



**HAL**  
open science

# Comparaison de modèles in vitro de cellules épithéliales des voies respiratoires pour la sécrétion de mucus et le processus inflammatoire

Aude Bodin

► **To cite this version:**

Aude Bodin. Comparaison de modèles in vitro de cellules épithéliales des voies respiratoires pour la sécrétion de mucus et le processus inflammatoire. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-03138517

**HAL Id: hal-03138517**

**<https://ephe.hal.science/hal-03138517v1>**

Submitted on 11 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté  
par

**Aude Bodin**

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Comparaison de modèles *in vitro* de cellules épithéliales des voies  
respiratoires pour la sécrétion de mucus et le processus  
inflammatoire**

Soutenu le 01 décembre 2020 devant le jury suivant :

Dr. GARDIE Betty

Pr. LAGENTE Vincent

Dr. RENAUD-PAITRA Flore

Dr. JOANNES Audrey

Dr. ARLOT Yannick

Présidente

Tuteur scientifique

Tuteur pédagogique

Rapporteur

Examineur

Mémoire préparé sous la direction de : Pr. Vincent LAGENTE et Dr. Tatiana VICTONI

Laboratoire : Institut NuMeCan INSERM UMR 1241

Directeur : Dr. Bruno CLEMENT

Et de

Dr. Flore RENAUD-PAITRA

Laboratoire : Institut Gustave Roussy UMR CNRS 9019 Université Paris Sud EPHE  
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail. Je remercie le **Dr. Audrey Joannes** d'avoir accepté d'en être la rapporteure et le **Dr. Yannick Arlot** d'avoir accepté d'en être l'examinatrice. Je remercie également le **Dr. Betty Gardie** d'avoir accepté d'être la présidente du jury.

Merci au **Dr. Flore Renaud-Paitra** pour ses conseils et son soutien en tant que tuteur pédagogique.

Je tiens également à remercier le **Pr. Vincent Lagente**, tuteur scientifique du projet. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet, et de m'avoir encadré pendant ces trois années.

Un grand merci au **Dr. Tatiana Victoni** qui m'a encadré et soutenu tout le long du projet. Je te dois beaucoup, tu as été très patiente avec moi, et tu m'as énormément appris.

Merci beaucoup à toutes les collègues qui ont partagé mon quotidien au laboratoire, qui m'ont supporté pendant ces trois années, et m'ont aidé à concrétiser ce projet.

Un grand merci à Julien, tu m'as toujours soutenu dans les moments de doute et les moments difficiles.

Tu as toujours été présent pour moi.

Merci également à Yann, qui m'a beaucoup aidé pour les manip du mercredi, mais aussi pour l'anglais.

Enfin je tiens à remercier ma famille et plus particulièrement mon conjoint de m'avoir soutenu tout ce temps, mais aussi pour m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles.

Merci à mes enfants qui ont supporté mes sauts d'humeurs, même si parfois ils en étaient un peu responsables... Et merci à mes parents et à mes beaux-parents de s'être occupés des enfants pendant mes semaines de cours à Paris.

# Table des matières

|  |          |
|--|----------|
| <b>Remerciements</b> .....   | <b>2</b> |
| <b>Table des figures et tableaux</b> .....   | <b>5</b> |
| <b>Abréviations</b> .....  | <b>6</b> |
| <b>I. Introduction</b> .....   | <b>7</b> |
| A. GENERALITES : L'APPAREIL RESPIRATOIRE .....   | 7        |
| 1. <i>L'arbre bronchique</i> .....   | 8        |
| 2. <i>Epithélium trachéo-bronchique</i> .....  | 9        |
| 3. <i>Epithélium alvéolaire</i> .....  | 10       |
| B. MECANISMES DE L'IMMUNITE DES VOIES AERIENNES .....  | 12       |
| 1. <i>Fonction de barrière épithéliale</i> .....   | 12       |
| 2. <i>Les mucines sécrétées : MUC5B et MUC5AC</i> .....                                      | 13       |
| i. Protection épithéliale .....  | 13       |
| ii. Hypersécrétion de mucus.....   | 14       |
| 3. <i>Mécanismes de reconnaissance des signaux de dangers</i> .....                          | 17       |
| i. Les Toll-like receptors.....  | 17       |
| ii. Les NOD-like receptors.....  | 19       |
| iii. Les RIG-like receptors.....   | 19       |
| iv. Les C-type lectin receptors .....  | 19       |
| 4. <i>Les médiateurs inflammatoires</i> .....  | 20       |
| i. Les cytokines Th2.....  | 20       |
| ii. Les cytokines Th1.....   | 21       |
| iii. Les chimiokines.....  | 21       |
| (1) L'Interleukine 8 : CXCL8/IL-8.....   | 22       |
| (2) Growth Related Oncogen-a: CXCL1/ GRO $\alpha$ .....                                      | 23       |
| (3) Monocyte Chemotactic protein 1 : CCL2 / MCP-1 .....                                      | 23       |
| 5. <i>Les voies de signalisation impliquées dans les physiopathologies pulmonaires</i> ..... | 24       |
| i. La voie de signalisation impliquant l'EGFR.....   | 25       |
| ii. Nuclear Factor Kappa B .....   | 26       |
| iii. Les voies Mitogen Activated Protein Kinase .....  | 28       |
| (1) La voie Extracellular signal-regulated kinase : ERK1/2.....                              | 28       |
| (2) p38 Mitogen activated Protein Kinase .....   | 29       |
| C. PATHOLOGIES DES VOIES RESPIRATOIRES .....   | 30       |
| 1. <i>L'Asthme</i> .....   | 30       |
| 2. <i>Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)</i> .....                            | 32       |
| 3. <i>La mucoviscidose</i> .....   | 35       |
| 4. <i>Traitements actuels</i> .....  | 37       |
| i. Traitements contre l'asthme.....  | 37       |
| ii. Traitements contre la Bronchopnumopathie Chronique Obstructive .....                     | 38       |
| iii. Traitements contre la mucoviscidose.....  | 38       |
| 5. <i>Perspectives de traitements des pathologies respiratoires</i> .....                    | 39       |
| i. Inhibition de la synthèse la mucine .....   | 39       |
| (1) Inactivation de l'EGFR.....  | 40       |
| (2) Inhibiteurs du facteur Hypoxia Inductible factor-1 .....                                 | 40       |
| (3) Les antagonistes des récepteurs GABA .....   | 41       |
| (4) Inhibiteur du canal hCLCA1 .....   | 41       |
| ii. Inhibition de la sécrétion de mucine .....   | 41       |

|  |           |
|--|-----------|
| (1) Blocage de MARCKS et de son complexe .....                                       | 42        |
| (2) Récepteur P2Y <sub>2</sub> .....   | 43        |
| (3) Les antibiotiques de type macrolides .....                                       | 43        |
| 6. <i>Inhibition de l'inflammation : les voies de signalisation</i> .....            | 43        |
| (1) La voie NFκB .....   | 43        |
| (2) Le récepteur Peroxisome proliferator-activated γ .....                           | 44        |
| (3) La voie p38-MAPK .....   | 44        |
| ii. Blocage des médiateurs inflammatoires .....                                      | 44        |
| (1) Les anti-Interleukines 13 .....  | 44        |
| (2) Les antagonistes de CXCR2 et CCR3 .....  | 45        |
| (3) Les anti-protéases .....   | 45        |
| iii. La thérapie génique .....   | 46        |
| D. MODELES D'ETUDES POUR LA PRODUCTION DE MUCUS ET DE CYTOKINES INFLAMMATOIRES ..... | 48        |
| 1. <i>Les lignées pulmonaires humaines</i> .....                                     | 48        |
| i. Les A549 .....  | 48        |
| ii. Les NCI H292 .....   | 48        |
| iii. Les Calu3 .....   | 49        |
| 2. <i>Modèle d'exposition au Lipopolysaccharide</i> .....                            | 49        |
| 3. <i>Modèle d'exposition à la fumée de cigarette</i> .....                          | 49        |
| <b>II. Objectifs</b> .....   | <b>52</b> |
| <b>III. Matériels et méthodes</b> .....  | <b>54</b> |
| A. MILIEUX DE CULTURE .....  | 54        |
| B. LA PREPARATION DE L'EXTRAIT DE FUMEE DE CIGARETTE (CSE) .....                     | 54        |
| C. LA CULTURE CELLULAIRE .....   | 55        |
| 1. <i>Mise en culture des cellules</i> .....   | 55        |
| 2. <i>Traitements des cellules</i> .....   | 55        |
| D. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE .....  | 56        |
| E. ETUDES DES ARNm PAR RT-PCR .....  | 56        |
| F. DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE DANS LES SURNAGEANTS CELLULAIRES .....                   | 58        |
| 1. <i>Les chimiokines</i> .....  | 58        |
| 2. <i>La protéine MUC5AC</i> .....   | 59        |
| G. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE .....   | 59        |
| H. ETUDES STATISTIQUES .....   | 60        |
| <b>IV. Résultats</b> .....   | <b>61</b> |
| A. MESURE DE LA TOXICITE DU CSE ET DU LPS .....                                      | 61        |
| B. EXPRESSION DE MUCINE (MUC5AC) .....   | 63        |
| C. SECRETION DE MUCINE (MUC5AC) .....  | 65        |
| D. PRODUCTION DE MEDIATEURS INFLAMMATOIRES .....                                     | 67        |
| E. PRODUCTION DE MUCINE ET DE CHIMIOKINES APRES 48H DE STIMULATION .....             | 70        |
| F. ETUDE DE L'INDUCTION DE MUCINE CHEZ NCI H292 .....                                | 71        |
| <b>V. Discussion et perspectives</b> .....   | <b>74</b> |

## Table des figures et tableaux

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Schéma du système respiratoire .....  | 8  |
| Figure 2 : Schéma du lobule pulmonaire.....  | 8  |
| Figure 3 : Ultra structure de l'épithélium bronchique .....  | 10 |
| Figure 4 : Schéma des alvéoles pulmonaires et ultra structure d'une alvéole .....  | 11 |
| Figure 5 : Hypersécrétion de mucus et hyperplasie chez un patient BPCO .....   | 16 |
| Figure 6 : Activation des TLRs.....  | 18 |
| Figure 7 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation des gènes MUC .....   | 25 |
| Figure 8 : Schéma de la voie d'activation du facteur NFκB.....   | 27 |
| Figure 9 : Schéma simplifié des cascades d'activation des voies Mitogen Activated Protein Kinase ...   | 28 |
| Figure 10 : Rôle des cellules Th2 dans l'asthme .....  | 32 |
| Figure 11 : Inflammation de type Th1 dans la Bronchopneupathie chronique Obstructive.....  | 34 |
| Figure 12 : Physiopathologie de la mucoviscidose.....  | 37 |
| Figure 13 : Les barrières de la thérapie génique .....   | 47 |
| Figure 14 : Les trois méthodes d'exposition à la fumée de cigarette. ....  | 50 |
| Figure 15 : Thérapie génique par voie respiratoire : la barrière de mucus.....   | 53 |
| Figure 16 : Dispositif expérimental pour la préparation de l'extrait de fumée de cigarette. ....   | 54 |
| Figure 17 : Protocole expérimental.....  | 56 |
| Figure 18 : Principe de l'amplification par PCR .....  | 57 |
| Figure 19 : Mesure de la toxicité du CSE et du LPS sur différentes lignées de cellules épithéliales après 24h et 48h d'exposition.....                             | 62 |
| Figure 20 : Comparaison du taux d'ARNm de MUC5AC après exposition de CSE et/ou LPS pendant 24h par différentes lignées de cellules épithéliales .....              | 64 |
| Figure 21 : Comparaison du taux de sécrétion relatif de la protéine MUC5AC après exposition de CSE et/ou LPS par différentes lignées de cellules épithéliales..... | 66 |
| Figure 22 : Comparaison du taux d'ARNm et de sécrétion protéique des trois chimiokines après exposition à une dose de CSE à 4% et/ou de LPS pendant 24h .....      | 69 |
| Figure 23 : Comparaison du niveau de sécrétion protéique de MUC5AC et des trois chimiokines. ....  | 71 |
| Figure 24 : Induction de la production de MUC5AC chez NCI H292. ....   | 72 |
| Figure 25 : Comparaison du taux d'ARNm de MUC5B après exposition au CSE et/ou au LPS pendant 24h par A549 et NCI H292. ....  | 73 |
| <br>   |    |
| Tableau 1 : Classification GOLD de la BPCO: 5 niveaux de sévérité croissante.....  | 35 |
| Tableau 2 : Les Potentiels cibles et Inhibiteurs de mucines.....   | 39 |
| Tableau 3 : Séquences d'amorces humaines .....   | 57 |

## Abréviations

**AJC** : Jonctions Adhérentes Complexes  
**AJs** : Jonctions Adhérentes  
**ANOVA** : Analyse de la variance  
**ARNm** : Acide Ribo Nucléique messenger  
**BPCO** : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive  
**CARD** : *Caspase Recruitment domain*  
**CCL2 (MCP-1)** : *C-C Chemokine Ligand 2 (Monocyte Chemotactic Protein-1)*  
**CLRs** : *C-type lectin receptors*  
**CFTR** : *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*  
**CFV** : Capacité Vitale Forcée  
**CV** : Capacité Vitale  
**CXCL1(GRO- $\alpha$ )** : *C-X-C Chemokine Ligand 1 (Growth Related Oncogene- $\alpha$ )*  
**CXCL8(IL-8)** : *C-X-C Chemokine Ligand 8 (Interleukine-8)*  
**DAMPs** : *Damage-Associated Molecular Pattern*  
**EGF** : *Epidermal Growth Factor*  
**EGFR** : *Epidermal Growth Factor Receptor*  
**ELF** : *Epithelial Lining Fluid*  
**ENaC** : *Epithelial Sodium Channel*  
**HIF-1** : *Hypoxia Inductible factor-1*  
**HSP-70** : *Heat Shock Protein-70*  
**ICS** : Corticostéroïdes Inhalés  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IL-1 $\beta$**  : Interleukine 1  $\beta$   
**IRF** : *Interferon Regulatory Factor*  
**LABA** : *Long- Acting  $\beta$ 2-adrenergicreceptor Agonist*  
**LAMA** : *Long-Acting Muscarinicacetylcholinereceptor Antagonist*  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**MAPK** : *Mitogen Activated Protein Kinase*  
**MAPKK** : *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*  
**MAPKKK** : *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*  
**MARCKS** : *Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate*  
**MCC** : Clairance muco ciliaire  
**MMP** : *Matrix Metallo Proteinase*  
**MUC5AC** : Mucine 5AC  
**MUC5B** : Mucine 5B  
**MV** : Mucoviscidose  
**NF $\kappa$ B** : *Nuclear Factor-kappa B*  
**NLRs** : *NOD (Nucleotid-binding Oligomerization Domain )-like receptors*  
**PAMPs** : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*  
**RLRs** : *RIG (Retinoid acid-inductible gene-1) –like receptors*  
**SABA** : *Short Acting  $\beta$ 2-adrenergicreceptor Agonist*  
**SAMA** : *Short-Acting Muscarinicacetylcholinereceptor Antagonist*  
**SEM** : *Standard Error of Mean*  
**SNARE** : *Soluble NFS Attachment Protein Receptor*  
**TNF $\alpha$**  : *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*   
**TJs** : *Tigh Junctions*  
**TLRs** : *Toll like receptors*  
**VEMS** : Volume Expiratoire Maximal par Second

# I. Introduction

## A. Généralités : L'appareil respiratoire

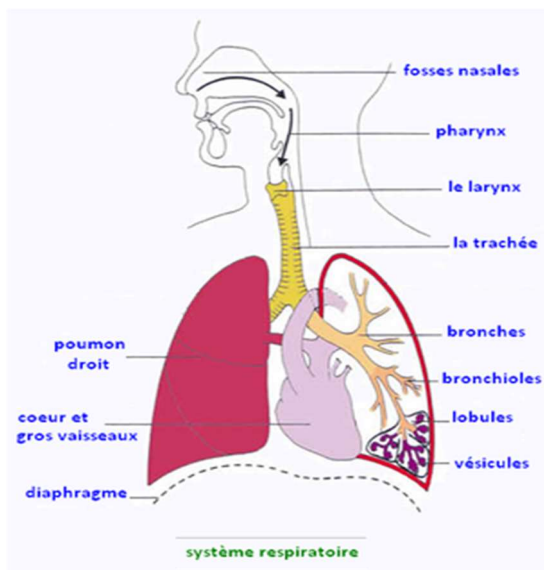
L'appareil respiratoire est composé de deux parties : les conduits respiratoires, qui permettent l'acheminement de l'air et les poumons où s'effectuent les échanges gazeux entre l'air et le sang. La circulation de l'air débute par les conduits nasaux pour ensuite traverser le pharynx, où il est réchauffé et réuni à la vapeur d'eau. Puis, l'air descend *via* le larynx dans la trachée, passe ensuite dans les bronches, bronchioles terminales et respiratoires. Enfin, grâce aux canaux alvéolaires, l'air gagne les alvéoles où il pourra être diffusé dans les capillaires sanguins.

Les poumons jouent un rôle fondamental dans la respiration. Ils permettent de fournir l'oxygène nécessaire à l'ensemble des organes du corps, ainsi que d'éliminer le gaz carbonique contenu dans le sang. L'être humain possède deux poumons séparés médialement par le médiastin. Le poumon droit est composé de trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) et le gauche de deux lobes (supérieur et inférieur). Ils sont recouverts de membranes de protection : les plèvres. Ces membranes sont liées aux côtes de la cage thoracique, ce qui maintient les poumons au sein de cette cage, et les protège. L'ensemble repose sur le diaphragme (Ganong et Jobin 2012).

