmatic models have been developed in animals, mainly in mice [8, 9]. However, evaluation of bronchial wall thickness requires histological studies and thus sacrificing of animals. To date, there is no means for assessing bronchial wall thickness in animal asthmatic models in vivo and such a method would be highly useful for preclinical studies.

In the past decade, micro-computed tomography (micro-CT) has become a powerful technique in laboratory investigations, enabling sufficient spatial resolution to generate images of small animals. In the field of lung diseases, micro-CT has been used for imaging excised lung specimens of rodents [10] or humans [11]. Using

respiratory gating and micro-CT, *in vivo* imaging of rodents has become possible in various pathological conditions including lung tumours, lung fibrosis or emphysema [12–15]. However, to the best of our knowledge, there are no studies reporting the use of micro-CT for the assessment of bronchial remodelling in rodent asthma.

Hypothesizing that bronchial wall inflammation and remodelling could modify wall attenuation values, the aims of our study were (1) to compare *in vivo* respiratory-gated micro-CT bronchial wall density between asthmatic and control mice and (2) to correlate this parameter with plethysmographic and histological data.

## Materials and methods

### Animals

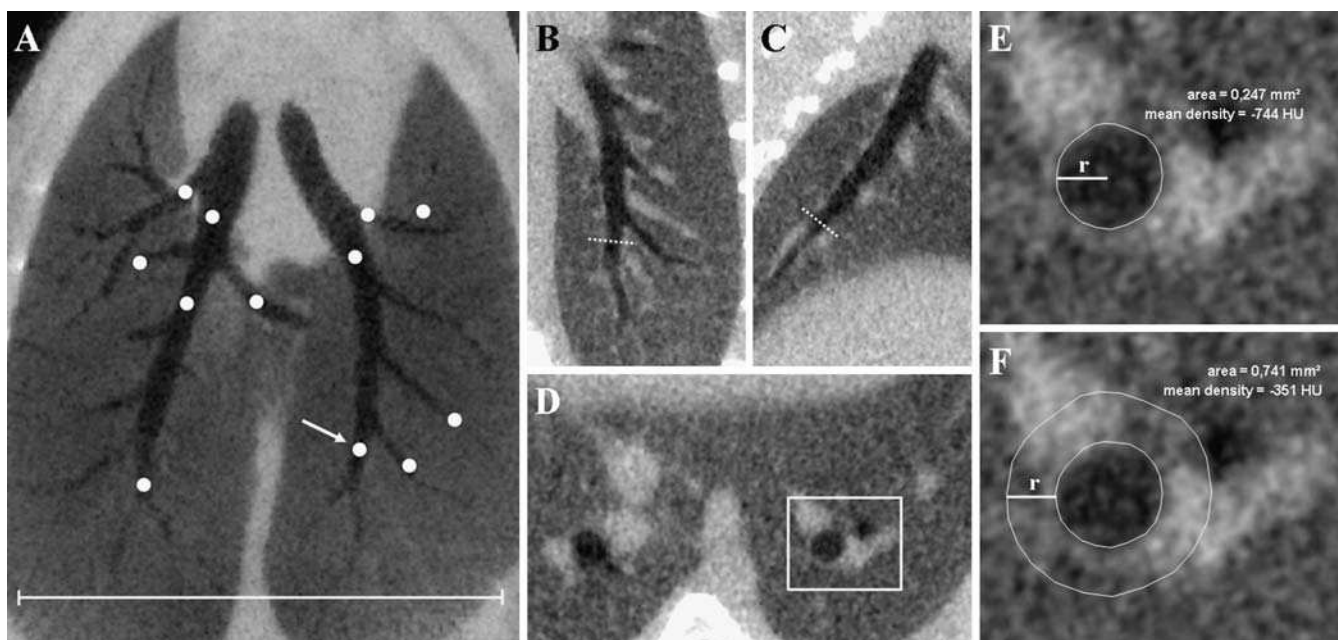
Twelve female BALB/c mice (5 weeks old) were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, St Isle, France) and acclimatised for 1 week before the experiment started. All animal use procedures were approved by our local Animal Care Committee.

### Chronic model of asthma

Six mice were sensitised by two intraperitoneal injections of 100  $\mu\text{g}$  of ovalbumin on days 0 and 14 in the absence of aluminium hydroxide. Mice were anaesthetised using an intraperitoneal injection of both 50  $\mu\text{g}/\text{g}$  ketamine (Panpharma, Fougères, France) and 5  $\mu\text{g}/\text{g}$  xylazine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). They were then challenged intranasally with 500  $\mu\text{g}$  of ovalbumin on days 14, 27, 28, 29, 47, 61, 73, 74 and 75 as described by Henderson et al. [9]. The control group ( $n=6$ ) received normal saline intraperitoneally or intranasally on the same days.

### Bronchial hyperresponsiveness measurement

BHR to methacholine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was determined in unrestrained conscious mice by single-chamber plethysmography (Emka Technologies, Paris, France). Enhanced pause parameter (Penh) was measured and averaged for 3 min, 30 s after each successive inhalation of an increasing dose of aerosolised methacholine (1–32 mg/ml) [16, 17]. These measurements were performed on days 0 and 76 for all mice and expressed as a ratio of Penh measured in response to 8 mg/ml methacholine to that with normal saline.



**Fig. 1** Typical *in vivo* micro-CT images from a control mouse (voxel dimensions =  $46 \mu\text{m}^3$ ). **a** Thick coronal minIP reformation of the entire bronchial tree showing the 12 reconstructed bronchi (dots). Scale bar indicates 1 cm. Arrow indicates the bronchus of interest. **b** Coronal and **c** sagittal thin-section reformations of the left bronchial tree. The dotted lines placed perpendicular to the main axis of the studied bronchus indicate the plane for the orthogonal

reformation. **d** Thin-section reformation of the studied bronchus orthogonal to its long axis, as defined in **b** and **c**. The outlined area indicates the studied bronchus. **e** Magnification of **d** showing the lumen delineation for lumen area and lumen density measurement.  $r$  Radius of the lumen. **f** A hollow ring-shaped ROI is drawn around the lumen area with an ROI thickness equal to  $r$  in order to measure the mean peribronchial density

## Micro-CT imaging

On day 81, mice were anaesthetised using the protocol described above and tracheal intubation was performed with a 22-Gauge Teflon intravenous catheter that was immediately connected to a dedicated ventilator Alphalab (Minerve, Esternay, France). Mice were ventilated using 100% FIO<sub>2</sub>, 40/min breathing frequency, and a 20 cm H<sub>2</sub>O inspiratory pressure peak. They were then positioned supine on a dedicated polycarbonate bed and placed within a thermostatic chamber, CTI-120 (Minerve, Esternay, France). Water, bone and air standards were placed in the chamber, in order to normalise the Hounsfield Units (HU) scale for each dataset acquisition. Mice were then placed within the micro-CT system (GE Healthcare eXplore Locus, GE Healthcare, London, ON, Canada) for in vivo data acquisition. The output signal of the ventilator allowed data acquisition to be triggered at the end of expiration. Images were obtained in the absence of any contrast agent at 80 kV, 0.45 mA. A total of 720 projections were acquired with a 0.5° angular increment during a 360° circular orbit. A single frame was acquired at each angle, with a 400-ms nominal exposure time per projection. The entire acquisition lasted 17 min and the X-ray entrance dose was 0.26 Gy per acquisition. Contiguous axial images in DICOM format were reconstructed using a 23-mm field of view, a 512 ×

512 matrix and a high-resolution reconstruction algorithm. The resulting voxel size was 46 × 46 × 46 μm. A mouse thorax image data set contained a mean of 300 images, typically with the lungs included in a mean of 180 images.

## Image post-processing

Volume datasets were exported to a commercial workstation (DXMM, Medasys, Gif-sur-Yvette, France) in DICOM format, and information about the group was deleted. All micro-CT images were analysed in random order. Commercially available software (Myrian, Intravision, Montpellier, France) using a volume-growing algorithm from bi-thresholded voxels (−1000 to −100 HU) was used for total lung volume and mean density measurement. Furthermore, three bronchial parameters were measured from the same 12 bronchi in each mouse (Fig. 1). Multiplanar reformations and anatomical landmarks helped to identify the selected bronchi. For each bronchus, a cross-sectional reformation was first performed at a fixed distance from its origin. On each orthogonal reformation, the bronchial lumen was manually delineated, and lumen area (LA) and mean lumen density (LD) were measured. Because the outer limit of the bronchial wall was not clearly identifiable in asthmatic mice, a ring-shaped region

**Table 1** Mice characteristics

	Asthmatic mice ( <i>n</i> =6)	Control mice ( <i>n</i> =6)	<i>P</i> value
Weight at day 76 (g)	20.8±0.8	21.2±1.3	0.579
Plethysmographic data			
Penh ratio at day 0	1.81±1	1.92±1.24	0.937
Penh ratio at day 76	10.51±2.35	2.23±1.67	0.002
Histological data			
Peribronchial space area (μm <sup>2</sup> )	52,778±27,977	15,518±3,861	0.002
Number of nucleated cells within the peribronchial space area (cell/μm <sup>2</sup> )	599±317	232±57	0.026
Wall area (μm <sup>2</sup> /bronchus)	34,977±11,023	19,201±2,289	0.041
Wall area/basement membranous length (μm)	8.17±1.98	5.29±0.63	0.009
Bronchial muscle area (μm <sup>2</sup> /bronchus)	13,400±4,994	6,280±3,293	0.041
Bronchial muscle area/basement membranous length (μm)	14.54±4.56	7.86±3.34	0.016
Vascular muscle area (μm <sup>2</sup> /vessel)	8,700±2,907	5,872±1,481	0.065
Micro-CT data			
	( <i>n</i> =5)	( <i>n</i> =5)	
Total lung volume (cm <sup>3</sup> )	0.67±0.19	0.63±0.09	0.0675
Total lung density (HU)	−467±65	−472±29	0.859
TLA (mm <sup>2</sup> )	3.73±1.46	3.14±0.41	0.690
LDI (HU)	−658.2±61	−714.4±27.9	0.222
PBDI (HU)	−210±40	−338.9±55	0.008

Data are means ± standard deviation

TLA Total lumen area, LDI lumen density index, PBDI peribronchial density index

**Table 2** Measurement agreement of micro-CT bronchial lumen areas and peribronchial densities

	Over-time agreement	Across-observer agreement
Bronchial lumen areas		
Pearson correlation coefficient ( <i>P</i> value)	0.977 (<0.001)	0.968 (<0.001)
Difference <sup>a</sup>	0.01±0.06	0.03±0.09
Intra-class correlation coefficient	0.976	0.943
Sw	0.04	0.07
Spearman rank correlation coefficient <sup>b</sup> ( <i>P</i> value)	0.31 (<0.001)	0.53 (<0.001)
Peribronchial densities		
Pearson correlation coefficient ( <i>P</i> value)	0.976 (<0.001)	0.947 (<0.001)
Difference <sup>a</sup>	7.92±26.88	4.96±40.29
Intra-class correlation coefficient	0.97	0.95
Sw	19.74	28.59
Spearman rank correlation coefficient <sup>b</sup> ( <i>P</i> value)	0.057 (0.053)	-0.16 (0.08)

Note: agreements were evaluated using data from 120 reconstructed bronchi

Sw Error measurement

<sup>a</sup>Data are mean ± standard deviation

<sup>b</sup>Data are correlation coefficients between mean measurements and their standard deviations

of interest (ROI) was then drawn around the lumen in order to measure the peribronchial density (PBD). The thickness of the ROI was chosen equal to the radius of the bronchial lumen since peribronchial infiltration was shown to grossly scatter just beyond this limit in a previous histological study using the same asthma model [9]. From LD and PBD, we calculated a lumen density index (LDI) and a peribronchial density index (PBDI) by assigning to each of the 12 studied bronchi a weighting depending on its LA. LDI was then calculated as  $LDI = \sum (LA \times LD) / \sum LA$  and PBDI as  $PBDI = \sum (LA \times PBD) / \sum LA$ . Lastly, we computed the total lumen area (TLA) as the sum of the 12 bronchial LA. Bronchial measurements were performed by two observers, one of them repeating the analysis after 1 month.

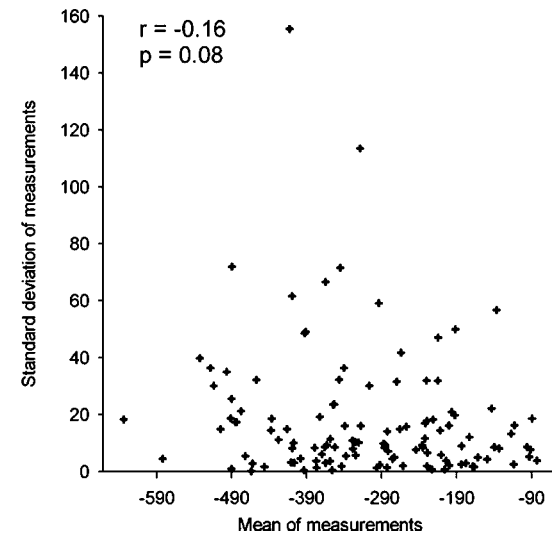
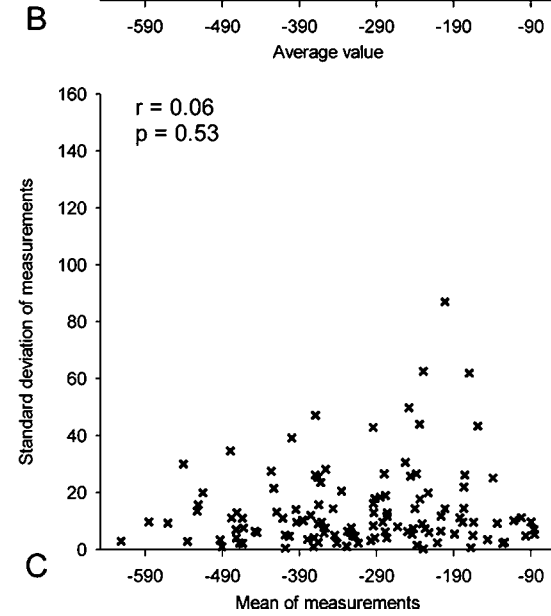
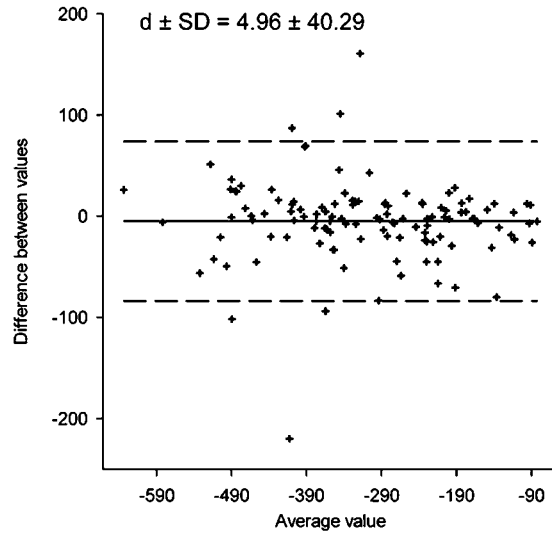
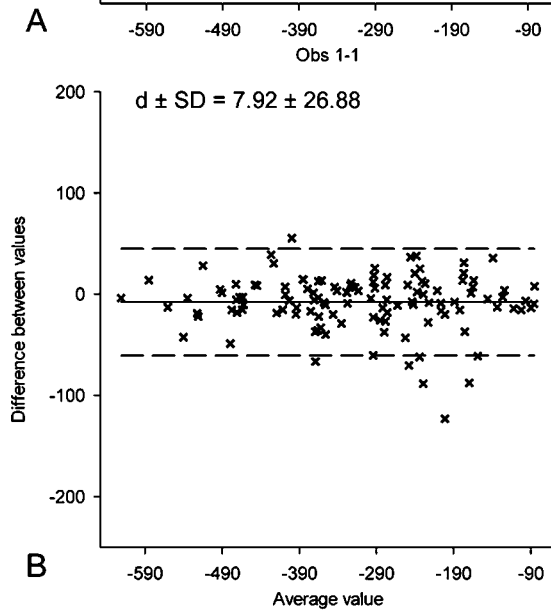
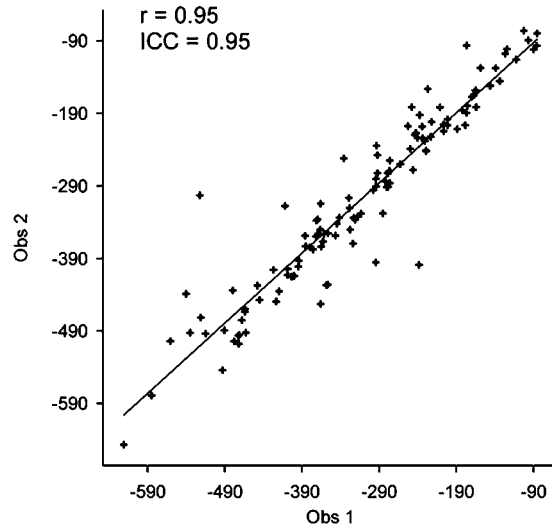
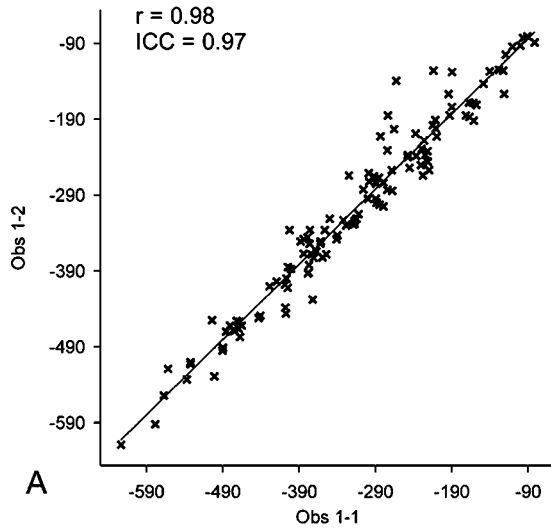
#### Lung histology and immunohistochemistry

On day 81, anaesthetised mice were exsanguinated by cardiac puncture within 6 h of micro-CT. Right and left lung tissue were dissected out, fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. Histological analysis was performed on 4-µm-thick lung slices stained with haematoxylin-eosin-safran and Masson's trichrome.

Immunohistochemistry was performed after deparaffinisation and rehydration through graded alcohols [18]. Endogenous peroxidase was then inhibited using a solution of 0.1% sodium azide and 0.3% hydrogen peroxide for 30 min, followed by two rinses in phosphate-buffered saline (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Non-specific staining was blocked using 10% bovine serum albumin

(Dako, Trappes, France) for 30 min. Sections were incubated for 2 h at room temperature with an anti-mouse alpha smooth muscle actin or the relevant antibody (both from Sigma-Aldrich). After rinsing in phosphate-buffered saline, biotinylated rabbit secondary antibody (Dako) was applied to the sections for 2 h and followed by the streptavidin-biotin horseradish-peroxidase complex (Dako) for a further 2-h period. After rinsing in phosphate-buffered saline, 1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako) in the presence of 0.02% hydrogen peroxide was incubated for 6 min and used as a substrate to develop a peroxide-dependent brown color reaction at room temperature. Finally, the sections were rinsed and counterstained with Mayer's haematoxylin. Smooth muscle was identified by a pathologist in a blinded fashion using both morphological characteristics and α-smooth muscle actin staining as described previously [19]. Various quantitative parameters were assessed using Quancoul (Quant'Image, Bordeaux, France) software at magnifications of 200× to 400× [20]. The peribronchial space and the basal membrane length were manually delineated. The number of

**Fig. 2** Bland-Altman analysis for peribronchial density. **a** Correlation over time (*left*) or across observers (*right*) of peribronchial density measurements. The *diagonal lines* correspond to the lines of equality. **b** Means of measurements over time (*left*) or across observers (*right*) are plotted against their differences. *Solid lines* correspond to the mean difference. *Dashed lines* correspond to the mean difference ± 2 standard deviations. **c** Means of measurements over time (*left*) or across observers (*right*) are plotted against their standard deviations. ICC Intra-class correlation coefficient, *Obs1-1* first measurement obtained by observer 1, *Obs1-2* second measurement obtained by observer 1, *Obs1* average value obtained by observer 1, *Obs2* measurement obtained by observer 2, *r* Spearman correlation coefficient





nucleated cells was automatically counted within the peribronchial space. The wall area (defined by the sum of epithelial, submucosal and smooth-muscle areas) and the bronchial smooth muscle area were automatically delineated from a mean of five bronchi per mouse. Similarly, the vascular smooth muscle area was automatically delineated from a mean of five arterial pulmonary vessels per mouse.

### Statistical analysis

According to Bland-Altman analysis, intra- and inter-observer agreement of LA and PBD were evaluated by (1) Pearson's correlation coefficient, (2) lack of agreement (i.e. bias estimated by the mean difference and the standard deviation from the mean), (3) intra-class correlation coefficient (ICC), and (4) means of both measurements plotted against their differences [21–23]. We also analysed the measurement error graphically by plotting the standard deviation of measurements against their mean and analytically by Spearman's correlation coefficient of data and the within-subject standard deviation.

Comparison of functional data, micro-CT measurements (total lung volume, total lung mean density, PBDI, LDI and TLA), and histological data between groups was achieved using Wilcoxon's signed-rank test. Correlations between PBDI on the one hand, and functional or histological data on the other hand were achieved using Spearman's correlation test. For the purpose of comparisons and correlations, we used values of PBDI averaged across observers and over time. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . All analyses were performed using NCSS software (NCSS 2001, Kaysville, UT, USA).

## Results

### Relevance of the asthmatic mouse model

Chronic ovalbumin sensitisation of BALB/c mice did reproduce the main characteristics of asthma. Before sensitisation, the Penh ratio between the groups was not statistically different. Conversely, after sensitisation, asthmatic mice presented a bronchial hyperresponsiveness to methacholine with a Penh ratio significantly increased at day 76 compared with control mice and with the baseline level (Table 1). Histological data showed a significantly higher bronchial wall area in asthmatic mice than in controls. The number of nucleated cells within the peribronchial space, which defines bronchial inflammation, and the bronchial smooth-muscle area, which defines bronchial remodelling, were also significantly higher in asthmatic mice than in controls (Table 1).

### Micro-CT analysis

Micro-CT was successfully performed in 10 out of 12 mice. One mouse from the asthmatic group did not recover from anaesthesia, and one from the control group was not sufficiently anaesthetised, resulting in a poorly synchronised acquisition that led to motion artefacts. Micro-CT analysis was performed from the 3rd to 7th bronchial generations. Lumen diameters ranged from 292 to 923  $\mu\text{m}$ .

LA and PBD measurement agreement across observers and over time was very good (Table 2, Fig. 2). The error measurement found was minimal (Table 2). Standard deviations of measurements correlated with mean values for LA only ( $P < 0.001$ ).

### Comparisons of micro-CT parameters between asthmatic and control mice

Total lung volume, total lung density, TLA and LDI were not significantly different between asthmatic and control mice (Table 1). By contrast, PBDI was significantly higher in asthmatic mice than in control mice ( $-210$  vs  $-338.9$  HU,  $P = 0.008$ ) (Table 1, Fig. 3).

### Correlations between micro-CT and plethysmographic or histological parameters

PBDI was positively and significantly correlated to the Penh ratio and various histological parameters including peribronchial space, wall area and bronchial muscle area (Table 3, Fig. 4). Conversely, PBDI correlated neither with the number of nucleated cells infiltrating the peribronchial space nor with the vascular muscle area (Table 3).

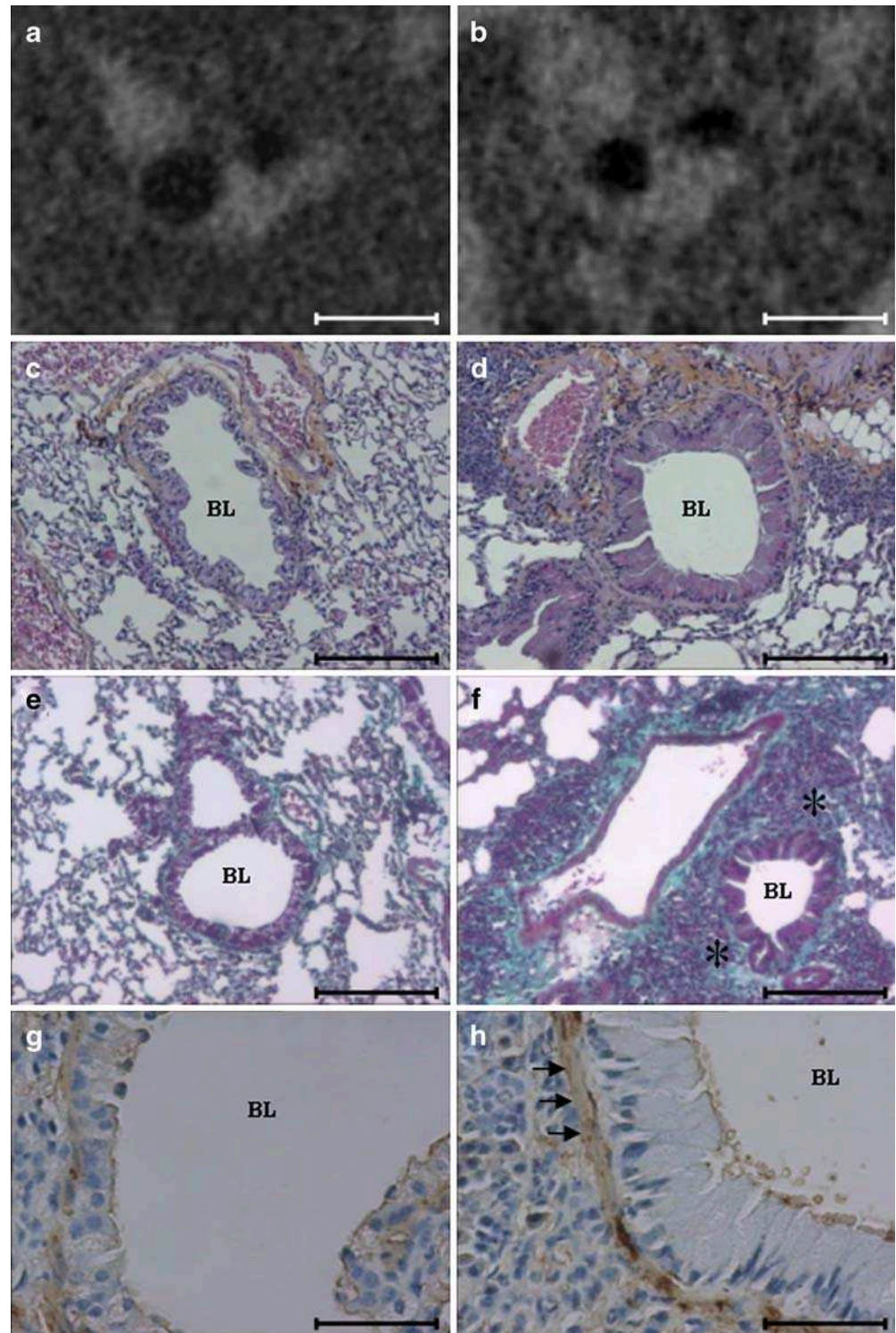
## Discussion

This study demonstrates that, in a validated model of murine asthma, *in vivo* measurement of PBDI using respiratory-gated micro-CT discriminates between asthmatic and control mice and correlates with functional and histological data. To the best of our knowledge, this is the first *in vivo* CT study assessing bronchial measurement in asthmatic mice.

We used a model of asthma developed in BALB/c mice and exhibiting the three characteristics of the disease, i.e. bronchial hyperresponsiveness, inflammation and remodelling [9]. This model resulted in asthma-related peribronchial modifications only, as attested in our mice by the absence of difference in lumen area, lumen density, total lung volume and total lung density between groups.

One of the major findings of our study was the strong correlation between PBDI and bronchial smooth muscle size, which reflects bronchial remodelling. Hypertrophy

**Fig. 3** Reformatted thin-section micro-CT of the left postero-basal bronchus from a control (**a**) and an asthmatic mouse (**b**). The PBDI (definer) was  $-351$  and  $-232$  HU in **a** and **b** respectively. Representative optic microscopic images from bronchial sections stained with HES (**c, d**), Masson's trichrome (**e, f**) or  $\alpha$ -smooth muscle actin (**g, h**) obtained from a control (**c, e, g**) and an asthmatic mouse (**d, f, h**). Note the diffuse cell infiltration of the peribronchial space (*asterisks*) and the increased smooth-muscle mass (*arrowheads*) in the asthmatic mouse compared with the control. BL Bronchial lumen. Scale bars represent 1 mm (**a, b**), 200  $\mu$ m (**c-f**, 100 $\times$  magnification) or 50  $\mu$ m (**g, h**, 400 $\times$  magnification)



and/or hyperplasia of smooth muscle cells are major components of bronchial remodelling [3] that constitute potential targets for new treatments [19, 24]. As a consequence, micro-CT could be a reliable non-invasive

tool to monitor treatment-induced evolution of bronchial remodelling in preclinical studies.

Another finding of our study was the positive correlation between hyperresponsiveness and PBDI. Because in the

**Table 3** Correlation between PBDI values and functional or histological parameters

Parameters	PBDI (all mice)
Penh ratio	0.64 (0.048)
Peribronchovascular space area	0.69 (0.025)
Number of nucleated cells within the peribronchial space	0.47 (0.174)
Wall area	0.67 (0.033)
Wall area/basement membranous length	0.81 (0.005)
Bronchial muscle area	0.72 (0.018)
Bronchial muscle area/basement membranous length	0.81 (0.005)
Vascular muscle area	0.55 (0.098)

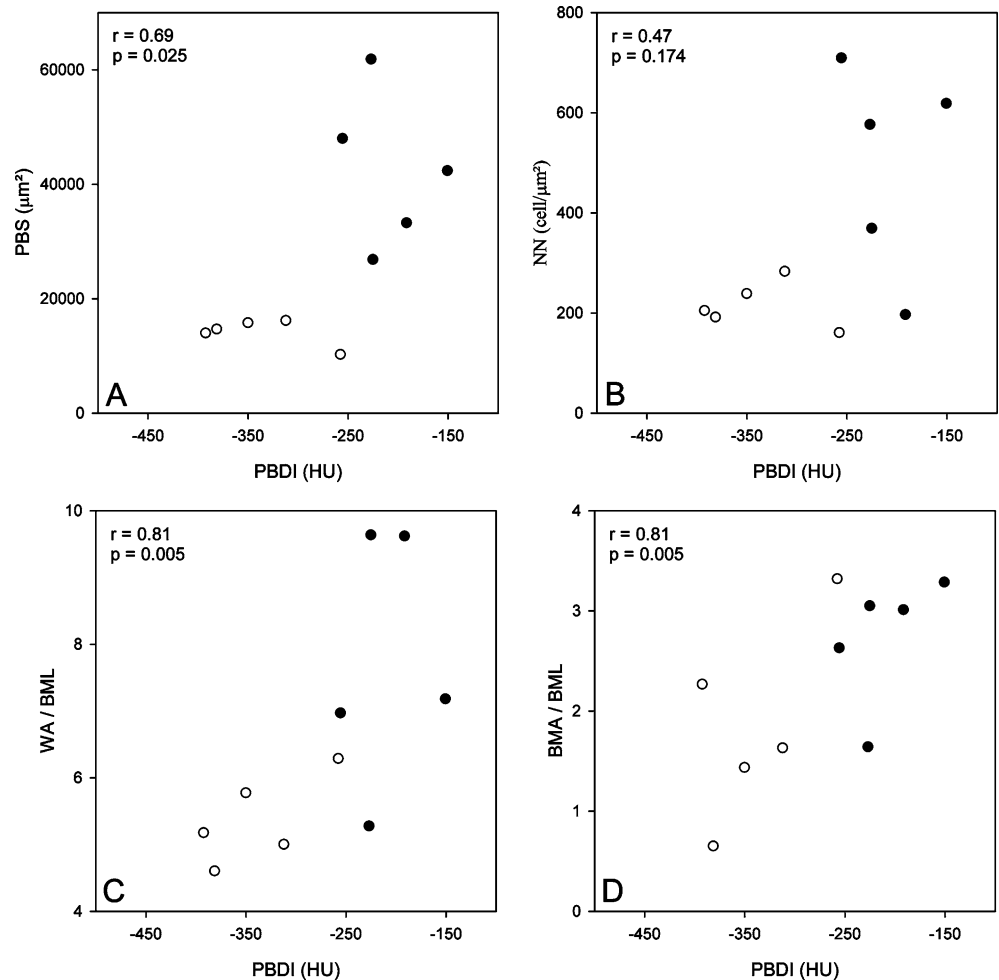
Data are Spearman rank correlation coefficients. Data *in parentheses* are *P* values

BALB/c strain bronchial hyperresponsiveness has been related to eosinophil accumulation [25], this result suggests that PBDI could reflect peribronchial inflammation. Nevertheless, we did not find any correlation between the number of inflammatory cells and PBDI despite histology showing an intense peribronchial cell inflammation in the

asthmatic mice. However, we did not specifically count eosinophils, and this issue requires further study.

The choice of the PBDI parameter in asthma deserves further comment. Using a 100- $\mu\text{m}^3$  spatial resolution, Johnson had already proposed attenuation value measurement from a ring-shape ROI drawn around a single bronchus

**Fig. 4** Scatterplots show correlation between peribronchial density index (*PBDI*) with various histological parameters: **a** peribronchial space (*PBS*), **b** number of nucleated cells within the PBS (*NN*), **c** wall area/basement membranous length ratio (*WA/BML*), **d** bronchial muscle area/basement membranous length ratio (*BMA/BML*). Spearman correlation coefficients (*r*) and *P* values are indicated





in a mouse model of lung fibrosis [13]. In humans, asthma-related histological changes are limited to the bronchial wall [26]. Consequently, the analysis of bronchial wall thickness and cross-sectional surfaces appears to be relevant when studying human asthma using CT [5–7]. Conversely, in mice, a previous histological study using this asthma model showed that cell infiltration was largely scattered in the peribronchial space [9]. This pattern was also displayed in our mice (Fig. 3f) and likely explained the ill-defined outer limit of the bronchial wall on micro-CT images (Fig. 3b). As a consequence, measurements of wall thickness/area in mice could be inaccurate; therefore, we decided to measure the mean attenuation value of a peribronchial ring-shaped ROI, the thickness of which was equal to the bronchial radius. By doing so, most of remodelling elements were expected to be included in the ROI [9]. Finally, delineating the inner limit of the bronchial wall was the only operator-dependent key step. Using micro-CT, both high spatial resolution and contrast between bronchial wall and lumen allowed an accurate delineation of the inner bronchial limit, as shown by the very good agreements when measuring LA.

The micro-CT technique used in this study also deserves further discussion. Mice were imaged at end-expiration, which is the period of minimal motion. This respiratory-gated technique is commonly used [12, 13]. However, it lasts 17 min and requires endotracheal intubation and mechanical ventilation, which can induce lung injury [27], especially in animals with impaired respiratory function. Some authors have developed free-breathing techniques without intubation [15, 28, 29] that permit both anatomical

and functional assessments. Nevertheless, mechanical ventilation results in a slower and more regular breath than free-breathing techniques. As a consequence, exposure time was longer leading to a better image quality. Flat-panel volumetric CT is another interesting method that can be used in small animals and allows acquisition of a large volume with reduced imaging times and exposure dose [30]. However, despite imaging times approaching 8–10 s, respiratory gating remains necessary.

Furthermore, assessment of small bronchi requires high spatial resolution and consequently long exposure times. To reach a spatial resolution of 46  $\mu\text{m}$ , we used a 400-ms nominal frame exposure. In order to increase the expiratory phase duration and avoid motion artefacts, the respiratory rate was set at 40 cycles/min, which is markedly different from the physiological breathing rate (163/min) as assessed by the Mouse Phenome Database [29].