La respiration est, au niveau de l'organisme, une ventilation pulmonaire et au niveau tissulaire, c'est un échange nutritif de gaz entre le sang et l'air pulmonaire. La ventilation pulmonaire met en jeu des voies aériennes (fosses nasales, pharynx, larynx, trachée artère, bronches et bronchioles) et deux poumons (Figure 1). Un cycle respiratoire comprend une phase d'expiration, pendant laquelle presque tous les muscles thoraciques sont relâchés, et une phase d'inspiration active (remplissage "actif" des poumons), pendant laquelle le diaphragme et les muscles intercostaux sont contractés. La respiration est réalisée grâce aux mouvements de la paroi thoracique associés aux muscles respiratoires. Lors de l'inspiration ou de l'expiration de l'air, le volume de la cage thoracique va augmenter ou diminuer afin de ventiler les poumons. Au repos, l'être humain effectue 12 à 15 respirations par minute, ce qui représente 500mL d'air respiré. Cet air se mélange au gaz contenu dans les alvéoles et par simple diffusion, le dioxygène pénètre au niveau des capillaires pulmonaires, tandis que le dioxyde de carbone entre dans les alvéoles (Ganong et Jobin 2012; Martin, Vallet, et Riou

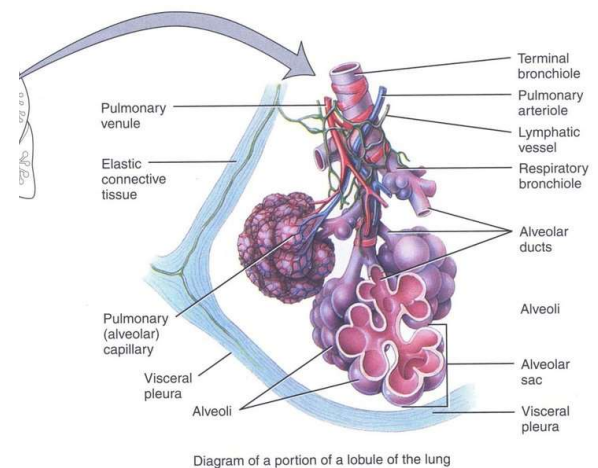


2017). Les voies aériennes sont constituées de deux types de voies : supérieures et inférieures. Les voies aériennes supérieures assurent la conduction mais aussi le conditionnement et le filtrage de l'air. Elles sont extrathoraciques et se composent du nez, des fosses nasales, de la bouche, du pharynx et du larynx. Les voies respiratoires inférieures, appelées aussi arbre bronchique, sont quant à elles, intrathoraciques. Elles sont composées de la trachée, des bronches, des bronchioles terminales et respiratoires, ainsi que des alvéoles (Figure 2). Les voies aériennes inférieures participent à la conduction de l'air mais aussi aux échanges gazeux (Ganong et Jobin 2012; Martin, Vallet, et Riou 2017).



**Figure 1 : Schéma du système respiratoire.**

D'après : <http://pacp-tpe.blogspot.com>



**Figure 2 : Schéma du lobule pulmonaire.**

D'après : <http://www.ifsii-faslafleche.fr>

### 1. L'arbre bronchique

L'arbre bronchique constitue l'ensemble des voies aériennes de conduction de l'air inspiré. Il débute au niveau de la bifurcation trachéale en deux bronches, appelé carène; et se termine au niveau des canaux alvéolaires. De la trachée aux bronchioles respiratoires, il y a 23 divisions successives, où une bronche mère donne deux bronches filles (Ganong et Jobin 2012). A chaque division, le diamètre des bronches diminue de 15 à 20%. Ce système répond à une loi hydrodynamique qui permet l'optimisation du flux d'air au sein de l'arbre bronchique. Cet arbre est composé de deux zones qui diffèrent par leur rôle, une zone de conduction et une zone de transition et d'échanges gazeux (Martin, Vallet, et Riou 2017).

- Zone de conduction :

Cette zone comprend l'ensemble des bronches et bronchioles jusqu'à la 17<sup>ème</sup> génération. Sa principale fonction est de véhiculer l'air inspiré et de conditionner l'air en l'humidifiant et en le réchauffant grâce à la présence de la muqueuse. Cette zone ne participe pas aux échanges gazeux (Martin, Vallet, et Riou 2017).

- Zone de transition et d'échanges gazeux :

Cette zone est caractérisée par la présence d'alvéoles au niveau des parois des bronchioles. Le nombre d'alvéoles croît avec le nombre de divisions. Ces bronchioles respiratoires sont des unités fonctionnelles nommées acinus. Puis, après la 20<sup>ème</sup> génération, les bronchioles sont entièrement bordées d'alvéoles, on parle alors de canaux alvéolaires. Enfin, à partir de la 23<sup>ème</sup> génération, les sacs alvéolaires se forment. Les échanges gazeux peuvent avoir lieu au niveau des bronchioles respiratoires, des canaux alvéolaires ainsi qu'au niveau des sacs alvéolaires (Martin, Vallet, et Riou 2017).

## 2. Epithélium trachéo-bronchique

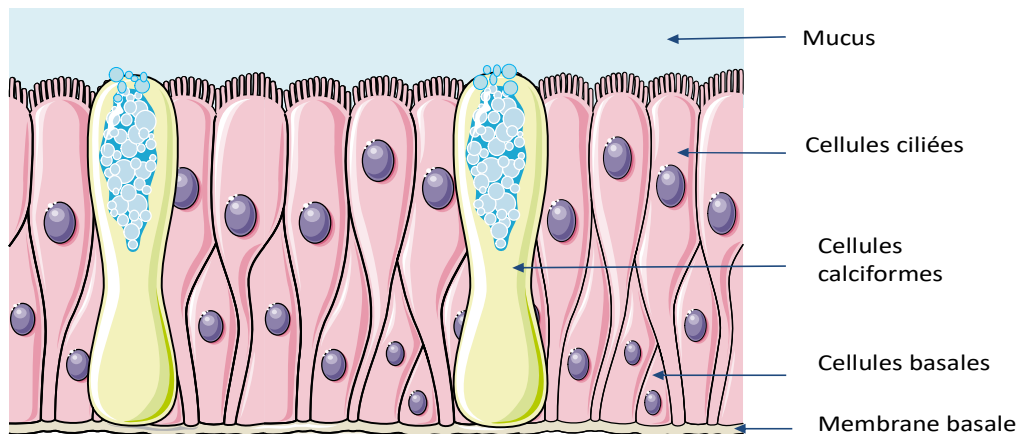
L'organisation morphologique et la composition cellulaire de l'épithélium varient selon le diamètre des voies aériennes. Au niveau trachéal, l'épithélium est pseudostratifié et devient unistratifié au fur et à mesure des divisions bronchiques. Toutes les cellules constituant cet épithélium, sont en contact avec la lame basale, mais seules certaines s'allongent jusqu'à la lumière bronchique. La lame basale repose, quant à elle, sur un chorion de tissu conjonctif, la *lamina propria*.

L'épithélium est constitué des plusieurs types cellulaires : des cellules ciliées, les plus abondantes, des cellules sécrétrices, dites cellules calciformes et cellules de Clara, ainsi que des cellules basales (Figure 3) (Martin, Vallet, et Riou 2017). **Les cellules ciliées** composent 50% de l'épithélium et possèdent des cils du côté apicale, environ 200 par cellules. Leur principale fonction est de lutter contre les agressions extérieures, grâce aux battements de leurs cils apicaux. Les cellules basales reposent sur la lame basale et n'atteignent pas la lumière bronchique. Elles ont pour fonction de régénérer l'épithélium après une agression (Guyton & Hall 2014).

Les cellules sécrétrices, dites **calciformes**, représentent quant à elles 25% de l'épithélium. Ces cellules ont au niveau apical, des vacuoles de sécrétions riches en mucine, MUC5B et MUC5AC,

pouvant être libérées en cas d'agression. Le mucus agit comme barrière physique, en retenant les particules inhalées et les pathogènes. L'association du mucus et des battements ciliaires entraîne le mécanisme de clairance mucociliaire (Bonser et Erle 2017).

Les **cellules de Clara** sont également des cellules sécrétrices et remplacent les cellules calciformes au niveau de la zone de transition et d'échanges gazeux (Martin, Vallet, et Riou 2017).



**Figure 3 : Ultra structure de l'épithélium bronchique.** Modifié à partir de <https://blogglophys.wordpress.com/2016/09/28/muqueuse-respiratoire>

### 3. Epithélium alvéolaire

Les alvéoles sont de petits sacs qui terminent les voies aériennes, où se produisent les échanges gazeux. Leur structure anatomique permet d'obtenir une grande surface d'échange gazeux avec une distance de diffusion minimale. Celle-ci se décompose en trois couches : l'épithélium alvéolaire, l'interstitium de faible épaisseur et l'endothélium. Parfois, dans les parties les plus fines, l'épithélium alvéolaire fusionne directement avec l'endothélium (Guyton & Hall 2014).

L'épithélium alvéolaire est composé de deux types de cellules épithéliales, 35% sont des pneumocytes de type I et 65% des pneumocytes de types II. Les **cellules de type I** sont plates et dotées de longs prolongements cytoplasmiques. Elles représentent 95 % des cellules tapissant la surface épithéliale alvéolaire. Grâce à leurs jonctions très spécifiques, ces cellules forment une barrière peu perméable aux agents hydrosolubles.

Par ailleurs, la surface apicale de ces cellules est recouverte d'un liquide ELF (Epithelial Lining Fluid) d'une épaisseur de 0,2 à 0,3µm.

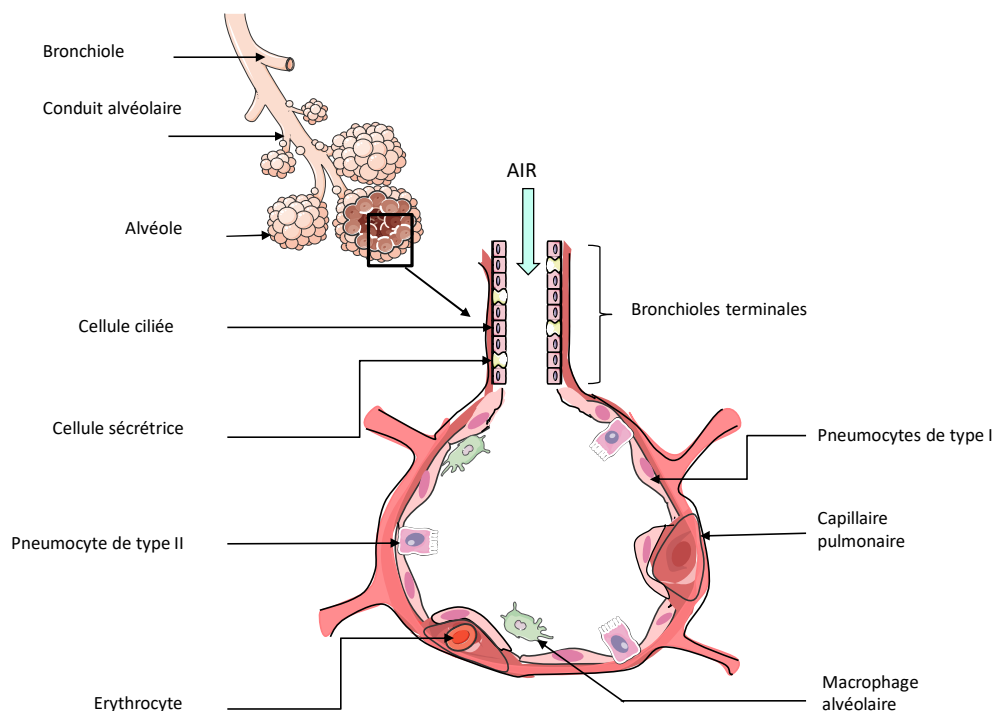
Cette couche liquidienne possède une phase aqueuse qui sépare l'épithélium de la phase lipidique hydrophobe, nommé le surfactant, située à l'interface gaz-liquide (Guyton & Hall 2014; Martin et al. 2017).

**Les cellules de type II**, sont des pneumocytes granuleux, qui contiennent de nombreux corps lamellaires d'inclusion. Leur principale fonction est de sécréter le surfactant qui assure le maintien de l'architecture pulmonaire et participe à la défense immunitaire innée.

Les pneumocytes de type II ne représentent que 5% de la surface des parois alvéolaires (Guyton & Hall 2014).

Enfin, l'épithélium pulmonaire contient des cellules immunitaires résidentes, les macrophages alvéolaires. Ils dérivent de monocytes de la micro vascularisation.

Ces monocytes vont traverser la barrière endothéliale, et ainsi se différencier pour prendre le phénotype de macrophage. Les macrophages sont des phagocytes, ils peuvent répondre de façon précoce à la présence d'agents toxiques et pathogènes afin de les éliminer. De par cette activité, ils participent donc à la réponse immunitaire non spécifique mais sont également aptes à stimuler une réponse immune (Martin et al. 2017).



**Figure 4 : Schéma des alvéoles pulmonaires et ultra structure d'une alvéole.** Modifié à partir de [https://www.researchgate.net/figure/Schema-des-alveoles-pulmonaires-humaines-et-de-lultrastructure-dune-alveole\\_fig6\\_275098995](https://www.researchgate.net/figure/Schema-des-alveoles-pulmonaires-humaines-et-de-lultrastructure-dune-alveole_fig6_275098995)

## B. Mécanismes de l'immunité des voies aériennes

Le rôle du système immunitaire est de contrôler l'invasion et la prolifération des agents pathogènes. L'immunité innée est la première ligne de défense contre ces agressions. Elle se caractérise par la mise en place de mécanismes pouvant être constitutifs et inductibles, avec des composantes physique, cellulaire et humorale (Jouan et al. 2016).

Au niveau pulmonaire, le premier opposant à l'infection est la barrière constituée par l'épithélium respiratoire. En effet, de par sa situation à l'interface entre le milieu intérieur tissulaire et la lumière des espaces aériens, il a un rôle majeur dans les mécanismes de défense. L'épithélium des voies respiratoires est au cœur de la défense microbienne pulmonaire et présente différents systèmes, de nature mécanique ou biologique, qui préviennent la colonisation par un agent pathogène. Les cellules épithéliales ciliées et les cellules sécrétrices de mucus constituent un mouvement mucociliaire permettant l'élimination mécanique de la majorité des pathogènes pulmonaires. Cependant, l'épithélium respiratoire ne se réduit pas à une fonction de barrière. Une très grande variété de mécanismes de défense de l'hôte peut également être mise en jeu par l'épithélium. Les cellules épithéliales ont notamment la capacité de réguler les réponses immunitaires innées et adaptatives grâce à la production de médiateurs spécifiques, secondaire à la reconnaissance de motifs portés par les microorganismes pathogènes (Jouan et al. 2016).

### 1. Fonction de barrière épithéliale

L'épithélium pulmonaire constitue une barrière mécanique de défense des voies respiratoires. Il limite l'entrée d'agents pathogènes et toxiques externes ; grâce à sa monocouche de cellules épithéliales polarisées. Celles-ci maintiennent leur intégrité par le biais de jonctions apicales complexes (AJC) (De Rose et al. 2018). Il en existe différents types: les jonctions serrées (TJs), les jonctions adhérentes (AJs) et les desmosomes (De Rose et al. 2018; Hallstrand et al. 2014). Les jonctions serrées (TJs), situées au pôle apical de la cellule, sont constituées de protéines de claudines, d'occludines, et de *zonula occludens* (ZO). Elles régulent principalement la perméabilité paracellulaire, les mouvements des ions et des solutés.

Elles permettent également de filtrer l'accès des cellules inflammatoires et de protéger l'entrée d'éventuelles substances toxiques ou pathogènes provenant de la lumière des espaces aériens (Jouan et al. 2016; Hallstrand et al. 2014; De Rose et al. 2018).

Puis, les jonctions adhérentes (AJs) situées en dessous des précédentes, utilisent des adhésions dépendantes au calcium, formées par des E-cadhérines homotypiques. Ces dernières sont stabilisées par des protéines d'ancrages de type caténine, comme la  $\beta$ -caténine et forment une interface avec le réseau de microtubules de la cellule et le cytosquelette d'actine. Ces jonctions d'ancrage permettent le maintien de la morphologie cellulaire. Elles sont également impliquées dans les voies de signalisation contrôlant la croissance, la morphologie et la différenciation cellulaire ainsi que l'activation de la voie Wnt par la  $\beta$ -caténine (De Rose et al. 2018; Hallstrand et al. 2014).

Enfin, les desmosomes situés au pôle basal de la cellule, assurent la solidité mécanique du tissu épithélial. Ils constituent des adhésions renforcées par des filaments intermédiaires entre cellules adjacentes. Ce type de jonctions peut également former des connexions avec la lame basale, dans ce cas on parle d'hémidesmosomes.

Toutes ces structures permettent ainsi de former une barrière physique efficace dont la finalité est de maintenir l'intégrité épithéliale (Hallstrand et al. 2014; Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2016).

## 2. Les mucines sécrétées : MUC5B et MUC5AC

### i. Protection épithéliale

A l'état normal, les cellules épithéliales sont recouvertes d'un film de mucus, qui assure leur protection. Ce mucus constitue la première ligne de défense de l'immunité innée, en piégeant les pathogènes et particules toxiques inhalées. Ces derniers sont expulsés des voies aériennes *via* l'aide des battements ciliaires. Ce phénomène est appelé clairance muco ciliaire (MCC) (Ha et Rogers 2016).

Le mucus est composé principalement de mucines qui sont codées par plusieurs gènes *MUC* (Ha et Rogers 2016). A ce jour, 21 gènes ont été identifiés, et répertoriés sous deux familles : les polymères de mucines sécrétées et les mucines attachées aux membranes (Ha et Rogers 2016; Ridley et Thornton 2018). La couche de gel périciliaire, environnant les cils, est principalement constitué de mucines dites « attachées », telles que MUC1, MUC4, MUC16 et MUC20. Cette couche de mucus permet le maintien de l'homéostasie autour des cils et le bon fonctionnement de la clairance mucociliaire (Ridley et Thornton 2018).

Les mucines retrouvées dans les voies aériennes, sont MUC2, MUC5B et MUC5AC. MUC2 est produit par l'épithélium et les glandes submucosales (Ha et Rogers 2016; Rogers 2007) mais est retrouvé en faible quantité dans les sécrétions bronchiques. (Rose et Voynow 2006). MUC5B est décrit comme étant sécrété par les glandes submucosales alors que MUC5AC est produite par les cellules calciformes (Ha et Rogers 2016; Rogers 2007; Ridley et Thornton 2018). Néanmoins, dans les voies aériennes les plus distales, MUC5B et MUC5AC sont produites par les cellules sécrétrices à la surface de l'épithélium (Ridley et Thornton 2018).

Les polymères de mucines sécrétés, MUC5B et MUC5AC, sont des protéines hautement glycosylées. Sur leur partie peptidique centrale, qui représente 80 à 85 % de leur masse, se situe de nombreux oligosaccharides liés aux multiples répétitions de sérine, proline et thréonine. En marge de leurs groupements O-glycane communs, MUC5AC est décrit comme étant plutôt fucosylé, alors que MUC5B possède plus d'acide sialique.

D'autre part, MUC5B possède deux glycoformes chargés différemment : une dite faible et l'autre dit fortement ; probablement due au niveau de sulfatation de chaque forme.

En outre, ces deux mucines sont riches en cystéines, domaines très conservés qui leur confèrent le pouvoir de former des réticulations grâce à des ponts disulfures (Ridley et Thornton 2018; Rose et Voynow 2006). Cependant, leurs rôles sont physiologiquement distincts. MUC5B est décrit comme essentiel pour le bon fonctionnement de la clairance mucociliaire, en contrôlant les défenses médiées par les macrophages et les infections bactériennes (Ha et Rogers 2016; Ridley et Thornton 2018; Roy et al. 2014; Evans et al. 2015). Tandis que MUC5AC jouerait un rôle important dans l'obstruction des voies aériennes, et dans l'hyperréactivité des pathologies allergiques (Evans et al. 2015).

#### ii. Hypersécrétion de mucus

Lors de maladies respiratoires obstructives, telles que l'asthme, la BPCO ou encore la mucoviscidose, la présence de mucus en excès contribue à l'obstruction des voies aériennes. Cette augmentation de mucus serait en partie due à l'hypertrophie des glandes submucosales et l'hyperplasie des cellules calciformes (Kramer et Clancy 2018; Bonser et Erle 2017; Ha et Rogers 2016; Zhou-Suckow et al. 2017; Barnes 2017).

Chez les patients asthmatiques, l'excès de production de l'IL-13, va contribuer à amplifier le nombre de cellules sécrétrices (Rose et Voynow 2006; Bonser et Erle 2017; Ha et Rogers 2016;

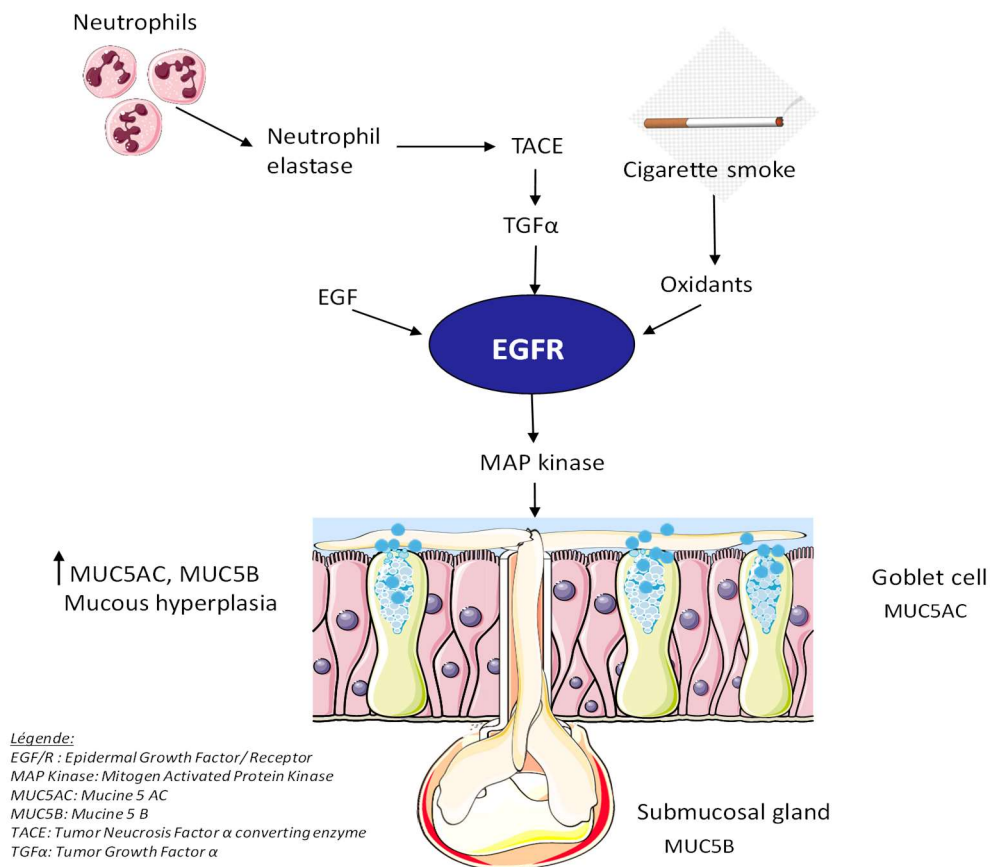
Zhou-Suckow et al. 2017). Ainsi, il existe un déséquilibre entre la production de MUC5B et MUC5AC (Shimura et al. 1996), où MUC5AC est produite en plus grande quantité que MUC5B, et MUC2 est absent des sécrétions (Rose et Voynow 2006; Bonser et Erle 2017; Ha et Rogers 2016; Zhou-Suckow et al. 2017). Par ailleurs, il semble que chez certains asthmatiques, le domaine extracellulaire de MUC5AC reste associé aux cellules productrices de mucus, favorisant un encombrement du lumen entraînant une défaillance de la clairance mucociliaire (Bonser et Erle 2017). L'accumulation de ces défaillances associées à l'hyperréactivité bronchique contribue à l'obstruction des voies aériennes (Ha et Rogers 2016; Williams et al. 2006; Bonser et Erle 2017).

Dans le cadre de la BPCO, l'élargissement des glandes submuqueuses va modifier la distribution cellulaire favorisant les cellules muqueuses (Ha et Rogers 2016). Les sécrétions de MUC5B et MUC5AC sont donc retrouvées en plus grandes quantités et modifient les propriétés viscoélastiques du mucus en le rendant plus visqueux (Barnes 2019b). La sécrétion de MUC2 est, quant à elle, augmentée bien qu'elle ne soit retrouvée qu'en faible quantité (Ha et Rogers 2016).

D'autre part, les cellules épithéliales des petites voies aériennes possèdent le récepteur à l'EGFR (*Epidermal Growth Factor*) activé (Barnes 2019b), et il semble être augmenté chez les patients BPCO.

Ce dernier joue un rôle important dans l'augmentation de la sécrétion de mucines (Barnes 2019b; 2016). Il peut être activé par le TNF- $\alpha$  mais aussi par le stress oxydatif ou encore l'élastase du neutrophile (NE) induit par l'inflammation chronique (Caramori et al. 2016; Barnes 2016).





**Figure 5 : Hypersécrétion de mucus et hyperplasie chez un patient BPCO.** Modifié à partir de Barnes: *inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease* (2016)

Enfin, concernant la mucoviscidose, la déshydratation et l'acidification de la surface de l'épithélium augmentent d'une part la concentration en MUC5B sous sa forme dite «faible» (Ridley et Thornton 2018) et d'autre part contribuent à l'attachement de MUC5AC aux cellules sécrétrices (Zhou-Suckow et al. 2017). L'augmentation de la viscoélasticité des expectorations pourrait également être amplifiée par d'autres composés comme l'actine et des fragments d'ADN ou encore des bactéries (Rubin 2007; Ridley et Thornton 2018).

Il s'en suivra une modification de la pression osmotique sur l'espace périciliaire entraînant la détérioration des cils, ainsi qu'une défaillance de la clairance muco ciliaire, contribuant à obstruer l'espace aérien. La surproduction de mucine contribue à la mortalité et la morbidité dans ce type de pathologies (Ridley et Thornton 2018; Rubin 2007; Zhou-Suckow et al. 2017).

### 3. Mécanismes de reconnaissance des signaux de dangers

La réponse de l'immunité innée met en jeu des récepteurs spécifiques, les PRRs (Pattern Recognition Receptors), dont sont pourvues les cellules épithéliales. Ces récepteurs sont pré-déterminés à reconnaître les signaux de dangers : comme les PAMPS (Pathogen associated molecular pattern), correspondant aux motifs moléculaires des pathogènes mais aussi les DAMPS (Damage associated molecular pattern), molécules produites de manière endogène par les cellules endommagées lors d'un stress physiologique (Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2016). Lorsque ces PRRs sont activés, un réseau de plusieurs voies de signalisation se met en place aboutissant à la production de médiateurs inflammatoires (Bérubé et al. 2009). Il existe plusieurs catégories de PRRs : les récepteurs transmembranaires de type TLRs (*Toll-like receptor*), ainsi que les protéines cytosoliques comme les NLRs (*Nucleotid-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*), les RLRs (*Retinoid acid-inductible gene-1 (RIGI)-like receptors*), et enfin les CLR (C-type lectin receptors) (De Rose et al. 2018; Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2016; Hallstrand et al. 2014).

#### i. Les *Toll-like receptors*

Le récepteur Toll a initialement été décrit chez la drosophile en 1996. A ce jour, 13 molécules de TLRs ont été retrouvés chez les mammifères, dont 10 décrites chez l'homme (Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2016). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires, qui peuvent être situés au niveau de la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) mais aussi dans les compartiments intracellulaires tels que les endosomes (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) (Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2016). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales tout le long des voies aériennes, au niveau trachéale, bronchique et alvéolaire de type II (De Rose et al. 2018; Hallstrand et al. 2014) et plus particulièrement pour TLR2 et 4 fonctionnels sur les cellules épithéliales alvéolaires primaires ainsi que TLR3 et 5 rapportés dans la lignée cellulaire A549 (Hallstrand et al. 2014).

Chaque type de TLR peut se lier sélectivement à son ligand. Les PAMPS sont reconnus par les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6. La flagelline, quant à elle, est l'agoniste du TLR5 et les ARNs viraux sont reconnus par les TLR3, TLR7 et TLR8 (Hallstrand et al. 2014). Concernant le TLR9, il se lie au motif CpG de l'ADN non-méthylé bactérien, et enfin pour le TLR10 son ligand spécifique

n'est pas encore déterminé (Hallstrand et al. 2014). Au contact du ligand, les deux molécules de TLRs vont se dimériser et induire l'activation de plusieurs voies de signalisation.

La majorité des TLRs, utilisent les protéines adaptatrices *Myeloid differentiation factor 88* (MyD88) conduisant à l'activation de la voie NFκB, et de la voie *Interferon Regulatory Factor 5/7* (IRF5/7).

La première est impliquée dans l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires ; quant à la deuxième, elle cible plus particulièrement la production d'interféron de type I (IFN-α et IFN-β).

Pour le TLR de type 3, il n'utilise pas la protéine MyD88, mais induit l'activation de la voie de signalisation IRF3, également impliquée dans l'expression des interférons de type I (Delneste, Beauvillain, et Jeannin 2007).

Les TLRs jouent donc un rôle important dans la réponse inflammatoire dirigée contre les agressions bactériennes et virales (Hallstrand et al. 2014; Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2016). Par ailleurs, des études sur l'inhibition de l'expression de TLR4 et de MyD88 chez les patients BPCO, affecterait l'expression de multiples cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α , INF-γ, mais aussi des agents remodelant tel que MMP-1 (Matrix Métallo Protéinase 1) (Ekman et Cardell 2010; Dutta, Chinnapaiyan, et Unwalla 2019).

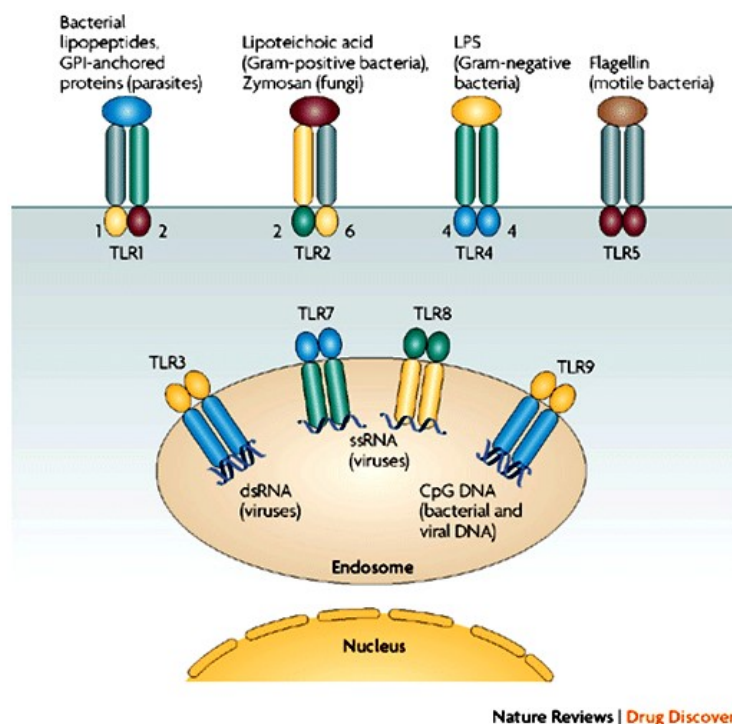


Figure 6 : Activation des TLRs. D'après Border et al 2007, Nature review

### ii. Les NOD-like receptors

Les NLRs sont des récepteurs cytosoliques, dont environ 20 membres ont été décrits chez l'Homme (Ekman et Cardell 2010; Wilmanski, Petnicki-Ocwieja, et Kobayashi 2008). Parmi ces NLRs, les plus décrits sont NOD1 (*Nucleotid-binding oligomerization domain 1*), NOD2 et NLRP3 (*NACHT-LRR-PYD-containing protein 3*). NOD1 et NOD2 reconnaissent le peptidoglycane des bactéries, et peuvent induire une réponse inflammatoire *via* le facteur NFκB.

Quant à NLRP3, il est capable de reconnaître les signaux de dangers tels que le lipopolysaccharide (LPS), les cristaux d'acides uriques mais aussi les particules bactériennes et virales ; provenant de l'extérieur et alertant le système immunitaire.

Les NLRs peuvent être exprimés par les cellules épithéliales des voies aériennes (De Rose et al. 2018), et seraient impliqués dans diverses maladies immunologiques comme la maladie de Crohn ou encore l'asthme (Ekman et Cardell 2010).

### iii. Les RIG-like receptors

Les RLRs sont des récepteurs cytosoliques à domaine hélicase, capables de détecter les ARNs viraux, et sont exprimés par les cellules épithéliales des voies aériennes (Hallstrand et al. 2014). RIG-1 (*Retinoic acid Inductible-1*) et le MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*) peuvent d'induire la production de l'Interféron de type 1 (IFN I), comme réponse anti-virale (Hallstrand et al. 2014). Ils peuvent également interagir *via* leur domaine CARD (*Caspase Recruitment domain*) avec l'IPS-1 (*Interferon β promoter stimulator 1*) pour induire l'activation des voies NFκB et IRF (*Interferon Regulatory Factor*), protégeant les cellules des infections virales (Kawai et al. 2005). Par ailleurs, il est décrit que RIG-1 reconnaît préférentiellement l'extrémité 5' triphosphate dans les ARNs viraux simple brin, ainsi que les petits ARNs viraux double brin, contrairement à MDA5, qui détecte plus particulièrement les longs doubles brins d'ARN viraux. Ainsi, ces deux récepteurs sont complémentaires dans la lutte contre les agressions virales (Hallstrand et al. 2014).

### iv. Les C-type lectin receptors

Les lectines de type C sont exprimées principalement par les cellules dendritiques. Leur principale fonction est de détecter les oligosaccharides, présents chez les espèces fongiques ; comme la dectin-1, impliquée dans la reconnaissance du Beta-glucan de *Aspergillus fumigatus* ou présent dans les HDM (*House dust mite*) (De Rose et al. 2018). Ces récepteurs sont capables

de stimuler le système immunitaire en induisant l'internalisation et la dégradation du pathogène.

#### 4. Les médiateurs inflammatoires

Après activation des PPRs, les cellules épithéliales vont sécréter des médiateurs inflammatoires comme des cytokines pro-inflammatoires mais aussi des chimiokines. Ces dernières vont permettre le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection. Les cytokines sont des substances de communication solubles synthétisées par les cellules épithéliales. Dans les pathologies comme l'asthme, la BPCO ou encore la mucoviscidose, l'inflammation y joue une place centrale. Par conséquent, le rôle des cytokines est donc très important dans la physiopathologie.

Il existe plusieurs types de cytokines, celles dites Th2 comme l'IL-5, IL-9 et IL-13, surtout présentes chez les asthmatiques. Elles sont responsables de l'inflammation de type allergique. Alors que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires, dites de type Th1. Ces dernières participent à l'inflammation des patients BPCO et lors de la mucoviscidose, mais aussi chez certains patients asthmatiques dit sévères (Barnes 2017; Kuruvilla, Lee, et Lee 2019).

##### i. Les cytokines Th2

Les cytokines de type Th2, telles que l'IL-4-5-9 et 13 sont retrouvées principalement chez les patients asthmatiques. Elles sont dues à l'accumulation des lymphocytes CD4+T helper2, dans leurs voies aériennes. A propos de l'IL-4, cette cytokine joue un rôle important pour l'inflammation de type Th2 puisqu'elle intervient dans la différenciation des lymphocytes Th0 en Th2, ce qui est primordial pour la sensibilisation à l'allergène. D'un autre côté, accompagnée de l'IL-13, elle est capable d'activer les lymphocytes B afin d'augmenter la sécrétion en IgE, et de promouvoir l'inflammation de type éosinophile. Ces deux interleukines possèdent un récepteur commun : IL-4R $\alpha$ , qui une fois activé entraîne la transcription du facteur STAT-6 (*signal transducer and activator of transcription 6*), mais seule IL-13, est nécessaire à la métaplasie des muqueuses chez les modèles animaux allergiques (Williams et al. 2006). IL-13 est ainsi décrite comme impliquée dans l'hypersécrétion de mucus, l'hyperréactivité bronchique, mais aussi dans la fibrose des voies aériennes (Barnes 2018). Son

niveau est également augmenté dans les voies aériennes de patients asthmatiques alors qu'elle semble diminuée chez les patients BPCO sévères (Barnes 2008).

#### ii. Les cytokines Th1

Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 sont retrouvées augmentées dans les expectorations forcées et le BALF (*Bronchoalveolar Lavage Fluid*) des patients BPCO et asthmatiques. Ces cytokines amplifient l'inflammation *via* la voie NF $\kappa$ B qui régule l'expression de nombreux gènes d'inflammation (Barnes 2008). De plus, le TNF- $\alpha$  est sécrété par de nombreuses cellules inflammatoires, mais aussi les cellules épithéliales et celles du muscle lisse des voies aériennes. Chez les patients sains, le TNF- $\alpha$  participe à l'inflammation médiée par les neutrophiles. Néanmoins, il est retrouvé aussi chez les asthmatiques et serait impliqué dans l'hyperréactivité bronchique où il influe sur la contraction du muscle lisse. De plus, *via* sa sécrétion par les mastocytes, le TNF- $\alpha$  contribue également à amplifier l'inflammation par la voie NF $\kappa$ B (Barnes 2008). Quant à l'IL-1 $\beta$ , c'est une des premières cytokines à être activée durant l'inflammation. Chez les patients asthmatiques, son expression est augmentée dans les voies aériennes. Ainsi, elle participe à l'amplification de l'inflammation en activant plusieurs gènes inflammatoires exprimés dans l'asthme. Chez les patients BPCO, l'IL-1 $\beta$  induit l'activation des macrophages, entraînant la sécrétion de cytokines, chimiokines mais aussi de MMP-9 (Barnes 2008). En outre, l'IL-1 $\beta$  peut aussi induire l'augmentation de l'expression de MUC5AC dans plusieurs lignées cellulaires comme les cellules HNE (*Human Nasal Epithelial*), HBE (*Human Bronchial Epithelial*) mais aussi des lignées cancéreuses bronchiques NCI H292 et alvéolaires A549 (Chen et al. 2014).

#### iii. Les chimiokines

Les chimiokines font partie de la famille des cytokines. Elles sont de faible poids moléculaire (8 à 15 kDa). Pour la plupart, ces médiateurs sont classés selon la position relative des deux premiers résidus cystéines situés à l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique.