Finally, whereas the radiation dose delivered to the animal in the present study can be considered adequate and safe [31], repeated micro-CT, especially with short-time intervals, may induce radiation pneumonitis and alter the experimental outcomes [32, 33]. Further technical improvements are thus required.

In conclusion, we showed that peribronchial attenuation values measured using *in vivo* respiratory-gated micro-CT discriminate between normal and asthmatic mice and correlate with bronchial hyperresponsiveness and remodelling. The peribronchial density index may be used to evaluate the effects of new drugs on bronchial remodelling in asthma.

## References

- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM (2000) Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1720–1745
- Sumi Y, Hamid Q (2007) Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 56:341–348
- Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q (2005) Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:544–549
- Grenier P, Mourey-Gerosa I, Benali K, Brauner MW, Leung AN, Lenoir S, Cordeau MP, Mazoyer B (1996) Abnormalities of the airways and lung parenchyma in asthmatics: CT observations in 50 patients and inter- and intraobserver variability. *Eur Radiol* 6:199–206
- Niimi A, Matsumoto H, Amitani R, Nakano Y, Mishima M, Minakuchi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T (2000) Airway wall thickness in asthma assessed by computed tomography. Relation to clinical indices. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1518–1523
- Kasahara K, Shiba K, Ozawa T, Okuda K, Adachi M (2002) Correlation between the bronchial subepithelial layer and whole airway wall thickness in patients with asthma. *Thorax* 57:242–246
- Little SA, Sproule MW, Cowan MD, Macleod KJ, Robertson M, Love JG, Chalmers GW, McSharry CP, Thomson NC (2002) High resolution computed tomographic assessment of airway wall thickness in chronic asthma: reproducibility and relationship with lung function and severity. *Thorax* 57:247–253
- Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP (2005) Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 35:1251–1253
- Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY (2002) A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 165:108–116
- Langheinrich AC, Leithauser B, Greschus S, Von Gerlach S, Breithecker A, Matthias FR, Rau WS, Bohle RM (2004) Acute rat lung injury: feasibility of assessment with micro-CT. *Radiology* 233:165–171
- Watz H, Breithecker A, Rau WS, Kriete A (2005) Micro-CT of the human lung: imaging of alveoli and virtual endoscopy of an alveolar duct in a normal lung and in a lung with centrilobular emphysema-initial observations. *Radiology* 236:1053–1058

12. Cody DD, Nelson CL, Bradley WM, Wislez M, Juroske D, Price RE, Zhou X, Bekele BN, Kurie JM (2005) Murine lung tumor measurement using respiratory-gated micro-computed tomography. *Invest Radiol* 40:263–269
13. Johnson KA (2007) Imaging techniques for small animal imaging models of pulmonary disease: micro-CT. *Toxicol Pathol* 35:59–64
14. Lee HJ, Goo JM, Kim NR, Kim MA, Chung DH, Son KR, Kim HC, Lee CH, Park CM, Chun EJ, Im JG (2008) Semiquantitative measurement of murine bleomycin-induced lung fibrosis in vivo and postmortem conditions using microcomputed tomography: correlation with pathologic scores-initial results. *Invest Radiol* 43:453–460
15. Ford NL, Martin EL, Lewis JF, Veldhuizen RA, Holdsworth DW, Drangova M (2009) Quantifying lung morphology with respiratory-gated micro-CT in a murine model of emphysema. *Phys Med Biol* 54:2121–2130
16. Dohi M, Tsukamoto S, Nagahori T, Shinagawa K, Saitoh K, Tanaka Y, Kobayashi S, Tanaka R, To Y, Yamamoto K (1999) Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma. *Lab Invest* 79:1559–1571
17. Adler A, Cieslewicz G, Irvin CG (2004) Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Appl Physiol* 97:286–292
18. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM (2007) Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 62:8–15
19. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Berger P (2007) Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204:3173–3181
20. Berger P, Lavallee J, Rouiller R, Laurent F, Marthan R, Tunon-de-Lara JM (1999) Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 14:1394–1402
21. Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307–310
22. Bland JM, Altman DG (1996) Measurement error. *BMJ* 313:744
23. Bland JM, Altman DG (1996) Measurement error and correlation coefficients. *BMJ* 313:41–42
24. Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Niven RM, Corris PA, Siersted HC, Olivenstein R, Pavord ID, McCormack D, Chaudhuri R, Miller JD, Laviolette M (2007) Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med* 356:1327–1337
25. Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW (2001) Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L394–402
26. Jeffery PK (2001) Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164:S28–S38
27. Walder B, Fontao E, Totsch M, Morel DR (2005) Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats. *Eur J Anaesthesiol* 22:785–794
28. Ford NL, Nikolov HN, Norley CJ, Thornton MM, Foster PJ, Drangova M, Holdsworth DW (2005) Prospective respiratory-gated micro-CT of free breathing rodents. *Med Phys* 32:2888–2898
29. Bartling SH, Dinkel J, Stiller W, Grasruck M, Madisch I, Kauczor HU, Semmler W, Gupta R, Kiessling F (2008) Intrinsic respiratory gating in small-animal CT. *Eur Radiol* 18:1375–1384
30. Greschus S, Kiessling F, Lichy MP, Moll J, Mueller MM, Savai R, Rose F, Ruppert C, Gunther A, Luecke M, Fussenig NE, Semmler W, Traupe H (2005) Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging. *Neoplasia* 7:730–740
31. Ford NL, Thornton MM, Holdsworth DW (2003) Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med Phys* 30:2869–2877
32. Taschereau R, Chow PL, Chatziioannou AF (2006) Monte Carlo simulations of dose from microCT imaging procedures in a realistic mouse phantom. *Med Phys* 33:216–224
33. Liao ZX, Travis EL, Tucker SL (1995) Damage and morbidity from pneumonitis after irradiation of partial volumes of mouse lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:1359–1370

## **B. Évaluation du remodelage bronchique par micro-scanner dans différents modèles murins d'asthme**

Le précédent travail ne permet néanmoins pas de préciser si cette augmentation de la densité péri-bronchique observée dans un modèle murin caractérisé par un infiltrat inflammatoire et des remaniements structuraux bronchiques, reflète plus spécifiquement l'inflammation ou le remodelage bronchique. Par ailleurs, la détermination manuelle de la densité péri-bronchique et le temps nécessaire à l'analyse des images post-acquisition constituent un facteur limitant à son utilisation.

Les objectifs de ce travail étaient donc (i) d'établir différents modèles murins de sensibilisation à l'ovalbumine caractérisés sur le plan histologique par une inflammation et/ou un remodelage bronchique, (ii) de valider une méthode semi-automatique de détermination de la densité péri-bronchique par micro-scanner, et (iii) de préciser si cette densité péri-bronchique relevait plus spécifiquement de l'inflammation et/ou du remodelage bronchique.

Trois modèles murins de sensibilisation à l'ovalbumine ont ainsi été utilisés, chaque groupe étant constitué de 20 souris BALB/C femelles âgées de 5 semaines, avec 10 animaux témoins et 10 animaux sensibilisés. Après deux injections intra-péritonéales, 30 souris ont bénéficié d'instillations intra-nasales répétées d'ovalbumine, tandis que les 30 souris contrôles ont reçu une administration de sérum salé isotonique selon le même calendrier. La différence entre ces différents modèles de sensibilisation résidait dans la durée de la sensibilisation, plus ou moins longue. Comme précédemment, la réactivité bronchique a été déterminée avant et après sensibilisation, puis ont été effectués l'imagerie des voies aériennes par micro-scanner et le sacrifice des animaux pour l'étude cytologique et histologique des bronches. La densité péri-bronchique a été déterminée grâce à un traitement des images post-acquisition en 4 étapes, avec une segmentation automatique première des voies aériennes, suivie d'une dilatation de 8

voxels et d'une nouvelle segmentation des voies aériennes, pour finalement procéder à une soustraction manuelle de la lumière bronchique. Un index de densité péri-bronchique normalisé en fonction de la densité pulmonaire totale a également pu être déterminé.

Ces différents modèles murins de sensibilisation ont permis de reproduire, sur le plan cytologique et histologique, trois profils phénotypiques distincts : inflammatoire, inflammatoire et remodelé, et uniquement remodelé. La densité péri-bronchique déterminée de façon semi-automatique est corrélée à celle obtenue de façon manuelle, validant ainsi la méthode. Comme précédemment, la densité péri-bronchique normalisée en fonction de la densité pulmonaire totale est augmentée chez les souris sensibilisées présentant un profil histologique à la fois inflammatoire et remodelé. En revanche, elle n'est pas augmentée chez les souris sensibilisées présentant un profil histologique inflammatoire seul, alors qu'elle est augmentée lorsque le profil histologique est uniquement remodelé. Par ailleurs, cet index de densité péri-bronchique normalisé est corrélé plus spécifiquement à des paramètres histologiques témoignant du remodelage bronchique, telles que la surface du muscle lisse bronchique ou la fibrose péri-bronchique.

Ce travail démontre donc que la densité péri-bronchique normalisée en fonction de la densité pulmonaire totale relève plus spécifiquement du remodelage que de l'inflammation bronchique. Par ailleurs, cette méthode semi-automatique de détermination de la densité péri-bronchique présente l'avantage de diminuer le temps nécessaire à l'analyse des images post-acquisition tomодensitométriques. En outre, elle permet une analyse globale et tridimensionnelle de l'arbre bronchique chez la souris.

**Article n°4**

***In vivo* micro-CT in various mouse asthma models: integrated  
assessment of airway remodelling**

Soumis à Radiology 2011

Mathieu Lederlin, Annaïg Ozier, Gael Dournes, Olga Ousova,  
Jana Savitskaia, Andrei Kamaev, Hugues Begueret, Michel  
Montaudon, François Laurent, Patrick Berger

***In vivo* micro-CT in various mouse models of asthma: integrated assessment of airway remodelling.**

M. Lederlin, A. Ozier, G. Dournes, O. Ousova, J. Savitskaia, A. Kamaev, H. Begueret, R. Marthan, M. Montaudon, F. Laurent, P. Berger.

Manuscript type: original research.

Advances in Knowledge:

1. In various mouse models of asthma, micro-CT provides a reliable integrated assessment of airway remodelling.
2. The peribronchial attenuation value normalized by the total lung attenuation value is a reliable biomarker of airway remodelling in mouse models of asthma.

Implications for patient Care:

1. Micro-CT can monitor remodelling non-invasively in asthmatic mice when testing new drugs targeting airway remodelling.
2. The peribronchial attenuation value normalized by the total lung attenuation value may be applied to human lung CT studies to assess remodelling non-invasively.

Summary statement:

The peribronchial attenuation value normalized by the total lung attenuation value was increased in mice exhibiting airway remodelling, but was unchanged in mice exhibiting inflammation only. Moreover, normalized PBA was the best micro-CT parameter correlated with remodelling markers (page 9, first paragraph of the discussion section).

## **Abstract**

**Purpose:** To develop flexible mouse models of asthma exhibiting inflammation alone, remodelling alone, or both characteristics. To determine whether in vivo micro-CT is able to demonstrate airway inflammation or remodelling in these models.

**Material and method:** This study complied with the European law and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. Sixty Balb/c mice were challenged intranasally with ovalbumin or saline at 3 different endpoints (Days 35, 75, and 110). Using micro-CT images, total lung attenuation (TLA) and peribronchial attenuation (PBA) were extracted. A semi-automatic method for PBA extraction was assessed against a method of reference. Normalized PBA was calculated as  $1-(PBA/TLA)$ . All mice underwent plethysmography before micro-CT, whereas BAL fluid and lung histology were performed after micro-CT. Each parameter was compared between OVA and control mice using Wilcoxon's signed-rank tests. Spearman rank correlation coefficients were calculated between micro-CT and histological data.

**Results:** As compared to control animals, OVA-sensitized mice exhibited inflammation alone (Day 35), remodelling alone (Day 110) or both inflammation and remodelling (Day 75). The semi-automatic method for PBA measurement showed a good agreement with the manual method. Normalized PBA was significantly different in mice exhibiting bronchial remodelling either alone or in combination with inflammation. Normalized PBA correlated with various remodelling markers such as bronchial smooth muscle size or fibrosis.

**Conclusion:** This study demonstrates that, using 3 different models of murine asthma, normalized PBA extracted from micro-CT examinations in respiratory-gated living mice, can predict the presence of airway remodelling.

**Word count in abstract:** 250

**Keywords:** asthma, remodelling, micro-CT, small animal, attenuation value

## **Introduction**

As a major public health problem worldwide, asthma still requires strong research efforts for a better understanding of the disease leading to new therapeutics. Airway inflammation and remodelling are well-established features of asthma even if their complex relationships are not fully understood (1, 2). Airway remodelling refers to structural changes such as bronchial fibrosis, increase in basal membrane thickness and smooth muscle size (3). This latter has been associated with a decrease in lung function and only-partly reversible airway obstruction leading to a more severe asthma phenotype (4). Thus, understanding of this remodelling process is essential in order to identify new potential therapeutic targets. Histology is the standard method for identifying and grading airway remodelling but its use is limited by its invasiveness. By contrast, imaging techniques such as thin-section computed tomography (CT) are non-invasive and have been shown to identify asthma-related structural changes (5), without distinguishing however, between inflammation and remodelling (6).

Research on animal, models of human diseases, is of main importance for filling the gap between fundamental concepts and their clinical applications. In this way, imaging techniques in animals should strive to target as specific pathological processes as possible, *i.e.* inflammation or remodelling in the case of asthma. Moreover, from a translational viewpoint, imaging of animals should ideally be *in vivo*, thereby allowing longitudinal cohort studies and follow-up of new therapeutic effects (7). *In vivo* micro-computed tomography (micro-CT) has been shown to be promising by demonstrating peribronchial changes in a mouse asthma model (8). In this latter study, the peribronchial attenuation value, extracted from micro-CT images through a time-consuming post-processing, was significantly increased in asthmatic mice as compared to control mice. However, this parameter was also correlated to inflammation and remodelling components, both being present in this animal model of asthma. Therefore, the question whether increase in peribronchial attenuation corresponds to inflammation or remodelling remains to be addressed. Two key points are thus required for



further validation of micro-CT in animal model of asthma: more specific histological patterns of murine asthma as well as a more specific micro-CT parameter.

The aims of our study were thus (i) to develop flexible mouse models of asthma exhibiting inflammation alone, remodelling alone, or both characteristics together, (ii) to validate a semi-automatic method enabling a quick and reproducible assessment of peribronchial attenuation from micro-CT datasets, and (iii) to determine whether the peribronchial attenuation or a derived parameter could be related to inflammation, remodelling, or both.

## **Methods**

A complete description of all methods is available as supplemental material.

### *Models of asthma and scheme of the study*

The challenge protocols were modified from that described by Lederlin et al. (8). Briefly, 60 BALB/c mice were sensitized intraperitoneally and challenged intranasally with ovalbumin (OVA) or saline at different days (Figure 1). All animal use procedures were approved by our local Animal Care Committee.

### *Plethysmography*

Bronchial hyperresponsiveness (BHR) to methacholine was determined in unrestrained conscious mice by single-chamber plethysmography (8). The results were expressed as a ratio of enhanced pause parameter (Penh) measured in response to 8 mg/ml methacholine to that with normal saline. In another set of experiments, lung resistance (LR) was measured using invasive plethysmography.

### *Micro-CT imaging*

The micro-CT procedure was identical to that previously described (8). Briefly, mice were anaesthetised, intubated, and connected to a dedicated ventilator for respiratory gating. The output signal of the ventilator allowed data acquisition to be triggered at the end of expiration. Images were obtained in the absence of any contrast agent at 80kV, 0.45mA. The full acquisition lasted 17 min and the expected entrance dose was 0.26 Gy per scan. We obtained an average of 300 DICOM images with a 23-mm field of view and an isotropic  $46 \mu\text{m}^3$  voxel size. Water, bone and air standards were placed in the chamber, in order to normalize the Hounsfield Units (HU) scale for each dataset acquisition. Volume datasets were exported to commercially available software (Myrian, Intrasure, Montpellier, France) in DICOM format, and information about the groups was deleted. All micro-CT images were analyzed in random order.

### *Image post-processing*

From each micro-CT examination, 2 parameters were extracted using Myrian software:

- the total lung mean attenuation (TLA) was automatically assessed using a volume-growing algorithm from bi-thresholded voxels (-900 to -100 HU).
- the peribronchial mean attenuation (PBA) was assessed using a 3D semi-automatic method lasting 6-8 min and comprising 4 steps (Figure 2). The first step was to perform automatic segmentation of the bronchial lumen using a bi-threshold approach (-1024 to -900 HU). The second step applied an automatic three-dimensional morphologic dilatation tool to the volume of interest (VOI) obtained from the first step. This dilatation allowed including the peribronchial space into the VOI (Figure 2C). A 8-voxels dilatation level was found to be optimal to achieve the same peribronchial segmentation than with the manual method (8). The third step consisted in creating a second segmentation VOI of the bronchial lumen overwriting the first VOI. The final step was to subtract the previous VOI (bronchial lumen only) from the

initial VOI (bronchial lumen and peribronchial space). The trachea and the mediastinum were also manually subtracted. The resultant VOI displayed a mean attenuation value named PBA, which was recorded for further analysis. Then, normalized PBA was calculated as follow: 1-(PBA/TLA).

#### *Bronchoalveolar lavage*

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed immediately after sacrifice of animals. At least 400 cells per slide were analyzed by a blinded investigator using standard haematological criteria. Total leukocyte number, percentage of eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages were counted in the BAL fluid using a Neubauer chamber.

#### *Histology*

Histology and immunohistochemistry were performed using lung slices stained with both haematoxylin-eosin-safran or modified Masson's trichrome and anti-mouse alpha smooth muscle actin antibody clone 1A4 (Dako, Trappes, France).

Several quantitative parameters were assessed using Quancoul software (Quant'Image, Bordeaux, France) at magnifications of 100× to 400× (9). The markers of remodelling (10) were the basal membrane thickness (manually delineated), the wall area and the bronchial smooth muscle area (automatically delineated from a mean of five bronchi per mouse) and the area of fibrosis within the peribronchial space (automatically delineated). We also quantified the peribronchial space and the number of nucleated cells within the peribronchial space (automatically counted), which were considered as markers of both inflammation and remodelling.

### *Statistical analysis*

A preliminary study was carried out to compare the semi-automatic method versus a validated manual method for measuring PBA. The manual method has been described previously in detail (8) and was based upon a two-dimensional analysis from multiplanar reformations. In 10 datasets chosen at random, we performed both manual and semi-automatic methods and tested the agreement between semi-automatic and manual methods using Bland-Altman analysis (11).

For each group, we compared all parameters between sensitized and control mice using Wilcoxon's signed-rank tests. Correlations between, on the one hand, PBA or normalized PBA, and, on the other hand, Penh ratio, BAL or histological data, were assessed using the Spearman rank correlation coefficients.

All analyses were performed using NCSS software (NCSS 2001, Kaysville, UT, USA) and results were considered statistically significant when  $P\text{-values} < 0.05$ .

## **Results**

### *Description of asthmatic mouse models*

From an initial set of 60 mice, 51 completed the study. Two mice died during the intubation procedure, 3 mice did not recover from anaesthesia following micro-CT, and 4 mice presented CT motion artefacts. Body weights were similar between control and OVA-sensitized mice at each endpoint. Table 1 displays experimental data from non invasive plethysmography, BAL, and histological parameters for each group (Figure 1). OVA-sensitized mice from group A (Days 35-37) exhibited features of BHR to methacholine, as assessed by a significant increase in Penh ratio, characteristics of airway inflammation, as assessed by the increased percentage of both eosinophils and lymphocytes within the BAL fluid, but no evidence of bronchial remodelling as compared to control animals (Table 1, Figure 3A). OVA-sensitized mice from group B (Days 75-77) also exhibited features of BHR to methacholine and more pronounced

characteristics of airway inflammation (Table 1). However, these mice additionally presented patterns of bronchial remodelling as assessed by the increased basal membrane thickness, wall area and bronchial smooth muscle area (Table 1, Figure 3B). By contrast, OVA-sensitized mice from group C (Days 110-112) did not show any evidence of BHR or airway inflammation but a significant increase in all remodelling markers (Table 1, Figure 3C). In another set of experiments, we measured BHR to methacholine using both non invasive and invasive plethysmography in both control and OVA-sensitized mice at Days 77-78. OVA-sensitized mice presented a significant increase in both Penh and LR ratios (Supplemental Figure 1A and B). In addition, the two parameters were significantly correlated (Spearman correlation coefficient  $r=0.56$ ,  $p=0.03$ ).

#### *Validation of a semi-automatic method for PBA assessment*

PBA measurements obtained with the semi-automatic method showed a good agreement with PBA values obtained with the manual method (Figure 4). The Pearson's correlation coefficient was 0.963. The intraclass correlation coefficient was 0.933. The measurement error between the two methods was 19 HU. Standard deviations of measurements did not correlate with mean values.

#### *Comparisons of micro-CT parameters*

There was no difference in TLA between OVA-sensitized and control mice whatever the group (Figure 5A). There was a significant difference in PBA only in mice from the group B exhibiting both inflammation and remodelling (Figure 5B). However, when PBA was normalized to TLA, significant differences were found in both groups B and C (Figure 5C). Typical micro-CT images from each group are illustrated (Figure 6).

### *Correlations between micro-CT bronchial parameters, Penh ratio, BAL and histological parameters*

A correlation matrix has been built (Table 2). Penh ratio was significantly correlated with PBA. By contrast, correlation was weaker between Penh ratio and normalized PBA, and only present when all mice were included in the analysis. In addition, both PBA and normalized PBA were significantly correlated with inflammatory markers from the BAL fluid such as total number of inflammatory cells and percentages of eosinophils or lymphocytes. Finally, both PBA and normalized PBA were significantly correlated with remodelling parameters such as bronchial wall area, and fibrosis. However, normalized PBA demonstrated higher correlation coefficients particularly with smooth muscle area, even if coefficients were determined in OVA-sensitized mice only. The higher the normalized PBA, the higher the bronchial smooth muscle remodelling was.

### **Discussion**

Taken together, this study demonstrates that, using 3 different models of murine asthma, normalized PBA extracted from micro-CT examinations in living mice, can predict the presence of airway remodelling. Indeed, **the peribronchial attenuation value normalized by the total lung attenuation value was increased in mice exhibiting airway remodelling, but was unchanged in mice exhibiting inflammation only. Moreover, normalized PBA was the best micro-CT parameter correlated with remodelling markers** including smooth muscle hypertrophy.

In this study, we paid a special attention to build flexible challenge protocols based upon different endpoints which reproduced 3 phenotypes of asthma (*i.e.* inflammation only, inflammation and remodelling, and remodelling only). Particularly, eosinophilic inflammation

was observed in groups A and B only, while the main markers of remodelling, *i.e.* bronchial smooth muscle hypertrophy and peribronchial fibrosis, were observed in groups B (day 75) and C (Day 110) only. In human asthma, both inflammation and remodelling are often associated, even if, as in our 3 murine models, patients lacking remodelling and patients lacking inflammation can be identified (12, 13). One could argue that normalized PBA was also correlated with inflammatory markers and thus cannot be considered as a real non invasive CT parameter of the sole airway remodelling. However, the absence of any significant alteration in the normalized PBA of mice with inflammation only was of particular interest. In addition, in mice with both inflammation and remodelling, there were cross-correlations between inflammatory markers such as total cell count in the BAL fluid and remodelling markers such as bronchial fibrosis (data not shown), indicating why normalized PBA was also correlated with inflammatory markers.

In the absence of normalization by the lung attenuation value, PBA appeared to be less specific and only increased in mice exhibiting both inflammation and remodelling, which is concordant with previous study (8). Such result can be explained by the fact that, in mice as well as in humans, remodelling is only located within bronchi whereas inflammation occurs not only in bronchi but also in the distal lung parenchyma (14). For instance, lung attenuation was correlated to distal bronchial inflammation in human COPD patients (15). Therefore, the normalization by the whole lung attenuation might have withdrawn inflammation from the PBA value. Anyway, our results suggest the potential role of this parameter as a biomarker of airway remodeling in mice. Micro-CT should thus be considered for monitoring remodelling when testing new drugs targeting remodelling in longitudinal studies. Micro-CT could also be used as a complement of histology since our technique allows a three-dimensional and comprehensive assessment of remodelling, while histology only provides two-dimensional information from small samples. The 3D semi-automatic method we validated here is less

time-consuming (8 min vs. 40 min) than the manual method (8) since it requires no manual drawing.

No micro-CT parameter was shown to be specific from inflammation in our study. The inflammation component within the distal lung is probably too low to entail significant differences in the total lung attenuation value.

BHR is one of the characteristics of asthma but the exact contribution of inflammation or remodelling remains undetermined in humans (16). In our study, BHR assessed by the Penh ratio was only observed in mice exhibiting inflammation either alone or with remodelling. In small animals, even if clear model-dependent differences have been shown (17), Penh ratio has been shown to be mainly linked to eosinophilic inflammation in Balb/C mice (18), which is consistent with our results. Therefore, a dual *in vivo* examination including both Penh measurement and micro-CT, could provide a reliable integrated longitudinal assessment of both airway inflammation and remodelling respectively.

Potential applications in humans are thus conceivable. Even if molecular imaging is thought to play a crucial role in a near future by targeting specific proteins or receptors involved in asthma (2, 19), multidetector CT might be an easier, cost-effective and is obviously immediately available. By studying attenuation of bronchi wall in COPD patients, Washko et al have shown significant correlations between airway wall attenuation and functional obstructive parameters. Thus, the peribronchial attenuation can be considered as a valid translational concept (20, 21). To our knowledge, no correlation with histology has ever been carried out. Our results in mice should open the way to further studies in humans, aimed at identifying CT markers of asthma.



Our study has some limitations. First, micro-CT examinations were performed after endotracheal intubation. Intubating a mouse is a subtle technique requiring a training phase and may induce injury if improperly done. Free-breathing techniques have been developed to avoid intubation (22, 23) however, in our experience, they cannot reach the same quality of gating than those under mechanical ventilation. To avoid any confounding effect related to repeated anaesthesia, tracheal intubation, or radiation exposure, we did not study a unique cohort of mice at three different time points. Likewise, age-matched control mice were necessary to avoid potential confounding effects due to age-related changes. Another limitation is the use of Penh. This parameter has been validated for BHR assessment in Balb/C mice but does not represent the airway resistance per se (24). We have thus performed additional experiments to compare Penh ratio and lung resistance. In our hands, results from both invasive and non invasive plethysmography were similar and correlated.

To conclude, in vivo respiratory-gated micro-CT allows a non-invasive integrated assessment of airway remodelling. The peribronchial attenuation value normalized by the total lung attenuation value appears to be the most reliable marker of remodelling. It may help evaluating new drugs targeting airway remodelling in pre-clinical studies. This concept might also be applied to lung CT in humans to assess remodelling non-invasively.

#### Practical applications:

Micro-CT can monitor remodelling in asthmatic mice when testing new drugs targeting airway remodelling. The peribronchial attenuation value may be applied to human lung CT studies to assess remodelling non-invasively.

## **Bibliography**

1. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:176-183.
2. Trian T, Benard G, Begueret H, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;204:3173-3181.
3. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J* 2010;36:1174-1184.
4. Kaminska M, Foley S, Maghni K, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:45-51 e41-44.
5. Copley SJ, Wells AU, Muller NL, et al. Thin-section CT in obstructive pulmonary disease: discriminatory value. *Radiology* 2002;223:812-819.
6. Montaudon M, Lederlin M, Reich S, et al. Bronchial measurements in patients with asthma: comparison of quantitative thin-section CT findings with those in healthy subjects and correlation with pathologic findings. *Radiology* 2009;253:844-853.
7. Koo V, Hamilton PW, Williamson K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cell Oncol* 2006;28:127-139.
8. Lederlin M, Ozier A, Montaudon M, et al. Airway remodeling in a mouse asthma model assessed by in-vivo respiratory-gated micro-computed tomography. *Eur Radiol* 2010;20:128-137.
9. Berger P, Lavallee J, Rouiller R, Laurent F, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 1999;14:1394-1402.
10. Denis D, Fayon MJ, Berger P, et al. Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats. *Pediatr Res* 2001;50:515-519.

11. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.
12. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 2007;62:8-15.
13. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:218-224.
14. Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. *Chest* 2003;123:348S-355S.
15. Berger P, Laurent F, Begueret H, et al. Structure and function of small airways in smokers: relationship between air trapping at CT and airway inflammation. *Radiology* 2003;228:85-94.
16. Leigh R, Ellis R, Wattie J, et al. Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:526-535.
17. Kannan MS, Deshpande DA. Allergic asthma in mice: what determines the phenotype? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L29-31.
18. Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L394-402.
19. Chen DL, Kinahan PE. Multimodality molecular imaging of the lung. *J Magn Reson Imaging* 2010;32:1409-1420.
20. Washko GR, Dransfield MT, Estepar RS, et al. Airway wall attenuation: a biomarker of airway disease in subjects with COPD. *J Appl Physiol* 2009;107:185-191.

21. Yamashiro T, Matsuoka S, Estepar RS, et al. Quantitative assessment of bronchial wall attenuation with thin-section CT: An indicator of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *AJR Am J Roentgenol* 2010;195:363-369.
22. Bartling SH, Dinkel J, Stiller W, et al. Intrinsic respiratory gating in small-animal CT. *Eur Radiol* 2008;18:1375-1384.
23. Ford NL, Nikolov HN, Norley CJ, et al. Prospective respiratory-gated micro-CT of free breathing rodents. *Med Phys* 2005;32:2888-2898.
24. Lundblad LK, Irvin CG, Hantos Z, Sly P, Mitzner W, Bates JH. Penh is not a measure of airway resistance! *Eur Respir J* 2007;30:805.

**Table 1: Description of the 3 asthmatic mouse models**

	Group A (Days 35-37)			Group B (Days 75-77)			Group C (Days 110-112)		
	Control (n=8)	OVA (n=8)	P-value	Control (n=9)	OVA (n=10)	P-value	Control (n=8)	OVA (n=8)	P-value
<b>Weight at endpoint (g)</b>	18.4 ± 0.3	18.9 ± 0.4	0.234	22.3 ± 0.4	21.1 ± 0.6	0.150	24.3 ± 0.8	23.4 ± 0.5	0.450
<b>Plethysmography</b>									
Penh ratio at baseline	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.3	0.916	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.156	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.3	0.959
Penh ratio at endpoint	3.5 ± 0.5	10.0 ± 3.6	0.001	3.4 ± 0.8	7.5 ± 1.4	0.045	2.8 ± 0.3	3.5 ± 0.6	0.279
<b>BAL</b>									
Total cells (x 10 <sup>4</sup> /mL)	36.4 ± 7.5	48.6 ± 6.8	0.105	35.6 ± 2.3	76.9 ± 12.8	<0.001	24.0 ± 2.4	36.0 ± 5.8	0.172
% macrophages	93.3 ± 2.1	86.4 ± 2.8	0.050	91.8 ± 0.6	60.4 ± 9	0.013	95.8 ± 1.3	93.7 ± 1.6	0.382
% neutrophils	3.3 ± 1.2	3.2 ± 2.8	0.125	3.2 ± 1.2	18 ± 7	0.573	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.7	0.421
% eosinophils	0.6 ± 0.6	4.2 ± 0.9	0.003	0.4 ± 0.4	10.6 ± 3.1	0.002	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.160
% lymphocytes	2.8 ± 1.4	6.3 ± 1.6	0.038	4.7 ± 0.9	11 ± 2.1	0.081	3.4 ± 1.2	4.6 ± 1.7	0.878
<b>Histological data</b>									
Peribronchial space area (µm <sup>2</sup> )	14.5 ± 2.2	25.6 ± 5.1	0.083	13.594 ± 1.153	56.2 ± 10.2	<0.001	11.3 ± 1.3	14.4 ± 1.43	0.083
Number of nucleated cells within the peribronchial space area (cell/µm <sup>2</sup> )	106.8 ± 11.9	171.2 ± 28.4	0.028	138.6 ± 19.2	505 ± 85	<0.001	76.7 ± 7.1	102.3 ± 9.7	0.028
Basal membrane thickness (µm)	5.4 ± 0.3	5.9 ± 0.2	0.065	5.3 ± 0.4	10.2 ± 0.9	<0.001	5.5 ± 0.3	8.9 ± 0.6	<0.001
Wall area (µm <sup>2</sup> /bronchus)	17.4 ± 2.4	18.4 ± 1.4	0.442	16.7 ± 1.0	25.4 ± 1.6	<0.001	16.2 ± 0.7	24.5 ± 2.4	<0.001
Bronchial muscle area (x 10 <sup>3</sup> µm <sup>2</sup> /bronchus)	4.3 ± 0.9	3.6 ± 0.5	0.798	4.1 ± 0.8	6.6 ± 0.9	0.035	3.6 ± 0.4	6.9 ± 0.6	0.002
Peribronchial fibrosis (x 10 <sup>3</sup> µm <sup>2</sup> )	1.9 ± 0.6	2.8 ± 0.4	0.105	2.6 ± 0.4	6.1 ± 1.1	0.012	2.0 ± 0.3	5.6 ± 1.2	0.005

Data are means ± standard error of the mean. P-values were obtained using Wilcoxon's signed-rank tests. BAL: bronchoalveolar lavage.

**Table 2: Correlation matrix between micro-CT bronchial parameters and plethysmographic, BAL and histological data**

	All mice (n=51)		OVA sensitized mice (n=26)	
	PBA	Normalized PBA	PBA	Normalized PBA
<b>Plethysmography</b>				
Penh ratio at endpoint	0.45 (0.001)	0.29 (0.038)	0.43 (0.03)	0.04 (0.841)
<b>BAL</b>				
Total cells ( $\times 10^4$ /mL)	0.39 (0.007)	0.52 (<0.001)	0.37 (0.073)	0.45 (0.027)
% monocytes-macrophages	-0.42 (0.004)	-0.55 (<0.001)	-0.53 (0.008)	-0.49 (0.015)
% neutrophils	0.02 (0.891)	0.24 (0.115)	0.26 (0.22)	0.38 (0.068)
% eosinophils	0.52 (<0.001)	0.52 (<0.001)	0.51 (0.012)	0.21 (0.326)
% lymphocytes	0.41 (0.005)	0.40 (0.006)	0.64 (0.001)	0.44 (0.032)
<b>Histological data</b>				
Peribronchial space area ( $\mu\text{m}^2$ )	0.38 (0.006)	0.70 (<0.001)	0.69 (<0.001)	0.59 (0.002)
Number of nucleated cells within the peribronchial space area (cell/ $\mu\text{m}^2$ )	0.35 (0.011)	0.51 (<0.001)	0.67 (<0.001)	0.56 (0.003)
Basement membranous thickness ( $\mu\text{m}$ )	0.35 (0.013)	0.48 (<0.001)	0.18 (0.375)	0.27 (0.179)
Wall area ( $\mu\text{m}^2$ /bronchus)	0.31 (0.026)	0.60 (<0.001)	0.05 (0.813)	0.43 (0.03)
Bronchial muscle area ( $\mu\text{m}^2$ /bronchus)	0.25 (0.082)	0.56 (<0.001)	0.05 (0.792)	0.42 (0.034)
Peribronchial fibrosis ( $\mu\text{m}^2$ )	0.38 (0.007)	0.43 (0.002)	0.29 (0.156)	0.53 (0.005)

Data are Spearman rank correlation coefficients. Data in parentheses are P-values.

BAL: bronchoalveolar lavage. PBA: peribronchial mean attenuation, Normalized PBA corresponds to  $1 - \text{PBA} / \text{total lung mean attenuation}$ .

## Captions for illustrations

Figure 1. Chronologic diagram of OVA-sensitized in mice.

Three groups of mice are generated: group A (days 35 to 37), group B (days 75 to 77), group C (days 110 to 112).

OVA= ovalbumin, IP= intraperitoneal, IN=intranasal, BAL= bronchoalveolar lavage.