Les  $\alpha$ -chimiokines possèdent leurs deux cystéines séparées par un autre acide aminé (CXC) et les  $\beta$ -chimiokines ont leurs deux premières cystéines de la chaîne adjacentes (CC) (Koelink et al. 2012; Bhusal, Foster, et Stone 2020). Il existe également d'autres familles de chimiokines : notées C ( $\gamma$ -chimiokines) qui ne contiennent qu'un seul résidu de cystéine et les CX<sub>3</sub>C (les  $\delta$ -chimiokines), dont leurs résidus de cystéines sont séparés par 3 acides aminés (Laing et

Secombes 2004). Ces molécules sont fortement impliquées dans le trafic et l'activation cellulaire dans les conditions physiologiques mais aussi pathologiques.

Les chimiokines sont initialement traduites en une séquence d'environ 23 acides aminés, qui sera clivée avant la sécrétion de la forme mature (Stone et al. 2017). Ainsi, une fois matures, elles peuvent être activées *via* leurs récepteurs couplés à une protéine G. Ces récepteurs sont classés en deux grands groupes les CCRs (*Chemokine-Chemokine-Receptors*), et les CXCRs (*Chemokine-X-Chemokine-Receptors*), présents sur de nombreux types cellulaires. L'interaction entre la chimiokine et son récepteur entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et ainsi provoque la migration des cellules cibles sur le site de l'inflammation (Bhusal et al. 2020; Jouan et al. 2016; Hallstrand et al. 2014; Koelink et al. 2012).

Les chimiokines CXC ont une particularité qui permet de les différencier en deux sous-groupes : celles ayant un motif ELR adjacent au motif CXC et les autres. Cette particularité leur confère le pouvoir d'adhérence aux polynucléaires neutrophiles.

Par ailleurs, elles répondent à de multiples stimuli comme les cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 ou le TNF- $\alpha$  (Laing et Secombes 2004). La fumée de cigarette peut induire une réaction inflammatoire au sein des voies aériennes, en activant les cellules épithéliales ainsi que les macrophages (Shin et al. 2018). Ces cellules peuvent produire des chimiokines telles que CXCL8/IL-8, CXCL1/Gro- $\alpha$  et CCL2/MCP-1. Ces trois chimiokines participent à l'inflammation des voies aériennes (Barnes 2017).

#### (1) L'Interleukine 8 : CXCL8/IL-8

La chimiokine CXCL8/IL-8 (interleukine 8) est produite en particulier par les cellules épithéliales et les macrophages mais aussi les polynucléaires neutrophiles (Koelink et al. 2012). Le rôle principal de CXCL8 est d'assurer le recrutement des polynucléaires neutrophiles, mais aussi des monocytes, des basophiles et des lymphocytes T sur le site de l'inflammation grâce à son pouvoir chimiotactique.

Cette chimiokine peut être sécrétée suite à des infections bactériennes et virales, mais aussi par des agents toxiques tels que les espèces réactives de l'oxygène ou encore la fumée de cigarette (De Rose et al. 2018). Ces différents stimuli peuvent activer plusieurs voies de signalisation, impliquant les voies MAP Kinases, le récepteur EGFR, mais aussi des facteurs de transcription tel que NF $\kappa$ B, qui peuvent induire la synthèse de CXCL8 par les cellules

épithéliales (Burgel et Nadel 2008; Koff et al. 2008; Montalbano et al. 2016). D'ailleurs, certaines cytokines, comme par exemple l'IL-17A, peuvent aussi promouvoir sa sécrétion de façon dépendante à l'activation de la voie NFκB dans les cellules HBE (Montalbano et al. 2016). Le CXCL8 interagit avec ces cellules grâce à deux récepteurs, CXCR1 et CXCR2. D'ailleurs, ces deux récepteurs sont plus exprimés chez les patients atteints de BPCO (Koelink et al. 2012; Barnes 2008). CXCL8 joue un rôle crucial dans le recrutement des cellules inflammatoires au sein des voies aériennes des patients BPCO (Barnes 2004). Son augmentation est corrélée à celle des polynucléaires neutrophiles (Barnes 2008), dont leur nombre est amplifié dans les expectorations forcées et les BALF de patients BPCO et asthmatiques sévères (Koelink et al. 2012; Barnes 2008). Il est également décrit que les exacerbations engendrent l'augmentation de cette chimiokine (Barnes 2008) qui peut entraîner l'accumulation de neutrophiles (Barnes 2008; Folkerts et al. 2008). De même chez les enfants atteints de mucoviscidose, le taux en CXCL8 est élevé, conséquence du dysfonctionnement du canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) mais aussi d'infection par des agents pathogènes (De Rose et al. 2018).

### (2) *Growth Related Oncogen-a: CXCL1/ GROα*

La CXCL1/GRO-α (*growth related oncogene α*) est une α-chimiokine, comme CXCL8. Elle est produite par de nombreuses cellules, comme les cellules épithéliales ou encore les macrophages. Elle joue un rôle important dans l'inflammation comme chimio-attractant pour les neutrophiles et les monocytes grâce au récepteur CXCR2 (Koeling et al. 2012). D'ailleurs, CXCR2 est retrouvé de façon plus importante dans les biopsies bronchiques de patients BPCO (Koelink et al. 2012). D'un côté, CXCL1 semble induire plus de chimiotactisme des monocytes chez les patients BPCO que chez les fumeurs non atteints par cette pathologie, reflétant l'importance du turn-over et l'accumulation des monocytes chez ces patients (Barnes 2017). D'un autre côté, l'amplification du nombre de neutrophiles dans les BALF et expectorations forcées des patients BPCO, induit également l'augmentation de production de CXCL1 comme pour CXCL8 (Koelink et al. 2012; Chen et al. 2014; Barnes 2008).

### (3) *Monocyte Chemotactic protein 1 : CCL2 / MCP-1*

CCL2/MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) est une β-chimiokine. Cette famille de chimiokines est divisée en plusieurs sous-groupes, comprenant celui des allergéniques dont

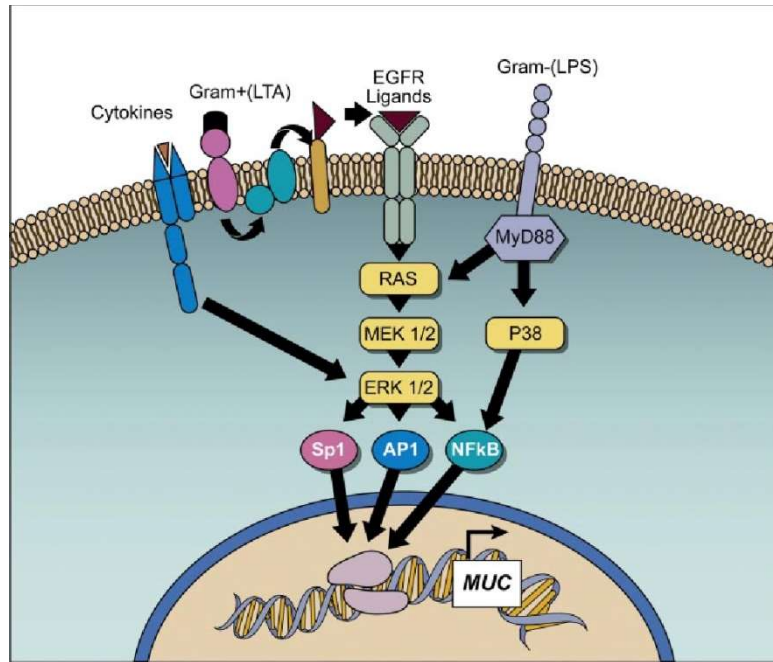


fait partie CCL2 (Laing et Secombes 2004). Elle est produite par une grande variété de cellules telles que les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales, etc. Il s'agit d'un puissant facteur chimiotactique des monocytes et des lymphocytes T *via* leur récepteur CCR2.

CCL2/MCP-1 peut être induit par divers stimuli, comme Interleukine 1 (IL-1), Tumeur necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ainsi que le LPS (LipoPolySaccharide) des bactéries Gram-. Cette chimiokine est également décrite comme stimulant la prolifération de cellules BECs, et donc pourrait être un agent important dans la réparation tissulaire des voies aériennes (Lundien et al. 2002). Par ailleurs, CCL2/ MCP-1 et son récepteur CCR2 sont retrouvés en plus grande quantité dans les BALF et expectorations des patients BPCO. Cette chimiokine pourrait être impliquée dans l'accumulation de macrophage au sein des poumons de ces patients, grâce à son pouvoir chimio-attractant des monocytes (Koelink et al. 2012; Barnes 2008).

#### 5. Les voies de signalisation impliquées dans les physiopathologies pulmonaires

Les facteurs environnementaux tels que la fumée de cigarette, la pollution, mais aussi les signaux internes comme les cytokines, les facteurs de croissance ou encore le stress oxydatif, peuvent activer différentes voies de signalisation impliquées dans la production de cytokines et de mucus. Lors de pathologies respiratoires obstructives, ces productions sont médiées plus particulièrement par les voies MAP Kinases (ERK1/2 et p38) et le facteur de transcription NF $\kappa$ B. L'activation de l'EGFR, du TLR, et des récepteurs à cytokines sont les principaux initiateurs de ces différentes voies de signalisation (Figure 7).



**Figure 7 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation des gènes *MUC*.** D'après Rose et Voynow 2006

#### i. La voie de signalisation impliquant l'EGFR

La voie de signalisation impliquant l'EGFR participe aux processus de protection et répartition de la barrière épithéliale. L'EGFR appartient à la famille des ErbB comprenant quatre récepteurs transmembranaires : EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Ces récepteurs comprennent trois domaines : un site de liaison au ligand au niveau extracellulaire, un domaine transmembranaire, ainsi qu'un domaine tyrosine kinase intracellulaire. Après liaison avec son ligand, les récepteurs ErbB vont s'homo-ou-hétérodimériser, entraînant la transphosphorylation des résidus tyrosine et son activation (Burgel et Nadel 2008). L'activation de l'EGFR peut se faire directement par liaison spécifique avec son ligand, comme pour le TGF- $\alpha$ , l'amphiréguline, mais aussi l'Héparine-binding (HB), l'héréguline, et la betacelluline. Néanmoins, son activation peut également être induite de manière indirecte, comme avec les ligands des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), tels que la thrombine, l'IL-8 ou encore l'endotheline-1. Les RCPG activés vont induire la sécrétion de pro-ligands par les cellules épithéliales des voies respiratoires. Ces pro-ligands sont ancrés à la membrane et nécessitent d'être clivés par des métalloprotéases, telle que TACE (*Tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme*), afin qu'ils puissent être solubles et activer le récepteur de l'EGF (Burgel et Nadel 2008).

L'activation de ce récepteur joue un rôle important dans la production de mucine et de certains médiateurs inflammatoires. En réponse à divers stimuli, comme la fumée de cigarette, l'élastase du neutrophile ou encore le LPS, l'activation de la voie à l'EGFR participe à l'induction de mucine par les cellules épithéliales des voies aériennes (Shao et al. 2004; Burgel et Nadel 2008). Par ailleurs, certaines cellules inflammatoires, telles que les éosinophiles ou encore les mastocytes semblent pouvoir induire la production de mucus par le biais de l'EGFR (Burgel et Nadel 2008). Certains auteurs suggèrent même que les ROS (Reactive oxygen species) produits par le stress oxydatif seraient capables d'activer la phosphorylation du domaine tyrosine de l'EGFR sans passer par la liaison avec un ligand (Kanai et al. 2015). Ainsi la production de mucine induite par l'activation de l'EGFR, semble être promue par les deux types d'activation de ce récepteur, c'est à dire de manière dépendante et indépendante aux ligands de l'EGFR (Kanai et al. 2015).

D'un autre côté, l'EGFR est décrit comme étant également impliqué dans le processus de synthèse de la chimiokine CXCL8, chémoattractant des neutrophiles.

Ces cellules sont fortement impliquées dans la physiopathologie des maladies respiratoires comme l'asthme sévère, la BPCO ou encore la mucoviscidose.

D'ailleurs, l'expression de l'EGFR est faible dans les épithéliums pulmonaires sains, alors qu'elle est augmentée dans celui de patients asthmatiques, BPCO et atteints de mucoviscidose mais aussi chez certains fumeurs avec des fonctions pulmonaires normales (Burgel et Nadel 2008). En outre, l'augmentation de la concentration en TGF- $\alpha$  et en EGF, ligands de l'EGFR, est décrite comme conduisant à l'augmentation de CXCL8, suggérant l'implication de ce récepteur. De plus, certains auteurs ont montré que le LPS et l'élastase du neutrophile induiraient en plus de la synthèse de mucine, celle de CXCL8, également par la voie EGFR, et ce par l'activation Duox1 (Burgel et Nadel 2008). Toutes ces données suggèrent donc un rôle important de l'activation de l'EGFR dans la physiopathologie des maladies chroniques des voies respiratoires.

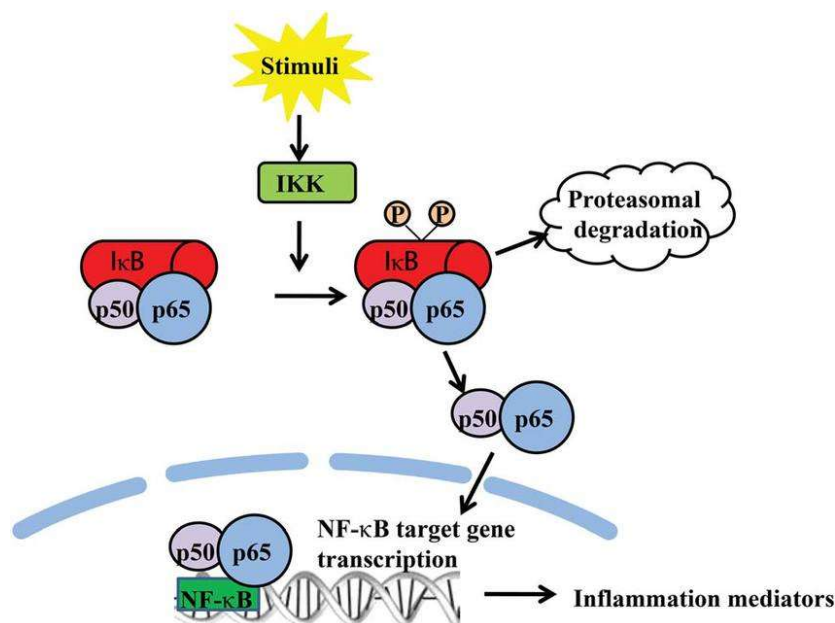
## ii. Nuclear Factor Kappa B

Le facteur NF $\kappa$ B est impliqué dans la régulation de divers processus liés à l'inflammation, l'immunité, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Doyle et O'Neill 2006). NF $\kappa$ B est un dimère pouvant être formé à partir de cinq sous unités : p50, p52, p65, RelB et c-Rel. La forme la plus commune est l'hétérodimère p50-p65. Ces sous unités sont constituées d'un domaine

conservé : *Rel Homology Domain* (RHD) contenant un site de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation, et un signal de localisation nucléaire (Hatada et al. 2006). NFκB répond à un large spectre de stimuli, comme des agents infectieux bactériens et viraux, mais aussi des agents chimiques ainsi que le stress cellulaire.

Dans les conditions physiologiques normales, NFκB est régulé par une molécule inhibitrice IκB, qui se lie et retient le facteur de transcription dans le cytoplasme de la cellule. Lors d'un stress ou d'une agression de la cellule, des signaux vont activer le complexe IKK comprenant IKKα et IKKβ. Ces kinases vont phosphoryler l'inhibiteur, qui sera envoyé pour destruction au protéasome 26S après ubiquitination.

Par conséquent, NFκB est libéré, et peut migrer vers le noyau afin de se lier et d'activer les promoteurs de ses gènes cibles (Hatada et al. 2006). La voie NFκB est impliquée dans la production de nombreux médiateurs inflammatoires comme de CXCL8, l'IL-1β, le TNF-α mais aussi des MMPs. NFκB est activé au niveau des cellules épithéliales et de macrophages de patients BPCO (Barnes et Hansel 2004, 20).

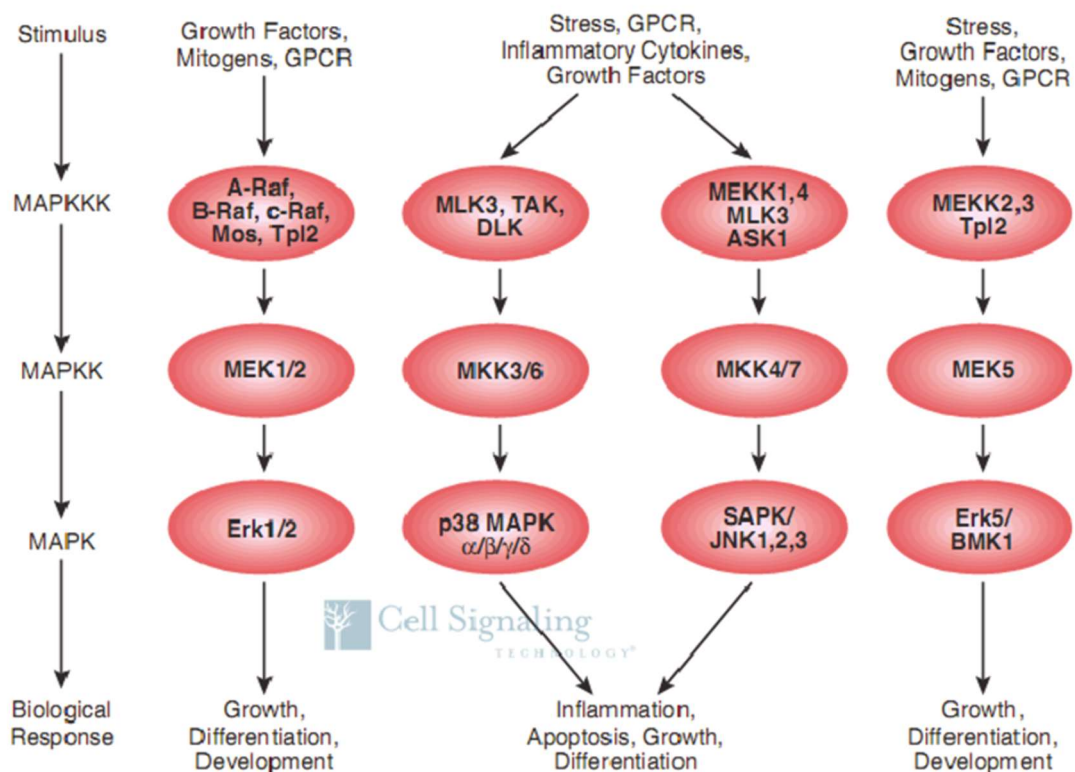


**Figure 8 : Schéma de la voie d'activation du facteur NFκB.** D'après *Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health* de Zheng Sun 2014

### iii. Les voies Mitogen Activated Protein Kinase

Les voies MAP Kinases sont activées par de nombreux stimuli comme les virus, bactéries, facteur de croissance et hormones. Elles constituent une cascade d'activation par phosphorylation de sérines/thréonine kinase, amplifiant le signal capté à la membrane cellulaire, jusqu'à sa transmission dans le noyau. Enfin, le signal induira l'activation de facteurs de transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et l'inflammation (Abdock et al. 2006).