Figure 2. Semi-automatic 3D method for assessing peribronchial attenuation. A. Native axial (top) and coronal thin-section reformatted (bottom) micro-CT images of the bronchial tree. B. Automatic segmentation of the bronchial lumen (pink). C. Automatic 8-voxels dilatation of the lumen volume. D. Second automatic segmentation of the bronchial lumen volume (green) overwriting bronchial lumen from the previous volume of interest. E. After subtraction of the bronchial lumen, the resultant volume of interest includes only the peribronchial area of the whole bronchial tree. From the created peribronchial volume, the software provides the peribronchial mean attenuation (PBA) value.

Figure 3. Representative optic microscopic images (100× magnification) from bronchial sections stained with anti- $\alpha$ -smooth muscle actin antibody obtained from control (top) and OVA-sensitized mice (bottom). Bars represent 85  $\mu$ m.

A: mice from group A (Day 37); B: mice from group B (day 77); and C: mice from group C (day 112). There is a diffuse cell infiltration of the peribronchial space in OVA-sensitized mice from groups A and B, as compared to OVA-sensitized mice from group C (nuclei are stained in dark blue). OVA-sensitized mice from groups B and C exhibit an increased smooth-muscle mass ( $\alpha$ -actin is stained in brown), as compared to OVA-sensitized mice from group A.

Figure 4. Bland-Altman analysis of manual and semi-automatic methods for peribronchial attenuation (PBA) measurements.

A. Correlation of peribronchial mean attenuation (PBA) between the two methods. Dashed line represents the line of equality. Solid line corresponds to the regression line.

B. Means of measurement between the two methods are plotted against their differences. Solid line corresponds to the mean difference. Dashed lines correspond to the mean difference  $\pm 2$  standard deviations.

C. Means of measurement between the two methods are plotted against their standard deviations.

Figure 5. Comparison of micro-CT parameters.

Total lung attenuation (A), peribronchial mean attenuation (PBA) (B), and normalized PBA (C) are presented for control (white box plots) and OVA-sensitized (grey box plots) mice at each endpoint. Box plots summarise medians with 25% and 75% interquartiles. Error bars represent 5th and 95th percentiles. \* $p < 0.05$  using Wilcoxon's signed-rank tests between control and OVA.

Figure 6. Typical coronal reformatted micro-CT images of the bronchial tree.

Images were obtained from control mice (left) and OVA-sensitized (right) at different endpoints: Day 36 (A), Day 76 (B) and Day 111 (C).



Figure 1. Chronologic diagram of OVA-sensitized in mice.

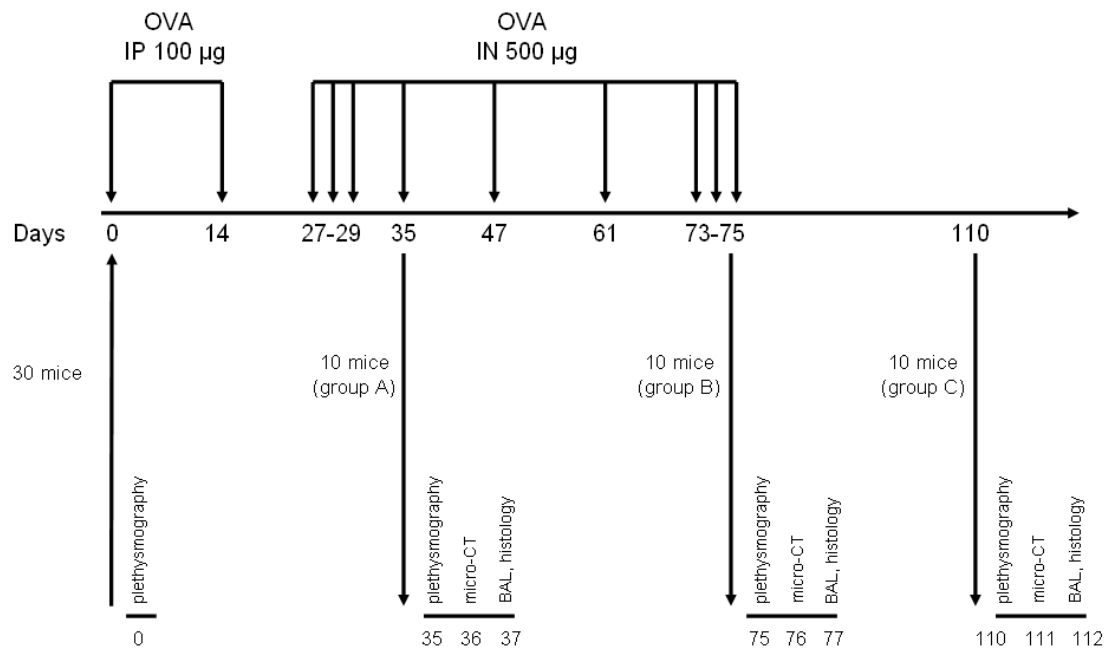


Figure 2. Semi-automatic 3D method for assessing peribronchial attenuation.

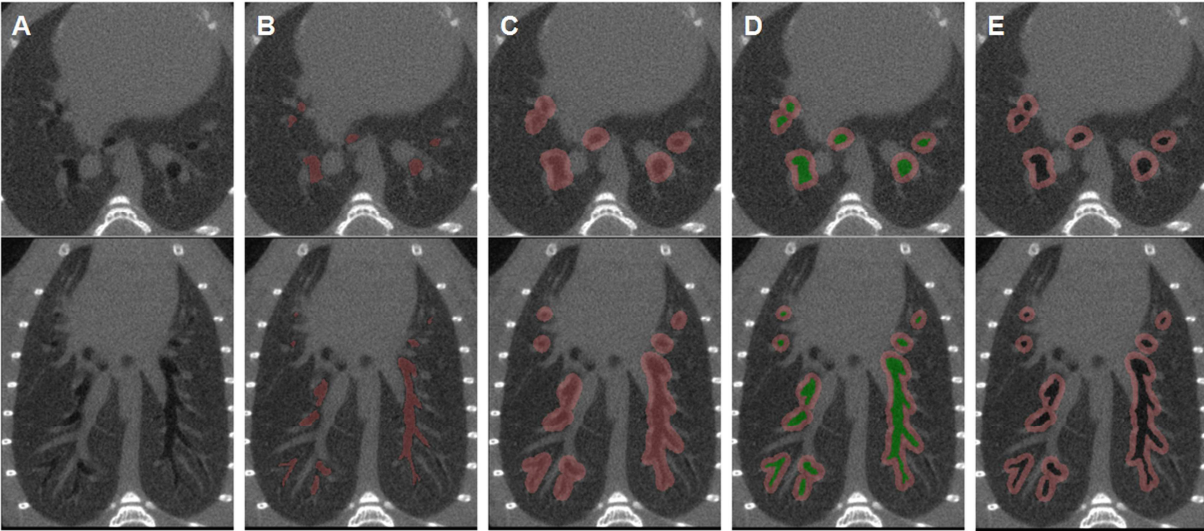


Figure 3. Representative optic microscopic images (100× magnification) from bronchial sections stained with anti- $\alpha$ -smooth muscle actin antibody obtained from control (top) and OVA-sensitized mice (bottom).

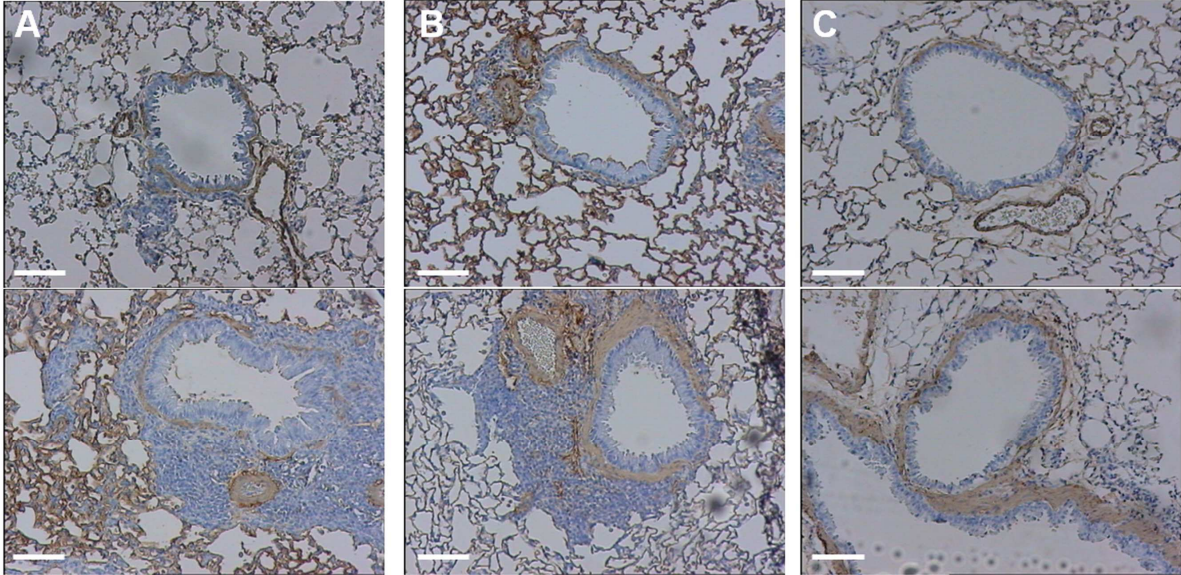


Figure 4. Bland-Altman analysis of manual and semi-automatic methods for peribronchial attenuation (PBA) measurements.

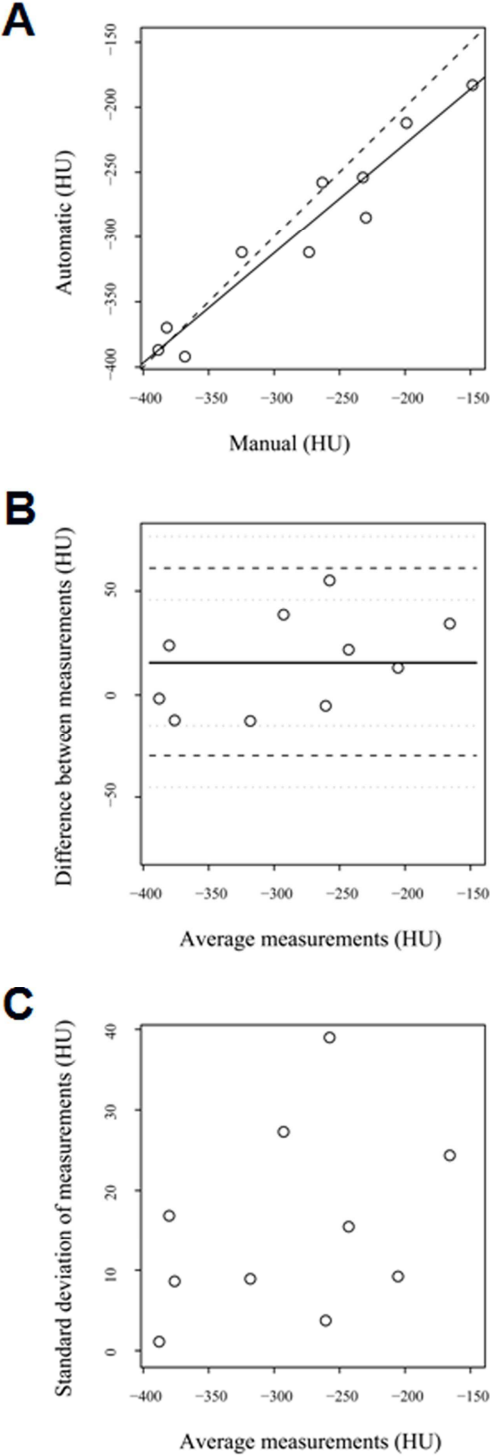


Figure 5. Comparison of micro-CT parameters.

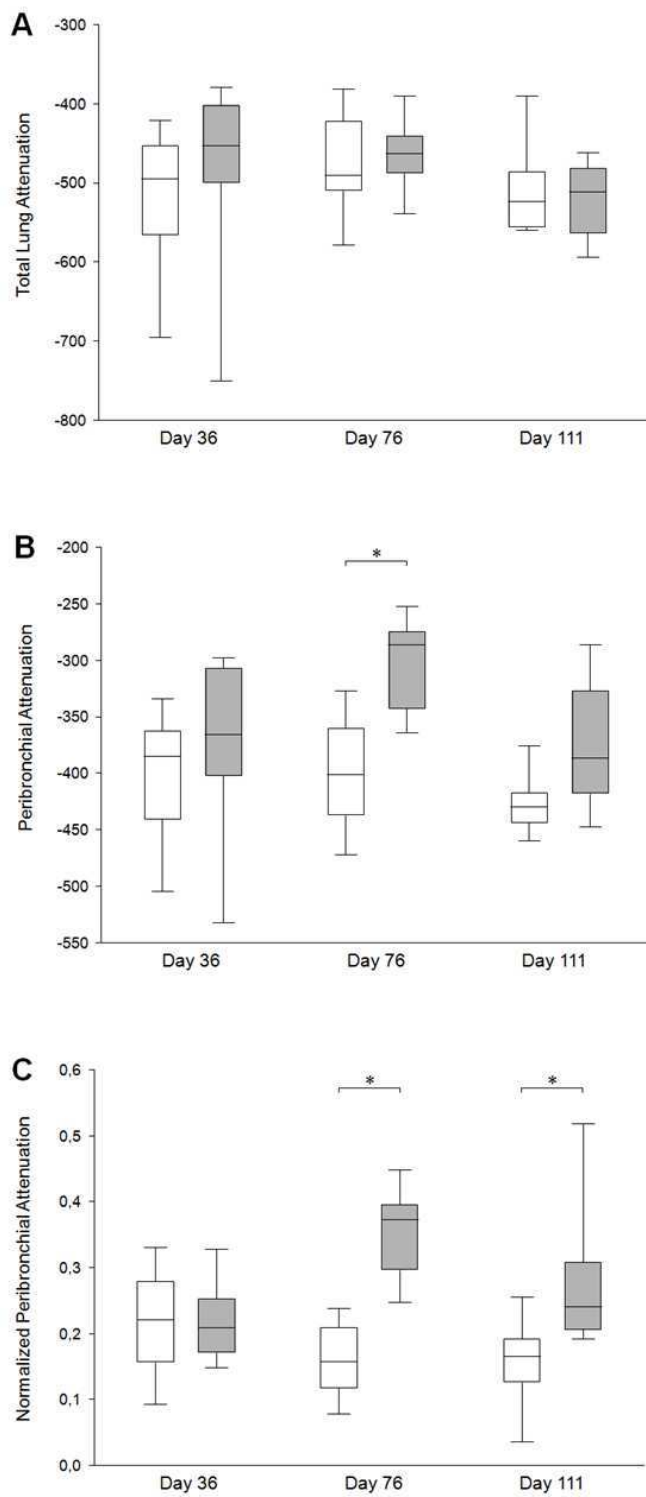
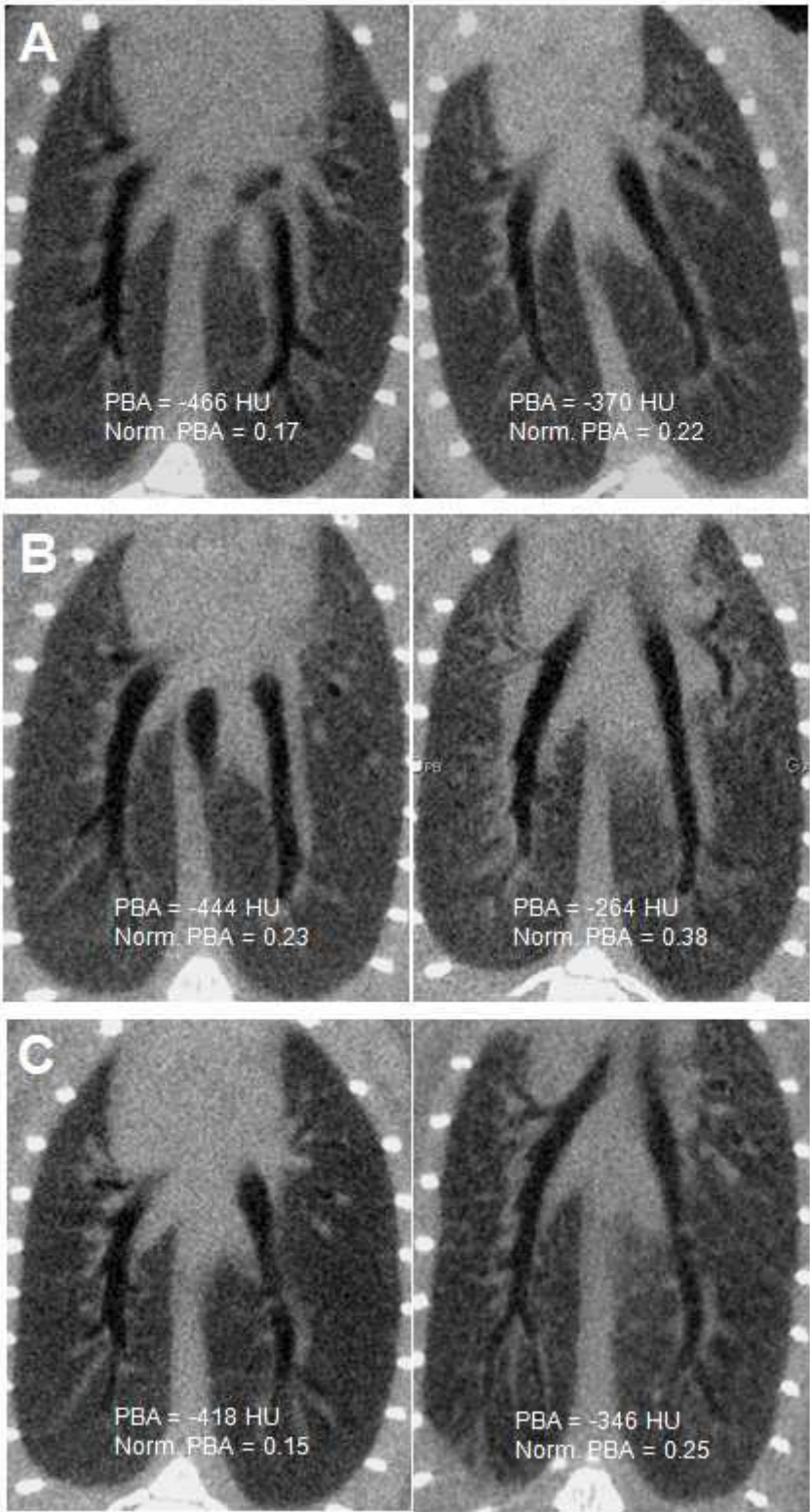


Figure 6. Typical coronal reformatted micro-CT images of the bronchial tree.



## Supplemental material

### ***In vivo* micro-CT in various mouse models of asthma: integrated assessment of airway remodelling.**

M. Lederlin, A. Ozier, G. Dournes, O. Ousova, J. Savitskaia, A. Kamaev, H. Begueret, R. Marthan, M. Montaudon, F. Laurent, P. Berger.

### **Methods**

#### *Animals*

Sixty female BALB/c mice (5 weeks old) were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, St Isle, France) and acclimatised in environmentally controlled conditions for 1 week prior to study and for the duration of the experiments. All animal use procedures were approved by our local Animal Care Committee.

#### *Models of asthma and scheme of the study*

The challenge protocols were modified from that described by Lederlin et al. (1). Thirty mice were sensitized by two intraperitoneal injections of 100 µg of ovalbumin (OVA) on days 0 and 14 in the absence of aluminium hydroxide. All the mice were anaesthetised using an intraperitoneal injection of both 50 µg/g ketamine (Panpharma, Fougères, France) and 5 µg/g xylazine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). They were then challenged intranasally with 500 µg of OVA at different days (Figure 1). Three different endpoints were used to obtain 3 groups of 10 mice: group A was analyzed at days 35-37, group B was analyzed at days 75-77, and group C was analyzed at days 110-112. Thirty other mice

received normal saline intraperitoneally and intranasally on the same days and constitute 3 control groups corresponding to the 3 various endpoints.

### *Plethysmography*

Bronchial hyperresponsiveness (BHR) to methacholine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was determined in unrestrained conscious mice by single-chamber plethysmography (Emka Technologies, Paris, France). Enhanced pause parameter (Penh) was measured and averaged for 3 min, 30 s after each successive inhalation of an increasing dose of aerosolised methacholine (1–16 mg/ml) (1). These measurements were performed at day 0 for all mice and at each endpoint. The results were expressed as a ratio of Penh measured in response to 8 mg/ml methacholine to that with normal saline. In another set of experiments, ratios of Penh were compared to that of lung resistance (LR) measured using invasive plethysmography in anaesthetised and intubated animals from additional OVA and control animals assessed at Day 77 and 78.

### *Micro-CT imaging*

The micro-CT procedure was identical to that previously described (1). Briefly, mice were anaesthetised, intubated, and connected to a dedicated ventilator for respiratory gating. The output signal of the ventilator allowed data acquisition to be triggered at the end of expiration. Images were obtained in the absence of any contrast agent at 80kV, 0.45mA. The full acquisition lasted 17 min and the expected entrance dose was 0.26 Gy per scan. We obtained an average of 300 DICOM images with a 23-mm field of view and an isotropic  $46 \mu\text{m}^3$  voxel size. Water, bone and air standards were placed in the chamber, in order to normalise the Hounsfield Units (HU) scale for each dataset acquisition. Volume datasets were exported to commercially available software (Myrian, Intrasure, Montpellier, France) in DICOM format,



and information about the groups was deleted. All micro-CT images were analyzed in random order.

### *Image post-processing*

From each micro-CT examination, 2 parameters were extracted using Myrian software:

- the total lung mean attenuation (TLA) was automatically assessed using a volume-growing algorithm from bi-thresholded voxels (-900 to -100 HU).
- the peribronchial mean attenuation (PBA) was assessed using a 3D semi-automatic method lasting 6-8 min and comprising 4 steps (Figure 2). The first step was to perform automatic segmentation of the bronchial lumen using a bi-threshold approach (-1024 to -900 HU). The second step applied an automatic three-dimensional morphologic dilatation tool to the volume of interest (VOI) obtained from the first step. This dilatation allowed including the peribronchial space into the VOI (Figure 2C). A 8-voxels dilatation level was found to be optimal to achieve the same peribronchial segmentation than with the manual method (1). The third step consisted in creating a second segmentation VOI of the bronchial lumen overwriting the first VOI. The final step was to subtract the previous VOI (bronchial lumen only) from the initial VOI (bronchial lumen and peribronchial space). The trachea and the mediastinum were also manually subtracted. The resultant VOI displayed a mean attenuation value named PBA, which was recorded for further analysis. Then, normalized PBA, was calculated as follow:  $1 - (PBA/TLA)$ .

### *Bronchoalveolar lavage*

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed immediately after sacrifice of animals. Two 0.3 ml aliquots of phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5 mM ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) were used for BAL. Following cyto-centrifugation (Cytospin, Shandon

Inc., Pittsburgh, PA) and staining with Diff-Quik (Baxter Healthcare, Miami, FL), at least 400 cells per slide were analyzed by a blinded investigator using standard haematological criteria. Total leukocyte number, percentage of eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages were counted in the BAL fluid using a Neubauer chamber.

### *Histology*

Right and left lung tissue were dissected out, fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. Histological analysis was performed using 4- $\mu$ m-thick lung slices stained with haematoxylin-eosin-safran and a modified Masson's trichrome (half dilution of hematoxylin as compared to the standard staining procedure). Immunohistochemistry was performed using an anti-mouse alpha smooth muscle actin antibody clone 1A4 (Dako, Trappes, France). Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were incubated in pretreatment buffer for antigen retrieval and were then reacted with anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin for 15 minutes. Immunoreaction was detected using Bond Polymer Refine Detection (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) on Bond TM max (A.Menarini Diagnostics, Firenze, Italy).

Several quantitative parameters were assessed using Quancoul software (Quant'Image, Bordeaux, France) at magnifications of 100 $\times$  to 400 $\times$  (2). All were measured on HES and actin-stained sections, except fibrosis which was quantified on modified Masson's trichrome stain.

The markers of remodelling (3) were the basal membrane thickness (manually delineated), the wall area and the bronchial smooth muscle area (automatically delineated from a mean of five bronchi per mouse) and the area of fibrosis within the peribronchial space (automatically delineated). We also quantified the peribronchial space and the number of nucleated cells within the peribronchial space (automatically counted), which were considered as markers of both inflammation and remodelling.

### *Statistical analysis*

A preliminary study was carried out to compare the semi-automatic method versus a validated manual method for measuring PBA. The manual method has been described previously in detail (1) and was based upon a two-dimensional analysis from multiplanar reformations. In 10 datasets chosen at random, we performed both manual and semi-automatic methods and tested the agreement between semi-automatic and manual methods using Bland-Altman analysis (4). In particular, the agreement were evaluated by (i) Pearson's correlation coefficient, (ii) lack of agreement (i.e. bias estimated by the mean difference and the standard deviation from the mean), (iii) intraclass correlation coefficient (ICC), and (iv) means of both measurements plotted against their differences. We also analysed the measurement error graphically by plotting the standard deviation of measurements against their mean and analytically by Spearman's correlation coefficient of data and the within-subject standard deviation.

For each group, the following parameters were compared between sensitized and control mice using Wilcoxon's signed-rank test: weight at endpoint, Penh ratio, LR, micro-CT parameters, BAL results and histological data. Correlations between, on the one hand, PBA or normalized PBA, and, on the other hand, Penh ratio, BAL or histological data, were assessed using the Spearman rank correlation coefficients. These coefficients were calculated twice, when considering all mice and then OVA-sensitized mice only to avoid a dumbbell effect.

All analyses were performed using NCSS software (NCSS 2001, Kaysville, UT, USA) and results were considered statistically significant when  $P$ -values  $< 0.05$ .

## **Bibliography**

1. Lederlin M, Ozier A, Montaudon M, et al. Airway remodeling in a mouse asthma model assessed by in-vivo respiratory-gated micro-computed tomography. *Eur Radiol* 2010;20:128-137.
2. Berger P, Lavallee J, Rouiller R, Laurent F, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 1999;14:1394-1402.
3. Denis D, Fayon MJ, Berger P, et al. Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats. *Pediatr Res* 2001;50:515-519.
4. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.

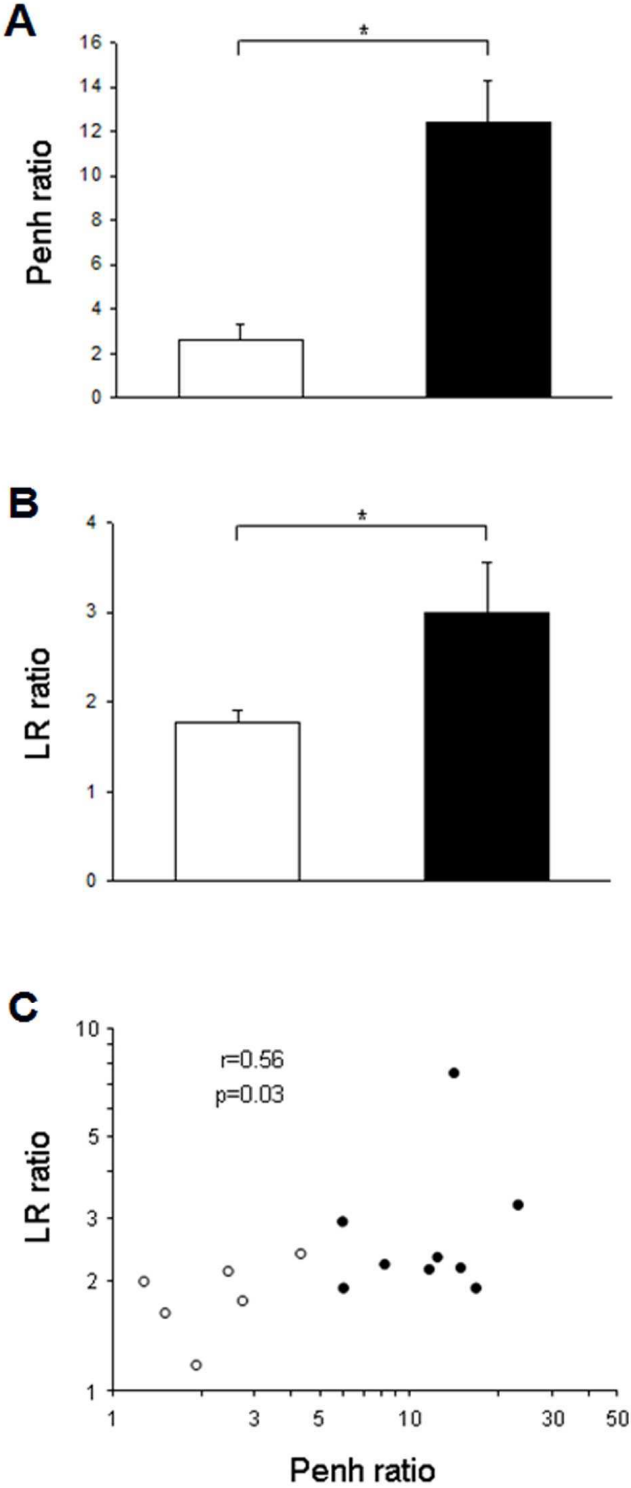
Supplemental Figure 1. Comparison of Penh and lung resistance

A. Bronchial hyperresponsiveness (BHR) to methacholine was determined at Day 77 in unrestrained conscious mice by single-chamber plethysmography. The results were expressed as a ratio of Penh measured in response to 8 mg/ml methacholine to that with normal saline.

B. Bronchial hyperresponsiveness (BHR) to methacholine was also determined at Day 78 in anaesthetised and intubated animals by invasive plethysmography. The results were expressed as a ratio of LR measured in response to 8 mg/ml methacholine to that with normal saline.

C. Penh results were plotted against LR. Spearman correlation coefficient  $r$  is calculated. Results from control (white bars and circles) and OVA-sensitized mice (black bars and circles) are presented.

Supplemental Figure 1. Comparison of Penh and lung resistance.



### **III-3. Étude *in vitro* des mécanismes à l'origine du remodelage musculaire lisse bronchique chez l'asthmatique**

Le remodelage musculaire lisse représente une caractéristique essentielle du remodelage bronchique. En effet, il contribue à une évolution défavorable de la maladie et s'accompagne d'une dégradation non réversible de la fonction ventilatoire (2, 3). Par conséquent, il représente un réel enjeu thérapeutique dans l'asthme. L'asthme étant une maladie chronique inflammatoire, la pierre angulaire de son traitement de fond repose sur les glucocorticoïdes, le plus souvent par voie inhalée (146). Leur efficacité clinique repose sur la diminution de l'HRB chez les sujets allergiques (398) et sur l'inhibition non seulement, de la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par les cellules des voies aériennes, mais aussi du recrutement de cellules inflammatoires (399). Néanmoins, le remodelage bronchique et, en particulier, le remodelage musculaire lisse, demeure peu sensible à l'effet des glucocorticoïdes (4). Par conséquent, une meilleure connaissance des mécanismes étiopathogéniques à l'origine de ce remodelage musculaire lisse apparaît fondamentale pour le développement de thérapeutiques ciblées. C'est dans cette optique qu'ont été étudiés, *in vitro*, les rôles potentiels de la chitinase YKL-40 et de la protéine p53 dans le remodelage musculaire lisse bronchique chez l'asthmatique.

## **A. Étude du rôle de la chitinase YKL-40 dans le remodelage musculaire lisse chez l'asthmatique**

La chitinase YKL-40 a récemment été considérée comme un biomarqueur du remodelage bronchique dans l'asthme (224). Les principaux mécanismes à l'origine de l'augmentation de la masse du muscle lisse dans l'asthme sont une hyperplasie, une hypertrophie, une migration des CML et/ou un dépôt accru de protéines de la matrice-extracellulaire (5). Cependant, l'implication d'YKL-40 dans la pathogénie du remodelage musculaire lisse bronchique demeure inconnue à ce jour.

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer les effets d'YKL-40 sur (i) la prolifération, (ii) la taille, (iii) la migration des CML et (iv) leur aptitude à synthétiser des cytokines et des protéines de la matrice extra-cellulaire.

Ce travail expérimental a été réalisé à partir de cultures primaires de CML bronchiques issues de patients asthmatiques modérés à sévères et de sujets témoins ayant une fonction ventilatoire normale. La prolifération cellulaire a été estimée par comptage et incorporation de BrdU, tandis que l'apoptose a été étudiée par cytométrie en flux. La taille des CML a été déterminée par cytométrie en flux et, indirectement, par l'expression de l' $\alpha$ -actine par Western blot et immunocytochimie. L'étude de la migration cellulaire a reposé sur la technique des inserts et sur la réorganisation du réseau d'actine en cytométrie en flux et immunocytochimie, grâce à un marquage à la phalloïdine. La synthèse cellulaire a été appréciée par la mesure de la concentration de certaines cytokines (TGF- $\beta$ 1, IP-10, IL-8, SCF) dans le surnageant des CML par ELISA, ainsi que par l'expression en Western blot d'une protéine de la matrice extra-cellulaire, le collagène I.

Les résultats de ce travail démontrent que la chitinase YKL-40 favorise la prolifération cellulaire, comme en témoigne l'augmentation du nombre des CML en culture, cet effet étant



lié à une synthèse accrue d'ADN, et non à une diminution de l'apoptose. Elle entraîne par ailleurs une hypertrophie des CML, celle-ci s'accompagnant d'une augmentation de l'expression d'une protéine contractile, l' $\alpha$ -actine musculaire lisse. Cet effet sur la taille des CML est significativement plus important chez l'asthmatique. YKL-40 induit en outre un chimiotactisme des CML d'asthmatiques et l'association d'un chimiotactisme et d'une chimiokinésie dans les CML de témoins. Cet effet chimiotactique est, par ailleurs, significativement plus important chez l'asthmatique. La réorganisation du réseau d'actine et la présence de pseudopodes sur les CML stimulées par YKL-40 corroborent cet effet chimiotactique. En revanche, YKL-40 ne modifie pas l'aptitude des CML à produire des protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène I, ou à synthétiser certaines cytokines, telles que le TGF- $\beta$ 1, l'IP-10, l'IL-8 ou le SCF. L'expression d'YKL-40 par l'épithélium des patients asthmatiques est, au demeurant, positivement corrélée *ex vivo* avec la masse du muscle lisse bronchique.

Au total, ce travail démontre que la chitinase YKL-40 s'avère être plus qu'un simple biomarqueur du remodelage bronchique dans l'asthme. En effet, dans la mesure où la surexpression d'YKL-40 au niveau des cellules épithéliales est corrélée avec l'excès de muscle lisse bronchique, ces résultats suggèrent que le muscle lisse est une cible à part entière d'YKL-40, qui, en modifiant ses propriétés, concourt au remodelage bronchique dans l'asthme.

**Article n°5**

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

En révision à l'Am J Respir Crit Care Med

Imane Bara, Annaïg Ozier, Pierre-olivier Girodet, Hugues  
Begueret, Roland Kolbeck, Anthony Coyle, Jose-Manuel tunon de  
Lara, Roger Marthan, Patrick Berger.

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

Imane Bara <sup>\*,†</sup>, Annaig Ozier <sup>\*,†,‡</sup>, Pierre-Olivier Girodet <sup>\*,†,‡</sup>, Hugues Begueret <sup>\*,†,‡</sup>, Roland Kolbeck <sup>§</sup>, Anthony Coyle <sup>§</sup>, Jose-Manuel Tunon de Lara <sup>\*,†,‡</sup>, Roger Marthan <sup>\*,†,‡</sup>, and Patrick Berger <sup>\*,†,‡</sup>

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

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

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

**Running head:** YKL-40 and bronchial smooth muscle remodeling

**Descriptor number:** 1.4

**Word count:** 3117

**At a glance commentary:**

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

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

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

## **Abstract**

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

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

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

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

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

**Word count:** 247

**Keywords:** Chitinase, proliferation, hypertrophy, migration.

## **Introduction**

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

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

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

## **Material and methods**

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

### **Study populations**

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

### **Cell culture**

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



as described previously (5). BSM cells were seeded on 96-well plates for BrdU incorporation, on 6-well plates for cell counting, immunoblotting and flow cytometry, on chamber slides for immunocytochemistry, on 25-cm<sup>2</sup> culture flasks for migration study, or on 24-well plates for ELISA. BSM cells were serum deprived for 24 h and stimulated with YKL-40 (MedImmune) in a time- and/or concentration-dependent manner.