Il existe plusieurs voies MAPK (Figure 9), ici nous n'aborderons que les voies ERK1/2 et p38 MAPK, qui semblent être les plus affectées par l'exposition à la fumée de cigarette (Liang et al. 2018).



**Figure 9 : Schéma simplifié des cascades d'activation des voies Mitogen Activated Protein Kinase.** D'après Cell Signalling Technology

#### (1) La voie Extracellular signal-regulated kinase : ERK1/2

La voie ERK1/2 est activée suite à la fixation de l'EGF sur le domaine tyrosine Kinase de son récepteur (EGFR), entraîne l'activation du complexe Ras-GTP. Ce dernier active Raf-1, qui est

une MAPKKK, qui induit la phosphorylation de MEK puis de ERK. Les facteurs de transcription phosphorylés par ERK inclus : Elk-1, Ap-1, Ets et SP-1 (Arabipour et al. 2019).

D'autres manières d'activer la voie ERK sont possibles, comme avec la présence de PAMPS ou de DAMPS, mais aussi des cytokines pro-inflammatoires. La fumée de cigarette entraîne l'activation de la voie ERK1/2, par le biais de l'EGFR, induisant plusieurs facteurs de transcription, dont ceux impliqués dans l'expression de MUC5AC, les MMP-1 mais aussi les sécrétions de ligands à l'EGFR (Arabipour et al. 2019). Les MAP Kinases ERK1/2 participent à l'induction de MUC5AC dans les cellules épithéliales des voies aériennes.

Divers stimuli comme des neuropeptides responsables de la migration des cellules inflammatoires (Xu et al. 2014), des cytokines (Song et al. 2003) ou encore le benzoapyrène (Chiba et al. 2011b) peuvent induire la production de MUC5AC *via* la voie ERK1/2.

## (2) *p38 Mitogen activated Protein Kinase*

L'activation de p38 MAPK est induit principalement par des stress intracellulaires tel que le choc osmotique, les UV, les ligands des récepteurs couplés aux protéines G et les hormones (Arabipour et al. 2019). Lorsque p38 est activée, elle favorise l'action de plusieurs facteurs de transcriptions : ATF-2, CREB, STAT-3, Elk-1, c-Myc et NFκB. La famille de p38 est constituée de quatre enzymes, p38α, p38β, p38γ et p38δ. Cette voie est impliquée dans la régulation de l'inflammation induite par le TNF. (Arabipour et al. 2019). Elle participe à la synthèse de cytokines par les cellules inflammatoires (Arabipour et al. 2019). De plus, l'activation de ERK1/2 et p38 MAP kinase, jouerait un rôle important dans l'induction de MUC5AC après stimulation par des cytokines telles que l'IL-1β et le TNF-α (Song et al. 2003).

### C. Pathologies des voies respiratoires

Les maladies respiratoires telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, la mucoviscidose, le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA), le cancer bronchopulmonaire sont parmi les causes les plus représentatives de la mortalité et de la morbidité dans le monde (> 20%) selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Ces pathologies respiratoires sont responsables de la détérioration des voies aériennes, en affectant les bronches, les voies nasales ainsi que les poumons. Elles peuvent être classées comme aiguës (la pneumonie et la bronchite), mais également comme chroniques (l'asthme, la mucoviscidose ou la BPCO) (De Rose et al. 2018; Barnes 2017). Ces trois pathologies chroniques sont également obstructives. Elles sont caractérisées par une inflammation persistante des poumons, avec une production excessive de mucus, participant à l'obstruction des voies aériennes.

#### 1. L'Asthme

L'asthme est une pathologie très répandue dans les pays développés, elle touche plus de 10% des personnes adultes (Barnes 2017). Elle débute généralement durant l'enfance, et semble être la conséquence de facteurs combinés, comme la pollution ou le tabac, mais aussi des prédispositions génétiques, ainsi qu'une probable défaillance du microbiote pulmonaire ou de ces métabolites (Mims 2015).

Cette pathologie est principalement caractérisée par une inflammation chronique allergique, dite Th2. Elle s'étend de la trachée aux voies aériennes périphériques. L'inflammation est déclenchée par des allergènes tels que les produits irritants, l'air froid, ou encore les stimulants.

Celui-ci est pris en charge par les cellules dendritiques, qui une fois activées favorisent le recrutement de cellules de type Th2, telles que les lymphocytes CD4+Thelper-2, et les Cellules Lymphoïdes Innées du groupe 2 (ILC2). Ces cellules ont la capacité de produire des cytokines telles que l'interleukine (IL)-4, IL-5, IL-9 et IL-13 (Barnes 2018). Ces interleukines vont induire une persistance dans l'inflammation allergique par leurs multiples effets (Figure 10). Tout d'abord, la libération d'IL-4 favorise la différenciation des cellules Th0 en Th2, mais peut aussi entraîner, comme l'IL-13, l'activation des lymphocytes B, promouvant la synthèse d'IgE. Ainsi, cette libération d'IgE va conduire à la dégranulation des mastocytes. Par ailleurs, l'IL-13 peut

également agir sur les cellules épithéliales bronchiques en potentialisant l'hyperréactivité bronchique, mais aussi en favorisant l'hypersécrétion de mucus (Barnes 2008; 2018).

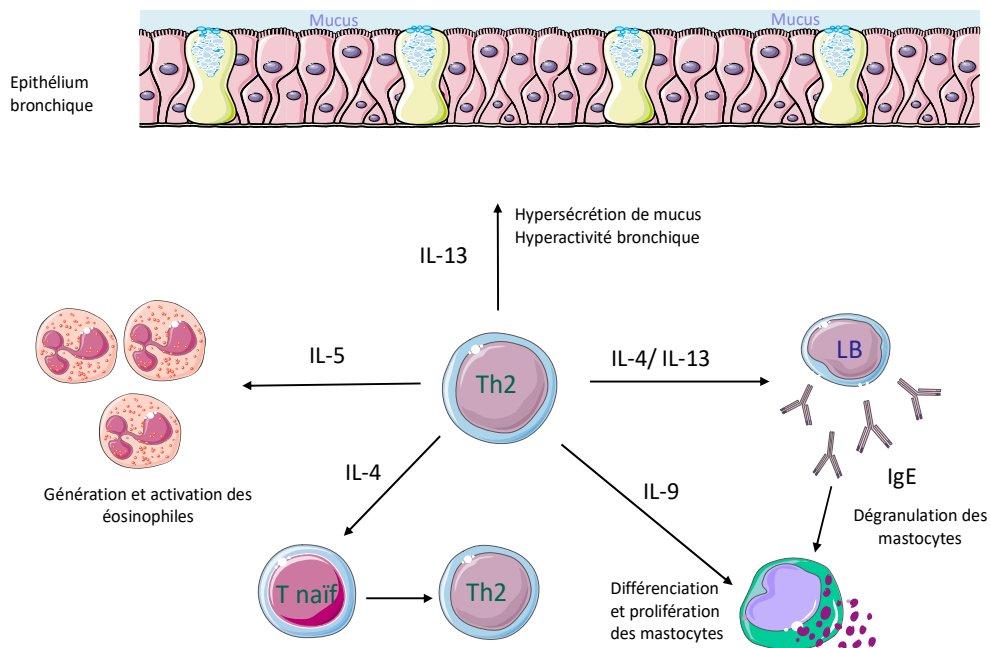
Enfin l'IL-5, accentue la différenciation des éosinophiles chez les cellules précurseurs, et prolonge leur survie, alors que l'IL-9 joue un rôle important dans la différenciation et prolifération des mastocytes (Barnes 2008; 2018).

La dégranulation des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes conduit à la contraction du muscle lisse des bronches entraînant une dyspnée et une respiration sifflante. Cette contraction est réversible et est généralement traitée par inhalation des bronchodilatateurs et de corticostéroïdes. Cette pathologie s'accompagne d'une accumulation de mucus dans les voies aériennes, en partie due à l'augmentation du nombre de cellules sécrétrices chez les patients asthmatiques (Bonser et Erle 2017).

La majorité des patients asthmatiques appartiennent à ce phénotype, dit T2 lié à l'inflammation Th2 (Barnes 2017). Cependant, certains patients asthmatiques possèdent un phénotype différent nommé non-T2. Il est associé une inflammation présentant une majorité de cellules neutrophiles, avec l'activation de cellules inflammatoires Th1 et /ou Th17 (Kuruville et al. 2019).

La mortalité par asthme a diminué, bien qu'il soit dénombré encore 851 décès en France en 2014, selon l'Agence Santé Publique France. Par ailleurs, des crises aiguës chez les asthmatiques, peuvent engager le pronostic vital et nécessiter une hospitalisation du patient.





**Figure 10 : Rôle des cellules Th2 dans l'asthme.** Modifié à partir de <https://www.biologiemaroc.com/2017/08/asthme-allergique-memoire-de-fin-detude.html>

## 2. Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

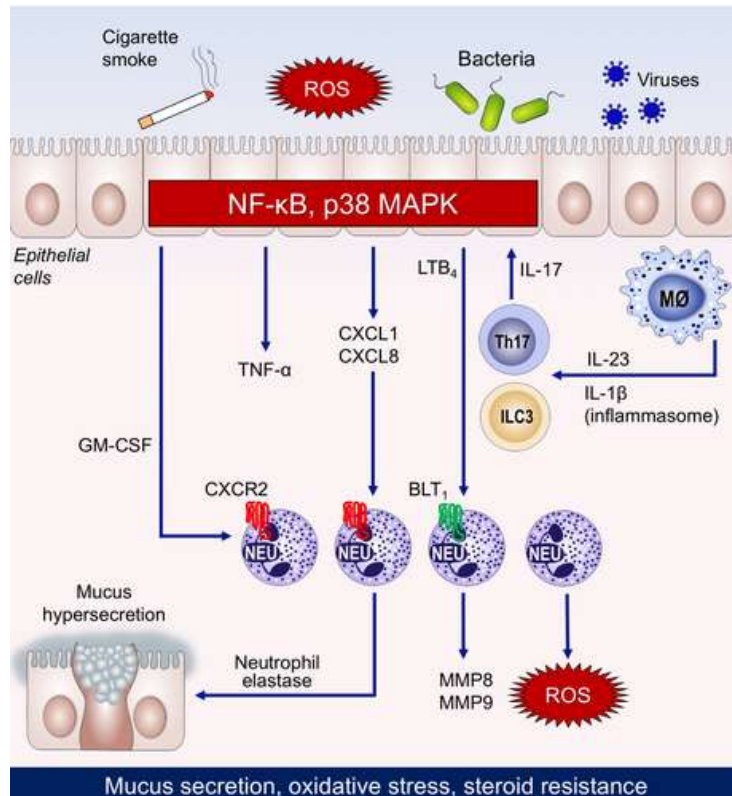
La broncho pneumopathie chronique obstructive est une pathologie qui touche actuellement plus de 300 millions de personnes. Elle est répertoriée comme étant la troisième cause de mortalité dans le monde ; et la cinquième en terme de morbidité (Barnes 2019b; 2016). Cette pathologie peut être induite par plusieurs facteurs environnementaux et ou génétiques mais le principal facteur de risque de la BPCO est le tabagisme qui déclenche une inflammation chronique des petites voies aériennes (De Rose et al. 2018).

La BPCO est due à une inflammation systémique dite de type Th1, orchestrée par les lymphocytes CD8+ Tc1 (cytotoxique1) ainsi que des CD4+ Th1 et Th17 (Figure 11) (Barnes 2019a). La fumée de cigarette, les agents pathogènes ainsi que les espèces réactives de l'oxygène sont impliqués dans l'activation de l'inflammation. D'une part, ils vont stimuler la production de médiateurs inflammatoires par les cellules épithéliales, activant les voies NFκB et p38 MAPK. Ainsi, les taux de TNF-α, de CXCL1 et CXCL8 seront augmentés au sein des voies aériennes. En parallèle, ils vont aussi activer les macrophages résidents, attractants des cellules Th17 et ILC3, engendrant l'augmentation de la production d'IL-17. Cette interleukine, va contribuer à accroître la sécrétion de l'IL-6 et de CXCL8 par les cellules épithéliales ; formant

ainsi une boucle d'amplification. D'autre part, les chimiokines, CXCL1 et CXCL8 ainsi produites, vont attirer les neutrophiles sur le site de l'inflammation grâce aux récepteurs CXCR2. La libération du TNF- $\alpha$ , va quant elle, amplifier l'inflammation par la voie NF $\kappa$ B (Barnes 2008; 2018) mais aussi induire la production de médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes LTB<sub>4</sub>. Ces dernières jouent également un rôle dans le recrutement des neutrophiles *via* leur récepteurs LTB<sub>1</sub> (Barnes 2019a; Bui et al. 2012). Par conséquent, les neutrophiles vont s'accumuler dans les voies aériennes, entraînant d'une part, une augmentation du taux de l'élastase du neutrophile (NE), potentiel inducteur de l'hypersécrétion de mucus et de métalloprotéinases (MMPs); et d'autre part générer un stress oxydatif, le tout entretenant l'inflammation (Barnes 2019a).

Ainsi, cette maladie est caractérisée d'un côté par une obstruction des voies aériennes dont la réversibilité est incomplète, et d'un autre côté de la perte d'élasticité accompagnée de la destruction des parois alvéolaires (emphysème). En conséquence, la progression de la bronchite est due à une inflammation persistante des bronchioles; elle-même due à l'exposition à la fumée de cigarette entraînant des modifications morphologiques irréversibles des espaces aériens, accompagnée d'une destruction des parois élastiques des alvéoles. Cela se traduit par une augmentation permanente des espaces aériens, aussi connue comme l'emphysème, conduisant à une réduction des zones d'échange de gaz, provoquant la dyspnée (Barnes 2017).

Ce phénomène est irréversible et s'accompagne d'un excès de production de mucus qui aggrave l'obstruction des voies aériennes. Aussi, les exacerbations vont augmenter la sévérité des symptômes, ainsi la maladie va s'aggraver et peut aboutir à une fibrose et /ou cancer pulmonaire.



**Figure 11 : Inflammation de type Th1 dans la Bronchopneuropathie chronique Obstructive.** D'après Barnes 2019 : review : *Inflammatory endotypes in COPD*

La sévérité de la BPCO peut être classée selon différents stades d'atteintes, et déterminée par la valeur de trois facteurs : le Volume Expiratoire Maximale par Seconde (VEMS), la Capacité Vitale (CV), la Capacité Vitale Forcée (CVF). Ils sont mesurés par spirométrie suite à une prise de bronchodilatateurs. Les niveaux de sévérités débutent au stade I, où l'obstruction bronchique est dite légère, jusqu'au stade IV, où l'obstruction bronchique est dite très sévère (Tableau 1).

| Stade               | Caractéristiques  |
|---------------------|---|
| 0: à risque         | Spirométrie Normale<br>Symptômes Chroniques (toux, expectoration)   |
| 1: BPCO débutante   | VEMS/CVF < 70%<br>VEMS > ou égale à 80% des valeurs prédites<br>Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration) |
| 2: BPCO modérée     | VEMS/CVF < 70%<br>VEMS entre 50% et 80% des valeurs prédites<br>Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration) |
| 3: BPCO sévère      | VEMS/CVF < 70%<br>VEMS entre 30% et 50% des valeurs prédites<br>Avec ou sans symptômes chroniques (toux, expectoration) |
| 4: BPCO très sévère | VEMS/CVF < 70%<br>VEMS < 30% des valeurs prédites ou FEV1 < 50% des valeurs prédites et insuffisance respiratoire       |

**Tableau 1: Classification GOLD de la BPCO: 5 niveaux de sévérité croissante** *Global Initiative for Chronic Obstructive lung disease (GOLD) 2006*

### 3. La mucoviscidose

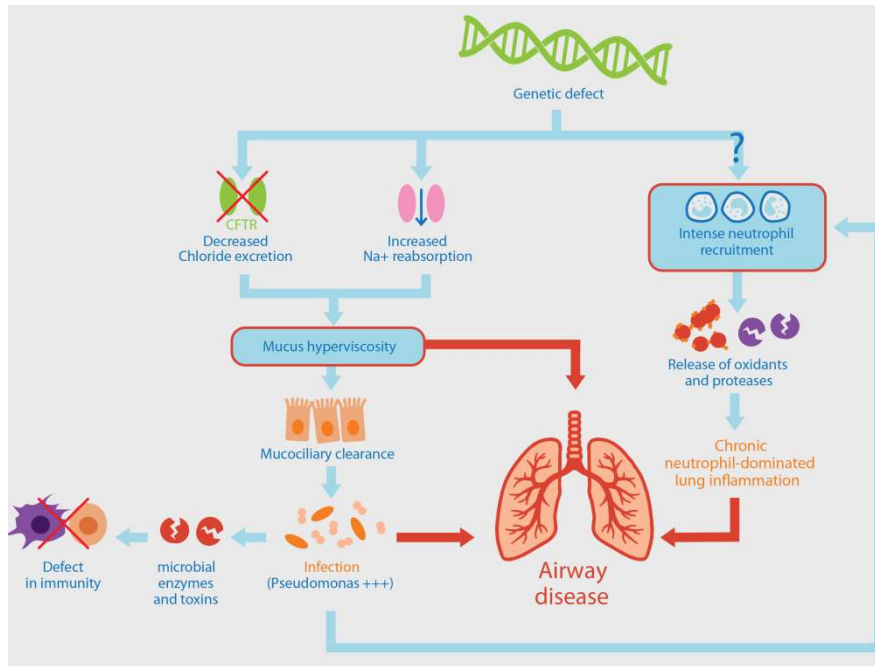
La mucoviscidose est une maladie génétique multi viscérale ; liée à la mutation du gène codant pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Cette pathologie se transmet de façon autosomale et touche plus fréquemment les populations de type caucasien. Ainsi en 2015, environ 70 000 cas étaient dénombrés dans le monde, dont 6585 répertoriés en France (Kramer et Clancy 2018).

Au niveau respiratoire, la mucoviscidose se caractérise par une bronchite chronique suppurée, sécrétante et obstructive. La défaillance de la protéine transmembranaire CFTR, entraîne un défaut de sécrétion des ions chlorures, accompagné d'une augmentation d'absorption d'ions sodiums en sur activant les canaux EnaC (*Epithelial Sodium Chanel*). Il en résulte une acidification ainsi qu'une déshydratation de la muqueuse épithéliale qui se traduit par une perte de volume du liquide à sa surface et l'épaississement du mucus (De Rose et al. 2018). Cela engendre un dysfonctionnement du système de clairance mucociliaire qui contribue à l'obstruction des conduits aériens.

De plus, le défaut de sécrétion des ions  $\text{HCO}_3^-$ , altère également l'activité des peptides antimicrobiens tels que les défensines dépendantes des ions calciums (Bui et al. 2012). Par conséquent, le risque d'infection bactérienne va augmenter et entretenir une inflammation systémique (De Rose et al. 2018; Kramer et Clancy 2018).