### **Cell proliferation and apoptosis**

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

### **Cell size**

Cell size was measured by flow cytometry as described previously (18). Briefly, cells were stained with propidium iodide and treated with RNase. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells were then gated and cell size was determined using forward scatter measurement on FACSCanto<sup>®</sup> (BD Biosciences).

### **Cell migration**

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

### **Cell synthesis**

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

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

### **Immunohistochemistry**

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

### **Statistical analysis**

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

## **Results**

### **Study population**

The clinical characteristics of all subjects are shown in Table 1. All of the 25 asthmatics were lifelong nonsmokers and received stable treatments, including oral or inhaled corticosteroids and  $\beta_2$  agonists. None of the asthmatic patients experienced a recent ( $< 3$  mo) exacerbation of the disease. The mean duration of the disease in asthmatic patients was  $29 \pm 3.7$  yr. Of the 18 control subjects who received no treatment, 8 of them were lifelong nonsmokers, whereas 10 were former smokers. As compared to asthmatics, control subjects were not different in terms of age, BMI and FEV-1.

### **YKL-40 induced BSM cell proliferation**

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

### **YKL-40 induced BSM cell hypertrophy**

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

### **YKL-40 induced BSM cell migration**

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

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

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

### **YKL-40 expression was correlated with BSM mass in asthma**

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

## **Discussion**

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

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

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

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

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

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

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

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

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



### **Acknowledgements**

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

## References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Legends for illustrations

### Figure 1. YKL-40 induced BSM cell proliferation

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

### Figure 2. YKL-40 induced BSM cell hypertrophy

BSM cell size was assessed using flow cytometry. (A) A representative dot plot of propidium iodide weight (PI-W) against propidium iodide area (PI-A) illustrates how G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> BSM cells are gated. (B) A representative histogram illustrates the distribution of forward scatter (FSC) within unstimulated (gray line) or YKL-40-stimulated (black line) asthmatic BSM cells. (C) The mean percentage increase in FSC was calculated in the presence of YKL-40 (300 ng/ml) or ET-1 (10 nM) as compared to unstimulated cells. (D)  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) content was assessed using western blot and normalized by  $\beta$ -actin content in unstimulated (unS) or YKL-40 stimulated BSM cells. BSM cells were obtained from control subjects (white columns, n = 5 (C) or n = 7 (D)) or asthmatics (black columns, n = 6 (C-D)). Data are the mean  $\pm$  SEM. \*, p < 0.05 *versus* unstimulated condition within a population using paired Wilcoxon tests. #, p < 0.05 between asthmatic and control populations using unpaired Wilcoxon tests. (E-F)  $\alpha$ -SMA content

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

### **Figure 3. YKL-40 induced BSM cell migration**

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

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

(A-B) Optic microscopic views of representative specimen, obtained from a moderate (A) and a severe (B) asthmatic. Sections were stained in brown with anti-human YKL-40 (original magnification: x400, scale bars = 50  $\mu\text{m}$ ). (C) Correlation between YKL-40 epithelial expression

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

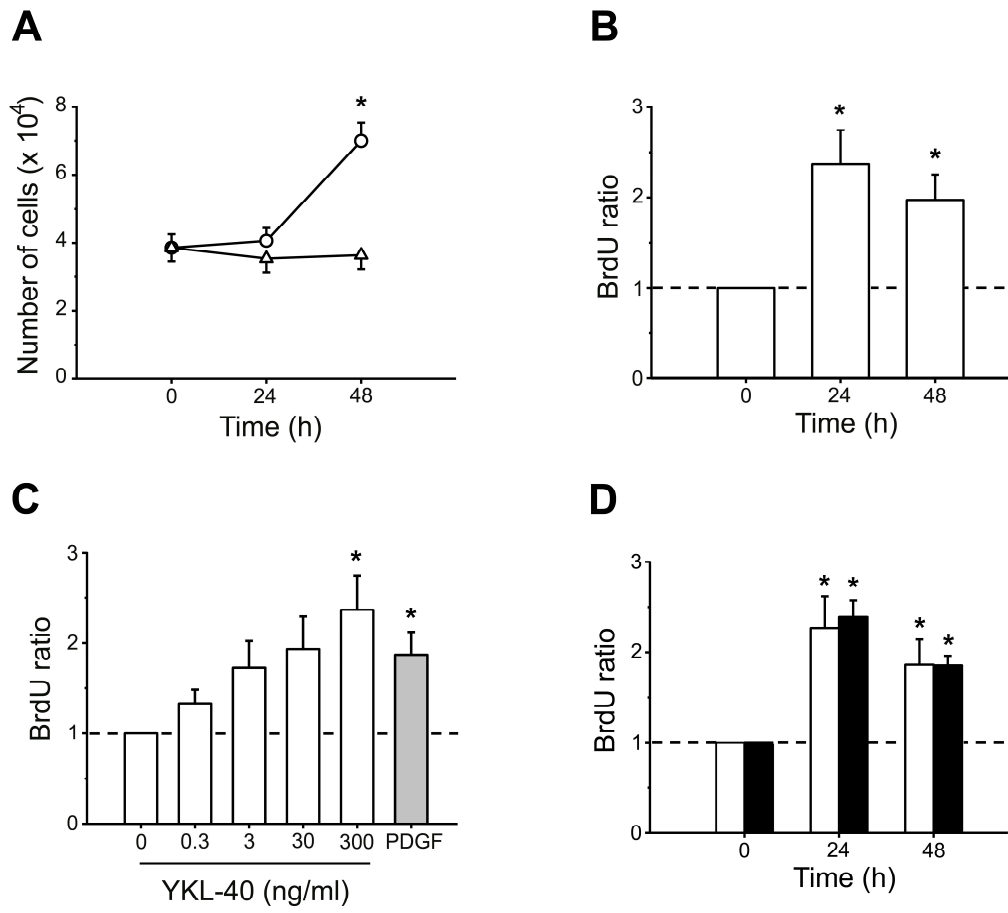


**Table 1. Clinical and functional characteristics of subjects**

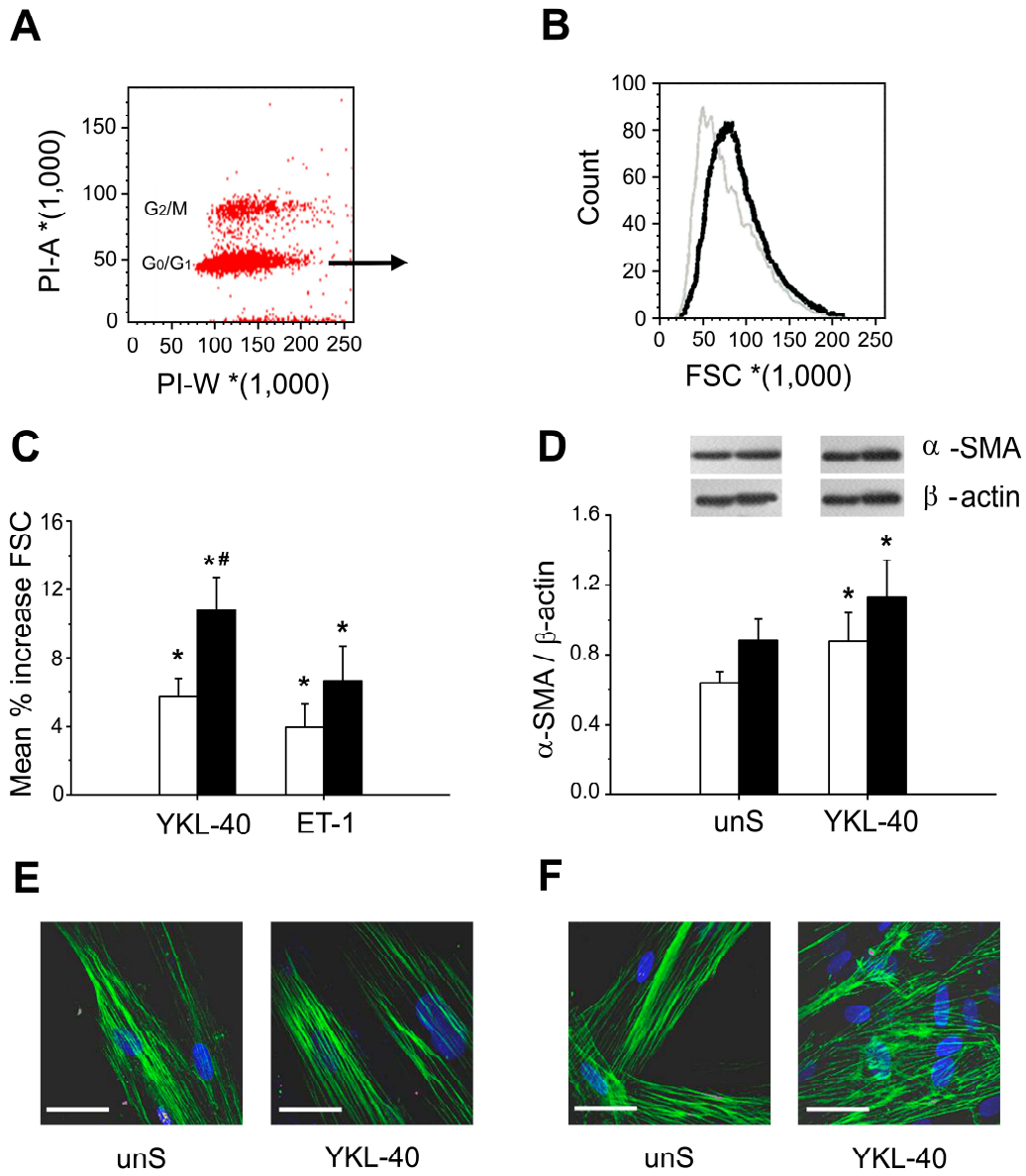
<b>Characteristics</b>	<b>Patients with asthma</b>	<b>Controls</b>
No. of patients	25	18
Age		
Year	42.5 ± 3.6	52.3 ± 4.0
Range	[20-73]	[18-72]
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.3 ± 1.5	27.0 ± 1.5
Treatments		
LABA (no. of patients)	15	0
ICS (no. of patients)	20	0
OCS (no. of patients)	4	0
FEV <sub>1</sub>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

Data are mean ± SEM. BMI: body mass index. LABA: long-acting β<sub>2</sub> agonist. ICS: inhaled corticosteroid. OCS: oral corticosteroid. FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second. FVC: forced vital capacity. FEF 25-75: forced expiratory flow between 25 and 75% of FVC.

Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

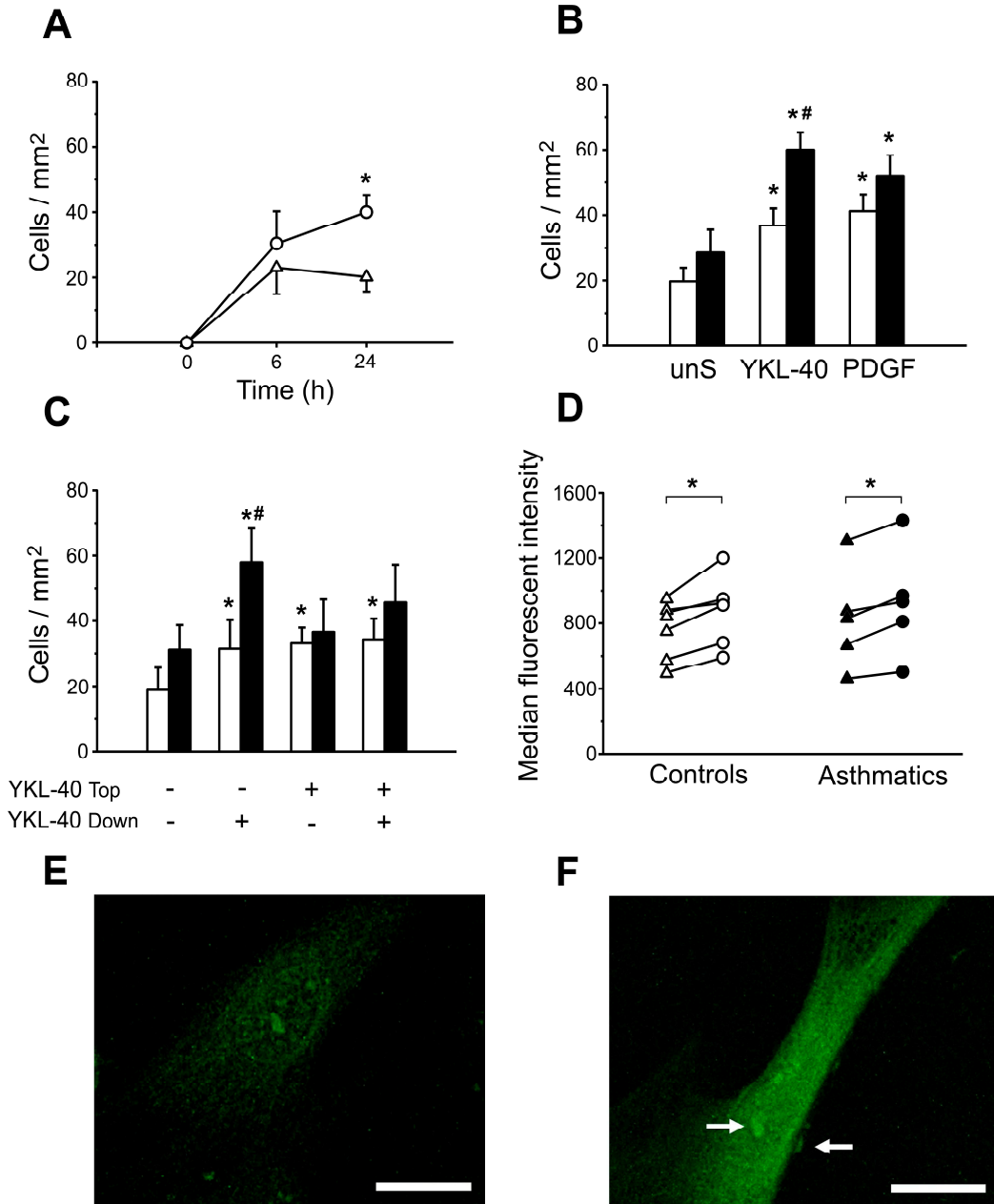
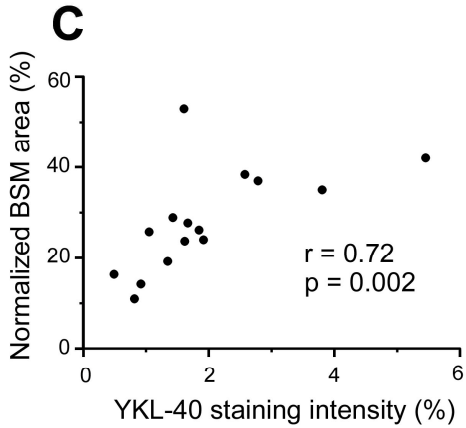
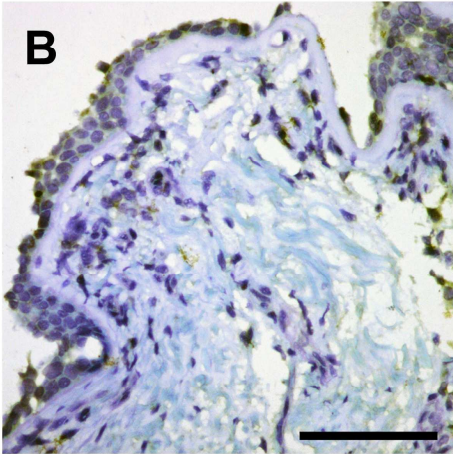
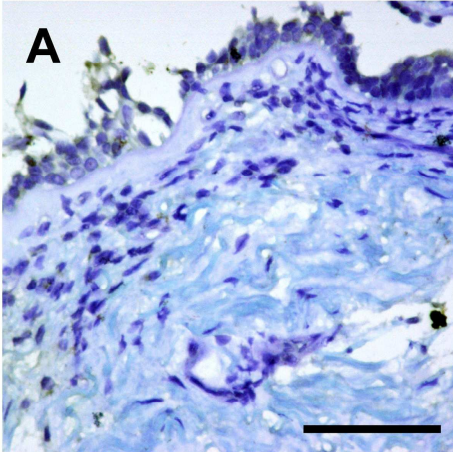


Figure 4



## **Online Data Supplements**

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

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

#### **Supplemental material and methods**

##### **Study populations**

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

##### **Cell culture**

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

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

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

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

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

### **Cell proliferation**

Cell proliferation was evaluated using both BrdU incorporation and cell counting as described previously (E2). Regarding BrdU, BSM cells were growth-arrested as described above in 96-well plates for 24 h and stimulated with 10% FCS, platelet-derived growth factor (PDGF) or 0 to 300 ng/ml YKL-40 for 24 to 48 h. Control BSM cells remained in serum-deprived DMEM. DNA synthesis was measured using the BrdU kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). Briefly, BSM cells were incubated with 10  $\mu$ M BrdU for 24 h at 37°C. Cells were fixed and denaturalized for 30 min at room temperature and incubated with the anti-BrdU Ab for 2 h at room temperature. Absorbance was measured at 370 nm in a microplate reader in triplicate. Results were expressed as a normalized ratio of BrdU incorporation, *i.e.* absorbance for test condition divided by absorbance for control serum-deprived condition. Regarding cell counting,  $2 \cdot 10^4$  BSM cells were seeded in 6-well plates. After 72 h, growth was arrested for 24 h as described above. BSM cells were then challenged with 300 ng/ml of YKL-40 for 0 to 48 h. BSM cells were then harvested and counted. Results were expressed as absolute cell number.

### **Cell apoptosis**

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



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

### **Cell size**

Cell size was measured by flow cytometry as described previously (E5). Briefly, cells were stained with propidium iodide and treated with RNase. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells were then gated and cell size was determined using forward scatter measurement on FACSCanto<sup>®</sup>.

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

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

### **Cell migration**

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

### **Cell synthesis**

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

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

### **Immunohistochemistry**

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

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

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

### **Statistical analysis**

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

### **Supplemental References**

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

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

## Legends for supplemental figures

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

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

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

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

### **Figure E3. YKL-40 has no effect on TGF- $\beta$ 1 release**

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

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

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

Supplemental results

Figure E1

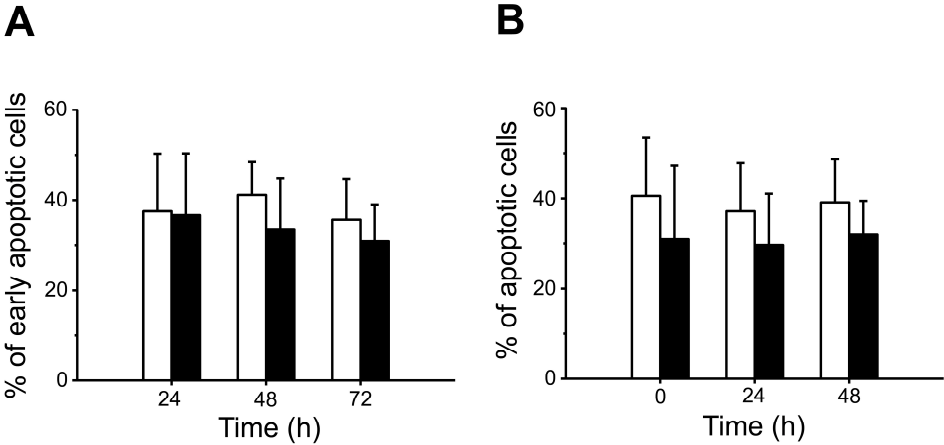




Figure E2

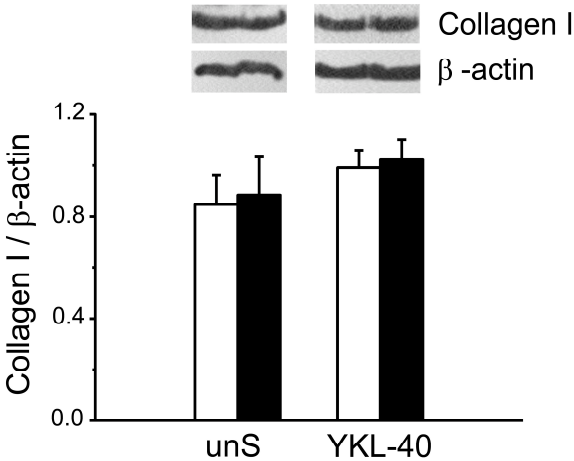


Figure E3

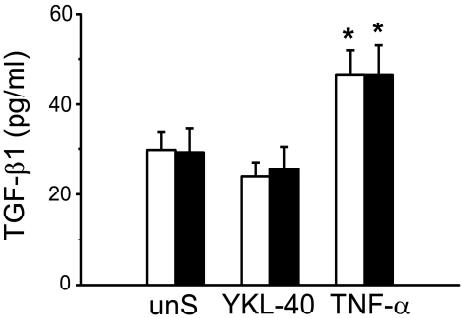
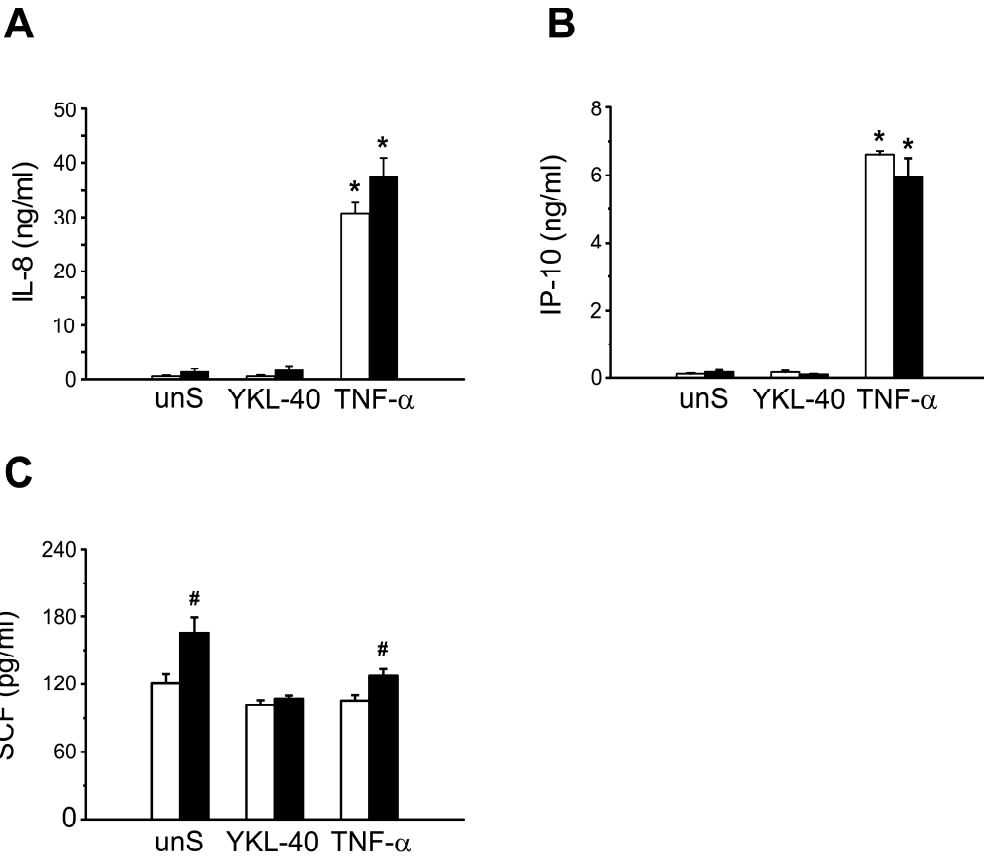


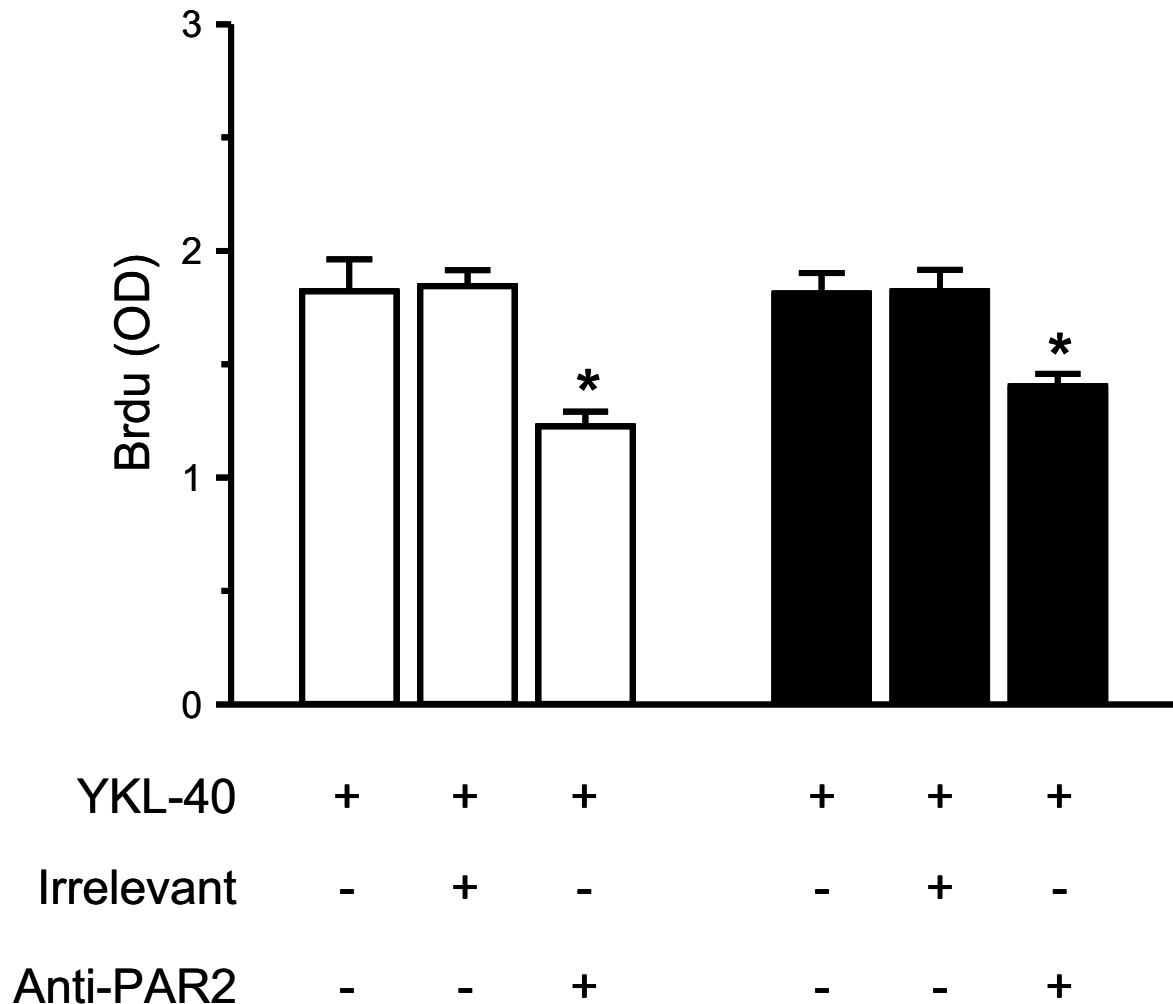
Figure E4



Néanmoins, les voies de transduction du signal par lesquelles YKL-40 modifie les propriétés du muscle lisse bronchique sont inconnues à ce jour. L'implication du récepteur PAR2 dans les effets d'YKL-40 sur le muscle lisse bronchique peut cependant être envisagée. En effet, divers allergènes provenant d'acariens, de champignons, de blattes ou de bactéries, sont susceptibles d'altérer la fonction épithéliale chez l'asthmatique, *via* l'activation du PAR2 (400-402). Ainsi, des protéases dérivées d'extraits de blattes germaniques ou d'allergènes de poussière, comme *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p3 et p9), activent le PAR2 de l'épithélium bronchique (402-404). En outre, les protéases provenant de la blatte germanique engendrent une inflammation bronchique médiée par le PAR2 (405). Or, des chitinases sont retrouvées dans les blattes (406, 407), ce qui suggère que les protéases provenant d'allergènes dérivés d'insectes et activant le PAR2, pourraient être des chitinases. L'activité chitinolytique de ces protéases reste néanmoins à évaluer. Par ailleurs, une chitinase exogène provenant de la bactérie *Streptomyces griseus*, retrouvée dans l'air humide d'intérieur et la poussière, induit un signal calcique et une augmentation de l'IL-8 dans les cellules épithéliales bronchiques, *via* l'activation du PAR-2 (408). En outre, des chitinases exogènes issues d'acariens, tels que *Dermatophagoides farinae* (Der f 18) et *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 15 et Der p 18), ont une activité allergénique chez l'homme (409, 410).

Par conséquent, afin de préciser si les effets d'YKL-40 sur la CML bronchique humaine sont susceptibles d'impliquer le PAR2 et dans le cadre de la révision de l'article soumis à l'Am J Respir Crit Care, des expérimentations sont actuellement en cours pour tester l'effet de l'inhibition du PAR2 par un anticorps bloquant sur les différentes propriétés de la CML altérées par la chitinase YKL-40. Des résultats préliminaires suggèrent ainsi que l'augmentation de prolifération des CML bronchiques humaines induite par YKL-40 est médiée, au moins en partie, par le PAR2 (Figure 33).

**Figure 33.** La prolifération des CML bronchiques induite par YKL-40 est médiée, en partie, par le PAR2.



**Légendes :** Incorporation de BrdU après 24h de stimulation des CML par YKL-40 à 300 ng/mL (Témoins : n=10 ; Asthmatiques : n=6). Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre la condition YKL-40 + anticorps bloquant anti-PAR2 et les conditions YKL-40 + anticorps irrelevant ou YKL-40 seule, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ).

□ : Témoin ; ■ : Asthmatique

## **B. Étude du rôle de la protéine p53 dans le remodelage musculaire lisse chez l'asthmatique**

Le remodelage musculaire lisse chez l'asthmatique implique principalement une hyperplasie des CML (5). Celle-ci peut résulter d'un excès de prolifération et/ou d'un défaut d'apoptose (5).

De nombreux stimuli sont susceptibles de favoriser la prolifération des CML, tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des médiateurs inflammatoires et des enzymes, ces différents médiateurs étant présents en excès dans la paroi bronchique de l'asthmatique. Néanmoins, ceux-ci ne suffisent pas à expliquer, à eux seuls, l'augmentation de prolifération musculaire lisse observée dans l'asthme. En effet, les CML des patients asthmatiques prolifèrent plus *in vitro*, indépendamment de tout stimulus externe (197). L'aptitude de ces cellules à proliférer de façon excessive pourrait donc également être liée à leurs propriétés intrinsèques. Il existe notamment une très nette diminution d'expression du facteur de transcription C/EBP $\alpha$  (CCAAT enhancer-binding protein  $\alpha$ ) dans les CML d'asthmatiques (411). Ce facteur est normalement activé par les corticoïdes *via* le récepteur aux glucocorticoïdes. Une telle diminution permettrait d'expliquer l'absence d'effet des corticoïdes sur l'augmentation de la masse musculaire lisse dans l'asthme. Plus récemment, une perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire a été impliquée dans cet excès de prolifération des CML chez l'asthmatique sévère (327). Une entrée anormale de calcium extracellulaire active la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse bronchique, *via* l'activation successive des facteurs de transcription PGC1- $\alpha$ , NRF1 et mtTFA.

Un déséquilibre des processus contrôlant la prolifération et l'apoptose des CML pourrait également concourir au développement d'une hyperplasie musculaire lisse. En effet, un défaut d'apoptose des CML a été mis en évidence dans un modèle expérimental de rat asthmatique

(412). Cependant, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de données démontrant chez l'homme un tel défaut d'apoptose des CML *in vivo* ou *in vitro* (327, 413).

La protéine p53 joue classiquement un rôle clé dans l'apoptose et le cycle cellulaire (307), et plus récemment, son rôle dans l'activation de la biogenèse mitochondriale du muscle strié a été démontré (330). Néanmoins, son rôle dans l'hyperplasie musculaire lisse, principale composante du remodelage musculaire chez l'asthmatique, demeure inconnu à ce jour. Les objectifs de ce travail expérimental étaient donc (i) de confirmer la présence d'une hyperplasie musculaire lisse chez l'asthmatique et d'en préciser les mécanismes, (ii) d'étudier l'expression de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique et (iii) d'en déterminer sa fonction.

### 1. Caractéristiques cliniques et fonctionnelles respiratoires des patients

Les différentes expérimentations ont été réalisées *in vitro* à partir de cultures primaires de CML issues de trois groupes de patients : i) des sujets ayant une fonction respiratoire normale, qu'ils soient fumeurs ou non, ii) des patients présentant une BPCO post-tabagique d'après la classification GOLD (370), et iii), des asthmatiques de différents stades de sévérité selon la classification GINA (146). Les deux premiers groupes sont utilisés à titre de groupes témoins pour le groupe des asthmatiques, au cours des diverses expérimentations. Le groupe témoin est en effet dépourvu de remodelage bronchique, tandis que le groupe BPCO est également caractérisé par une augmentation de la masse musculaire lisse relevant d'un mécanisme différent de celui de l'asthme (327). Les caractéristiques cliniques et fonctionnelles respiratoires de ces patients sont colligées dans le Tableau 8.

Le groupe des patients asthmatiques, majoritairement non fumeurs et dont le traitement de fond est stable, est ainsi constitué de 18 asthmatiques non sévères et 10 asthmatiques sévères. Les patients BPCO, fumeurs actifs ou ex-fumeurs, dont le tabagisme moyen est estimé à 41

**Tableau 8.** Caractéristiques cliniques et fonctionnelles respiratoires des patients.

Caractéristiques	Témoins	BPCO	Asthmatiques	p (Kruskal-Wallis)
<b>Nb de patients</b>	10	13	28	
<b>Age</b> (Années)	65,5 ± 2,3	61,4 ± 2,9	40,2 ± 3,0 *#	<0,001
<b>Sexe</b> (H/F)	6/4	11/2	5/23 *#	0
<b>IMC</b> (kg/m <sup>2</sup> )	26,2 ± 1,5	25,5 ± 1,4	27,9 ± 1,6	0,95
<b>Statut tabagique</b>				
PA (Paquet-année)	26,0 ± 9,3	41,0 ± 4,8 §	1,6 ± 0,6 *#	<0,001
Non fumeurs (Nb de patients)	5	0	23	
Fumeurs actifs (Nb de patients)	4	6	0	
Ex-fumeurs (Nb de patients)	1	7	5	
Nb d'années depuis l'arrêt	6,0 ± 0,0	5,2 ± 2,2	10,4 ± 4,5	
<b>Traitements</b>				
LABA (Nb de patients)	0	0	20	
ICS, µg éq. BDP/jour (Nb de patients)	0	0	23	
OCS (Nb de patients)	0	0	4	
<b>Fonction ventilatoire</b>				
<b>VEMS</b>				
Litres	2,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,2	0,21
Pourcentage de la valeur prédite	95,5 ± 5,2	72,4 ± 3,0 §	84,7 ± 3,4 *	0,003
VEMS/CVF (% de la CVF)	78,7 ± 2,2	61,7 ± 2,0 §	75,4 ± 1,4 *	<0,001
<b>DEMM<sub>25-75</sub></b>				
Litres sec <sup>-1</sup>	2,8 ± 0,4	1,3 ± 0,2 §	2,4 ± 0,2 *	0,009
Pourcentage de la valeur prédite	89,9 ± 13,9	38,7 ± 3,6 §	60,5 ± 4,6 *	0,002
<b>VR</b>				
Litres	2,2 ± 0,2	3,6 ± 0,3	2,0 ± 0,3 *	<0,001
Pourcentage de la valeur prédite	99,2 ± 10,1	148,6 ± 10,8 §	121,2 ± 18,6 *	0,005
<b>CPT</b>				
Litres	5,9 ± 0,4	6,8 ± 0,5	5,6 ± 0,4 *	0,04
Pourcentage de la valeur prédite	95,6 ± 3,7	111,0 ± 4,1 §	106,8 ± 6,3	0,04

**Légendes :** Les valeurs représentent des moyennes ± SEM. \*, #, §, représentent respectivement une différence significative entre les asthmatiques et les BPCO, les asthmatiques et les témoins, les BPCO et les témoins, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif (p<0,05).

**Abréviations :** BDP : Bécloéthasone ; IMC : Index de masse corporelle ; CPT : Capacité pulmonaire totale ; CVF : Capacité vitale forcée ; DEMM<sub>25-75</sub> : Débit expiratoire maximal médian entre 25 et 75% de la CVF ; F : Femme ; H : Homme ; ICS : Corticothérapie inhalée ; LABA : Bronchodilatateur de longue durée d'action ; NB : Nombre ; OCS : Corticothérapie orale ; SEM : Écart standard à la moyenne ; VEMS : Volume expiratoire maximum en une seconde ; VR : Volume résiduel.



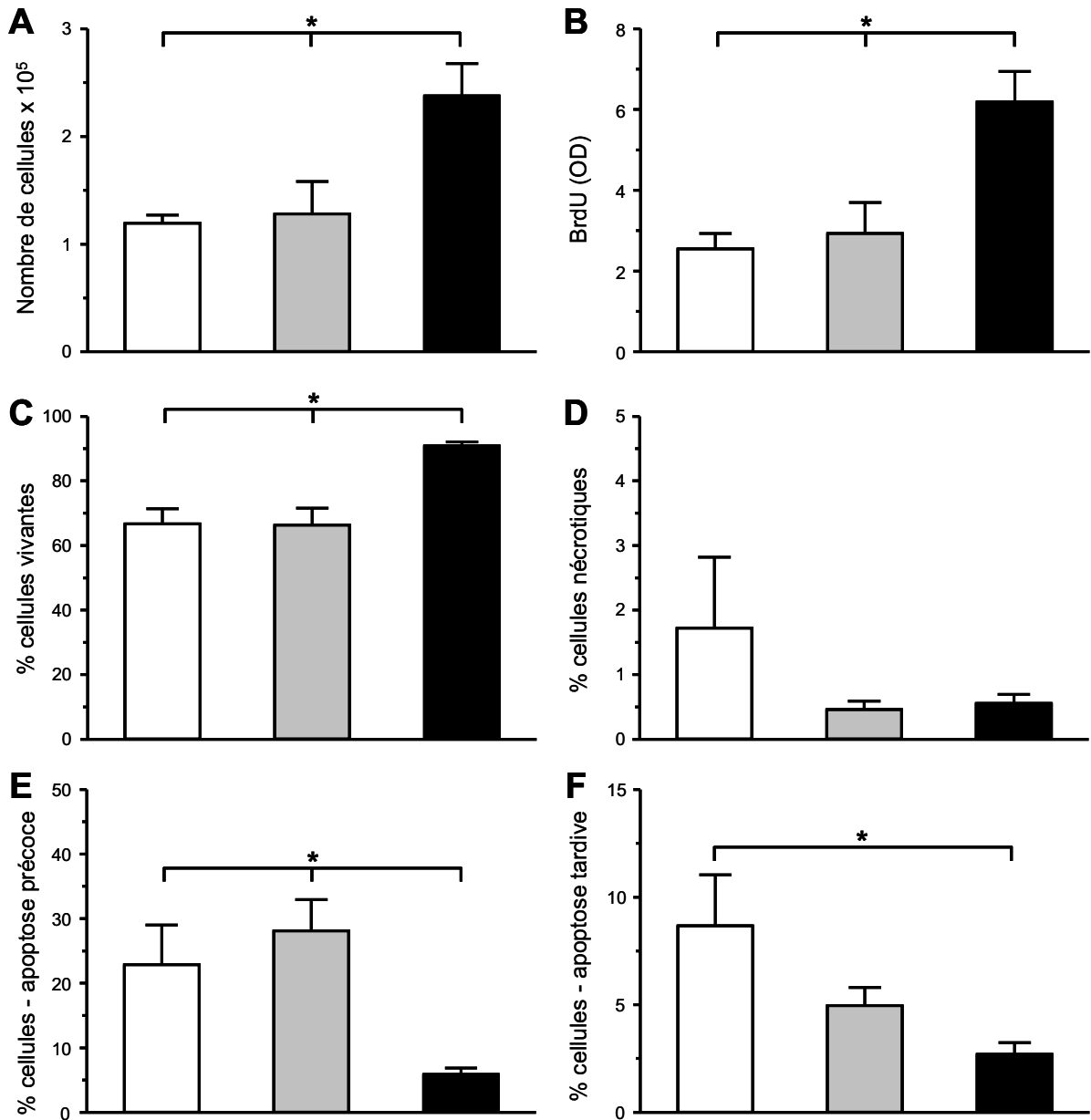
PA (Paquet-année), sont majoritairement des BPCO moyennement sévères (stade II) selon la classification GOLD, comme en témoigne la valeur de leur VEMS, comprise entre 50 et 80% de la valeur prédite (370). Aucun de ces patients n'a eu d'exacerbation récente de sa pathologie au cours des trois mois précédents la réalisation des prélèvements broncho-pulmonaires. La fonction ventilatoire du groupe témoin est normale et non différente, en terme de VEMS, de celle des asthmatiques. Le groupe BPCO présente en revanche une obstruction fonctionnelle respiratoire, associée à une distension pulmonaire relative. Une obstruction distale associée à une distension pulmonaire relative, moins marquée que celles des BPCO, est en outre observée dans le groupe des patients asthmatiques.

## 2. Hyperplasie des CML d'asthmatiques

Un excès de prolifération des CML d'asthmatiques est retrouvé *in vitro*, comme en témoignent l'augmentation du nombre de CML au 7<sup>ème</sup> jour de culture (Figure 34A) et de la synthèse d'ADN (Figure 34B). Ces résultats corroborent des données expérimentales préalablement établies dans ce type cellulaire (327).

En revanche, une diminution d'apoptose spontanée des CML d'asthmatiques fraîchement cultivées est également objectivée *in vitro* (Figure 34C). Cette diminution d'apoptose est liée principalement à une diminution du nombre de cellules en apoptose précoce (Figure 34E, F), sans modification significative du nombre de cellules nécrotiques (Figure 34D). Ces données vont à l'encontre de résultats précédemment publiés (327, 413). Toutefois, dans ces travaux, l'étude de l'apoptose avait été réalisée sur des cellules décongelées. Or, la décongélation après cryoconservation dans l'azote liquide est connue pour majorer la susceptibilité à l'apoptose dans d'autres types cellulaires (414), ce qui a également été confirmé dans les CML d'asthmatiques (Résultats non montrés). Une collaboration est actuellement en cours avec l'équipe espagnole de Davis Ramos-Barbon pour confirmer ces résultats *ex vivo* par TUNEL

**Figure 34.** Excès de prolifération et défaut d'apoptose des CML d'asthmatiques.



**Légendes :** Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les asthmatiques et les témoins ou les BPCO, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). Étude de la prolifération des CML bronchiques humaines : **A.** Nombre de CML au 7<sup>ème</sup> jour de culture (Témoins : n=7 ; BPCO : n=5 ; Asthmatiques : n=7) ; **B.** Incorporation de BrdU (Témoins : n=4 ; BPCO : n=4 ; Asthmatiques : n=8). Étude de l'apoptose spontanée des CML bronchiques humaines (Témoins : n=5 ; BPCO : n=5 ; Asthmatiques : n=11) : **C.** % de cellules vivantes ; **D.** % de cellules nécrotiques ; **E.** % de cellules en apoptose précoce ; **F.** % de cellules en apoptose tardive.  
 □ : Témoin ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique

(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) sur des coupes histologiques de muscle lisse bronchique d'asthmatique que nous lui avons fournies.

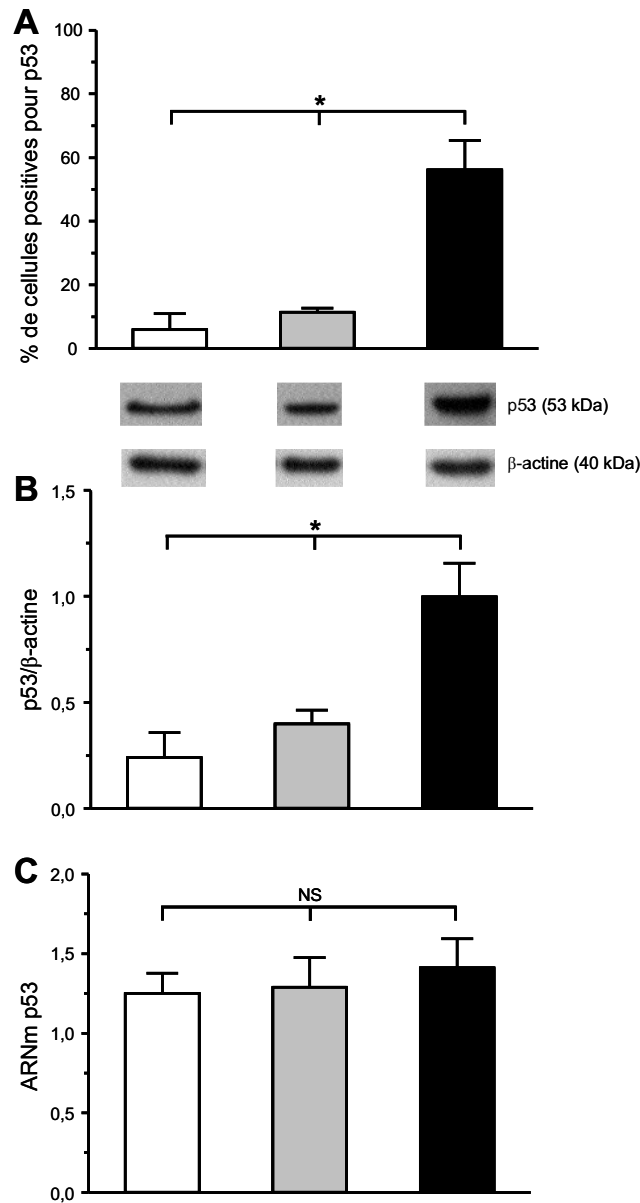
Par conséquent, ces résultats confirment la croissance plus rapide des CML d'asthmatiques *in vitro*. Cet excès de croissance chez l'asthmatique est lié non seulement, comme cela a déjà été décrit, à un excès de prolifération, mais également, comme cela est mis en évidence pour la 1<sup>ère</sup> fois dans ce travail, à un défaut d'apoptose.

### 3. Expression de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique

Pour préciser le rôle joué par la protéine p53 dans cette hyperplasie musculaire lisse chez l'asthmatique, son expression a été étudiée par cytométrie en flux et Western blot. Le pourcentage de cellules positives pour p53 au sein des CML, *i.e.* des cellules positives pour l' $\alpha$ -actine musculaire lisse, est significativement augmenté chez les asthmatiques par rapport aux témoins ou aux BPCO (Figure 35A). La quantification des protéines par Western blot, quant à elle, ne peut être réalisée, par définition, que sur l'ensemble des cellules en culture. En utilisant cette 2<sup>ème</sup> technique de quantification protéique, une augmentation significative d'expression de p53 a, de nouveau, été objectivée dans les CML provenant de patients asthmatiques par rapport aux témoins et aux BPCO (Figure 35B). Au niveau transcriptionnel, en revanche, il n'existe aucune différence significative dans la quantité d'ARNm de p53 des CML d'asthmatiques par rapport à celle des sujets témoins ou des BPCO (Figure 35C), ce qui suggère un mécanisme post-transcriptionnel à l'origine de l'augmentation d'expression de p53 dans le muscle lisse des asthmatiques.

Par conséquent, ces résultats démontrent, pour la 1<sup>ère</sup> fois, l'existence d'une surexpression de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique, dont le mécanisme est post-transcriptionnel. Cette surexpression de p53 n'est pas un épiphénomène, conséquence du

**Figure 35.** Surexpression de la protéine p53, d'origine post-transcriptionnelle, dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique.



**Légendes :** Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les asthmatiques et les témoins ou les BPCO, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). **A.** % de cellules positives pour p53 au sein des cellules positives pour l' $\alpha$ -actine musculaire lisse (Témoins : n=4 ; BPCO : n=4 ; Asthmatiques : n=4). **B.** Quantification de p53 au niveau protéique par Western blot, exprimée en ratio de la densité des bandes de p53 sur celles de la  $\beta$ -actine (Témoins : n=4 ; BPCO : n=4 ; Asthmatiques : n=8). **C.** Quantification de p53 au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative en temps réel exprimée en unité arbitraire par rapport à la moyenne géométrique de 3 gènes domestiques (Témoins : n=7 ; BPCO : n=8 ; Asthmatiques : n=10).

□ : Témoin ; ▒ : BPCO ; ■ : Asthmatique

stress cellulaire et des modifications phénotypiques induits par la culture cellulaire (415). En effet, des conditions de culture similaires ont été utilisées pour les CML d'asthmatiques, de témoins et de BPCO et les expérimentations ont été limitées aux passages précoces de ces cellules, afin d'éviter la dédifférenciation des CML en myofibroblastes ou fibroblastes. Cette surexpression reste néanmoins à confirmer *ex vivo* sur des coupes histologiques de muscle lisse bronchique d'asthmatique.

#### 4. Fonction de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique

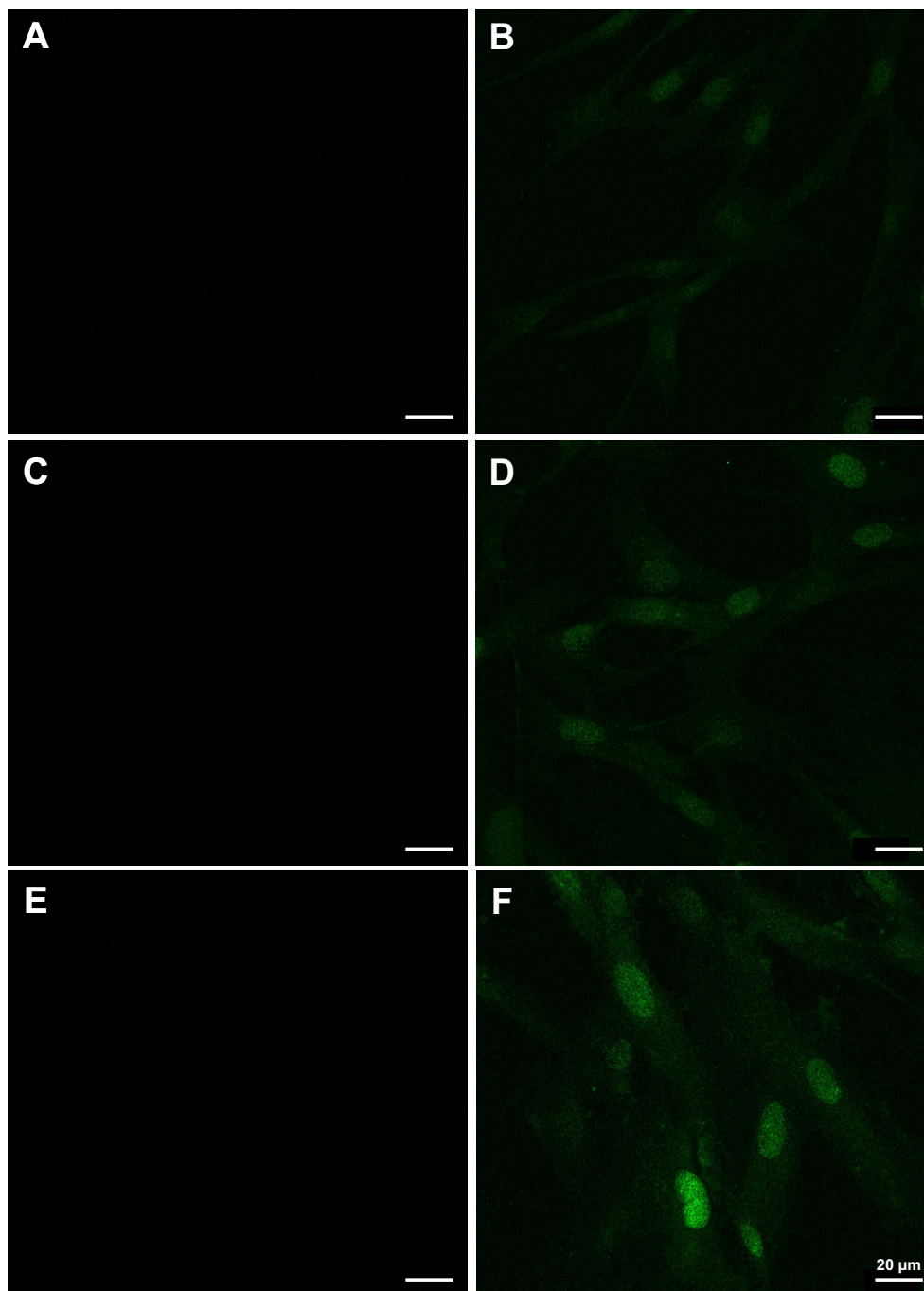
La surexpression de la protéine p53 retrouvée dans les CML bronchiques des asthmatiques va donc à l'encontre de l'hyperprolifération et du défaut d'apoptose de ces cellules, dans la mesure où les deux fonctions princeps de p53 sont l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Par conséquent, une telle discordance soulève d'emblée la question du caractère non-fonctionnel de cette protéine dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique.

La protéine p53 assurant la plupart de ses fonctions en tant que facteur de transcription, la localisation subcellulaire de p53 ainsi que sa capacité de liaison à l'ADN ont été vérifiées dans un 1<sup>er</sup> temps. Puis, son rôle dans l'hyperplasie musculaire lisse a été étudié par l'analyse de certains de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, grâce à une stratégie d'interférence ARN lentivirale.

##### *Localisation cellulaire de la protéine p53 dans les CML bronchiques humaines*

Pour assurer la plupart de ses fonctions en tant que facteur de transcription, la protéine p53 doit se lier à l'ADN dans le noyau. La localisation subcellulaire de la protéine p53 a donc été vérifiée en immunocytochimie. Le marquage immunologique confirme le siège majoritairement nucléaire de p53 dans les CML bronchiques (Figure 36) et s'avère plus intense dans les CML d'asthmatiques (Figure 36F) par comparaison à celui des témoins (Fi-

**Figure 36.** La protéine p53 est majoritairement nucléaire dans les CML bronchiques humaines.



**Légendes :** Photographies réalisées au grossissement x60 sous microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en trois dimensions de 20 coupes de 0,2 µm d'épaisseur. Les barres représentent 20 µm. Les cellules proviennent d'un sujet témoin (A, B), d'un patient BPCO (C, D) ou d'un patient asthmatique (E, F). Les lames sont marquées par un anticorps anti-p53 (B, D, F) ou par un anticorps irrelevant (A, C, E), puis par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor® 488.

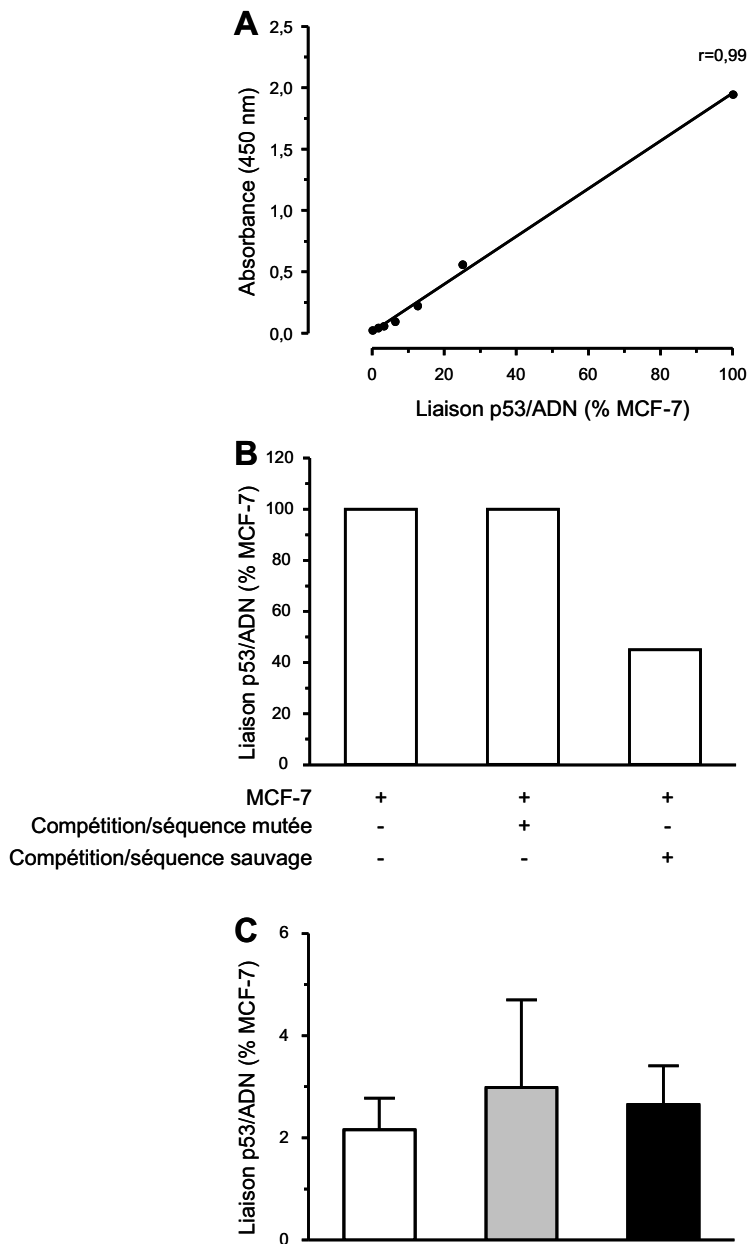
gure 36B) ou des BPCO (Figure 36D), bien qu'il ne s'agisse pas d'une technique quantitative.

#### *Capacité de liaison à l'ADN de la protéine p53 dans les CML bronchiques humaines*

La capacité de liaison à l'ADN de la protéine p53 nucléaire a été étudiée grâce à l'utilisation d'un kit ELISA (Figure 37). Une droite standard a pu être construite grâce à des dilutions croissantes d'extraits nucléaires de cellules de la lignée MCF-7, traitées par le peroxyde d'hydrogène, car elles sont connues pour produire une protéine p53 fonctionnelle, capable de se lier à sa séquence consensus cible de l'ADN (Figure 37A). Selon un protocole standard, l'absorbance des échantillons est alors exprimée en pourcentage de la capacité de liaison maximale de p53 à l'ADN produite par 6 µg d'extraits nucléaires de cellules de la lignée MCF-7 traitées au peroxyde d'hydrogène. Par ailleurs, pour confirmer la spécificité de ce test, des expériences de compétition ont également été effectuées, en ajoutant une séquence oligonucléotidique mutée ou sauvage, aux puits contenant les extraits nucléaires de la lignée cellulaire MCF-7. La diminution d'environ 50% de la capacité de liaison de p53 à l'ADN des cellules MCF-7 en présence de la séquence sauvage, et non de la séquence mutée, conforte la spécificité du test (Figure 37B).

Malgré la faible taille des échantillons, les résultats préliminaires obtenus tendent à montrer que la protéine p53 des CML d'asthmatiques se lie à l'ADN de façon comparable à celle des témoins ou des BPCO (Figure 37C). Néanmoins, ces données restent à confirmer, d'une part, en augmentant l'effectif de l'échantillon, et, d'autre part, en normalisant également les résultats au moyen d'une source commerciale de p53 recombinante, dont la quantité est connue.

**Figure 37.** Capacité de liaison à l'ADN de la protéine p53 dans les CML bronchiques humaines.



**Légendes :** Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. **A.** Droite de régression représentant la relation entre l'absorbance mesurée à 450 nm et la quantité de p53 fonctionnelle issue de la lignée MCF-7 stimulée par le peroxyde d'hydrogène (% MCF-7).  $r$  représente le coefficient de régression. **B.** Liaison de p53 à l'ADN (% MCF-7) lors d'une épreuve de compétition avec une séquence sauvage ou mutée (Témoin :  $n=1$ ). **C.** Capacité de liaison de p53 à l'ADN, exprimée en % de la capacité de liaison de p53 produite par 6  $\mu$ g d'extraits nucléaires de la lignée MCF-7 (Témoins :  $n=2$  ; BPCO :  $n=2$  ; Asthmatiques :  $n=3$ ).

□ : Témoin ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique



### *Rôle de p53 dans l'hyperplasie musculaire lisse de l'asthmatique*

Dans le muscle lisse bronchique, la protéine p53 est donc majoritairement nucléaire et sa capacité de liaison à sa séquence consensus cible de l'ADN semble comparable à celle des témoins et des BPCO. L'effet de l'inhibition stable de p53 par transfection lentivirale avec un shRNA anti-p53 a alors été testé, afin d'étudier le rôle de p53 dans l'hyperplasie musculaire lisse retrouvée chez l'asthmatique.

- Vérification de l'efficacité de la transfection lentivirale

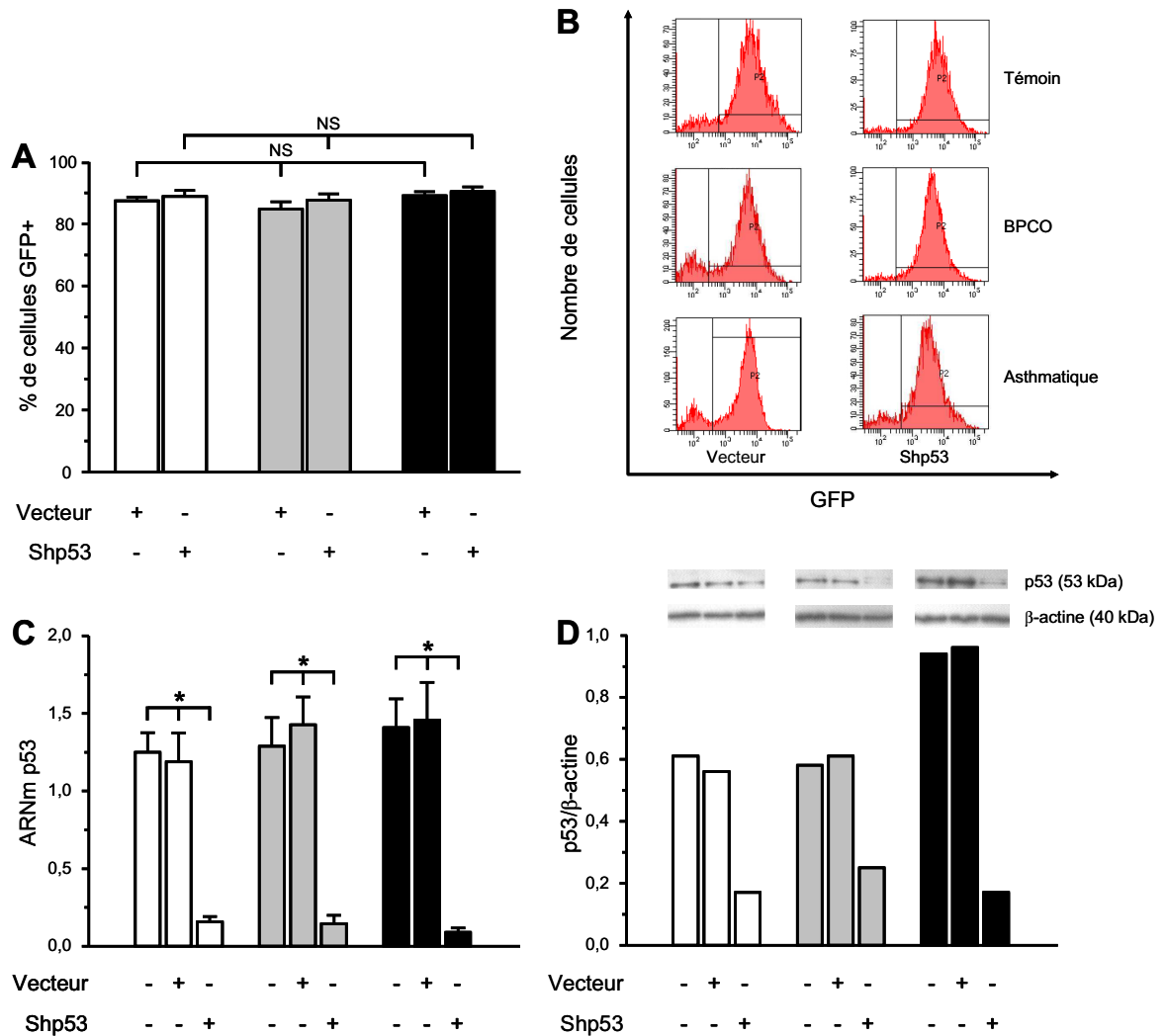
Les infections lentivirales ont été réalisées avec le pLVTHM vide ou contenant le shRNA anti-p53 à une MOI de 20, correspondant à une transfection théorique de 20 particules lentivirales/cellule. L'efficacité de la transduction est vérifiée en cytométrie en flux (FACScanto<sup>®</sup>, Beckton Dickinson) par l'analyse de la fluorescence de la GFP, 7 jours après la transfection lentivirale, et démontre que plus de 85% des cellules sont efficacement transfectées par le pLVTHM vide ou le shRNA anti-p53 (Figure 38A et B). Par ailleurs, l'efficacité de l'interférence ARN est également déterminée par l'analyse de l'expression de p53 au niveau transcriptionnel (Figure 38C) et protéique (Figure 38D). Une diminution de l'expression transcriptionnelle de p53 supérieure à 85% et de son expression protéique supérieure à 70% est ainsi observée, bien que ce dernier résultat reste à confirmer sur un échantillon de taille plus conséquente. Il s'agit en l'occurrence de la 1<sup>ère</sup> démonstration de l'efficacité d'une telle stratégie d'interférence ARN lentivirale dans des cultures primaires de CML bronchiques humaines d'asthmatiques.

- Effet de la transfection lentivirale avec le shp53 sur la prolifération cellulaire

Après vérification de l'efficacité de la transfection lentivirale et de l'interférence ARN, le rôle de p53 dans la prolifération cellulaire a été évalué par comptage des cellules après 7 jours de

**Figure 38.** Efficacité de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML

bronchiques humaines.



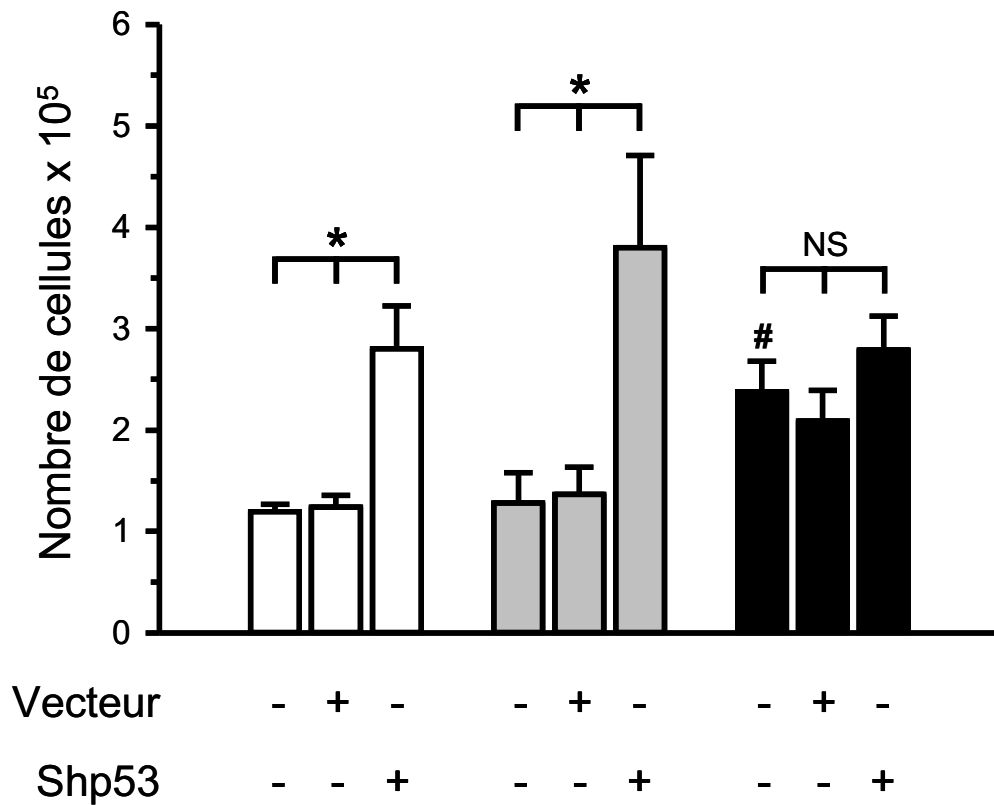
culture (Figure 39). Une hyperprolifération cellulaire est ainsi retrouvée dans les CML d'asthmatiques non transfectées par rapport à celles des témoins ou des BPCO, et reste à confirmer dans les cellules transfectées avec le vecteur vide ( $p=0,055$ ). Le shRNA anti-p53 entraîne une hyperprolifération des CML de témoins et de BPCO, par rapport aux mêmes cellules non transfectées ou transfectées avec le pLVTHM vide. Ces résultats démontrent donc que la prolifération des CML de témoins ou de BPCO est dépendante de p53. En revanche, la protéine p53, surexprimée dans le muscle lisse de l'asthmatique, semble inefficace à freiner l'hyperprolifération musculaire lisse, comme en témoigne l'absence d'effet du shp53 sur le nombre de ces cellules. Ce résultat soulève, de nouveau, la question du caractère non-fonctionnel de cette protéine dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique. Des expérimentations complémentaires sont actuellement en cours pour tester l'effet du shp53 sur la synthèse d'ADN, les différentes phases du cycle cellulaire et l'apoptose spontanée des CML bronchiques humaines.