D'un autre côté, l'inflammation inhérente à cette pathologie est associée à une accumulation de neutrophiles dans les voies aériennes, en partie due à la présence excessive de CXCL8. L'augmentation de CXCL8 semble être induite par le dysfonctionnement intrinsèque du canal CFTR mais aussi la présence d'agents infectieux (Bui et al. 2012; De Rose et al. 2018). Ainsi, la forte présence des neutrophiles induit l'élévation de la concentration en élastase du neutrophile (NE), qui représente 90% de l'activité protéolytique chez les patients atteints de mucoviscidose. D'une part, la NE potentialise les autres protéases et inhibe le rétrocontrôle anti-protéasique, aggravant la destruction des tissus pulmonaires. De plus, cette enzyme joue un rôle dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles, en activant les TLRs par la production de CXCL8 *via* la voie NF $\kappa$ B, mais aussi par production de leucotriène B<sub>4</sub>, en activant la voie du stress oxydatif. D'autre part, la NE contribue à l'obstruction des voies aériennes, en induisant la sécrétion de mucus *via* l'EGFR, mais aussi en inhibant les battements ciliaires. Enfin, cette enzyme est également impliquée dans l'amenuisement des défenses immunitaires aux niveaux innés et adaptatifs (Bui et al. 2012).

La maladie est progressive et s'aggrave au cours des exacerbations responsables de changements structuraux. Ainsi, au cours du temps, le patient risque de développer une bronchiectasie ou encore un emphysème qui vont compromettre les fonctions respiratoires, pouvant aller jusqu'à l'insuffisance respiratoire terminale (De Rose et al. 2018; Reix et al. 2018). La mucoviscidose est une pathologie létale dont l'âge médian de mortalité est prédit à 41,7 ans (Kramer et Clancy 2018). Elle est associée à de multiples problématiques, comme l'insuffisance pancréatique exocrine présente chez 80% des patients ; ainsi que des atteintes hépatobiliaires plus ou moins graves retrouvées très fréquemment (Reix et al. 2018).



**Figure 12 : Physiopathologie de la mucoviscidose.** D'après [https://www.institutcochin.fr/la-recherche/3i/equipe-witko\\_sarsat/mucoviscidose/mucoviscidoseschema.png](https://www.institutcochin.fr/la-recherche/3i/equipe-witko_sarsat/mucoviscidose/mucoviscidoseschema.png)

#### 4. Traitements actuels

##### i. Traitements contre l'asthme

Chez les patients asthmatiques, la prise en charge thérapeutique est basée sur le traitement des symptômes par voie inhalée. Pour cela, l'utilisation de bronchodilatateurs sympathomimétiques, tels que les agonistes des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques est préconisée. Ils peuvent agir rapidement et sur une courte durée : SABA (*Short Acting  $\beta_2$ -adrenergicreceptor Agonist*), et dans ce cas, sont suffisants pour traiter les symptômes lors d'un asthme léger. Néanmoins, ils peuvent aussi agir sur une durée plus prolongée : LABA (*Long Acting  $\beta_2$ -adrenergicreceptor Agonist*) et sont alors utilisés chez les patients asthmatiques modérés (Chanoine et al. 2018; Barnes 2018).

D'autre part, les corticostéroïdes inhalés (ICS), vont diminuer l'inflammation et sont utilisés comme traitement de fond chez tous les patients présentant des symptômes persistants. Dans le cadre d'asthme modéré à sévère, les ICS peuvent être ajoutés aux bronchodilatateurs sympathomimétiques à action longue durée (LABA). Néanmoins, environ 5% des patients souffrant d'asthme sévère vont nécessiter d'inclure un antagoniste muscarinique inhalé à action prolongée : LAMA (*Long Acting Muscarinicacetylcholinereceptor Antagonist*), de la théophylline orale à faible dose ou un antagoniste des récepteurs des leucotriènes.

Enfin, environ 1% des patients peuvent nécessiter une dose d'entretien de corticostéroïdes oraux, et chez ces patients, un traitement anti-IgE par omalizumab peut être tenté si les patients présentent des taux élevés d'IgE plasmatiques (Barnes 2018).

#### ii. Traitements contre la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Dans le cadre de la BPCO, le sevrage tabagique est prioritaire afin de ralentir le déclin de la fonction pulmonaire (Kossmann, Quillet, et Lebargy 2018). Par ailleurs, le traitement le plus efficace correspond à l'utilisation de bronchodilatateurs à action prolongée de type sympathomimétiques et parasympholytiques. Ils vont ainsi réduire les symptômes et les exacerbations. Les LAMA et les LABA ont des effets additifs et peuvent donc être administrés en association. De plus, chez les patients présentant des exacerbations continues, les corticostéroïdes peuvent être ajoutés aux deux autres traitements associés (Barnes 2018). D'autres parts, lorsque les patients BPCO sont dits sévères, ils subissent des bronchites chroniques avec des antécédents d'épisodes répétés d'exacerbations, il y a la possibilité d'associer à la prise des bronchodilatateurs, des inhibiteurs de phosphodiesterase 4, de manière continue. Ces inhibiteurs vont cibler l'inflammation systémique en plus de l'inflammation pulmonaire liée à la BPCO. Enfin, plusieurs procédés thérapeutiques viennent compléter les traitements de la BPCO, comme la réhabilitation respiratoire, l'oxygénothérapie, la ventilation non invasive, ainsi que le traitement chirurgical des emphysèmes (Kossmann, Quillet, et Lebargy 2018).

#### iii. Traitements contre la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie multiviscérale, ainsi plusieurs approches thérapeutiques vont être combinées afin d'améliorer la qualité de vie des patients et de ralentir la progression de la pathologie. Premièrement, au niveau respiratoire, la prise en charge concerne de la kinésithérapie visant à prévenir les déformations vertébrales et thoraciques, mais aussi à drainer les voies aériennes (Reix et al. 2018). Deuxièmement, l'ajout de traitement par voie inhalée avec des fluidifiants, comme la Dornase alpha, une enzyme humaine recombinante à effet mucolytique, mais aussi le Serum Salé Hypertonique hydratant du mucus, est préconisé.

Il est possible d'associer les deux, ce qui semble diminuer les épisodes d'exacerbations et par conséquent de ralentir le déclin de la fonction respiratoire (Kramer et Clancy 2018). Troisièmement, l'utilisation de corticoïdes, va permettre de combattre l'inflammation et

limiter les effets d'hyperréactivité bronchique de l'asthme souvent présent chez ce type de patient. Quatrièmement, une antibiothérapie inhalée, orale ou en intraveineuse peut être ajoutée, afin de diminuer l'inoculum bactérien et ce prescrit par cure tout au long de la vie (Reix et al. 2018). Enfin, une prise en charge thérapeutique sur un plan nutritionnel et digestif, est nécessaire afin de combler les carences et atteintes induite lors de cette pathologie.

### 5. Perspectives de traitements des pathologies respiratoires

Actuellement, il n'existe pas de traitements curatifs pour ces pathologies respiratoires obstructives. L'existence de différences phénotypiques inter individu jouent sur la variabilité de la réponse aux traitements administrés, ce qui multiplie les stratégies thérapeutiques. Par ailleurs, certains patients atteints d'asthme ou de BPCO sévère peuvent également montrer une résistance aux corticostéroïdes (Barnes 2017). De même, en plus d'être un symptôme aggravant, l'épaisse barrière de mucus exacerbée dans ces pathologies, affecte l'efficacité des traitements administrés par voie inhalée. Il est donc important de s'orienter vers de nouvelles voies thérapeutiques et plus particulièrement vers des cibles impactant l'obstruction des voies aériennes par le mucus.

#### i. Inhibition de la synthèse la mucine

L'hypersécrétion de mucus est un symptôme important et aggravant dans les pathologies respiratoire obstructives. De nombreuses études se sont donc orientées vers de nouvelles molécules thérapeutiques visant à affecter la synthèse ou la sécrétion de mucines. Quelques cibles sont référencées dans le tableau 2 suivant :

| Target                     | Inhibitor(s)   |
|----------------------------|--|
| <i>Mucin synthesis</i>     |  |
| CCR3                       | Anti-CCR3 monoclonal antibodies                                      |
| EGFR tyrosine kinase       | BIBW 2948, BIBX1382, BIBX1522, cetuximab, gefitinib                  |
| GABA-A receptors           | GABA <sub>A</sub> receptor antagonists                               |
| hCLCA1                     | Niflumic acid  |
| HIF-1                      | YC-1   |
| Hyperplasia (goblet cells) | Ellagic acid, statins  |
| MUC5AC expression          | Macrolides, statins  |
| <i>Mucin secretion</i>     |  |
| HSP-70                     | MAL3-101   |
| MARCKS                     | Bio-11006, MANS peptide  |
| Munc proteins              | Munc-18 inhibitors   |
| P2Y <sub>2</sub> receptors | P2Y <sub>2</sub> receptor agonists (mucus hydration) and antagonists |
| SNARE proteins             | Modified bacterial neurotoxins of <i>Clostridium botulinum</i>       |

**Tableau 2 : Les Potentiels cibles et Inhibiteurs de mucines** D'après Ha et Rogers 2016



### (1) *Inactivation de l'EGFR*

L'EGFR joue un rôle crucial dans la sécrétion de mucus par les cellules calciformes et les glandes sous mucoales. Ainsi, l'inhibition de son récepteur, l'EGFR (Epidermal Growth factor receptor) pourrait permettre de diminuer la production de mucus (Barnes et Hansel 2004). Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, font objet de différentes études, entre autres, *le Gefitinib* indiqué en monothérapie chez les adultes dans le traitement du cancer bronchique présentant des mutations activatrices de l'EGFR-TK. Cet inhibiteur semble réguler la synthèse de mucine. Des résultats ont montré chez la souris hypersécrétrice, une diminution de l'hyperplasie des cellules calciformes.

Par ailleurs, d'autres études sur l'inhibiteur BIBX1522 ont également montré ces effets, mais aussi une diminution du recrutement des neutrophiles, responsables de la production de ROS activateur de l'EGFR. De nombreux inhibiteurs de EGFR-TK semblent impacter la synthèse de mucine, et l'hyperplasie des cellules calciformes. Néanmoins, ces inhibiteurs possèdent de nombreux effets secondaires, et peu de résultats concluants ont été obtenu dans des essais cliniques menés chez des patients asthmatiques ou BPCO (Ha et Rogers 2016).

L'immunothérapie semble également une autre piste pour inactiver l'EGFR. Ainsi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire de l'EGFR pourrait potentiellement bloquer son activité et plus particulièrement son implication dans la synthèse de mucine. Le *Cetuximab*, en est un exemple, bien qu'il soit déjà utilisé comme traitements anticancéreux, il semble être un bon candidat pour diminuer la production de mucine. Actuellement, il n'existe pas de données disponibles sur les effets mucorégulateurs de cet anticorps (Ha et Rogers 2016).

### (2) *Inhibiteurs du facteur Hypoxia Inductible factor-1*

Le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia Inductible factor-1*), est impliqué dans de nombreux processus physiologiques dont ceux relatifs à l'hypoxie (Arabipour et al. 2019). Il est aussi décrit comme régulateur de l'expression du gène codant pour le VEGF (*Vascular Endothelial growth factor*) (Ha et Rogers 2016). D'ailleurs, l'augmentation de l'expression de *HIF-1 $\alpha$* , semble corrélée à la sévérité de la BPCO (Arabipour et al. 2019). D'une part, HIF-1 serait capable de se lier au promoteur du gène *MUC5AC*, induisant la transcription de cette mucine. D'autre part, HIF-1 semble être activé par l'IL-13 et répondre à l'inflammation. Aussi, des études *in vitro*, sur son inhibition comme avec l'anti-cancéreux YC-1 ont pu montrer une

diminution de l'expression et la sécrétion de MUC5AC en condition hypoxique. Il n'existe, à ce jour, pas d'essai clinique sur l'action de YC-1 chez des patients asthmatiques ou BPCO, probablement due aux effets antiprolifératif et pro apoptotique de YC-1 (Ha et Rogers 2016).

### (3) Les antagonistes des récepteurs GABA

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> ( $\gamma$ -aminobutyric acid) sont des canaux ioniques situés sur les membranes des neurones, dont l'ouverture induit l'efflux d'ions calcium, modifiant ainsi un potentiel de membrane. Ils partagent de nombreuses propriétés structurales avec les récepteurs de l'acétylcholine et de la sérotonine. Des études ont montré l'implication du récepteur GABA dans l'activation du processus inflammatoire et la surproduction de mucus dans l'asthme, *via* l'induction par l'IL-13. De plus, la nicotine semble induire l'augmentation de l'expression de ces récepteurs dans les cellules épithéliales bronchiques de macaques.

Ainsi, des antagonistes de ce récepteur ont permis de diminuer la production de mucine chez le singe. Néanmoins, l'effet non sélectif de ces antagonistes pourrait entraîner de nombreux effets indésirables, ainsi qu'une altération des fonctions cérébrales (Ha et Rogers 2016).

### (4) Inhibiteur du canal hCLCA1

Le canal CLCA1 semble être impliqué dans la production de mucus, même si son mécanisme d'action reste méconnu (Ha et Rogers 2016; Barnes et Hansel 2004). hCLCA1 semble activer la voie MAPK13, induit par l'IL-13, conduisant à la stimulation de l'expression et la synthèse de MUC5AC. L'étude d'inhibiteurs non sélectifs, tels que l'acide Niflumic a pu montrer *in vitro*, une réduction de la production de mucus et des ARNs de MUC5AC, de même qu'une diminution de l'hyperplasie des cellules calciformes induit par l'IL-13.

Néanmoins, des résultats contradictoires chez les souris asthmatiques ont montrés que le KO (Knockdown) du gène orthologue *hCLCA1* ne semble pas impacter la production de MUC5AC, ni affecter l'inflammation existante. Ces résultats suggèrent que la recherche de nouvelles molécules inhibitrices ciblant hCLCA1 ne semble pas être des plus pertinentes (Ha et Rogers 2016).

## ii. Inhibition de la sécrétion de mucine

Une autre manière de réguler l'obstruction de mucus dans les voies aériennes est de contrôler le niveau de sécrétion. Néanmoins, ces procédés ne permettent pas de bloquer sa production

et donc son accumulation intracellulaire, ce qui peut devenir problématique en cas de sur stimulation de sa production.

(1) *Blocage de MARCKS et de son complexe*

*Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate* (MARCKS), est un peptide qui permet l'exocytose du mucus grâce à la formation d'un complexe : MARCKS-HSP70-CSP-Granule sécréteur. Lors de sa phosphorylation par la protéine Kinase C, MARCKS se déplace vers le cytosol, puis se lie à la membrane des granules intracellulaires, grâce à la présence de deux protéines chaperonnes : HSP70 et de CSP. La liaison du granule contenant les mucines avec MARCKS semble jouer un rôle majeur dans la libération de ces mucines. Une inhibition de cette liaison semble corrélée avec une inhibition de sécrétions de mucine (Ha et Rogers 2016; Williams et al. 2006; J. Park et al. 2008). Ainsi, les inhibiteurs analogues de MARCKS ont fait l'objet de plusieurs études montrant une diminution de l'obstruction des voies aériennes lors de son blocage.

D'ailleurs, le procédé d'inactivation par MANS (*Myristoylated N-terminal sequence*), un peptide analogue, a aussi permis de limiter l'augmentation de l'inflammation et de la migration des neutrophiles chez la souris. Cependant, les essais cliniques menés sur certains analogues n'ont pas permis d'évaluer les éventuels risques d'une utilisation continue de ces molécules (Ha et Rogers 2016).

Par ailleurs, la protéine HSP70 (*Heat-Shock Protein-70*) fait également partie du complexe et est donc potentiellement une autre cible.

Des études *in vitro*, sur des inhibiteurs des HSP70 par Si-RNA ou *via* l'utilisation de son inhibiteur MAL3-101, ont montrés l'impact de son inhibition sur la sécrétion de mucine. Toutefois, l'efficacité et la non toxicité de ces procédés n'ont pas été évalué dans des essais cliniques (Ha et Rogers 2016).

Enfin, une autre cible lors de la fusion des granules d'exocytose à la membrane plasmique, sont des protéines d'attachement SNARE (*Soluble NFS Attachment Protein Receptor*). D'ailleurs certaines bactéries, comme *Clostridium botulinum*, fabrique une toxine capable de cliver cette protéine, perturbant ainsi l'attachement des granules à la membrane apicale. Par conséquent, la sécrétion de mucine ne pourra pas se faire. Cependant, SNARE est aussi utilisé pour l'exocytose de granule de neurotransmetteurs ainsi un défaut de SNARE risque d'entraîner de nombreux effets secondaires (Ha et Rogers 2016; Williams et al. 2006).

### (2) Récepteur P2Y<sub>2</sub>

Les glandes sous mucoales sont innervées par le système nerveux parasympathique, lui conférant la capacité à activer la sécrétion de mucine. Les agonistes des récepteurs cholinergiques et purinergiques, mais aussi les protéases ou encore les médiateurs inflammatoires peuvent stimuler le système parasympathique. D'ailleurs, l'ATP, agoniste du récepteur purinergique P2Y<sub>2</sub> est capable de générer l'activation du processus d'exocytose (Ha et Rogers 2016; Williams et al. 2006). Par conséquent, l'utilisation d'antagonistes de P2Y<sub>2</sub> pourrait être une bonne alternative pour inhiber l'hypersécrétion de mucus. Toutefois, l'activation du récepteur P2Y<sub>2</sub> est également impliquée dans les processus d'hydratation du mucus facilitant le système de clairance mucociliaire. Par conséquent, les agonistes de ce récepteur pourraient aussi diminuer l'obstruction des voies aériennes, mais de manière mécanistique, en favorisant le système mucociliaire (Ha et Rogers 2016).

### (3) Les antibiotiques de type macrolides

Les antibiotiques de type macrolides sont étudiés pour être utilisés chez les patients asthmatiques ou BPCO. Certains comme l'Azithromycine (AZM) et la Clarithromycine (CAM) réduirait l'inflammation des voies aériennes et bloquerait la libération de mucine en interférant avec le calcium intracellulaire. Des études ont mis en avant la réduction du nombre des exacerbations chez les patients BPCO par l'AZM. Mais aucun résultat significatifs n'a été détecté chez les patients asthmatiques. Le principal inconvénient de l'utilisation continue des antibiotiques est l'émergence d'une résistance bactérienne (Ha et Rogers 2016).

## 6. Inhibition de l'inflammation : les voies de signalisation

### (1) La voie NFκB

L'inhibition de voies impliquées dans la régulation de l'expression de cytokines inflammatoires et de chimiokines est une autre alternative. Au niveau de la voie NFκB, plusieurs inhibiteurs sont en cours de développement. Bien que ces inhibiteurs n'aient pas été testés chez les patients asthmatiques ou BPCO, les résultats obtenus chez le rat avec l'inhibiteur de Iκk2 sont encourageants. Celui-ci régule l'expression TNF-α et IL-1β dans les poumons du rat. Cependant, une inhibition de NFκB sur le long terme semble entraîner une défaillance du système immunitaire (Barnes 2008).