- Effet de la transfection lentivirale avec le shp53 sur certains des gènes cibles de p53 impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose

L'aptitude de p53 d'activer ou de réprimer la transcription de certains de ses gènes cible impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose a secondairement été étudié.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, ont ainsi été précisés l'effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 sur l'expression transcriptionnelle de p21, gène clé dans l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que sur celles de mtTFA, NRF1 et PGC1- $\alpha$ , dans la mesure où l'excès de biogenèse mitochondriale concourt à l'hyperprolifération musculaire lisse chez l'asthmatique (327) et que p53 est connue pour transactiver mtTFA dans le muscle strié chez la souris (330) (Figure 40). Le shRNA anti-p53 diminue ainsi l'expression transcriptionnelle de p21 d'environ 90%, quelque soit le type cellulaire, ce qui suggère que p21 est bien transactivé par p53 dans les

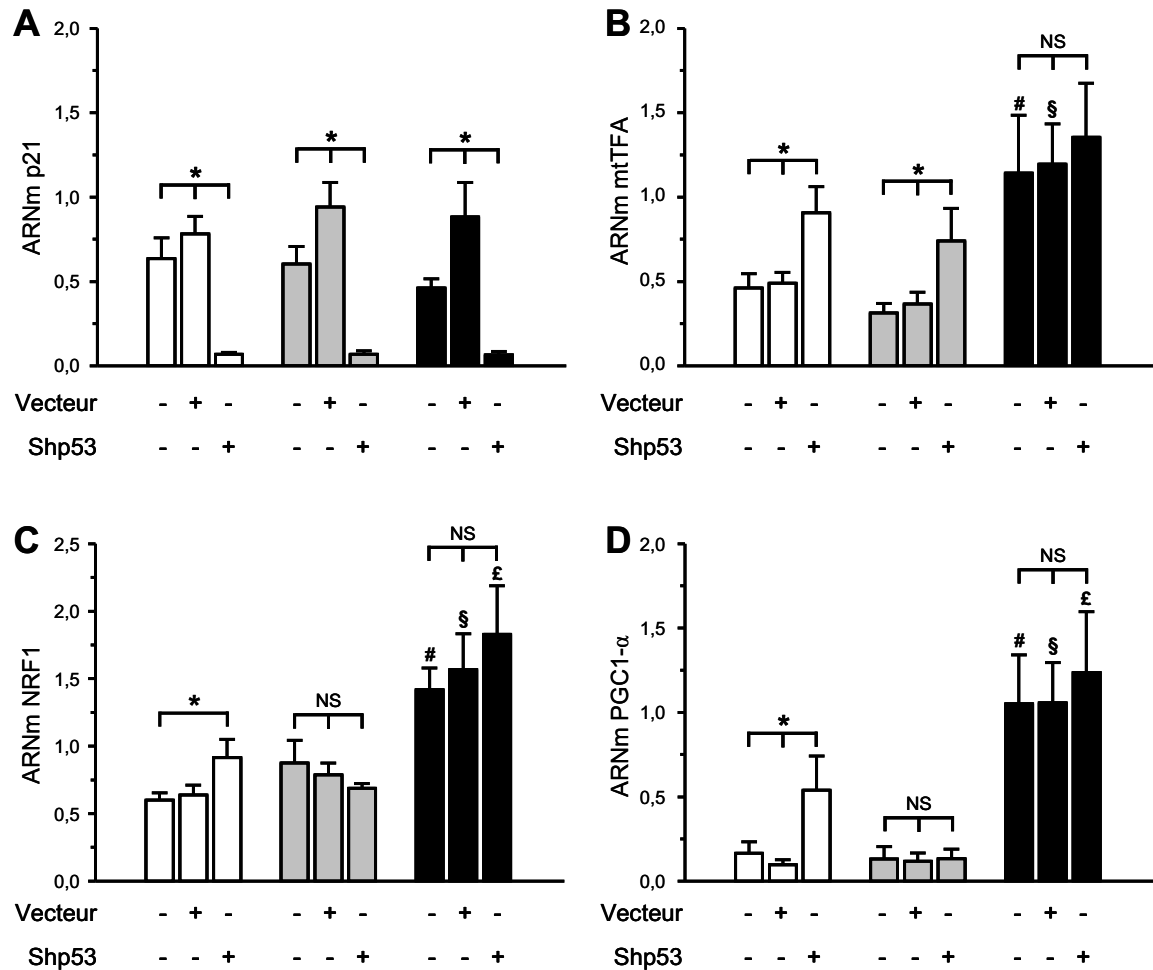
**Figure 39.** Effet sur la prolifération cellulaire de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines.



**Légendes :** Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. Prolifération cellulaire évaluée par comptage après 7 jours de culture (Témoins : n=5 ; BPCO : n=5 ; Asthmatiques : n=7). \* représente une différence significative entre les cellules transfectées avec le shp53 et les cellules non transfectées ou transfectées avec le pLVTHM vide dans chacun des groupes, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). # représente une différence significative entre les cellules non transfectées d’asthmatiques et celles de BPCO ou de témoins, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ).

□ : Témoin ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique

**Figure 40.** Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de p21, mtTFA, NRF1 et PGC1- $\alpha$ .



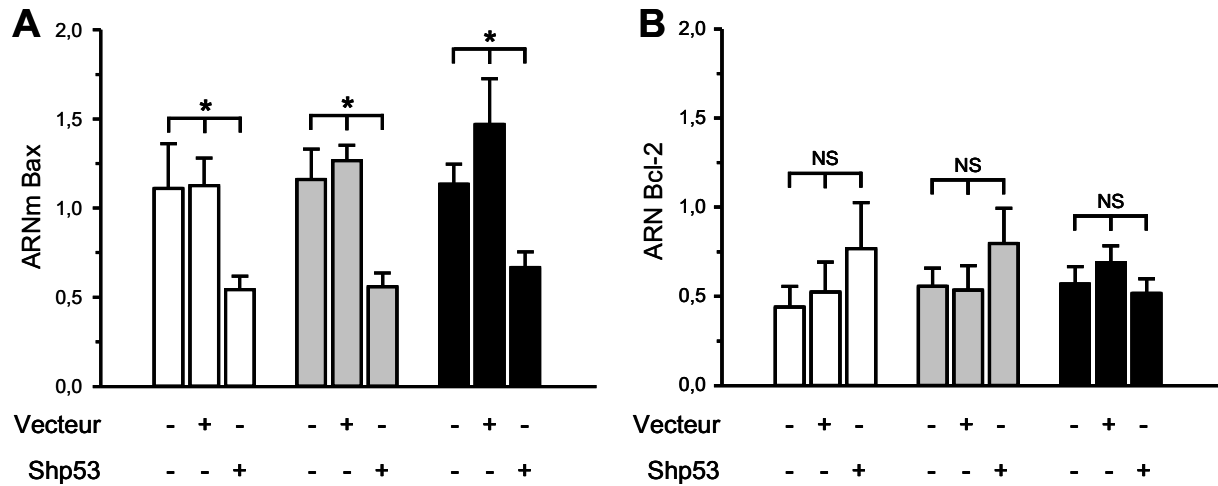
**Légendes :** Quantification de p21 (A), mtTFA (B), NRF1 (C) et PGC1- $\alpha$  (D) au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative en temps réel exprimée en unité arbitraire (Témoins : n=7 ; BPCO : n=8 ; Asthmatiques : n=10). Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les cellules transfectées avec le shp53 et les cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur vide dans chacun des groupes, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). # représente une différence significative entre les cellules non transfectées d'asthmatiques et celles de BPCO ou de témoins, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). § représente une différence significative entre les cellules d'asthmatiques transfectées avec le vecteur vide et celles de BPCO ou de témoins, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). £ représente une différence significative entre les cellules d'asthmatiques transfectées avec le shp53 et celles de BPCO ou de témoins, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ).

□ : Témoin ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique

CML bronchiques (Figure 40A). En revanche, de façon originale, la protéine p53 exerce un effet freinateur sur l'activation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse des témoins et des BPCO. En effet, le shRNA anti-p53 induit une augmentation de l'expression transcriptionnelle de mtTFA, NRF1 et PGC1- $\alpha$  chez le témoin, et uniquement de celle de mtTFA chez le BPCO (Figures 40B, C et D). Il s'agit ainsi de la 1<sup>ère</sup> description d'un lien entre p53 et biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse bronchique humain, qui est à l'opposé de son rôle activateur démontré dans le muscle strié (330). Cependant, dans le muscle lisse de l'asthmatique, l'activation de la biogenèse mitochondriale n'est pas freinée par la protéine p53, ce qui, de nouveau, plaide en faveur du caractère non-fonctionnel de p53. Ce rôle freinateur exercé par p53 sur la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse des témoins et des BPCO peut donc contribuer à limiter leur prolifération cellulaire, à la différence des CML d'asthmatiques.

Dans un 2<sup>nd</sup> temps, l'effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 sur l'expression transcriptionnelle de deux protéines impliquées dans l'apoptose, Bax et Bcl-2, a été étudié. La protéine pro-apoptique Bax est normalement transactivée par p53, tandis que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est transréprimée par p53. Le shRNA anti-p53 diminue ainsi l'expression transcriptionnelle de Bax d'environ 60%, quelque soit le type cellulaire, ce qui suggère que Bax est majoritairement transactivé par p53 dans les CML bronchiques (Figure 41A). En revanche, le shRNA anti-p53 augmente l'expression transcriptionnelle de Bcl-2 d'environ 30% dans les CML de témoins et de BPCO (figure 41B). Bien qu'encore non statistiquement significatif, ce résultat semble suggérer que Bcl-2 est transréprimé dans le muscle lisse des témoins et des BPCO. Cette augmentation d'expression transcriptionnelle de Bcl-2 induite par le shp53 n'est cependant pas retrouvée dans les CML d'asthmatiques (Figure 41B), ce qui représente un argument supplémentaire en faveur de la non-fonctionnalité de cette protéine dans le muscle lisse de l'asthmatique. L'effet de la transfec-

**Figure 41.** Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de Bax et Bcl-2.



**Légendes :** Quantification de Bax (A) et Bcl-2 (B) au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative en temps réel exprimée en unité arbitraire par rapport à la moyenne géométrique de trois gènes domestiques (Témoins : n=7 ; BPCO : n=8 ; Asthmatiques : n=10). Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les cellules transfectées avec le shp53 et les cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur vide dans chacun des groupes, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ).

□ : Témoin ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique

tion lentivirale sur l'expression protéique des produits de ces différents gènes cibles de p53 reste à déterminer.

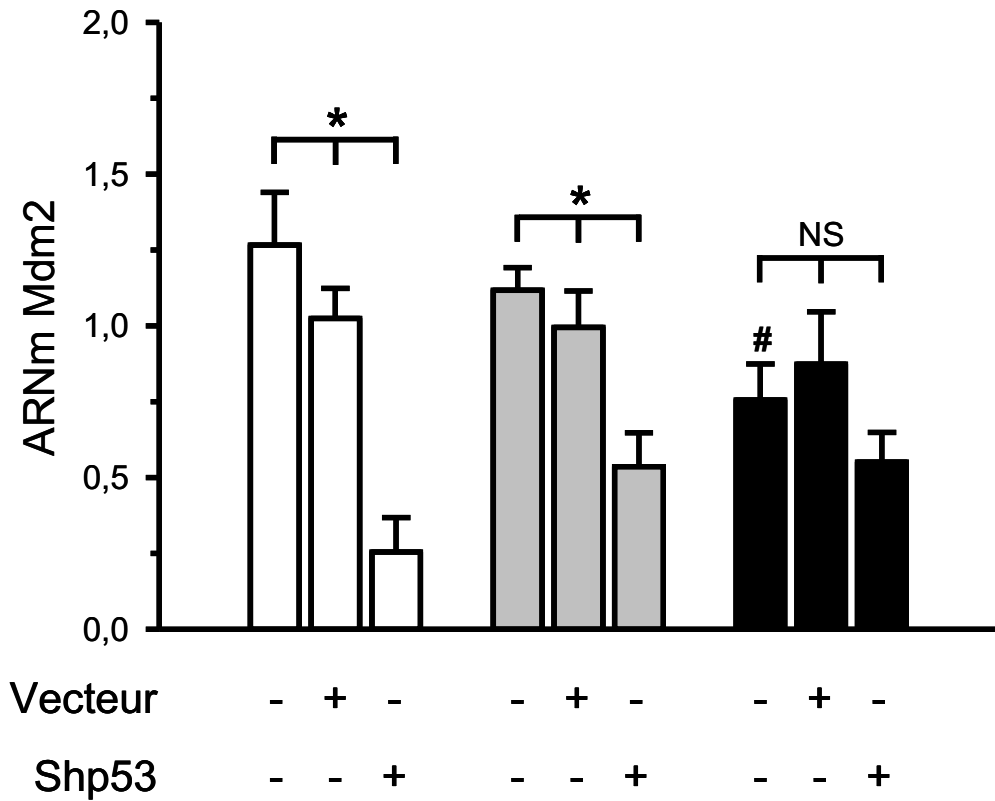
- Boucles de rétrocontrôle Mdm2/p53 et mtTFA/p53

Dans la mesure où il existe un rétrocontrôle négatif entre p53 et Mdm2, p53 transactivant Mdm2 et cette ubiquitine ligase favorisant la dégradation de p53 par la voie ubiquitine-protéasome, nous avons étudié l'effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 sur l'expression transcriptionnelle de Mdm2. Le shp53 diminue ainsi l'expression transcriptionnelle de Mdm2 de façon significative dans les CML de témoins et de BPCO, à la différence de celle des asthmatiques (Figure 42), ce qui représente un nouvel argument en faveur de la non-fonctionnalité de p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique. Par ailleurs, la quantité d'ARNm de Mdm2 est significativement inférieure dans les CML d'asthmatiques non transfectées par rapport à celles des témoins ou des BPCO, ce qui peut expliquer, du moins en partie, la surexpression de p53 retrouvée dans le muscle lisse de l'asthmatique.

L'hypothèse d'une boucle de rétrocontrôle entre mtTFA et p53 a également été envisagée, en testant l'effet de l'inhibition stable de mtTFA par transfection des CML bronchiques avec un shRNA anti-mtTFA. Comme précédemment, l'efficacité de la transfection a été vérifiée par cytométrie en flux et montre que plus de 90% des cellules sont transfectées par le shmtTFA (Résultats non montrés). Ces expérimentations préliminaires semblent toutefois infirmer l'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif ou positif de mtTFA sur p53 (Figure 43A). Le shRNA anti-mtTFA diminue par ailleurs la prolifération des CML d'asthmatiques de 55%, ce qui démontre que la prolifération de ces cellules est majoritairement dépendante de l'activation de la biogenèse mitochondriale (Figure 43B). En revanche, de façon surprenante, il diminue également celle des témoins et des BPCO. Or, leur prolifération cellulaire est moins



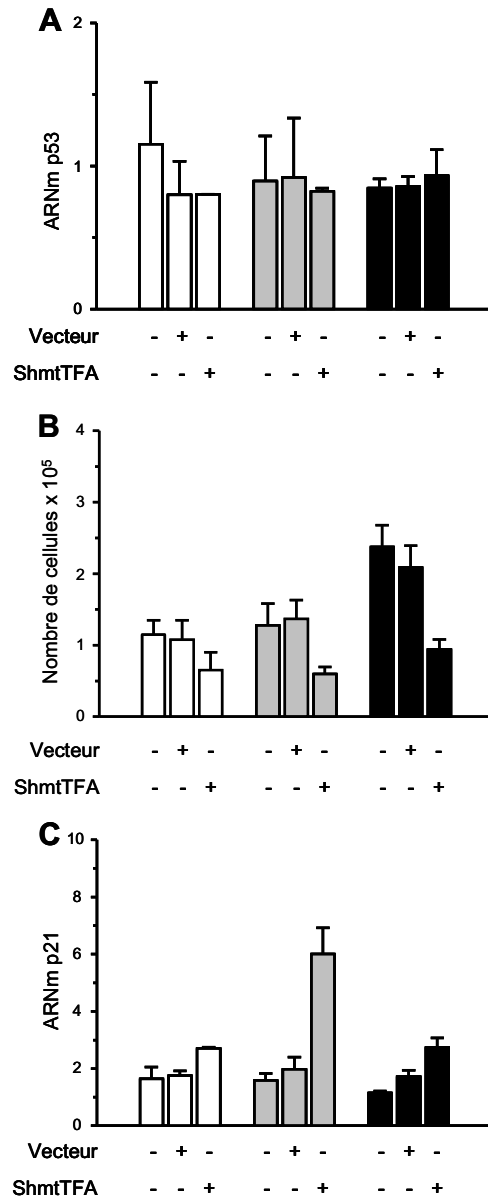
**Figure 42.** Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-p53 dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de Mdm2.



**Légendes :** Quantification de Mdm2 au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative en temps réel exprimée en unité arbitraire par rapport à la moyenne géométrique de trois gènes domestiques (Témoins : n=7 ; BPCO : n=8 ; Asthmatiques : n=10). Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les cellules transfectées avec le shp53 et les cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur vide dans chacun des groupes, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ). # représente une différence significative entre les cellules non transfectées d'asthmatiques et celles de BPCO ou de témoins, en test de comparaison multiple (Z-test) après un test de Kruskal-Wallis significatif ( $p < 0,05$ ).

□ : Témoin ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique

**Figure 43.** Effet de la transfection lentivirale avec le shRNA anti-mtTFA dans les CML bronchiques humaines sur l'expression de p53, la prolifération cellulaire et l'expression de p21.



**Légendes :** **A.** Quantification de p21 au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative en temps réel exprimée en unité arbitraire par rapport à la moyenne géométrique de trois gènes domestiques (Témoins : n=2 ; BPCO : n=2 ; Asthmatiques : n=4). **B.** Prolifération cellulaire évaluée par comptage après 7 jours de culture (Témoins : n=2 ; BPCO : n=5 ; Asthmatiques : n=7). **C.** Quantification de p21 au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative en temps réel exprimée en unité arbitraire par rapport à la moyenne géométrique de trois gènes domestiques (Témoins : n=2 ; BPCO : n=2 ; Asthmatiques : n=4). Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  SEM.

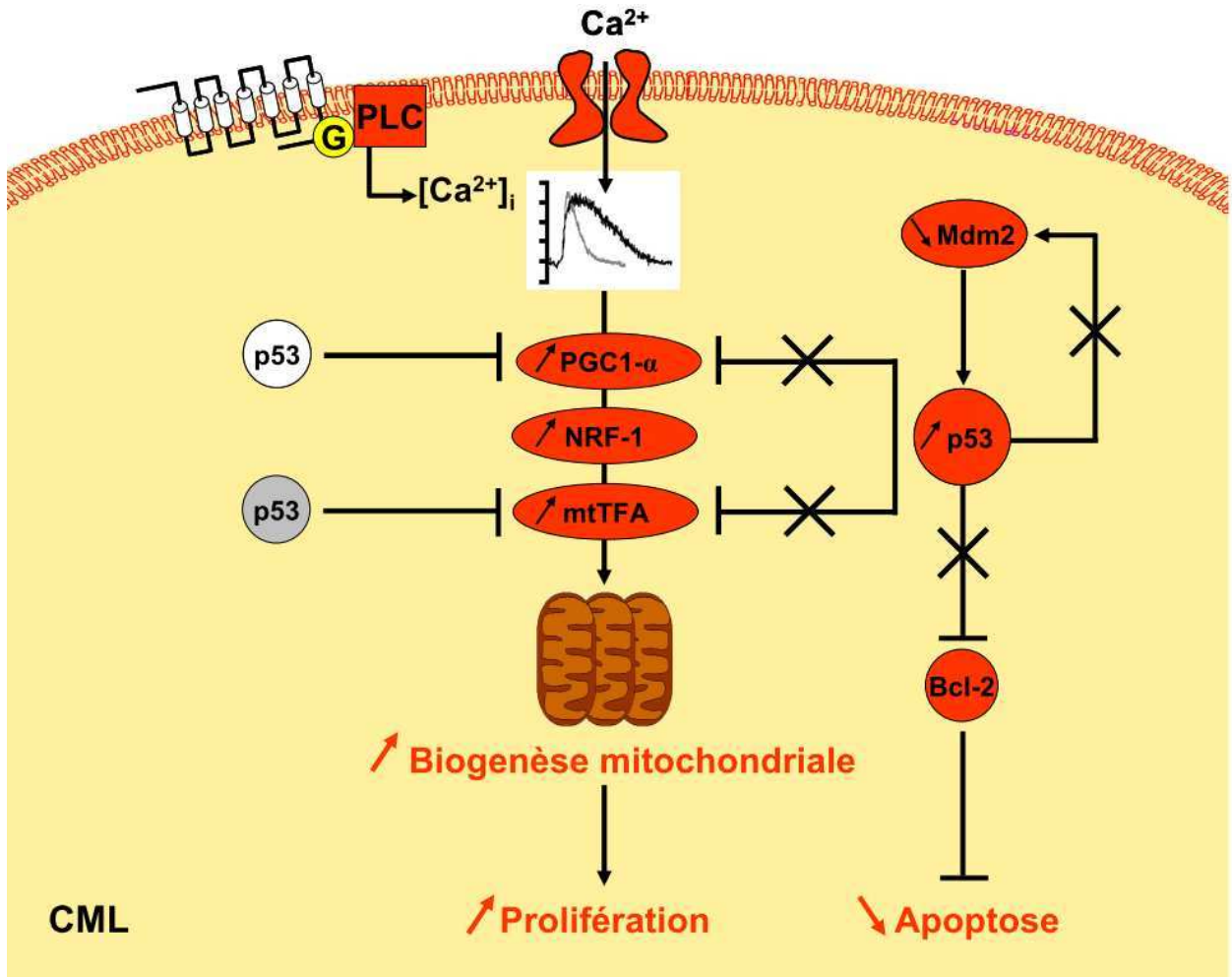
□ : Témoins ; ■ : BPCO ; ■ : Asthmatique

dépendante de la glycolyse aérobie (327). Ce résultat contradictoire peut être expliqué par l'effet du shmtTFA sur l'expression transcriptionnelle de p21, qui est accrue dans les trois types cellulaires (Figure 43C). L'effet du shmtTFA sur l'apoptose de ces cellules reste néanmoins à déterminer.

Au total, ce travail expérimental démontre l'existence d'une surexpression d'origine post-transcriptionnelle de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique, possiblement en rapport avec une diminution de sa dégradation protéasomale par l'ubiquitine-ligase Mdm2, dont l'expression est diminuée dans les CML d'asthmatiques. Bien que majoritairement nucléaire et capable de se lier à sa séquence consensus cible de l'ADN, la protéine p53 ne semble pas fonctionnelle dans le muscle lisse de l'asthmatique, comme en témoignent l'hyperprolifération cellulaire et le défaut d'apoptose retrouvés *in vitro* chez l'asthmatique. Un rôle inhibiteur original de p53 a ainsi été démontré sur la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse des témoins et des BPCO, ce rôle faisant en revanche défaut chez l'asthmatique. Par ailleurs, dans les CML d'asthmatiques, p53 ne transréprime pas Bcl-2, protéine anti-apoptotique, ce qui pourrait contribuer à expliquer le défaut d'apoptose observé dans ce type cellulaire, par modification de la balance protéines pro-apoptotiques/anti-apoptotiques. Le rôle de la protéine p53 dans l'hyperplasie musculaire lisse de l'asthmatique est résumé dans la Figure 44.

Il s'agit donc de la 1<sup>ère</sup> démonstration de l'implication de la protéine p53 dans le remodelage musculaire lisse lié à l'asthme. Une surexpression de la protéine p53 dans une pathologie non néoplasique a déjà été décrite dans l'ischémie cérébrale (416), rénale (417) et cardiaque (418) ou dans des maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer (419). Cependant, dans ces différentes maladies, la protéine p53 surexprimée est fonctionnelle et capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. En revanche, dans

**Figure 44.** Rôle de p53 dans l'hyperplasie musculaire lisse chez l'asthmatique.



**Légendes :** Dans la CML bronchique de l'asthmatique, une perturbation de l'homéostasie calcique est à l'origine d'une activation de PGC1- $\alpha$ , NRF1 et mtTFA. Il en résulte une activation de la biogenèse mitochondriale et une hyperprolifération musculaire lisse. La protéine p53, surexprimée dans le muscle lisse de l'asthmatique, possiblement du fait d'une diminution de sa dégradation protéasomale par Mdm2, ne peut freiner cette activation de la biogenèse mitochondriale. En revanche, dans le muscle lisse des témoins et des BPCO, p53 freine la biogenèse mitochondriale, *via* respectivement une inhibition de PGC1- $\alpha$  et mtTFA. Cet effet inhibiteur de p53 sur la biogenèse concourt donc à l'absence d'hyperprolifération musculaire lisse observée dans ces cellules. Par ailleurs, dans la CML bronchique de l'asthmatique, p53 ne transréprime pas Bcl-2, protéine anti-apoptotique, ce qui pourrait contribuer à expliquer le défaut d'apoptose observé dans ce type cellulaire, par modification de la balance protéines pro-apoptotiques/anti-apoptotiques.

le muscle lisse bronchique de l'asthmatique, elle ne semble pas fonctionnelle, au moins en partie. Le(s) mécanisme(s) à l'origine de son défaut de fonctionnalité demeure(nt) néanmoins à déterminer. Plusieurs hypothèses pourraient ainsi expliquer la non-fonctionnalité de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique. D'une part, l'hypothèse de mutation(s) somatique(s) ou de polymorphismes du gène *TP53* devra être envisagée. Des mutations de p53 ont en effet été décrites dans des maladies non néoplasiques, comme la polyarthrite rhumatoïde (420), mais de façon peu fréquente. Dans ces maladies inflammatoires, le stress oxydant résultant des processus inflammatoires a été impliqué dans la survenue de ces mutations du gène *TP53* (421). L'hypothèse de modifications post-traductionnelles de la protéine p53 devra également être envisagée. En effet, celles-ci contribuent à moduler la stabilité et l'activité de la protéine. Elles sont également susceptibles d'altérer la fonction de p53, en modifiant sélectivement la transcription de certains de ses gènes cibles.

# **Chapitre IV :**

## **Conclusion et perspectives**

Au total, ce travail de thèse a permis, grâce à une approche multi-technique basée sur l'étude physiopathologique de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'asthme, (i) de préciser l'intérêt de la mesure du NO exhalé chez l'asthmatique contrôlé, (ii) de déterminer la faisabilité du micro-scanner pour imager *in vivo* le remodelage bronchique grâce à la mesure non invasive de la densité péri-bronchique normalisée, et (iii) d'analyser les rôles respectifs de la chitinase YKL-40 et de la protéine p53 dans la genèse du remodelage musculaire lisse.

Ainsi, l'évaluation non invasive de l'inflammation bronchique par la mesure du NO exhalé démontre qu'un pourcentage non négligeable de patients dont l'asthme est contrôlé sur le plan clinique ont un risque de dégradation du contrôle de leur maladie dans les semaines à venir quand la valeur de NO exhalé est au-dessus d'un seuil de 31 ppb pour l'EndoNO et de 40 ppb pour le NIOX MINO<sup>®</sup>. Or, les recommandations internationales actuelles préconisent une diminution de la charge thérapeutique si l'asthme est contrôlé sur le plan clinique et fonctionnel respiratoire, indépendamment de la valeur du NO exhalé (146). Il est donc important de valider l'utilisation de ces seuils de NO exhalé dans les modalités de prise en charge du patient asthmatique. C'est dans cette optique, que doit être déposé prochainement un Projet Hospitalier de Recherche Clinique National afin de tester, chez des asthmatiques contrôlés d'après des paramètres cliniques et fonctionnels respiratoires, différentes modalités de traitement selon la valeur du NO exhalé. Ainsi, en utilisant les seuils précédemment définis, pour un NO inférieur au seuil, les patients seront randomisés entre un traitement inchangé ou diminué, alors que pour un NO exhalé supérieur au seuil, les patients seront randomisés entre un traitement inchangé ou augmenté. Le critère de jugement principal sera l'évaluation du contrôle de l'asthme selon chaque stratégie thérapeutique basée sur la valeur du NO exhalé.

Autre approche non invasive, le micro-scanner permet, *in vivo*, une analyse globale et tridimensionnelle de l'arbre bronchique chez la souris sensibilisée et révèle l'intérêt de la

mesure de la densité péri-bronchique pour évaluer et distinguer le remodelage de l'inflammation bronchique. L'utilisation de cet index non invasif pourrait ainsi avoir un intérêt potentiel dans l'évaluation de l'efficacité de nouveaux traitements ciblant le remodelage bronchique lors d'études longitudinales pré-cliniques chez la souris. Par ailleurs, ce concept de densité péri-bronchique pourrait être appliqué à l'étude du remodelage bronchique chez l'homme. En ce sens, une étude clinique a débuté pour évaluer la pertinence de la mesure de la densité péri-bronchique par TDM de haute-résolution chez le patient asthmatique, couplée à une mesure de la fonction ventilatoire et à une analyse histologique de l'inflammation et du remodelage bronchique. Ce concept de densité péri-bronchique bronchique, reflet des processus de remodelage bronchique, pourrait également être transposé à l'étude de l'angiogenèse, une caractéristique du remodelage bronchique encore mal définie à l'heure actuelle.

*In vitro*, les travaux exposés dans cette thèse ont également permis de mieux préciser certains des mécanismes à l'origine du remodelage musculaire lisse bronchique dans l'asthme. Ainsi, il a été démontré que le muscle lisse bronchique était une cible de la chitinase YKL-40, qui, en induisant une prolifération, une hypertrophie et une migration des CML, concourt au remodelage bronchique dans l'asthme. Les voies de transduction à l'origine de cet effet sont susceptibles d'impliquer, au moins en partie, le PAR2. Néanmoins, l'effet d'inhibiteurs d'autres voies de signalisation, telle que des voies MAP Kinase, PI3K, AKT, PKC, GSK3 $\beta$  ou mTOR, devront être envisagées. De plus, les mécanismes à l'origine d'une augmentation plus importante de l'hypertrophie et de la migration induite par YKL-40 dans les CML d'asthmatiques devront être précisés. Par ailleurs, une activation de la biogenèse mitochondriale étant impliquée dans l'excès de prolifération musculaire lisse chez l'asthmatique, il serait intéressant d'étudier les effets d'YKL-40 sur l'expression de PGC1- $\alpha$  et des facteurs de transcription NRF1 et mtTFA, ainsi que sur la masse mitochondriale estimée



par la quantification de la porine ou des complexes de la chaîne respiratoire. En outre, l'inhibition d'YKL-40 pourrait s'avérer une stratégie thérapeutique prometteuse et bénéfique, non seulement dans l'asthme, mais aussi dans d'autres maladies inflammatoires. Une telle approche a en effet déjà été testée *in vitro* dans des cellules de cancer du sein et de cancer colique, grâce à la transfection des cellules par un siRNA, et résulte en une suppression de l'angiogenèse tumorale (422). Une stratégie d'interférence ARN lentivirale sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques dans un modèle de co-culture avec des CML bronchiques humaines d'asthmatiques pourrait ainsi être envisagée, pour inhiber, de façon stable la production d'YKL-40 par les cellules épithéliales. Par conséquent, une telle approche devrait permettre de mieux définir l'implication d'YKL-40 dans la pathogénie du remodelage musculaire lisse. Enfin, l'effet d'autres chitinases, telles que l'AMCase et la chitotriosidase, dont il existe des sources commerciales recombinantes, pourra être évalué sur la CML bronchique.

Enfin, une surexpression d'origine post-transcriptionnelle de la protéine p53 dans le muscle lisse bronchique de l'asthmatique a été démontrée, celle-ci ne semblant pas fonctionnelle dans le muscle lisse de l'asthmatique, comme en témoignent l'hyperprolifération cellulaire et le défaut d'apoptose retrouvés *in vitro* chez l'asthmatique. Un rôle inhibiteur original de p53 a, de plus, été démontré sur la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse des témoins et des BPCO, ce rôle faisant en revanche défaut chez l'asthmatique. Par ailleurs, dans les CML d'asthmatiques, p53 ne transréprime pas Bcl-2, protéine anti-apoptotique, ce qui pourrait contribuer à expliquer le défaut d'apoptose observé dans ce type cellulaire, par modification de la balance protéines pro-apoptotiques/anti-apoptotiques. Les mécanismes à l'origine de ce défaut de fonction devront toutefois être précisés. Ainsi, dans un 1<sup>er</sup> temps, l'hypothèse de polymorphismes et de mutations somatiques de p53 sera vérifiée par pyroséquençage et séquençage de l'ADN génomique issu de CML d'asthmatiques cultivées *in vitro*. Dans un 2<sup>nd</sup>

temps, le séquençage de l'ADN génomique de p53 issu de muqueuses bronchiques microdisséquées de patients asthmatiques et de sujets témoins devrait permettre de vérifier *ex vivo* si les éventuelles mutations observées ne sont pas induites par la culture cellulaire, d'une part, et, d'autre part, de préciser leur spécificité tissulaire, cette technique permettant en effet l'analyse d'autres types cellulaires. L'hypothèse de modifications post-traductionnelles de la protéine p53 sera également vérifiée par spectrométrie de masse (423). Enfin, dans l'optique de déterminer de façon plus exhaustive les gènes transactivés ou transréprimés par p53, une analyse combinant l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et le séquençage à haut débit devrait permettre de cartographier à l'échelle du génome les sites d'interaction entre l'ADN et la protéine p53 dans la CML (424). Un contact a été pris en ce sens avec la plateforme de transcriptomique et génomique du Centre de Génomique Fonctionnelle de l'Université Bordeaux Segalen.

# **Chapitre V :**

## **Références bibliographiques**

1. Pearce, N., N. Ait-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell, and C. Robertson. 2007. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62:758-766.
2. Kaminska, M., S. Foley, K. Maghni, C. Storness-Bliss, H. Coxson, H. Ghezzi, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, Q. Hamid, and J. Martin. 2009. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 124:45-51 e41-44.
3. Pepe, C., S. Foley, J. Shannon, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, M.S. Ludwig, J.G. Martin, and Q. Hamid. 2005. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:544-549.
4. Hirst, S.J., and T.H. Lee. 1998. Airway smooth muscle as a target of glucocorticoid action in the treatment of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158:S201-206.
5. Bara, I., A. Ozier, J.M. Tunon de Lara, R. Marthan, and P. Berger. 2010. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma *Eur Respir J* 36:1-11; in press.
6. Haldar, P., I.D. Pavord, D.E. Shaw, M.A. Berry, M. Thomas, C.E. Brightling, A.J. Wardlaw, and R.H. Green. 2008. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 178:218-224.
7. Bradding, P., and R.H. Green. 2010. Subclinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10:54-59.
8. Anderson, S.D. 2010. Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 138:25S-30S.
9. Crapo, R.O., R. Casaburi, A.L. Coates, P.L. Enright, J.L. Hankinson, C.G. Irvin, N.R. MacIntyre, R.T. McKay, J.S. Wanger, S.D. Anderson, D.W. Cockcroft, J.E. Fish, and P.J. Sterk. 2000. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 161:309-329.
10. Postma, D.S., and H.A. Kerstjens. 1998. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158:S187-192.
11. Carbone, R., F. Luppi, A. Monselise, and G. Bottino. 2005. Bronchial hyperresponsiveness in asthmatic adults--a long-term correlation study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 9:125-131.
12. Altounyan, R.E. 1964. Variation of Drug Action on Airway Obstruction in Man. *Thorax* 19:406-415.
13. Homer, R.J., and J.A. Elias. 2000. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med* 21:331-343, ix.
14. Cockcroft, D.W., R.E. Ruffin, J. Dolovich, and F.E. Hargreave. 1977. Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy* 7:503-513.
15. Kariyawasam, H.H., M. Aizen, J. Barkans, D.S. Robinson, and A.B. Kay. 2007. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 175:896-904.
16. Gauvreau, G.M., R.M. Watson, and P.M. O'Byrne. 1999. Kinetics of allergen-induced airway eosinophilic cytokine production and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160:640-647.
17. Pin, I., A.P. Freitag, P.M. O'Byrne, A. Girgis-Gabardo, R.M. Watson, J. Dolovich, J.A. Denburg, and F.E. Hargreave. 1992. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 145:1265-1269.
18. De Monchy, J.G., H.F. Kauffman, P. Venge, G.H. Koeter, H.M. Jansen, H.J. Sluiter, and K. De Vries. 1985. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 131:373-376.
19. Gauvreau, G.M., L.P. Boulet, D.S. Postma, T. Kawayama, R.M. Watson, M. Duong, F. Deschesnes, J.G. De Monchy, and P.M. O'Byrne. 2005. Effect of low-dose ciclesonide on allergen-induced responses in subjects with mild allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:285-291.
20. Gauvreau, G.M., A.B. Becker, L.P. Boulet, J. Chakir, R.B. Fick, W.L. Greene, K.J. Killian, M. O'Byrne P, J.K. Reid, and D.W. Cockcroft. 2003. The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112:331-338.
21. Borish, L.C., H.S. Nelson, J. Corren, G. Bensch, W.W. Busse, J.B. Whitmore, and J.M. Agosti. 2001. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107:963-970.
22. Leckie, M.J., A. ten Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B.J. O'Connor, C.M. Walls, A.K. Mathur, H.C. Cowley, K.F. Chung, R. Djukanovic, T.T. Hansel, S.T. Holgate, P.J. Sterk, and P.J. Barnes. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-2148.

23. Hammad, H., and B.N. Lambrecht. 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 118:331-336.
24. Ramos-Barbon, D., R. Fraga-Iriso, N.S. Brienza, C. Montero-Martinez, H. Vereza-Hernando, R. Olivenstein, C. Lemiere, P. Ernst, Q.A. Hamid, and J.G. Martin. 2010. T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 182:317-324.
25. Begueret, H., P. Berger, J.M. Vernejoux, L. Dubuisson, R. Marthan, and J.M. Tunon-de-Lara. 2007. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 62:8-15.
26. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
27. Romagnani, S. 1992. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* 13:379-381.
28. Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls. 2010. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* 72:495-516.
29. Kim, C.H., L. Rott, E.J. Kunkel, M.C. Genovese, D.P. Andrew, L. Wu, and E.C. Butcher. 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 108:1331-1339.
30. Shirakawa, T., T. Enomoto, S. Shimazu, and J.M. Hopkin. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275:77-79.
31. Oro, A.S., T.J. Guarino, R. Driver, L. Steinman, and D.T. Umetsu. 1996. Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 97:1402-1408.
32. Tang, L., S. Benjaponpitak, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 1998. Reduced prevalence of allergic disease in patients with multiple sclerosis is associated with enhanced IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol* 102:428-435.
33. El Biase, M., S. Boniface, V. Koscher, E. Mamessier, P. Dupuy, F. Milhe, M. Ramadour, D. Vervloet, and A. Magnan. 2003. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 58:844-853.
34. Magnan, A.O., L.G. Mely, C.A. Camilla, M.M. Badier, F.A. Montero-Julian, C.M. Guillot, B.B. Casano, S.J. Prato, V. Fert, P. Bongrand, and D. Vervloet. 2000. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1790-1796.
35. Boniface, S., V. Koscher, E. Mamessier, M. El Biase, P. Dupuy, A.M. Lorec, C. Guillot, M. Badier, P. Bongrand, D. Vervloet, and A. Magnan. 2003. Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study. *Clin Exp Allergy* 33:1238-1243.
36. Seroojy, C.M., and J.E. Gern. 2005. The role of T regulatory cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:996-999.
37. Akbari, O., J.L. Faul, E.G. Hoyte, G.J. Berry, J. Wahlstrom, M. Kronenberg, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2006. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 354:1117-1129.
38. Vijayanand, P., G. Seumois, C. Pickard, R.M. Powell, G. Angco, D. Sammut, S.D. Gadola, P.S. Friedmann, and R. Djukanovic. 2007. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 356:1410-1422.
39. Ling, E.M., T. Smith, X.D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V.A. Carr, and D.S. Robinson. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608-615.
40. Provoost, S., T. Maes, Y.M. van Durme, P. Gevaert, C. Bachert, C.B. Schmidt-Weber, G.G. Brusselle, G.F. Joos, and K.G. Tournoy. 2009. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy* 64:1539-1546.
41. Hartl, D., B. Koller, A.T. Mehlhorn, D. Reinhardt, T. Nicolai, D.J. Schendel, M. Griese, and S. Krauss-Etschmann. 2007. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119:1258-1266.
42. Karagiannidis, C., M. Akdis, P. Holopainen, N.J. Woolley, G. Hense, B. Ruckert, P.Y. Mantel, G. Menz, C.A. Akdis, K. Blaser, and C.B. Schmidt-Weber. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:1425-1433.
43. Huang, X., J. Zhu, and Y. Yang. 2005. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4+ CD25+ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 175:4283-4291.

44. Pene, J., S. Chevalier, L. Preisser, E. Venereau, M.H. Guilleux, S. Ghannam, J.P. Moles, Y. Danger, E. Ravon, S. Lesaux, H. Yssel, and H. Gascan. 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 180:7423-7430.
45. Berger, P., P.O. Girodet, and J. Manuel Tunon-de-Lara. 2005. Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma? *Allergy* 60:1238-1240.
46. Brightling, C.E., D. Kaur, P. Berger, A.J. Morgan, A.J. Wardlaw, and P. Bradding. 2005. Differential expression of CCR3 and CXCR3 by human lung and bone marrow-derived mast cells: implications for tissue mast cell migration. *J Leukoc Biol* 77:759-766.
47. Brightling, C.E., A.J. Ammit, D. Kaur, J.L. Black, A.J. Wardlaw, J.M. Hughes, and P. Bradding. 2005. The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1103-1108.
48. El-Shazly, A., P. Berger, P.O. Girodet, O. Ousova, M. Fayon, J.M. Vernejoux, R. Marthan, and J.M. Tunon-de-Lara. 2006. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176:1860-1868.
49. Berger, P., P.O. Girodet, H. Begueret, O. Ousova, D.W. Perng, R. Marthan, A.F. Walls, and J.M. Tunon de Lara. 2003. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J* 17:2139-2141.
50. Carroll, N.G., S. Mutavdzic, and A.L. James. 2002. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 57:677-682.
51. Okumura, S., H. Sagara, T. Fukuda, H. Saito, and Y. Okayama. 2005. FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 115:272-279.
52. Irani, A.A., N.M. Schechter, S.S. Craig, G. DeBlois, and L.B. Schwartz. 1986. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4464-4468.
53. Balzar, S., M.L. Fajt, S.A. Comhair, S.C. Erzurum, E. Bleecker, W.W. Busse, M. Castro, B. Gaston, E. Israel, L.B. Schwartz, D. Curran-Everett, C.G. Moore, and S.E. Wenzel. 2010. Mast Cell Phenotype, Location and Activation in Severe Asthma. Data from The Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*
54. Glenner, G.G., and L.A. Cohen. 1960. Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. *Nature* 185:846-847.
55. Wenzel, S.E., A.A. Fowler, 3rd, and L.B. Schwartz. 1988. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 137:1002-1008.
56. Sekizawa, K., G.H. Caughey, S.C. Lazarus, W.M. Gold, and J.A. Nadel. 1989. Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest* 83:175-179.
57. Berger, P., S.J. Compton, M. Molimard, A.F. Walls, C. N'Guyen, R. Marthan, and J.M. Tunon-De-Lara. 1999. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 29:804-812.
58. Berger, P., J.M. Tunon-De-Lara, J.P. Savineau, and R. Marthan. 2001. Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91:995-1003.
59. Tam, E.K., and G.H. Caughey. 1990. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3:27-32.
60. Molinari, J.F., M. Scuri, W.R. Moore, J. Clark, R. Tanaka, and W.M. Abraham. 1996. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *Am J Respir Crit Care Med* 154:649-653.
61. Clark, J.M., W.M. Abraham, C.E. Fishman, R. Forteza, A. Ahmed, A. Cortes, R.L. Warne, W.R. Moore, and R.D. Tanaka. 1995. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 152:2076-2083.
62. He, S., and A.F. Walls. 1997. Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 328:89-97.
63. Cairns, J.A., and A.F. Walls. 1996. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol* 156:275-283.
64. Compton, S.J., J.A. Cairns, S.T. Holgate, and A.F. Walls. 1998. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 161:1939-1946.
65. Berger, P., D.W. Perng, H. Thabrew, S.J. Compton, J.A. Cairns, A.R. McEuen, R. Marthan, J.M. Tunon De Lara, and A.F. Walls. 2001. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91:1372-1379.

66. Akers, I.A., M. Parsons, M.R. Hill, M.D. Hollenberg, S. Sanjar, G.J. Laurent, and R.J. McAnulty. 2000. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L193-201.
67. Gruber, B.L., R.R. Kew, A. Jelaska, M.J. Marchese, J. Garlick, S. Ren, L.B. Schwartz, and J.H. Korn. 1997. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol* 158:2310-2317.
68. Bousquet, J., P. Chané, J.Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard, and et al. 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 323:1033-1039.
69. Pang, L., M. Nie, L. Corbett, A. Sutcliffe, and A.J. Knox. 2006. Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities. *J Immunol* 176:3788-3795.
70. Enokihara, H., T. Koike, Y. Nakamura, K. Yamashiro, N. Tsuruoka, K. Saito, and S. Furusawa. 1996. Eosinophils negatively regulate eosinophilopoiesis by decreasing IL-5 levels. *Int Arch Allergy Immunol* 111 Suppl 1:2-4.
71. Tomaki, M., L.L. Zhao, J. Lundahl, M. Sjostrand, M. Jordana, A. Linden, P. O'Byrne, and J. Lotvall. 2000. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. *J Immunol* 165:4040-4050.
72. Martin, L.B., H. Kita, K.M. Leiferman, and G.J. Gleich. 1996. Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 109:207-215.
73. Takafuji, S., T. Ohtoshi, H. Takizawa, K. Tadokoro, and K. Ito. 1996. Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells. Effect of cytokines and role of adhesion. *J Immunol* 156:3980-3985.
74. Jatakanon, A., C. Uasuf, W. Maziak, S. Lim, K.F. Chung, and P.J. Barnes. 1999. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1532-1539.
75. Sur, S., T.B. Crotty, G.M. Kephart, B.A. Hyma, T.V. Colby, C.E. Reed, L.W. Hunt, and G.J. Gleich. 1993. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 148:713-719.
76. Ordonez, C.L., T.E. Shaughnessy, M.A. Matthay, and J.V. Fahy. 2000. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1185-1190.
77. White, J.R., J.M. Lee, P.R. Young, R.P. Hertzberg, A.J. Jurewicz, M.A. Chaikin, K. Widdowson, J.J. Foley, L.D. Martin, D.E. Griswold, and H.M. Sarau. 1998. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem* 273:10095-10098.
78. Gadek, J.E., G.A. Fells, D.G. Wright, and R.G. Crystal. 1980. Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase". *Biochem Biophys Res Commun* 95:1815-1822.
79. De, S., E.T. Zelazny, J.F. Souhrada, and M. Souhrada. 1995. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 78:1555-1563.
80. Thomas, P.S., D.H. Yates, and P.J. Barnes. 1995. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 152:76-80.
81. Bergeron, C., W. Al-Ramli, and Q. Hamid. 2009. Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6:301-305.
82. Payne, D.N., A.V. Rogers, E. Adelroth, V. Bandi, K.K. Guntupalli, A. Bush, and P.K. Jeffery. 2003. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167:78-82.
83. Barbato, A., G. Turato, S. Baraldo, E. Bazzan, F. Calabrese, C. Panizzolo, M.E. Zanin, R. Zuin, P. Maestrelli, L.M. Fabbri, and M. Saetta. 2006. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174:975-981.
84. Jeffery, P.K., A.J. Wardlaw, F.C. Nelson, J.V. Collins, and A.B. Kay. 1989. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140:1745-1753.
85. Chané, P. 2005. Severe asthma is an epithelial disease. *Eur Respir J* 25:945-946.
86. Benayoun, L., A. Druilhe, M.C. Dombret, M. Aubier, and M. Pretolani. 2003. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1360-1368.
87. Vermeer, P.D., R. Harson, L.A. Einwalter, T. Moninger, and J. Zabner. 2003. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:286-295.

88. Bruno, A., E. Pace, P. Chanez, D. Gras, I. Vachier, G. Chiappara, M. La Guardia, S. Gerbino, M. Profita, and M. Gjomarkaj. 2009. Leptin and leptin receptor expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 124:230-237, 237 e231-234.
89. Vachier, I., C. Bonnans, C. Chavis, M. Farce, P. Godard, J. Bousquet, and P. Chanez. 2005. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol* 115:55-60.
90. Huang, J., R. Olivenstein, R. Taha, Q. Hamid, and M. Ludwig. 1999. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 160:725-729.
91. Laitinen, A., A. Altraja, M. Kampe, M. Linden, I. Virtanen, and L.A. Laitinen. 1997. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med* 156:951-958.
92. Demedts, I.K., G.G. Brusselle, K.R. Bracke, K.Y. Vermaelen, and R.A. Pauwels. 2005. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 5:257-263.
93. Wenzel, S.E., S. Balzar, M. Cundall, and H.W. Chu. 2003. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol* 111:1345-1352.
94. Rogers, D.F. 2004. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol* 4:241-250.
95. Ordonez, C.L., R. Khashayar, H.H. Wong, R. Ferrando, R. Wu, D.M. Hyde, J.A. Hotchkiss, Y. Zhang, A. Novikov, G. Dolganov, and J.V. Fahy. 2001. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 163:517-523.
96. Evans, C.M., and J.S. Koo. 2009. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol Ther* 121:332-348.
97. Dabbagh, K., K. Takeyama, H.M. Lee, I.F. Ueki, J.A. Lausier, and J.A. Nadel. 1999. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 162:6233-6237.
98. Louahed, J., M. Toda, J. Jen, Q. Hamid, J.C. Renaud, R.C. Levitt, and N.C. Nicolaides. 2000. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:649-656.
99. Busse, P.J., T.F. Zhang, K. Srivastava, B.P. Lin, B. Schofield, S.C. Sealfon, and X.M. Li. 2005. Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 116:1256-1263.
100. Chen, Y., P. Thai, Y.H. Zhao, Y.S. Ho, M.M. DeSouza, and R. Wu. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* 278:17036-17043.
101. Vrugt, B., S. Wilson, A. Bron, S.T. Holgate, R. Djukanovic, and R. Aalbers. 2000. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J* 15:1014-1021.
102. Hashimoto, M., H. Tanaka, and S. Abe. 2005. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. *Chest* 127:965-972.
103. Detoraki, A., F. Granata, S. Staibano, F.W. Rossi, G. Marone, and A. Genovese. 2010. Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma. *Allergy* 65:946-958.
104. Hoshino, M., Y. Nakamura, and Q.A. Hamid. 2001. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107:1034-1038.
105. Hoshino, M., M. Takahashi, and N. Aoike. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 107:295-301.
106. Lee, Y.C., Y.G. Kwak, and C.H. Song. 2002. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol* 168:3595-3600.
107. Lee, C.G., H. Link, P. Baluk, R.J. Homer, S. Chapoval, V. Bhandari, M.J. Kang, L. Cohn, Y.K. Kim, D.M. McDonald, and J.A. Elias. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 10:1095-1103.
108. Ebina, M., T. Takahashi, T. Chiba, and M. Motomiya. 1993. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 148:720-726.
109. Wenzel, S.E., S.J. Szeffler, D.Y. Leung, S.I. Sloan, M.D. Rex, and R.J. Martin. 1997. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156:737-743.
110. Hamid, Q., Y. Song, T.C. Kotsimbos, E. Minshall, T.R. Bai, R.G. Hegele, and J.C. Hogg. 1997. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 100:44-51.



111. Synek, M., J.M. Anto, R. Beasley, A.J. Frew, L. Holloway, F.C. Lampe, J.L. Lloreta, J. Sunyer, A. Thornton, and S.T. Holgate. 1996. Immunopathology of fatal soybean dust-induced asthma. *Eur Respir J* 9:54-57.
112. Stuehr, D.J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217-230.
113. Villanueva, C., and C. Giulivi. 2010. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* 49:307-316.
114. Donnelly, L.E., and P.J. Barnes. 2002. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:144-151.
115. Asano, K., C.B. Chee, B. Gaston, C.M. Lilly, C. Gerard, J.M. Drazen, and J.S. Stamler. 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10089-10093.
116. Barnes, P.J., R.A. Dweik, A.F. Gelb, P.G. Gibson, S.C. George, H. Grasemann, I.D. Pavord, F. Ratjen, P.E. Silkoff, D.R. Taylor, and N. Zamel. 2010. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest* 138:682-692.
117. Guo, F.H., S.A. Comhair, S. Zheng, R.A. Dweik, N.T. Eissa, M.J. Thomassen, W. Calhoun, and S.C. Erzurum. 2000. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 164:5970-5980.
118. Dweik, R.A., D. Laskowski, H.M. Abu-Soud, F. Kaneko, R. Hutte, D.J. Stuehr, and S.C. Erzurum. 1998. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest* 101:660-666.
119. Tsoukias, N.M., and S.C. George. 1998. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 85:653-666.
120. George, S.C., M. Hogman, S. Permutt, and P.E. Silkoff. 2004. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol* 96:831-839.
121. Kerckx, Y., A. Michils, and A. Van Muylem. 2008. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *J Appl Physiol* 104:918-924.
122. Condorelli, P., H.W. Shin, A.S. Aledia, P.E. Silkoff, and S.C. George. 2007. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol* 102:417-425.
123. Mahut, B., B. Louis, and C. Delclaux. 2006. [Measurement of exhaled nitric oxide: methodology]. *Rev Mal Respir* 23:6S29-26S36.
124. 2005. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 171:912-930.
125. Strunk, R.C., S.J. Szeffler, B.R. Phillips, R.S. Zeiger, V.M. Chinchilli, G. Larsen, K. Hodgson, W. Morgan, C.A. Sorkness, and R.F. Lemanske, Jr. 2003. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 112:883-892.
126. Jatakanon, A., S. Lim, S.A. Kharitonov, K.F. Chung, and P.J. Barnes. 1998. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 53:91-95.
127. Berlyne, G.S., K. Parameswaran, D. Kamada, A. Efthimiadis, and F.E. Hargreave. 2000. A comparison of exhaled nitric oxide and induced sputum as markers of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 106:638-644.
128. Warke, T.J., P.S. Fitch, V. Brown, R. Taylor, J.D. Lyons, M. Ennis, and M.D. Shields. 2002. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 57:383-387.
129. Payne, D.N., I.M. Adcock, N.M. Wilson, T. Oates, M. Scallan, and A. Bush. 2001. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1376-1381.
130. van den Toorn, L.M., S.E. Overbeek, J.C. de Jongste, K. Leman, H.C. Hoogsteden, and J.B. Prins. 2001. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164:2107-2113.
131. Silkoff, P.E., P.A. McClean, A.S. Slutsky, M. Caramori, K.R. Chapman, C. Gutierrez, and N. Zamel. 1998. Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after inhaled beclomethasone in mild asthma. *J Asthma* 35:473-479.
132. Kharitonov, S.A., D.H. Yates, K.F. Chung, and P.J. Barnes. 1996. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 9:196-201.
133. van den Berge, M., H.A. Kerstjens, R.J. Meijer, D.M. de Reus, G.H. Koeter, H.F. Kauffman, and D.S. Postma. 2001. Corticosteroid-induced improvement in the PC20 of adenosine monophosphate is more closely associated with reduction in airway inflammation than improvement in the PC20 of methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1127-1132.

134. Jones, S.L., J. Kittelson, J.O. Cowan, E.M. Flannery, R.J. Hancox, C.R. McLachlan, and D.R. Taylor. 2001. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 164:738-743.
135. Leuppi, J.D., C.M. Salome, C.R. Jenkins, S.D. Anderson, W. Xuan, G.B. Marks, H. Koskela, J.D. Brannan, R. Freed, M. Andersson, H.K. Chan, and A.J. Woolcock. 2001. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 163:406-412.
136. Beck-Ripp, J., M. Griese, S. Arenz, C. Koring, B. Pasqualoni, and P. Bufler. 2002. Changes of exhaled nitric oxide during steroid treatment of childhood asthma. *Eur Respir J* 19:1015-1019.
137. Katsara, M., D. Donnelly, S. Iqbal, T. Elliott, and M.L. Everard. 2006. Relationship between exhaled nitric oxide levels and compliance with inhaled corticosteroids in asthmatic children. *Respir Med* 100:1512-1517.
138. Kharitonov, S.A., L.E. Donnelly, P. Montuschi, M. Corradi, J.V. Collins, and P.J. Barnes. 2002. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax* 57:889-896.
139. Silkoff, P.E., P. McClean, M. Spino, L. Erlich, A.S. Slutsky, and N. Zamel. 2001. Dose-response relationship and reproducibility of the fall in exhaled nitric oxide after inhaled beclomethasone dipropionate therapy in asthma patients. *Chest* 119:1322-1328.
140. Zacharasiewicz, A., N. Wilson, C. Lex, E.M. Erin, A.M. Li, T. Hansel, M. Khan, and A. Bush. 2005. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1077-1082.
141. Pijnenburg, M.W., E.M. Bakker, W.C. Hop, and J.C. De Jongste. 2005. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 172:831-836.
142. Smith, A.D., J.O. Cowan, K.P. Brassett, G.P. Herbison, and D.R. Taylor. 2005. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 352:2163-2173.
143. Shaw, D.E., M.A. Berry, M. Thomas, R.H. Green, C.E. Brightling, A.J. Wardlaw, and I.D. Pavord. 2007. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 176:231-237.
144. Szeffler, S.J., H. Mitchell, C.A. Sorkness, P.J. Gergen, G.T. O'Connor, W.J. Morgan, M. Kattan, J.A. Pongratic, S.J. Teach, G.R. Bloomberg, P.A. Eggleston, R.S. Gruchalla, C.M. Kerckmar, A.H. Liu, J.J. Wildfire, M.D. Curry, and W.W. Busse. 2008. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet* 372:1065-1072.
145. de Jongste, J.C., S. Carraro, W.C. Hop, and E. Baraldi. 2009. Daily telemonitoring of exhaled nitric oxide and symptoms in the treatment of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 179:93-97.
146. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. 2008 [Accessed June 2008]. Available from: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com).
147. Michils, A., S. Baldassarre, and A. Van Muylem. 2008. Exhaled nitric oxide and asthma control: a longitudinal study in unselected patients. *Eur Respir J* 31:539-546.
148. Pijnenburg, M.W., W. Hofhuis, W.C. Hop, and J.C. De Jongste. 2005. Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical asthma remission. *Thorax* 60:215-218.
149. Piacentini, G.L., D.G. Peroni, A. Bodini, E. Bonafiglia, E. Rigotti, E. Baraldi, A.H. Liu, and A.L. Boner. 2009. Childhood Asthma Control Test and airway inflammation evaluation in asthmatic children. *Allergy* 64:1753-1757.
150. Mahut, B., L. Trinquart, M. Le Bourgeois, M.H. Becquemin, N. Beydon, F. Aubourg, M. Jala, B. Bidaud-Chevalier, A.T. Dinh-Xuan, O. Randrianarivelo, A. Denjean, J. de Blic, and C. Delclaux. 2010. Multicentre trial evaluating alveolar NO fraction as a marker of asthma control and severity. *Allergy* 65:636-644.
151. Little, S.A., G.W. Chalmers, K.J. MacLeod, C. McSharry, and N.C. Thomson. 2000. Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax* 55:232-234.
152. Perez de Llano, L.A., F.C. Gonzalez, O.C. Anon, M.P. Perea, R.G. Gomez, A.B. Villar, M.V. Caruncho, and M. Boquete Paris. 2009. Exhaled nitric oxide predicts control in patients with difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J*
153. Szeffler, S.J., B.R. Phillips, F.D. Martinez, V.M. Chinchilli, R.F. Lemanske, R.C. Strunk, R.S. Zeiger, G. Larsen, J.D. Spahn, L.B. Bacharier, G.R. Bloomberg, T.W. Guilbert, G. Heldt, W.J. Morgan, M.H. Moss, C.A. Sorkness, and L.M. Taussig. 2005. Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 115:233-242.

154. Zeiger, R.S., S.J. Szeffler, B.R. Phillips, M. Schatz, F.D. Martinez, V.M. Chinchilli, R.F. Lemanske, Jr., R.C. Strunk, G. Larsen, J.D. Spahn, L.B. Bacharier, G.R. Bloomberg, T.W. Guilbert, G. Heldt, W.J. Morgan, M.H. Moss, C.A. Sorkness, and L.M. Taussig. 2006. Response profiles to fluticasone and montelukast in mild-to-moderate persistent childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117:45-52.
155. King, G.G., N.L. Muller, and P.D. Pare. 1999. Evaluation of airways in obstructive pulmonary disease using high-resolution computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 159:992-1004.
156. Hounsfield, G.N. 1980. Computed medical imaging. Nobel lecture, Decemberr 8, 1979. *J Comput Assist Tomogr* 4:665-674.
157. McNamara, A.E., N.L. Muller, M. Okazawa, J. Arntorp, B.R. Wiggs, and P.D. Pare. 1992. Airway narrowing in excised canine lungs measured by high-resolution computed tomography. *J Appl Physiol* 73:307-316.
158. Boulet, L., M. Belanger, and G. Carrier. 1995. Airway responsiveness and bronchial-wall thickness in asthma with or without fixed airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 152:865-871.
159. de Jong, P.A., N.L. Muller, P.D. Pare, and H.O. Coxson. 2005. Computed tomographic imaging of the airways: relationship to structure and function. *Eur Respir J* 26:140-152.
160. Nakano, Y., N.L. Muller, G.G. King, A. Niimi, S.E. Kalloger, M. Mishima, and P.D. Pare. 2002. Quantitative assessment of airway remodeling using high-resolution CT. *Chest* 122:271S-275S.
161. Hasegawa, M., Y. Nasuhara, Y. Onodera, H. Makita, K. Nagai, S. Fuke, Y. Ito, T. Betsuyaku, and M. Nishimura. 2006. Airflow limitation and airway dimensions in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1309-1315.
162. Nakano, Y., S. Muro, H. Sakai, T. Hirai, K. Chin, M. Tsukino, K. Nishimura, H. Itoh, P.D. Pare, J.C. Hogg, and M. Mishima. 2000. Computed tomographic measurements of airway dimensions and emphysema in smokers. Correlation with lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1102-1108.
163. Berger, P., V. Perot, P. Desbarats, J.M. Tunon-de-Lara, R. Marthan, and F. Laurent. 2005. Airway wall thickness in cigarette smokers: quantitative thin-section CT assessment. *Radiology* 235:1055-1064.
164. Montaudon, M., P. Berger, G. de Dietrich, A. Braquelaire, R. Marthan, J.M. Tunon-de-Lara, and F. Laurent. 2007. Assessment of airways with three-dimensional quantitative thin-section CT: in vitro and in vivo validation. *Radiology* 242:563-572.
165. Niimi, A., H. Matsumoto, R. Amitani, Y. Nakano, M. Mishima, M. Minakuchi, K. Nishimura, H. Itoh, and T. Izumi. 2000. Airway wall thickness in asthma assessed by computed tomography. Relation to clinical indices. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1518-1523.
166. Niimi, A., H. Matsumoto, M. Takemura, T. Ueda, K. Chin, and M. Mishima. 2003. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 168:983-988.
167. Matsumoto, H., A. Niimi, M. Takemura, T. Ueda, M. Minakuchi, R. Tabuena, K. Chin, T. Mio, Y. Ito, S. Muro, T. Hirai, S. Morita, S. Fukuhara, and M. Mishima. 2005. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax* 60:277-281.
168. Gupta, S., S. Siddiqui, P. Haldar, J.J. Entwisle, D. Mawby, A.J. Wardlaw, P. Bradding, I.D. Pavord, R.H. Green, and C.E. Brightling. 2010. Quantitative analysis of high-resolution computed tomography scans in severe asthma subphenotypes. *Thorax* 65:775-781.
169. Kasahara, K., K. Shiba, T. Ozawa, K. Okuda, and M. Adachi. 2002. Correlation between the bronchial subepithelial layer and whole airway wall thickness in patients with asthma. *Thorax* 57:242-246.
170. Little, S.A., M.W. Sproule, M.D. Cowan, K.J. Macleod, M. Robertson, J.G. Love, G.W. Chalmers, C.P. McSharry, and N.C. Thomson. 2002. High resolution computed tomographic assessment of airway wall thickness in chronic asthma: reproducibility and relationship with lung function and severity. *Thorax* 57:247-253.
171. Aysola, R.S., E.A. Hoffman, D. Gierada, S. Wenzel, J. Cook-Granroth, J. Tarsi, J. Zheng, K.B. Schechtman, T.P. Ramkumar, R. Cochran, E. Xueping, C. Christie, J. Newell, S. Fain, T.A. Altes, and M. Castro. 2008. Airway remodeling measured by multidetector CT is increased in severe asthma and correlates with pathology. *Chest* 134:1183-1191.
172. Montaudon, M., M. Lederlin, S. Reich, H. Begueret, J.M. Tunon-de-Lara, R. Marthan, P. Berger, and F. Laurent. 2009. Bronchial measurements in patients with asthma: comparison of quantitative thin-section CT findings with those in healthy subjects and correlation with pathologic findings. *Radiology* 253:844-853.
173. Tillie-Leblond, I., R. Louis, A. Magnan, M. Humbert, J. de Blic, and P. Chanez. 2009. [Asthma: a disease of the whole bronchial tree]. *Rev Mal Respir* 26:851-858.
174. McLean, A.N., M.W. Sproule, M.D. Cowan, and N.C. Thomson. 1998. High resolution computed tomography in asthma. *Thorax* 53:308-314.

175. Lee, Y.M., J.S. Park, J.H. Hwang, S.W. Park, S.T. Uh, Y.H. Kim, and C.S. Park. 2004. High-resolution CT findings in patients with near-fatal asthma: comparison of patients with mild-to-severe asthma and normal control subjects and changes in airway abnormalities following steroid treatment. *Chest* 126:1840-1848.
176. Paganin, F., V. Trussard, E. Seneterre, P. Chanez, J. Giron, P. Godard, J.P. Senac, F.B. Michel, and J. Bousquet. 1992. Chest radiography and high resolution computed tomography of the lungs in asthma. *Am Rev Respir Dis* 146:1084-1087.
177. Austin, J.H., N.L. Muller, P.J. Friedman, D.M. Hansell, D.P. Naidich, M. Remy-Jardin, W.R. Webb, and E.A. Zerhouni. 1996. Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the Nomenclature Committee of the Fleischner Society. *Radiology* 200:327-331.
178. Stern, E.J., and W.R. Webb. 1993. Dynamic imaging of lung morphology with ultrafast high-resolution computed tomography. *J Thorac Imaging* 8:273-282.
179. Grenier, P., I. Mourey-Gerosa, K. Benali, M.W. Brauner, A.N. Leung, S. Lenoir, M.P. Cordeau, and B. Mazoyer. 1996. Abnormalities of the airways and lung parenchyma in asthmatics: CT observations in 50 patients and inter- and intraobserver variability. *Eur Radiol* 6:199-206.
180. Lynch, D.A., J.D. Newell, B.A. Tschomper, T.M. Cink, L.S. Newman, and R. Bethel. 1993. Uncomplicated asthma in adults: comparison of CT appearance of the lungs in asthmatic and healthy subjects. *Radiology* 188:829-833.
181. Paganin, F., E. Seneterre, P. Chanez, J.P. Daures, J.M. Bruel, F.B. Michel, and J. Bousquet. 1996. Computed tomography of the lungs in asthma: influence of disease severity and etiology. *Am J Respir Crit Care Med* 153:110-114.
182. Lee, K.W., S.Y. Chung, I. Yang, Y. Lee, E.Y. Ko, and M.J. Park. 2000. Correlation of aging and smoking with air trapping at thin-section CT of the lung in asymptomatic subjects. *Radiology* 214:831-836.
183. Laurent, F., and M. Tunon De Lara. 2009. [Assessment of imaging techniques in the evaluation of small airways disease in asthma]. *Rev Mal Respir* 26:407-411; quiz 479, 483.
184. Kalender, W.A., H. Fichte, W. Bautz, and M. Skalej. 1991. Semiautomatic evaluation procedures for quantitative CT of the lung. *J Comput Assist Tomogr* 15:248-255.
185. Beigelman-Aubry, C., A. Capderou, P.A. Grenier, C. Straus, M.H. Becquemin, T. Similowski, and M. Zelter. 2002. Mild intermittent asthma: CT assessment of bronchial cross-sectional area and lung attenuation at controlled lung volume. *Radiology* 223:181-187.
186. Goldin, J.G., M.F. McNitt-Gray, S.M. Sorenson, T.D. Johnson, B. Dauphinee, E.C. Kleerup, D.P. Tashkin, and D.R. Aberle. 1998. Airway hyperreactivity: assessment with helical thin-section CT. *Radiology* 208:321-329.
187. Laurent, F., V. Latrabe, C. Raheison, R. Marthan, and J.M. Tunon-de-Lara. 2000. Functional significance of air trapping detected in moderate asthma. *Eur Radiol* 10:1404-1410.
188. Ueda, T., A. Niimi, H. Matsumoto, M. Takemura, T. Hirai, M. Yamaguchi, H. Matsuoka, M. Jinnai, S. Muro, K. Chin, and M. Mishima. 2006. Role of small airways in asthma: investigation using high-resolution computed tomography. *J Allergy Clin Immunol* 118:1019-1025.
189. Mitsunobu, F., K. Ashida, Y. Hosaki, H. Tsugeno, M. Okamoto, N. Nishida, T. Nagata, S. Takata, and Y. Tanizaki. 2003. Decreased computed tomographic lung density during exacerbation of asthma. *Eur Respir J* 22:106-112.
190. Goldin, J.G., D.P. Tashkin, E.C. Kleerup, L.E. Greaser, U.M. Haywood, J.W. Sayre, M.D. Simmons, M. Suttorp, G.L. Colice, J.A. Vanden Burgt, and D.R. Aberle. 1999. Comparative effects of hydrofluoroalkane and chlorofluorocarbon beclomethasone dipropionate inhalation on small airways: assessment with functional helical thin-section computed tomography. *J Allergy Clin Immunol* 104:S258-267.
191. Niimi, A., H. Matsumoto, M. Takemura, T. Ueda, Y. Nakano, and M. Mishima. 2004. Clinical assessment of airway remodeling in asthma: utility of computed tomography. *Clin Rev Allergy Immunol* 27:45-58.
192. Tunon-de-Lara, J.M., F. Laurent, V. Giraud, T. Perez, B. Aguilaniu, H. Meziane, A. Basset-Merle, and P. Chanez. 2007. Air trapping in mild and moderate asthma: effect of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 119:583-590.
193. Zeidler, M.R., E.C. Kleerup, J.G. Goldin, H.J. Kim, D.A. Truong, M.D. Simmons, J.W. Sayre, W. Liu, R. Elashoff, and D.P. Tashkin. 2006. Montelukast improves regional air-trapping due to small airways obstruction in asthma. *Eur Respir J* 27:307-315.
194. Cox, G., N.C. Thomson, A.S. Rubin, R.M. Niven, P.A. Corris, H.C. Siersted, R. Olivenstein, I.D. Pavord, D. McCormack, R. Chaudhuri, J.D. Miller, and M. Laviolette. 2007. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med* 356:1327-1337.