### (2) *Le récepteur Peroxisome proliferator-activated $\gamma$*

PPAR $\gamma$  fait partie de la super famille des récepteurs nucléaires aux hormones. Il semble impliqué dans la régulation négative de l'expression de *NF $\kappa$ B*. La présence de PPAR $\gamma$  est corrélée négativement avec l'expression de *NF $\kappa$ B* chez les fumeurs. Chez des patients atteints de BPCO, PPAR $\gamma$  est retrouvé en plus faible quantité dans les cellules épithéliales bronchiques et dans les tissus pulmonaires par rapport à ceux de non-fumeurs. Ce récepteur peut également induire la transcription de facteurs anti inflammatoires (Arabipour et al. 2019). L'utilisation d'agoniste de PPAR $\gamma$  a montré une diminution du risque d'exacerbation chez les patients traités. Il est aussi décrit comme participant à la régulation transcriptionnelle de *MUC5AC* (Lakshmi et al. 2018).

### (3) *La voie p38-MAPK*

Une autre voie importante dans la production de médiateurs inflammatoires, est la voie p38 MAPK. Cette voie est activée par le stress cellulaire et régule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-8, TNF- $\alpha$  et les MMPs (Matrix Metallo Protéinases) (Barnes et Hansel 2004).

Par exemple, le SDS282, inhibiteur de l'isoforme du p38- $\alpha$ , inhibe la production *in vitro* de TNF- $\alpha$  provenant des macrophages pulmonaires humains. Cependant, plusieurs inhibiteurs de cette voie ont montré de nombreux effets indésirables et une toxicité importante (Barnes 2008).

## ii. Blocage des médiateurs inflammatoires

### (1) *Les anti-Interleukines 13*

L'Interleukine-13 entretient l'inflammation de type Th2, en stimulant la sécrétion d'IgE (Immunoglobuline E) par les lymphocytes B, et est décrit comme un mucorégulateur (Barnes 2008). Plusieurs études ont été mené sur des anticorps anti-IL13, chez les patients asthmatiques de type sévère, mais ont été abandonné en raison de leur faible efficacité (Barnes 2018).

Il existe, néanmoins le *Lebrikizumab*, un anticorps dirigé spécifiquement contre l'IL-13 qui a démontré une petite amélioration de la fonction pulmonaire. Cependant, sur les deux études menées en parallèle, une seule a permis d'observer une diminution significative du taux d'exacerbation (Barnes 2018; Bonser et Erle 2017). D'autres études se sont plutôt penchées

sur l'inhibition du récepteur de l'IL-13, nommé IL-4R $\alpha$ , avec le *Dupilumab*. Le *Dupilumab* est un nouvel anticorps monoclonal humain ciblant les interleukines 4 (IL-4) et 13 (IL-13). Il semble avoir une plus grande efficacité que les anticorps anti-IL13, dont l'action est d'inhiber la sous-unité commune du récepteur à l'IL-13 et à l'IL-4. Cette molécule est indiquée en traitement de fond additionnel de l'asthme sévère depuis 2017, en France (Bonser et Erle 2017).

### (2) *Les antagonistes de CXCR2 et CCR3*

Le récepteur CXCR2 joue un rôle crucial dans les pathologies respiratoires, il est indirectement impliqué dans le chimiotactisme des neutrophiles et monocytes. Des antagonistes de CXCR2 ont montré une diminution du nombre de neutrophiles chez des individus sains après exposition à l'ozone et au LPS. Le *Navarixin*, un antagoniste, a permis après six mois de traitement une diminution des neutrophiles dans les expectorations des patients BPCO associé à une petite amélioration de la VEMS. Néanmoins, cette molécule ne permet pas de diminuer les exacerbations et chez les patients asthmatiques sévères, elle n'a pas montré d'amélioration (Barnes 2018).

Des études se sont orientées vers d'autres cibles comme le récepteur CCR3. Des anticorps dirigés contre lui, ont permis diminuer l'expression de *MUC5AC* et de l'*EGFR* chez les souris asthmatiques. Ce récepteur est aussi retrouvé plus exprimé chez les patients asthmatiques mais plus particulièrement dans les cellules CD-8 positives, et semble jouer un rôle dans le développement de l'emphysème chez les patients BPCO (Barnes 2018; Barnes et Hansel 2004). Néanmoins, peu d'études cliniques de ces anticorps monoclonaux chez l'humain ont été réalisés ou publiés (Ha et Rogers 2016). Un essai thérapeutique utilisant des oligonucléotides anti-sens dirigés contre les ARNm *CCR3* et la chaîne beta commune aux récepteurs de IL-3, IL-5 et le GM-CSF, a montré une diminution de la réponse éosinophile suite à l'exposition d'un allergène (Barnes 2018).

### (3) *Les anti-protéases*

Les protéases sont des enzymes protéolytiques qui dégradent les composants des tissus conjonctifs tels que l'élastine, la fibronectine, le protéoglycane mais aussi le collagène. Elles sont sécrétées par plusieurs types cellulaires comme les macrophages, les neutrophiles mais également les cellules épithéliales. Il en existe différentes classes: les protéases à sérines, les

protéases à cystéines, les protéases à acide aspartique, les métalloprotéases, répertoriés selon leur mécanisme catalytique.

Lors des pathologies respiratoires telles la BPCO ou encore la mucoviscidose, le déséquilibre entre les protéases et les anti-protéases joue un rôle important dans la pathogénicité et la progression des pathologies. L'inhibition de ces enzymes ou l'augmentation du niveau d'anti-protéases endogènes permettraient de limiter l'aggravation du niveau de la sévérité des pathologies (De Rose et al. 2018; Barnes et Hansel 2004). Plusieurs inhibiteurs de certaines métalloprotéases (MMPs), de cathepsines, ainsi que de l'élastase du neutrophile (NE) ont été étudiés. Par exemple, le *POL6014* bloque la fonction de l'élastase du neutrophile, réduisant la destruction tissulaire mais aussi l'inflammation. D'autres, comme l'*Adecaliximab*, anticorps dirigé contre la MMP-9, réduit l'inflammation et améliore les fonctions pulmonaires, mais ne peut pas être utilisé pour les cas les plus sévères. Par ailleurs l'administration par la voie orale de ces composés peut affecter l'activité d'autres protéases, qui seront également inhibés par ces traitements (Rafeeq et Murad 2017; Barnes et Hansel 2004).

### iii. La thérapie génique

Le principe de la thérapie génique est d'introduire ou d'altérer le matériel génétique à l'intérieur d'une cellule ou d'un organisme dans le but de traiter une maladie ou d'améliorer la qualité de vie du patient.

Plusieurs types de vecteurs peuvent être utilisés pour transporter l'acide nucléique, tels que les vecteurs viraux, mais aussi des vecteurs synthétiques comme des lipides cationiques, des polymères cationiques mais aussi des nanoparticules. L'application peut viser à rétablir l'expression d'un gène invalide, dans ce cas l'acide nucléique utilisé sera un ADN. Dans le second cas, le but sera de réprimer l'expression d'un gène délétère par un SiARN (Arabipour et al. 2019).

La thérapie génique serait donc un moyen d'agir localement et sur long terme lors de pathologies respiratoires qui à ce jour, ne présentent pas de traitements curatifs. Néanmoins, les vecteurs utilisés actuellement, ne sont pas suffisamment efficaces et possèdent un faible taux de transfert dans les poumons, en partie due à la toxicité et immunogénicité du vecteur, mais aussi au faible taux d'internalisation. Dans le cadre de pathologies respiratoires obstructives, l'importante barrière viscoélastique du mucus est un frein à l'efficacité de transfection des vecteurs dans les cellules. Le projet vise donc à développer des vecteurs

synthétiques en mesure de traverser le mucus, tout en protégeant l'intégrité de l'acide nucléique et en le libérant au sein de la cellule cible.

Pour cela une équipe du Laboratoire de Conception et Applications de Molécules Bioactives, UMR 7199, de l'Université de Strasbourg, réalise la mise au point de vecteurs lipoplexes possédant une activité mucolytique intrinsèque. Le laboratoire réalise ainsi la synthèse de lipides bio-labiles soufrés, comprenant l'acide nucléique d'intérêt. Les thiols seront libérés in situ pour induire la rupture des ponts disulfures constituant la structure des polymères du mucus.

Les acides nucléiques d'intérêts utilisés dans le cadre de ce projet, seront des SiARNs dirigés contre les gènes *MMP-12* et *p65*, sous unité du facteur NFκB, afin d'inhiber leur expression.

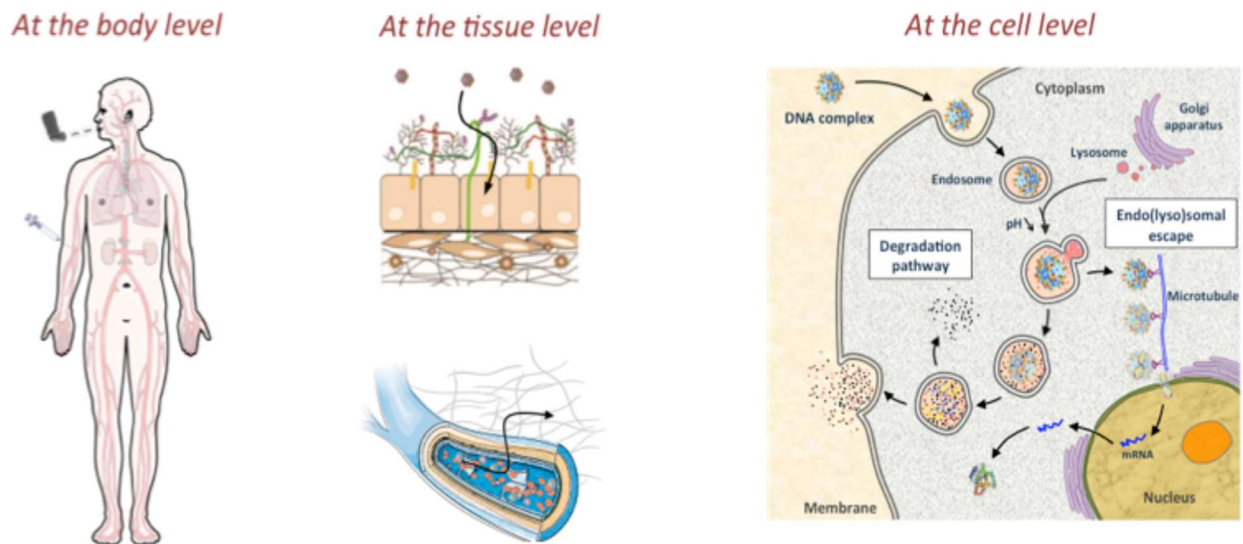


Figure 13 : Les barrières de la thérapie génique. D'après Sonntag Thomas, 2019



## D. Modèles d'études pour la production de mucus et de cytokines inflammatoires

### 1. Les lignées pulmonaires humaines

#### i. Les A549

La lignée A549, est issue de pneumocytes de type II isolés d'un patient atteint d'adénocarcinome pulmonaire. C'est une lignée très utilisée pour l'étude d'inhalation d'agents toxiques (Hetland et al. 2004). Il est décrit qu'après exposition à la fumée de cigarette associée au LPS d'*Escherichia coli*, ces cellules sont capables de produire des médiateurs inflammatoires tels que CXCL8, CCL2, et CXCL1 (Victoni et al. 2014). De plus, les A549 peuvent synthétiser de la mucine de type MUC5AC. Son expression peut être induite après une stimulation à l'IL-1 $\beta$ , médié par la voie NF $\kappa$ B (Chen et al. 2014) mais aussi induite par stimulation du LPS de *Pseudomonas* en activant *Dual Oxidase 1* (DUOX1).

La réponse de la lignée A549, après exposition à la fumée de cigarette et à des faible dose de LPS semble refléter l'activité des cellules épithéliales humaines dans un contexte d'exacerbation de BPCO (Victoni et al. 2014). Elle est utilisée au laboratoire comme modèle *in vitro* mimant ce contexte inflammatoire.

#### ii. Les NCI H292

Concernant, la lignée NCI H292, elle provient de cellules épithéliales bronchiques issues d'un carcinome pulmonaire muco-épidermoïde. Cette lignée est capable de synthétiser la MUC5AC. En réponse à la fumée de cigarette, une sur-production des ARNm de *MUC5AC*, une sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6 et l'IL-8, et d'agents remodelant comme MMP-1 (*Matrix Metallo Protéinase 1*) et GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) a été observé dans ces cellules (Newland et Richter 2008). Dans la lignée NCI H292, de nombreux évènements peuvent déclencher de manière redondante, la production de MUC5AC par activation de l'EGFR. Par exemple, l'enzyme TACE (*TNF- $\alpha$  Converting enzyme*) peut être activée par l'exposition à la fumée de cigarette, mais aussi au LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, entraînant le clivage de TGF- $\alpha$ , ligand de EGFR, et par conséquent induisant l'expression de mucine (Shao, Nakanaga, et Nadel 2004; Kohri, Ueki, et Nadel 2002). D'ailleurs, Chao et al. 2010 ont également constaté que le benzoapyrène pouvait induire l'expression de MUC5AC par la voie Ras-Raf-MEK/ERK, induit par l'EGFR.

Néanmoins, l'expression de MUC5B n'est pas retrouvée impactée par ce traitement dans cette lignée. NCI H292 est une des lignées cellulaires les plus étudiées pour la compréhension de l'induction de mucines, après exposition à des toxiques tels que la fumée de cigarette.

### iii. Les Calu3

Enfin, la lignée cellulaire Calu3, correspondant à des cellules épithéliales trachéo-bronchiques isolées lors d'une effusion pleurale chez un patient atteint d'adénocarcinome pulmonaire. Ces cellules sont décrites comme ayant de proches similitudes aux cellules calciformes, sécrétrices de MUC5AC. Au microscope électronique, des granules peu denses aux électrons à l'intérieur de ces cellules sont observables. Ces granules ressemblent aux granules de mucines (Kreda et al. 2007). Par ailleurs, ces cellules peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires, comme IL-6 ou encore l'IL-8 suite à une stimulation au LPS (*Pseudomonas aeruginosa*) (Morin et al. 2015). Calu3 peut se cultiver en contact de l'air sur un insert (ALI : Air Liquide), reflétant les propriétés d'un épithélium pulmonaire, avec la présence de jonctions serrées et l'augmentation de sécrétion de mucus dans ces conditions (Jeong et al. 2019). Calu3 est un modèle très utilisé dans le cadre des recherches sur la mucoviscidose.

## 2. Modèle d'exposition au Lipopolysaccharide

Le LPS fait partie de la famille des PAMPS, et active les récepteurs cellulaires et plus particulièrement le TLR4, provoquant l'influx de plusieurs voies de signalisation participant à l'inflammation. Des études ont montré qu'après exposition au LPS, les cellules épithéliales peuvent induire la sécrétion de cytokines inflammatoires, *via* la cascade TLR4/MyD88/NFκB (Burgel et Nadel 2008; Montalbano et al. 2016) mais aussi par l'activation de la voie Duox1-TACE-TGFα-EGFR (Burgel et Nadel 2008).

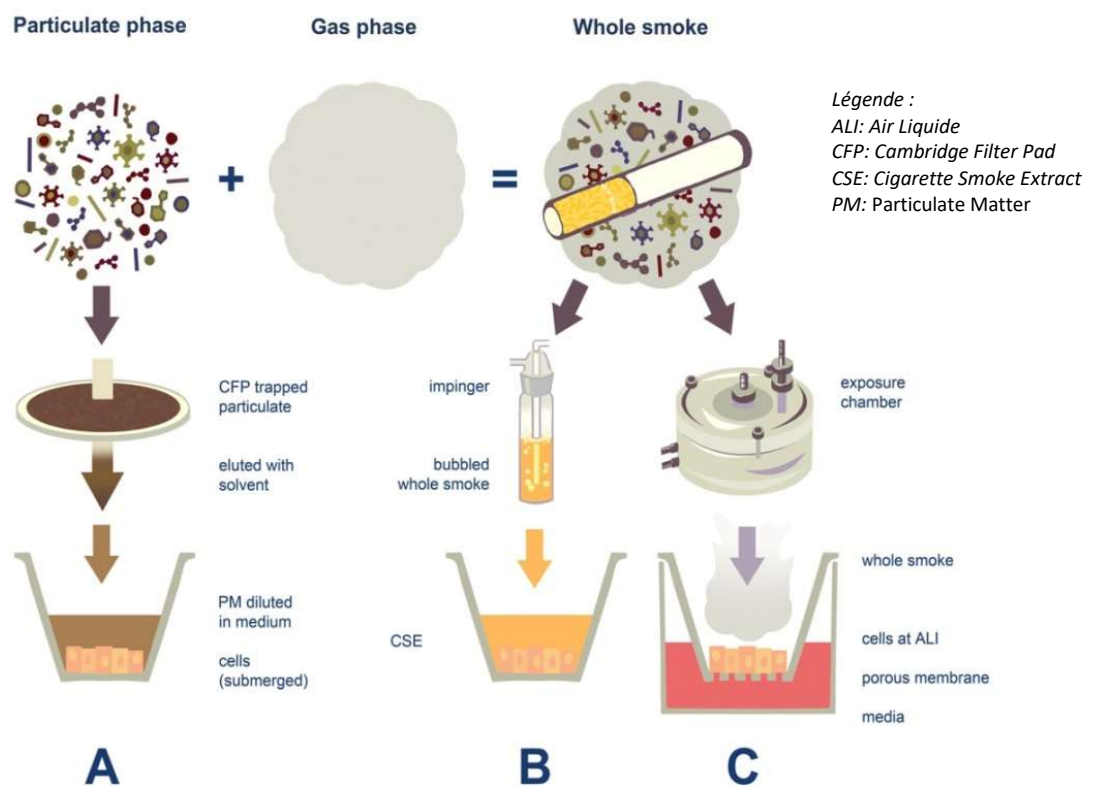
Les pathologies respiratoires chroniques sont très souvent associées aux risques infectieux récurrents et en particulier par des bactéries de types Gram-. L'utilisation du LPS d'*Escherichia coli*, peut accélérer la réponse inflammatoire et permet de mimer les infections bactériennes lors de ces pathologies (Liang et al. 2018).

## 3. Modèle d'exposition à la fumée de cigarette

La fumée de cigarette comme la pollution atmosphérique sont en grande partie impliquées dans les atteintes respiratoires chroniques. La fumée de cigarette est composée de plusieurs

milliers de produits chimiques (Rodgman, Smith, et Perfetti 2000). L'aérosol de fumée se décompose en deux phases, une particulaire et une gaz/vapeur. La phase particulaire ne constitue que 4 à 9% du poids total de la fumée alors que la phase gaz/vapeur comprend 91 à 96% du poids de la fumée (Clunes et al. 2008).