195. Zuyderduyn, S., M.B. Sukkar, A. Fust, S. Dhaliwal, and J.K. Burgess. 2008. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 32:265-274.
196. Solway, J., and C.G. Irvin. 2007. Airway smooth muscle as a target for asthma therapy. *N Engl J Med* 356:1367-1369.
197. Johnson, P.R., M. Roth, M. Tamm, M. Hughes, Q. Ge, G. King, J.K. Burgess, and J.L. Black. 2001. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164:474-477.
198. Bentley, J.K., and M.B. Hershenson. 2008. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc* 5:89-96.
199. Mitzner, W. 2004. Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 169:787-790.
200. Sparrow, M.P., M. Weichselbaum, and P.B. McCray. 1999. Development of the innervation and airway smooth muscle in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:550-560.
201. Rosenthal, M., and A. Bush. 2002. The growing lung: normal development, and the long-term effects of pre- and postnatal insults. *Eur Respir Monograph* 19:1-24.
202. Ebina, M., H. Yaegashi, T. Takahashi, M. Motomiya, and M. Tanemura. 1990. Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am Rev Respir Dis* 141:1322-1326.
203. Savineau, J.P., and R. Marthan. 1997. Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 11:289-299.
204. Hakonarson, H., N. Maskeri, C. Carter, and M.M. Grunstein. 1999. Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest* 103:1077-1087.
205. Elias, J.A., Y. Wu, T. Zheng, and R. Panettieri. 1997. Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines. *Am J Physiol* 273:L648-655.
206. McKay, S., J.C. de Jongste, P.R. Saxena, and H.S. Sharma. 1998. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:823-833.
207. Kassel, O., F. Schmidlin, C. Duvernelle, B. Gasser, G. Massard, and N. Frossard. 1999. Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. *Eur Respir J* 13:951-954.
208. John, M., B.T. Au, P.J. Jose, S. Lim, M. Saunders, P.J. Barnes, J.A. Mitchell, M.G. Belvisi, and K.F. Chung. 1998. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:84-90.
209. Chung, K.F., H.J. Patel, E.J. Fadlon, J. Rousell, E.B. Haddad, P.J. Jose, J. Mitchell, and M. Belvisi. 1999. Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br J Pharmacol* 127:1145-1150.
210. John, M., S.J. Hirst, P.J. Jose, A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C.H. Twort, P.J. Barnes, and K.F. Chung. 1997. Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J Immunol* 158:1841-1847.
211. Lazaar, A.L., S.M. Albelda, J.M. Pilewski, B. Brennan, E. Pure, and R.A. Panettieri, Jr. 1994. T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med* 180:807-816.
212. Hakonarson, H., C. Kim, R. Whelan, D. Campbell, and M.M. Grunstein. 2001. Bi-directional activation between human airway smooth muscle cells and T lymphocytes: role in induction of altered airway responsiveness. *J Immunol* 166:293-303.
213. Amrani, Y., A.L. Lazaar, and R.A. Panettieri, Jr. 1999. Up-regulation of ICAM-1 by cytokines in human tracheal smooth muscle cells involves an NF-kappa B-dependent signaling pathway that is only partially sensitive to dexamethasone. *J Immunol* 163:2128-2134.
214. Lazaar, A.L., Y. Amrani, J. Hsu, R.A. Panettieri, Jr., W.C. Fanslow, S.M. Albelda, and E. Pure. 1998. CD40-mediated signal transduction in human airway smooth muscle. *J Immunol* 161:3120-3127.
215. Sestini, P., L. Armetti, G. Gambaro, M.G. Pieroni, R.M. Refini, A. Sala, A. Vaghi, G.C. Folco, S. Bianco, and M. Robuschi. 1996. Inhaled PGE2 prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:572-575.
216. Hughes, J.M., C.A. Arthur, S. Baracho, S.M. Carlin, K.M. Hawker, P.R. Johnson, and C.L. Armour. 2000. Human eosinophil-airway smooth muscle cell interactions. *Mediators Inflamm* 9:93-99.
217. Hallsworth, M.P., C.P. Soh, C.H. Twort, T.H. Lee, and S.J. Hirst. 1998. Cultured human airway smooth muscle cells stimulated by interleukin-1beta enhance eosinophil survival. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:910-919.

218. Zhu, Y.K., X. Liu, H. Wang, T. Kohyama, F.Q. Wen, C.M. Skold, and S.I. Rennard. 2001. Interactions between monocytes and smooth-muscle cells can lead to extracellular matrix degradation. *J Allergy Clin Immunol* 108:989-996.
219. Yang, W., D. Kaur, Y. Okayama, A. Ito, A.J. Wardlaw, C.E. Brightling, and P. Bradding. 2006. Human lung mast cells adhere to human airway smooth muscle, in part, via tumor suppressor in lung cancer-1. *J Immunol* 176:1238-1243.
220. Girodet, P.O., A. Ozier, T. Trian, H. Begueret, O. Ousova, J.M. Vernejoux, P. Chanez, R. Marthan, P. Berger, and J.M. Tunon de Lara. 2010. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 65:1004-1012.
221. Brightling, C.E., P. Bradding, F.A. Symon, S.T. Holgate, A.J. Wardlaw, and I.D. Pavord. 2002. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346:1699-1705.
222. Hauck, R.W., C. Schulz, A. Schomig, R.K. Hoffman, and R.A. Panettieri, Jr. 1999. alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors. *Am J Physiol* 277:L22-29.
223. Hassan, M., T. Jo, P.A. Risse, B. Tolloczko, C. Lemiere, R. Olivenstein, Q. Hamid, and J.G. Martin. 2010. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125:1037-1045 e1033.
224. Chupp, G.L., C.G. Lee, N. Jarjour, Y.M. Shim, C.T. Holm, S. He, J.D. Dziura, J. Reed, A.J. Coyle, P. Kiener, M. Cullen, M. Grandsaigne, M.C. Dombret, M. Aubier, M. Pretolani, and J.A. Elias. 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 357:2016-2027.
225. Muzzarelli, R.A. 1999. Native, industrial and fossil chitins. *Exs* 87:1-6.
226. Muzzarelli, R.A., M. Mattioli-Belmonte, A. Pugnali, and G. Biagini. 1999. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing. *Exs* 87:251-264.
227. Latge, J.P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66:279-290.
228. Proespraiwong, P., A. Tassanakajon, and V. Rimphanitchayakit. 2010. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 156:86-96.
229. Andersson, M.G., and L. Cerenius. 2002. Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Dis Aquat Organ* 51:139-147.
230. Kramer, K.J., and S. Muthukrishnan. 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol* 27:887-900.
231. Beintema, J.J. 1994. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett* 350:159-163.
232. Funkhouser, J.D., and N.N. Aronson, Jr. 2007. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol* 7:96.
233. Bussink, A.P., D. Speijer, J.M. Aerts, and R.G. Boot. 2007. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* 177:959-970.
234. Fusetti, F., H. von Moeller, D. Houston, H.J. Rozeboom, B.W. Dijkstra, R.G. Boot, J.M. Aerts, and D.M. van Aalten. 2002. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem* 277:25537-25544.
235. Chou, Y.T., S. Yao, R. Czerwinski, M. Fleming, R. Krykbaev, D. Xuan, H. Zhou, J. Brooks, L. Fitz, J. Strand, E. Presman, L. Lin, A. Aulabaugh, and X. Huang. 2006. Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry* 45:4444-4454.
236. Fusetti, F., T. Pijning, K.H. Kalk, E. Bos, and B.W. Dijkstra. 2003. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J Biol Chem* 278:37753-37760.
237. Webb, D.C., A.N. McKenzie, and P.S. Foster. 2001. Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein. *J Biol Chem* 276:41969-41976.
238. Hollak, C.E., S. van Weely, M.H. van Oers, and J.M. Aerts. 1994. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 93:1288-1292.
239. Boot, R.G., G.H. Renkema, M. Verhoek, A. Strijland, J. Blik, T.M. de Meulemeester, M.M. Mannens, and J.M. Aerts. 1998. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 273:25680-25685.
240. Bussink, A.P., M. van Eijk, G.H. Renkema, J.M. Aerts, and R.G. Boot. 2006. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol* 252:71-128.
241. Shuhui, L., Y.K. Mok, and W.S. Wong. 2009. Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 149:369-377.

242. Boot, R.G., E.F. Blommaart, E. Swart, K. Ghauharali-van der Vlugt, N. Bijl, C. Moe, A. Place, and J.M. Aerts. 2001. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* 276:6770-6778.
243. Boot, R.G., A.P. Bussink, M. Verhoek, P.A. de Boer, A.F. Moorman, and J.M. Aerts. 2005. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem* 53:1283-1292.
244. Suzuki, M., W. Fujimoto, M. Goto, M. Morimatsu, B. Syuto, and T. Iwanaga. 2002. Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *J Histochem Cytochem* 50:1081-1089.
245. Choi, E.H., P.A. Zimmerman, C.B. Foster, S. Zhu, V. Kumaraswami, T.B. Nutman, and S.J. Chanock. 2001. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun* 2:248-253.
246. Dickey, B.F. 2007. Exoskeletons and exhalation. *N Engl J Med* 357:2082-2084.
247. Renkema, G.H., R.G. Boot, F.L. Au, W.E. Donker-Koopman, A. Strijland, A.O. Muijsers, M. Hrebicek, and J.M. Aerts. 1998. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 251:504-509.
248. Johansen, J.S., M.K. Williamson, J.S. Rice, and P.A. Price. 1992. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 7:501-512.
249. Hakala, B.E., C. White, and A.D. Recklies. 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 268:25803-25810.
250. Volck, B., P.A. Price, J.S. Johansen, O. Sorensen, T.L. Benfield, H.J. Nielsen, J. Calafat, and N. Borregaard. 1998. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians* 110:351-360.
251. Johansen, J.S., B.V. Jensen, A. Roslind, D. Nielsen, and P.A. Price. 2006. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:194-202.
252. Kzhyshkowska, J., S. Mamidi, A. Gratchev, E. Kremmer, C. Schmuttermaier, L. Krusell, G. Haus, J. Utikal, K. Schledzewski, J. Scholtze, and S. Goerdts. 2006. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 107:3221-3228.
253. Pretolani, M. 2008. [From mollusk to man: YKL-40, a novel mediator of severe asthma]. *Med Sci (Paris)* 24:235-237.
254. Johansen, J.S., H.S. Jensen, and P.A. Price. 1993. A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol* 32:949-955.
255. Harvey, S., M. Weisman, J. O'Dell, T. Scott, M. Krusemeier, J. Visor, and C. Swindlehurst. 1998. Chondrex: new marker of joint disease. *Clin Chem* 44:509-516.
256. Letuve, S., A. Kozhich, N. Arouche, M. Grandsaigne, J. Reed, M.C. Dombret, P.A. Kiener, M. Aubier, A.J. Coyle, and M. Pretolani. 2008. YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J Immunol* 181:5167-5173.
257. Kucur, M., F.K. Isman, B. Karadag, V.A. Vural, and S. Tavsanoğlu. 2007. Serum YKL-40 levels in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 18:391-396.
258. Peltomaa, R., L. Paimela, S. Harvey, T. Helve, and M. Leirisalo-Repo. 2001. Increased level of YKL-40 in sera from patients with early rheumatoid arthritis: a new marker for disease activity. *Rheumatol Int* 20:192-196.
259. Erzin, Y., H. Uzun, A. Karatas, and A.F. Celik. 2008. Serum YKL-40 as a marker of disease activity and stricture formation in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 23:e357-362.
260. Vind, I., J.S. Johansen, P.A. Price, and P. Munkholm. 2003. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 38:599-605.
261. Johansen, J.S., P. Christoffersen, S. Moller, P.A. Price, J.H. Henriksen, C. Garbarsch, and F. Bendtsen. 2000. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 32:911-920.
262. Johansen, J.S., N.A. Schultz, and B.V. Jensen. 2009. Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncol* 5:1065-1082.
263. De Ceuninck, F., S. Gauffillier, A. Bonnaud, M. Sabatini, C. Lesur, and P. Pastoureau. 2001. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 285:926-931.
264. Recklies, A.D., C. White, and H. Ling. 2002. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 365:119-126.

265. Nishikawa, K.C., and A.J. Millis. 2003. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 287:79-87.
266. Malinda, K.M., L. Ponce, H.K. Kleinman, L.M. Shackelton, and A.J. Millis. 1999. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res* 250:168-173.
267. Bigg, H.F., R. Wait, A.D. Rowan, and T.E. Cawston. 2006. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation. *J Biol Chem* 281:21082-21095.
268. Jacques, C., A.D. Recklies, A. Levy, and F. Berenbaum. 2007. HC-gp39 contributes to chondrocyte differentiation by inducing SOX9 and type II collagen expressions. *Osteoarthritis Cartilage* 15:138-146.
269. Zhu, Z., T. Zheng, R.J. Homer, Y.K. Kim, N.Y. Chen, L. Cohn, Q. Hamid, and J.A. Elias. 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304:1678-1682.
270. Bierbaum, S., R. Nickel, A. Koch, S. Lau, K.A. Deichmann, U. Wahn, A. Superti-Furga, and A. Heinzmann. 2005. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1505-1509.
271. Chatterjee, R., J. Batra, S. Das, S.K. Sharma, and B. Ghosh. 2008. Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 122:202-208, 208 e201-207.
272. Donnelly, L.E., and P.J. Barnes. 2004. Acidic mammalian chitinase--a potential target for asthma therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25:509-511.
273. Hartl, D., C.H. He, B. Koller, C.A. Da Silva, R. Homer, C.G. Lee, and J.A. Elias. 2008. Acidic mammalian chitinase is secreted via an ADAM17/epidermal growth factor receptor-dependent pathway and stimulates chemokine production by pulmonary epithelial cells. *J Biol Chem* 283:33472-33482.
274. Hartl, D., C.H. He, B. Koller, C.A. Da Silva, Y. Kobayashi, C.G. Lee, R.A. Flavell, and J.A. Elias. 2009. Acidic mammalian chitinase regulates epithelial cell apoptosis via a chitinolytic-independent mechanism. *J Immunol* 182:5098-5106.
275. Zhao, J., L.H. Yeong, and W.S. Wong. 2007. Dexamethasone alters bronchoalveolar lavage fluid proteome in a mouse asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 142:219-229.
276. Bargagli, E., C. Olivieri, M. Margollicci, D. Bennett, A. Luddi, M. Perrone, C. Maggiorelli, A. Prasse, and P. Rottoli. 2010. Serum chitotriosidase levels in patients with allergic and non-allergic asthma. *Respiration* 79:437-438.
277. Wu, A.C., J. Lasky-Su, C.A. Rogers, B.J. Klanderman, and A.A. Litonjua. 2010. Fungal exposure modulates the effect of polymorphisms of chitinases on emergency department visits and hospitalizations. *Am J Respir Crit Care Med* 182:884-889.
278. Wu, A.C., J. Lasky-Su, C.A. Rogers, B.J. Klanderman, and A. Litonjua. 2010. Polymorphisms of chitinases are not associated with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125:754-757, 757 e751-757 e752.
279. Zhang, L., M. Wang, X. Kang, P. Boontheung, N. Li, A.E. Nel, and J.A. Loo. 2009. Oxidative stress and asthma: proteome analysis of chitinase-like proteins and FIZZ1 in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *J Proteome Res* 8:1631-1638.
280. Lee, E., M. Jin, Z. Quan, N.K. Hwang, C.X. Lin, S. Kang, T.C. Moon, and H.W. Chang. 2008. Effect of dexamethasone on STAT6-dependent Ym1/2 expression in vivo and in vitro. *Biol Pharm Bull* 31:1663-1666.
281. Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, P. Kewin, G. Murphy, C.J. Corrigan, S. Ying, N. Pitman, A. Mirchandani, B. Rana, N. van Rooijen, M. Shepherd, C. McSharry, I.B. McInnes, D. Xu, and F.Y. Liew. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183:6469-6477.
282. Tang, H., Z. Fang, Y. Sun, B. Li, Z. Shi, J. Chen, T. Zhang, and Q. Xiu. 2010. YKL-40 in asthmatic patients, and its correlations with exacerbation, eosinophils and immunoglobulin E. *Eur Respir J* 35:757-760.
283. Park, J.A., J.M. Drazen, and D.J. Tschumperlin. 2010. The chitinase-like protein YKL-40 is secreted by airway epithelial cells at base line and in response to compressive mechanical stress. *J Biol Chem* 285:29817-29825.
284. Lee, C.G., D. Hartl, G.R. Lee, B. Koller, H. Matsuura, C.A. Da Silva, M.H. Sohn, L. Cohn, R.J. Homer, A.A. Kozhich, A. Humbles, J. Kearley, A. Coyle, G. Chupp, J. Reed, R.A. Flavell, and J.A. Elias. 2009. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 206:1149-1166.
285. Kuepper, M., K. Bratke, and J.C. Virchow. 2008. Chitinase-like protein and asthma. *N Engl J Med* 358:1073-1075; author reply 1075.



286. Ober, C., Z. Tan, Y. Sun, J.D. Possick, L. Pan, R. Nicolae, S. Radford, R.R. Parry, A. Heinzmann, K.A. Deichmann, L.A. Lester, J.E. Gern, R.F. Lemanske, Jr., D.L. Nicolae, J.A. Elias, and G.L. Chupp. 2008. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 358:1682-1691.
287. Knight, D.A., C.L. Lane, and S.M. Stick. 2004. Does aberrant activation of the epithelial-mesenchymal trophic unit play a key role in asthma or is it an unimportant sideshow? *Curr Opin Pharmacol* 4:251-256.
288. Moffatt, M.F., and W.O. Cookson. 2008. Asthma and chitinases. *N Engl J Med* 358:1725-1726.
289. Lane, D.P., and L.V. Crawford. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263.
290. Khoury, M.P., and J.C. Bourdon. 2010. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000927.
291. Hollstein, M., and P. Hainaut. 2010. Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol* 220:164-173.
292. Joerger, A.C., and A.R. Fersht. 2008. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77:557-582.
293. Liang, S.H., and M.F. Clarke. 2001. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 268:2779-2783.
294. Romer, L., C. Klein, A. Dehner, H. Kessler, and J. Buchner. 2006. p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:6440-6460.
295. Delmolino, L., H. Band, and V. Band. 1993. Expression and stability of p53 protein in normal human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 14:827-832.
296. Salvador, G., R. Sanmarti, A. Garcia-Peiro, J.R. Rodriguez-Cros, J. Munoz-Gomez, and J.D. Canete. 2005. p53 expression in rheumatoid and psoriatic arthritis synovial tissue and association with joint damage. *Ann Rheum Dis* 64:183-187.
297. Giaccia, A.J., and M.B. Kastan. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12:2973-2983.
298. Schwartz, D., N. Goldfinger, and V. Rotter. 1993. Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 8:1487-1494.
299. Vilborg, A., M.T. Wilhelm, and K.G. Wiman. 2010. Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level. *J Mol Med* 88:645-652.
300. Mosner, J., T. Mummenbrauer, C. Bauer, G. Sczakiel, F. Grosse, and W. Deppert. 1995. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo J* 14:4442-4449.
301. Lavin, M.F., and N. Gueven. 2006. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13:941-950.
302. Lee, J.T., and W. Gu. 2010. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ* 17:86-92.
303. Carter, S., and K.H. Vousden. 2009. Modifications of p53: competing for the lysines. *Curr Opin Genet Dev* 19:18-24.
304. Li, M., C.L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302:1972-1975.
305. Li, H., and G. Jogl. 2009. Structural and biochemical studies of TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator). *J Biol Chem* 284:1748-1754.
306. Sahin, E., and R.A. Depinho. 2010. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464:520-528.
307. Zilfou, J.T., and S.W. Lowe. 2009. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001883.
308. Gudkov, A.V., and E.A. Komarova. 2010. Pathologies associated with the p53 response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001180.
309. Bode, A.M., and Z. Dong. 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4:793-805.
310. Appella, E., and C.W. Anderson. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268:2764-2772.
311. Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
312. Braithwaite, A.W., G. Del Sal, and X. Lu. 2006. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ* 13:984-993.
313. Kastan, M.B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-323.
314. Giono, L.E., and J.J. Manfredi. 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* 209:13-20.
315. St Clair, S., L. Giono, S. Varmeh-Ziaie, L. Resnick-Silverman, W.J. Liu, A. Padi, J. Dastidar, A. DaCosta, M. Mattia, and J.J. Manfredi. 2004. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is

- mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell* 16:725-736.
316. Liu, J.J., M. Lin, J.Y. Yu, B. Liu, and J.K. Bao. 2010. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 300:105-114.
  317. Riedl, S.J., and G.S. Salvesen. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:405-413.
  318. Lessene, G., P.E. Czabotar, and P.M. Colman. 2008. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7:989-1000.
  319. Fridman, J.S., and S.W. Lowe. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-9040.
  320. Green, D.R., and G. Kroemer. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458:1127-1130.
  321. Moll, U.M., S. Wolff, D. Speidel, and W. Deppert. 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17:631-636.
  322. Chipuk, J.E., L. Bouchier-Hayes, T. Kuwana, D.D. Newmeyer, and D.R. Green. 2005. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309:1732-1735.
  323. Bellance, N., P. Lestienne, and R. Rossignol. 2009. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci* 14:4015-4034.
  324. Smolkova, K., L. Plecita-Hlavata, N. Bellance, G. Benard, R. Rossignol, and P. Jezek. 2010. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*
  325. Lee, H.C., and Y.H. Wei. 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 37:822-834.
  326. Kelly, D.P., and R.C. Scarpulla. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18:357-368.
  327. Trian, T., G. Benard, H. Begueret, R. Rossignol, P.O. Girodet, D. Ghosh, O. Ousova, J.M. Vernejoux, R. Marthan, J.M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2007. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204:3173-3181.
  328. Kulawiec, M., V. Ayyasamy, and K.K. Singh. 2009. p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway. *J Carcinog* 8:8.
  329. Lebedeva, M.A., J.S. Eaton, and G.S. Shadel. 2009. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1787:328-334.
  330. Park, J.Y., P.Y. Wang, T. Matsumoto, H.J. Sung, W. Ma, J.W. Choi, S.A. Anderson, S.C. Leary, R.S. Balaban, J.G. Kang, and P.M. Hwang. 2009. p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ Res* 105:705-712, 711 p following 712.
  331. Bourdon, A., L. Minai, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chretien, P. de Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, and A. Rotig. 2007. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 39:776-780.
  332. Nordlund, P., and P. Reichard. 2006. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 75:681-706.
  333. Yoshida, Y., H. Izumi, T. Torigoe, H. Ishiguchi, H. Itoh, D. Kang, and K. Kohno. 2003. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 63:3729-3734.
  334. Wong, T.S., S. Rajagopalan, F.M. Townsley, S.M. Freund, M. Petrovich, D. Loakes, and A.R. Fersht. 2009. Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic Acids Res* 37:568-581.
  335. Achanta, G., R. Sasaki, L. Feng, J.S. Carew, W. Lu, H. Pelicano, M.J. Keating, and P. Huang. 2005. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *Embo J* 24:3482-3492.
  336. Saleem, A., P.J. Adhietty, and D.A. Hood. 2009. Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics* 37:58-66.
  337. Irrcher, I., V. Ljubcic, A.F. Kirwan, and D.A. Hood. 2008. AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. *PLoS One* 3:e3614.
  338. Buchakjian, M.R., and S. Kornbluth. 2010. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:715-727.
  339. Vousden, K.H., and K.M. Ryan. 2009. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9:691-700.
  340. Gottlieb, E., and K.H. Vousden. 2010. p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001040.
  341. Matoba, S., J.G. Kang, W.D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P.J. Hurley, F. Bunz, and P.M. Hwang. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-1653.

342. Okamura, S., C.C. Ng, K. Koyama, Y. Takei, H. Arakawa, M. Monden, and Y. Nakamura. 1999. Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncol Res* 11:281-285.
343. Zhou, S., S. Kachhap, and K.K. Singh. 2003. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 18:287-292.
344. Suzuki, S., T. Tanaka, M.V. Poyurovsky, H. Nagano, T. Mayama, S. Ohkubo, M. Lokshin, H. Hosokawa, T. Nakayama, Y. Suzuki, S. Sugano, E. Sato, T. Nagao, K. Yokote, I. Tatsuno, and C. Prives. 2010. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7461-7466.
345. Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., M. Armoni, and E. Karnieli. 2004. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64:2627-2633.
346. Kawauchi, K., K. Araki, K. Tobiume, and N. Tanaka. 2008. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10:611-618.
347. Kondoh, H., M.E. Lleonart, J. Gil, J. Wang, P. Degan, G. Peters, D. Martinez, A. Carnero, and D. Beach. 2005. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 65:177-185.
348. Bensaad, K., A. Tsuruta, M.A. Selak, M.N. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb, and K.H. Vousden. 2006. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126:107-120.
349. Sablina, A.A., A.V. Budanov, G.V. Ilyinskaya, L.S. Agapova, J.E. Kravchenko, and P.M. Chumakov. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11:1306-1313.
350. Budanov, A.V., A.A. Sablina, E. Feinstein, E.V. Koonin, and P.M. Chumakov. 2004. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304:596-600.
351. Cano, C.E., J. Gommeaux, S. Pietri, M. Culcasi, S. Garcia, M. Seux, S. Barelier, S. Vasseur, R.P. Spoto, M.J. Pebusque, N.J. Duseti, J.L. Iovanna, and A. Carrier. 2009. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res* 69:219-226.
352. Yoon, K.A., Y. Nakamura, and H. Arakawa. 2004. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet* 49:134-140.
353. Holley, A.K., S.K. Dhar, and D.K. St Clair. 2010. Manganese superoxide dismutase versus p53: the mitochondrial center. *Ann NY Acad Sci* 1201:72-78.
354. Chen, W., Z. Sun, X.J. Wang, T. Jiang, Z. Huang, D. Fang, and D.D. Zhang. 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* 34:663-673.
355. Jaiswal, A.K. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36:1199-1207.
356. Okuda, Y., M. Okuda, and C.C. Bernard. 2003. Regulatory role of p53 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 135:29-37.
357. Yamanishi, Y., D.L. Boyle, M.J. Pinkoski, A. Mahboubi, T. Lin, Z. Han, N.J. Zvaifler, D.R. Green, and G.S. Firestein. 2002. Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 160:123-130.
358. Ghosh, S., T. Mendoza, L.A. Ortiz, G.W. Hoyle, C.D. Fermin, A.R. Brody, M. Friedman, and G.F. Morris. 2002. Bleomycin sensitivity of mice expressing dominant-negative p53 in the lung epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 166:890-897.
359. Davis, D.W., D.A. Weidner, A. Holian, and D.J. McConkey. 2000. Nitric oxide-dependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. *J Exp Med* 192:857-869.
360. Guevara, N.V., H.S. Kim, E.I. Antonova, and L. Chan. 1999. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5:335-339.
361. Komarova, E.A., V. Krivokrysenko, K. Wang, N. Neznanov, M.V. Chernov, P.G. Komarov, M.L. Brennan, T.V. Golovkina, O.W. Rokhlin, D.V. Kuprash, S.A. Nedospasov, S.L. Hazen, E. Feinstein, and A.V. Gudkov. 2005. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *Faseb J* 19:1030-1032.
362. Ak, P., and A.J. Levine. 2010. p53 and NF-kappaB: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *Faseb J* 24:3643-3652.
363. Santhanam, U., A. Ray, and P.B. Sehgal. 1991. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7605-7609.
364. Subbaramaiah, K., N. Altorki, W.J. Chung, J.R. Mestre, A. Sampat, and A.J. Dannenberg. 1999. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274:10911-10915.
365. Henderson, W.R., Jr., L.O. Tang, S.J. Chu, S.M. Tsao, G.K. Chiang, F. Jones, M. Jonas, C. Pae, H. Wang, and E.Y. Chi. 2002. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 165:108-116.
366. Hamelmann, E., J. Schwarze, K. Takeda, A. Oshiba, G.L. Larsen, C.G. Irvin, and E.W. Gelfand. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-775.

367. Adler, A., G. Cieslewicz, and C.G. Irvin. 2004. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Appl Physiol* 97:286-292.
368. Bates, J., C. Irvin, V. Brusasco, J. Drazen, J. Fredberg, S. Loring, D. Eidelman, M. Ludwig, P. Macklem, J. Martin, J. Milic-Emili, Z. Hantos, R. Hyatt, S. Lai-Fook, A. Leff, J. Solway, K. Lutchen, B. Suki, W. Mitzner, P. Pare, N. Pride, and P. Sly. 2004. The use and misuse of Penh in animal models of lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:373-374.
369. Berger, P., J. Lavallee, R. Rouiller, F. Laurent, R. Marthan, and J.M. Tunon-de-Lara. 1999. Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis. *Eur Respir J* 14:1394-1402.
370. The global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) revised (2010). Available from: [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
371. Young, L., J. Sung, G. Stacey, and J.R. Masters. 2010. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc* 5:929-934.
372. Gudkov, A.V., and E.A. Komarova. 2005. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 331:726-736.
373. Komarova, E.A., N. Neznanov, P.G. Komarov, M.V. Chernov, K. Wang, and A.V. Gudkov. 2003. p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 278:15465-15468.
374. Tang, H., K.L. Kuhlen, and F. Wong-Staal. 1999. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 33:133-170.
375. Wong, L.F., L. Goodhead, C. Prat, K.A. Mitrophanous, S.M. Kingsman, and N.D. Mazarakis. 2006. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum Gene Ther* 17:1-9.
376. Trian, T., P.O. Girodet, O. Ousova, R. Marthan, J.M. Tunon-de-Lara, and P. Berger. 2006. RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:49-55.
377. Dougherty, W.G., J.A. Lindbo, H.A. Smith, T.D. Parks, S. Swaney, and W.M. Proebsting. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 7:544-552.
378. Timmons, L., and A. Fire. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854.
379. Montgomery, M.K., S. Xu, and A. Fire. 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15502-15507.
380. Clemens, M.J. 1997. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 29:945-949.
381. Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
382. Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213.
383. Cullen, B.R. 2002. RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol* 3:597-599.
384. Tijsterman, M., R.F. Ketting, and R.H. Plasterk. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36:489-519.
385. Tuschl, T., P.D. Zamore, R. Lehmann, D.P. Bartel, and P.A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13:3191-3197.
386. Hammond, S.M., S. Boettcher, A.A. Caudy, R. Kobayashi, and G.J. Hannon. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293:1146-1150.
387. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
388. Wiznerowicz, M., and D. Trono. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77:8957-8961.
389. Simmons, A., and K. Jantz. 2006. Use of a lentivirus/VSV pseudotype virus for highly efficient genetic redirection of human peripheral blood lymphocytes. *Nat Protoc* 1:2688-2700.
390. Yasui, K., R.A. Furuta, K. Matsumoto, Y. Tani, and J. Fujisawa. 2005. HIV-1-derived self-inactivating lentivirus vector induces megakaryocyte lineage-specific gene expression. *Microbes Infect* 7:240-247.
391. Simeone-Penney, M.C., M. Severgnini, L. Rozo, S. Takahashi, B.H. Cochran, and A.R. Simon. 2008. PDGF-induced human airway smooth muscle cell proliferation requires STAT3 and the small GTPase Rac1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L698-704.
392. Deng, H., G.A. Dokshin, J. Lei, A.M. Goldsmith, K.N. Bitar, D.C. Fingar, M.B. Hershenon, and J.K. Bentley. 2008. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 283:10198-10207.

393. Marone, R., D. Hess, D. Dankort, W.J. Muller, N.E. Hynes, and A. Badache. 2004. Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* 6:515-522.
394. Juniper, E.F., P.M. O'Byrne, G.H. Guyatt, P.J. Ferrie, and D.R. King. 1999. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 14:902-907.
395. Cody, D.D., C.L. Nelson, W.M. Bradley, M. Wislez, D. Juroske, R.E. Price, X. Zhou, B.N. Bekele, and J.M. Kurie. 2005. Murine lung tumor measurement using respiratory-gated micro-computed tomography. *Invest Radiol* 40:263-269.
396. Lee, H.J., J.M. Goo, N.R. Kim, M.A. Kim, D.H. Chung, K.R. Son, H.C. Kim, C.H. Lee, C.M. Park, E.J. Chun, and J.G. Im. 2008. Semiquantitative measurement of murine bleomycin-induced lung fibrosis in vivo and postmortem conditions using microcomputed tomography: correlation with pathologic scores--initial results. *Invest Radiol* 43:453-460.
397. Ford, N.L., E.L. Martin, J.F. Lewis, R.A. Veldhuizen, D.W. Holdsworth, and M. Drangova. 2009. Quantifying lung morphology with respiratory-gated micro-CT in a murine model of emphysema. *Phys Med Biol* 54:2121-2130.
398. Sotomayor, H., M. Badier, D. Vervloet, and J. Orehek. 1984. Seasonal increase of carbachol airway responsiveness in patients allergic to grass pollen. Reversal by corticosteroids. *Am Rev Respir Dis* 130:56-58.
399. Barnes, P.J. 1996. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 154:S21-26; discussion S26-27.
400. Kauffman, H.F., J.F. Tomee, M.A. van de Riet, A.J. Timmerman, and P. Borger. 2000. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 105:1185-1193.
401. Eckmann, L., M.F. Kagnoff, and J. Fierer. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61:4569-4574.
402. Hong, J.H., S.I. Lee, K.E. Kim, T.S. Yong, J.T. Seo, M.H. Sohn, and D.M. Shin. 2004. German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 113:315-319.
403. Sun, G., M.A. Stacey, M. Schmidt, L. Mori, and S. Mattoli. 2001. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol* 167:1014-1021.
404. King, C., S. Brennan, P.J. Thompson, and G.A. Stewart. 1998. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* 161:3645-3651.
405. Page, K., J.R. Ledford, P. Zhou, K. Dienger, and M. Wills-Karp. 2010. Mucosal sensitization to German cockroach involves protease-activated receptor-2. *Respir Res* 11:62.
406. Powning, R.F., and H. Irzykiewicz. 1963. A Chitinase from the Gut of the Cockroach *Periplaneta Americana*. *Nature* 200:1128.
407. Bernier, I., J.C. Landureau, P. Grellet, and P. Jolles. 1974. Characterization of chitinases from haemolymph and cell cultures of cockroach (*Periplaneta americana*). *Comp Biochem Physiol B* 47:41-44.
408. Lau, A.T., Y. Wang, and J.F. Chiu. 2008. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* 104:657-667.
409. Weber, E., S. Hunter, K. Stedman, S. Dreitz, T. Olivry, A. Hillier, and C. McCall. 2003. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. *J Allergy Clin Immunol* 112:79-86.
410. O'Neil, S.E., T.K. Heinrich, B.J. Hales, L.A. Hazell, D.C. Holt, K. Fischer, and W.R. Thomas. 2006. The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 36:831-839.
411. Roth, M., P.R. Johnson, P. Borger, M.P. Bihl, J.J. Rudiger, G.G. King, Q. Ge, K. Hostettler, J.K. Burgess, J.L. Black, and M. Tamm. 2004. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 351:560-574.
412. Ramos-Barbon, D., J.F. Presley, Q.A. Hamid, E.D. Fixman, and J.G. Martin. 2005. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest* 115:1580-1589.
413. Kaur, D., F. Hollins, R. Saunders, L. Woodman, A. Sutcliffe, G. Cruse, P. Bradding, and C. Brightling. 2010. Airway smooth muscle proliferation and survival is not modulated by mast cells. *Clin Exp Allergy* 40:279-288.
414. Milosevic, J., A. Storch, and J. Schwarz. 2005. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells* 23:681-688.
415. Millau, J.F., S. Mai, N. Bastien, and R. Drouin. 2010. p53 functions and cell lines: have we learned the lessons from the past? *Bioessays* 32:392-400.

416. Fiskum, G., R.E. Rosenthal, V. Vereczki, E. Martin, G.E. Hoffman, C. Chinopoulos, and A. Kowaltowski. 2004. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 36:347-352.
417. Dagher, P.C. 2004. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. *Kidney Int* 66:506-509.
418. Matsusaka, H., T. Ide, S. Matsushima, M. Ikeuchi, T. Kubota, K. Sunagawa, S. Kinugawa, and H. Tsutsui. 2006. Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 70:457-465.
419. Jacobs, W.B., D.R. Kaplan, and F.D. Miller. 2006. The p53 family in nervous system development and disease. *J Neurochem* 97:1571-1584.
420. Igarashi, H., J. Hashimoto, T. Tomita, H. Yoshikawa, and K. Ishihara. 2010. TP53 mutations coincide with the ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in the fibroblast-like synoviocytes derived from a fraction of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 161:71-80.
421. Yamanishi, Y., D.L. Boyle, S. Rosengren, D.R. Green, N.J. Zvaifler, and G.S. Firestein. 2002. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10025-10030.
422. Shao, R., K. Hamel, L. Petersen, Q.J. Cao, R.B. Arenas, C. Bigelow, B. Bentley, and W. Yan. 2009. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene* 28:4456-4468.
423. Abraham, J., J. Kelly, P. Thibault, and S. Benchimol. 2000. Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analyzed by mass spectrometry. *J Mol Biol* 295:853-864.
424. Wei, C.L., Q. Wu, V.B. Vega, K.P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, A. Shahab, H.C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, J. Liu, X.D. Zhao, J.L. Chew, Y.L. Lee, V.A. Kuznetsov, W.K. Sung, L.D. Miller, B. Lim, E.T. Liu, Q. Yu, H.H. Ng, and Y. Ruan. 2006. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124:207-219.