Il existe trois grandes méthodes d'exposition à la fumée de cigarette *in vitro* : la méthode de la fumée particulaire (Particulate Matter: PM), l'obtention d'extraits aqueux de fumée de cigarette dit CSE (Cigarette Smoke Extract) et enfin la fumée utilisée dans une chambre d'exposition (whole smoke) (Figure 14).



**Figure 14 : Les trois méthodes d'exposition à la fumée de cigarette.** Selon Adamson J. 2011 : *In vitro Models of COPD*

La méthode de l'extrait aqueux de cigarette (CSE) est une méthode peu coûteuse et reproductible utilisée au laboratoire. Elle permet de reproduire *in vitro* des réponses cellulaires reflétant celles retrouvées chez des patients BPCO. Cette méthode d'extraction de la fumée de cigarette semble être la plus adéquate, elle permet de stimuler les cellules épithéliales à la production de cytokines, mais aussi de mucine.

Le CSE est obtenue à partir du pompage de la fumée par une pompe péristaltique et instillation dans le milieu de culture cellulaire. Ce dernier est standardisé par mesure de sa densité optique et peut être dilué avant d'être ajouté aux cellules. L'avantage de la méthode du CSE est qu'elle capture la phase particulaire et la phase gazeuse, même si sa composition en produits chimique reste incertaine (St Laurent et al., 2009). En revanche, cette méthode implique que les cellules restent immergées dans le milieu de culture, contrairement aux conditions physiologiques où l'épithélium des voies des voies aériennes est en contact avec l'air ambiant. Par conséquent, une méthode de culture des cellules en insert serait plus pertinente physiologiquement. Elle permettrait aux cellules un contact direct l'air, nommé condition ALI (Air Liquide), et nécessiterait l'utilisation d'une chambre d'exposition.

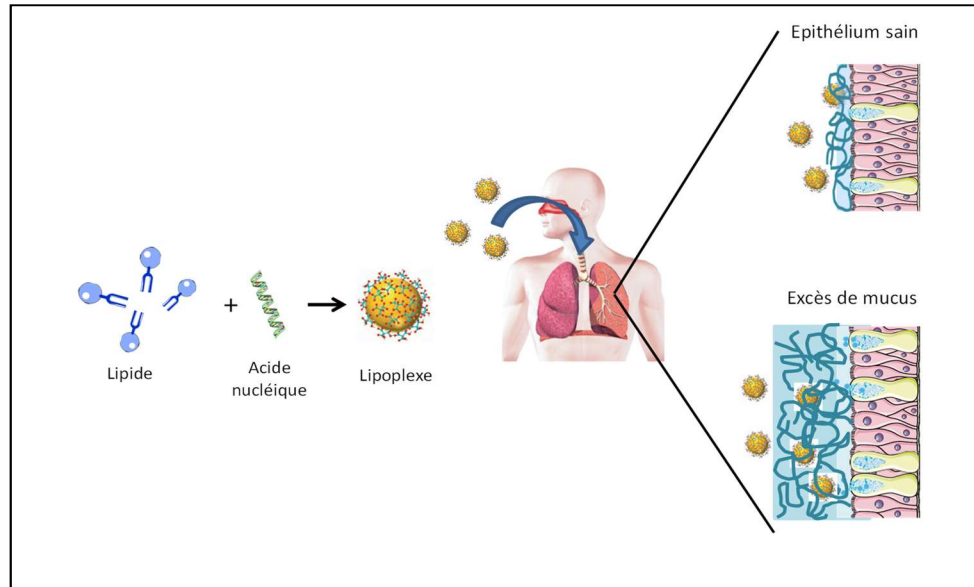
## II. Objectifs

Selon l'OMS, les affections respiratoires chroniques telles que l'asthme, la BPCO, et la mucoviscidose représentent plus de 20 % des causes de morbidité et mortalité dans le monde. Ces maladies sont caractérisées par une inflammation persistante et la présence en excès de mucus. Le tabac est un des facteurs de risque majeur et participe activement à l'aggravation de ces pathologies. Il affecte le système immunitaire, ce qui augmente ainsi le risque d'infections bactériennes. Celles-ci sont également aggravées par l'excès de mucus présent au sein des voies aériennes.

Actuellement, il n'existe pas de traitements curatifs, et certains patients acquièrent des résistances aux effets anti-inflammatoires des corticostéroïdes (Barnes 2017).

Il est donc nécessaire de se diriger vers de nouvelles thérapies afin d'améliorer la qualité de vie des patients ainsi que leurs prises en charge médicale.

La recherche sur la thérapie génique est porteuse d'espoir pour vaincre ce type de maladies, en agissant localement et sur le long terme. Néanmoins, les vecteurs actuels possèdent un faible taux d'efficacité d'internalisation, due à de multiples causes ; dont notamment celle de ne pas réussir à traverser efficacement la barrière de mucus qui protège l'épithélium des voies aériennes. Le Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactive de l'UMR 7199 de l'Université de Strasbourg, développe des vecteurs à acides nucléiques possédant une activité mucolytique intrinsèque et une activité anti-inflammatoire. Ces vecteurs devront être en mesure de traverser la barrière de mucus en gardant leur intégrité et ainsi libérer leur potentiel thérapeutique au sein de la cellule. L'efficacité des composés doit être déterminée *in vitro*.



**Figure 15 : Thérapie génique par voie respiratoire : la barrière de mucus.** Modifié à partir de SONNTAG Thomas. 2019

L'objectif de mon projet a donc été de comparer la réactivité de trois lignées épithéliales humaines pulmonaires productrices ou non de mucus, afin de déterminer le modèle *in vitro* le plus adéquate pour la production de médiateurs inflammatoires et de mucus. Nous nous sommes donc focalisé tout d'abord sur une lignée de pneumocytes de type II (A549), déjà utilisé comme modèle *in vitro* de BPCO (Victoni et al. 2014). Ensuite, notre intérêt s'est porté sur une lignée épithéliale bronchique (NCI H292) souvent étudiée pour l'expression de *MUC5AC* (Song et al. 2003; Montalbano et al. 2014; Lee et al. 2017) et de cytokines inflammatoires (Shin et al. 2018; Kurakula et al. 2015; Hulina-Tomašković et al. 2019) induite ou non par la fumée de cigarette. Enfin, une troisième lignée trachéo-bronchique (Calu3) est utilisée dans l'étude structurelle et fonctionnelle de l'épithélium respiratoire (Kreft et al. 2015; Zhu et al. 2010), ainsi que dans la production de mucus (Morin et al. 2015; Kreda et al. 2007). De plus, nous avons également utilisé un modèle de co-culture avec la lignée Calu3 et la lignée NCI H292.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons stimulé ces différentes lignées avec de l'extrait de fumée de cigarette et / ou du LPS d'*Escherichia coli* à faible dose. Nous avons mesuré l'expression et la libération des cytokines et du mucus, afin de déterminer la lignée épithéliale la plus pertinente pour tester l'efficacité des néo-vecteurs lipoplexes mucolytiques développés à Strasbourg.

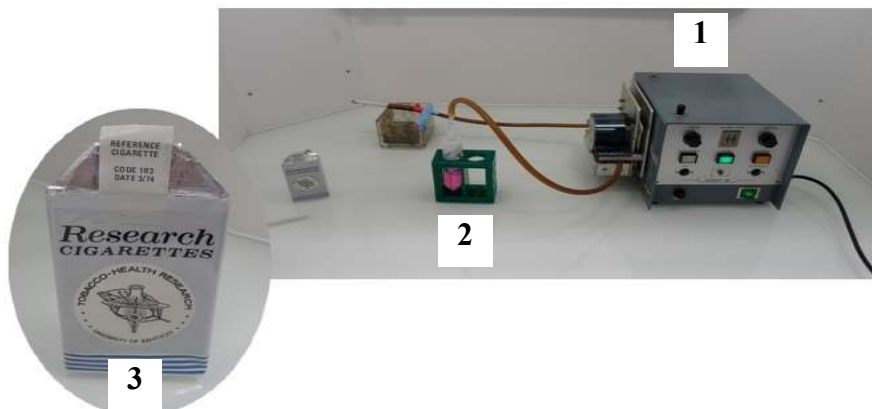
### III. Matériels et méthodes

#### A. Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour les lignées A549 et NCI H292 est composé de RPMI 1640 1X supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF), 2 mM L-Glutamine (10 mM HEPES Buffer (Lonza®), 1 mM pyruvate de sodium, 100 UI/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine (Sigma®). Concernant la lignée Calu3, le milieu est composé de Eagle's MEM 1X supplémenté de 10% sérum de veau foetal (SVF), 2 mM L-Glutamine (Gibco Invitrogen®), 10 mM HEPES Buffer (Lonza®), 1 mM pyruvate de sodium ainsi que 100 UI/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine (Gibco Invitrogen®). Les réactifs utilisés pour stimuler les cellules sont le Lipopolysaccharide (LPS) 055:B provenant d'*Escherichia coli* (Sigma®) et l'extrait de fumée de cigarette.

#### B. La préparation de l'extrait de fumée de cigarette (CSE)

Le CSE provient de la fumée d'une à deux cigarettes *Research* (U Kentucky, USA), extrait grâce à une pompe péristaltique permettant de faire buller la fumée dans 20mL de milieu de culture sans Sérum de Veau Fœtal. L'extrait récupéré correspond au CSE 100% et est standardisé par une mesure d'absorbance à 320nm qui doit être comprise entre 0,7 et 0,9.



**Figure 16 : Dispositif expérimental pour la préparation de l'extrait de fumée de cigarette.** (1) Pompe péristaltique (2) Tube Falcon contenant 20 ml de milieu et recueillant la fumée de cigarette (3) Cigarettes IFR3.

## C. La culture cellulaire

Les lignées A549, Calu3 et NCI H292 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC Manassas, USA). Elles sont cultivées au sein d'un incubateur cellulaire sous atmosphère contrôlée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules est effectué lorsqu'elles atteignent une confluence entre 80 et 90%. Pour ce faire, elles sont rincées avec du tampon PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), puis incubées avec de la Trypsine EDTA (Éthylène diamine tétra acétique) soit à 0,05%, pour les lignées A549 et NCI H292, soit à 0,25% pour la lignée Calu3. Les cellules sont détachées, et l'ajout de milieu complété avec 10% de SVF permet d'arrêter l'action de la trypsine.

### 1. Mise en culture des cellules

Lignée cellulaire A549 (Repiquage <10) : A J0, les A549 sontensemencées à 45 000 cellules/mL dans des plaques 24 puits (BD Falcon®) à 37°C.

Lignée cellulaire Calu3 (Repiquage <10) : A J0, les cellules sont mises en culture à 80 000 cellules/mL dans des plaques 24 puits (BD Falcon®) à 37°C.

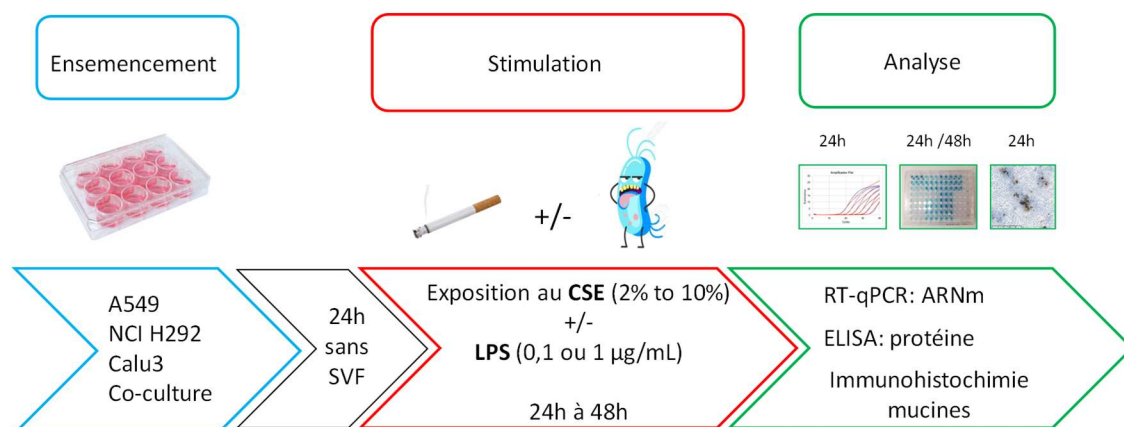
Lignée cellulaire NCI H292 (Repiquage <10) : A J0, les NCI H292 sontensemencées à 80 000 cellules/mL dans des plaques 24 puits (BD Falcon®) à 37°C.

Co-culture de NCIH292 (Repiquage <10) et Calu3 (Repiquage <10) : A J0, la lignée NCIH292 est à 210 000 cellules/puits et la lignée Calu3 à 140 000 cellules/puits, dans des plaques 12 puits (BD Falcon®) à 37°C.

### 2. Traitements des cellules

Tout d'abord, chaque lignée cellulaire a été cultivé en plaque 24 puits jusqu'à confluence. Par ailleurs, la co-culture des deux lignées NCI H292 et Calu3, a été réalisé en plaque 12 puits dans les mêmes conditions que précédemment. Les cellules (A549/NCI H292/Calu3) ainsi que la co-culture des lignées NCIH292 et Calu3, sont exposées à différentes doses de CSE: de 2, 4, 8 et 10%, et de LPS de 0,01; 0,1 et 1µg/mL ; ainsi qu'une association du CSE 4% au LPS à 0,1µg/mL, pendant 24h et 48h. Ensuite, les surnageants cellulaires sont stockés à -20°C, pour le dosage des différentes cytokines et de la production de mucine. Le lysat cellulaire est stocké à -80°C pour l'extraction des ARNm.





**Figure 17 : Protocole expérimental**

#### D. Test de viabilité cellulaire

La toxicité de l'extrait de fumée de cigarette et du LPS, a été mesurée par le kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Ce test permet de détecter le nombre de cellules viables basé sur la quantité d'ATP, reflétant la présence de cellules métaboliquement actives.

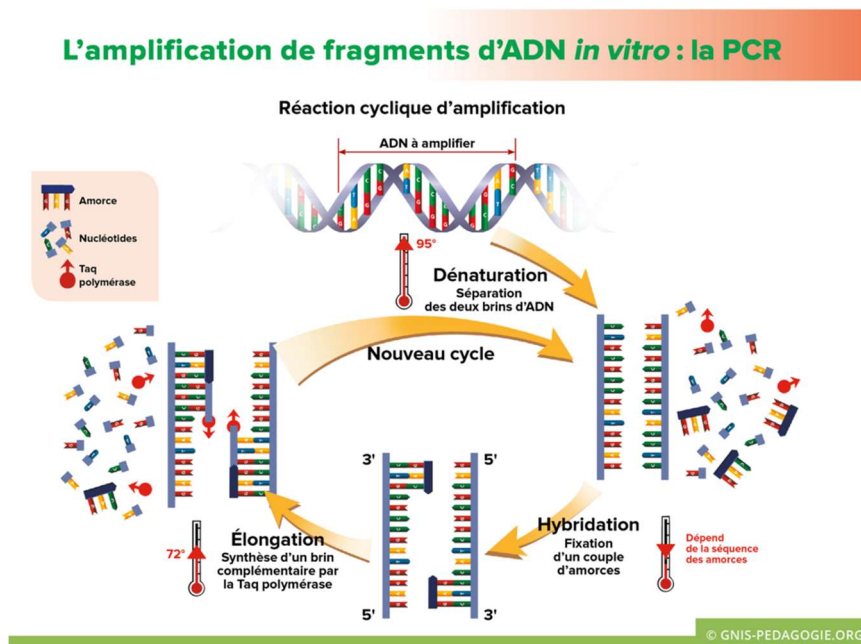
Tout d'abord, chaque lignée cellulaire est ensemencée puis exposée ou non aux différentes doses de stimuli pendant 24h ou 48h, en plaque 96 puits. Après retrait du surnageant de culture, 100µl de milieu de culture sans rouge de phénol sont déposés par puit et incubée 30 minutes à température ambiante. Ensuite, 100µL de réactifs reconstitués contenant de la luciférine et l'enzyme Ultra Glor Luciferase sont ajoutés. Après 3 minutes d'agitation à 300 rpm sur un agitateur orbital, 100µL du mélange sont déposés dans une plaque opaque. Enfin, après 10 minutes de repos dans le noir, la luminescence de chaque puits est lue à 575nm *via* un lecteur de microplaque POLARstar Omega® (BMG Labtech®).

#### E. Etudes des ARNm par RT-qPCR

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des cellules grâce au kit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNAII, selon les instructions du fournisseur. La quantité et la qualité d'ARN total a été mesurée par spectrophotométrie UV en utilisant un nanodrop.

Les ARNs ont été conservés à -80°C. L'étude des taux des ARNs de mucines et de cytokines ont ensuite été évalués par RT-qPCR. La transcription inverse (RT) a été réalisée à partir de

500ng d'ARN total et s'effectue à l'aide d'un kit «high Capacity cDNA Reverse Transcriptase » de Thermo Fisher Scientific®. La réaction de RT est initiée 10 minutes à 25°C, se poursuit pendant 2 heures à 37°C, puis est stoppée 5 secondes à 85°C. Les échantillons sont ensuite dilués au 1/10 puis déposés en triplicat à sur une plaque 384 puits ABI PRISM (Applied Biosystems®) où la concentration en ADNc est estimée à 2,5ng/μL.



**Figure 18 : Principe de l'amplification par PCR** D'après <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/coeur-adn>

Les réactions d'amplification sont effectuées par une ADN polymérase, intégrée au SYBR Green I PCR Master Mix, à l'aide du thermocycleur Quant 7 Flex Studio Real-Time PCR Systems (Thermo Fischer Scientific). Le programme de qPCR utilisé se déroule sur 40 cycles. Il débute par une phase à 95°C pendant 10 minutes puis 95°C pendant 15 secondes et enfin une phase à 60°C pendant une minute. Le « rapporteur » fluorescent utilisé est le SYBR Green I (SYBR Green I PCR Master Mix, Applied Biosystems®).

|                                     | <i>Sens</i>                 | <i>Anti-sens</i>            |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>CCL2/MCP1</i>                    | 5'-TGTCCCAAAGAAGCTGTGATC-3' | 5'-ATTCTTGGGTTGTGGAGTGAG-3' |
| <i>CXCL1/Gro<math>\alpha</math></i> | 5'-AACCGAAGTCATAGCCACAC-3'  | 5'-CCTCCCTTCTGGTCAGTTG-3'   |
| <i>CXCL8/IL8</i>                    | 5'-AAGAAACCACCGGAAGGAAC-3'  | 5'-AAATTTGGGGTGGAAAGGTT-3'  |
| <i>MUC5AC</i>                       | 5'-TGGAGCTGGACACCAAATAC-3'  | 5'-CTTGGTGTGTGGGAGAGG-3'    |
| <i>MUC5B</i>                        | 5'-GAACTGCCAGAGCTGTAAC-3'   | 5'-CATCGGTGGTGTGTAGATGA-3'  |
| <i>GAPDH</i>                        | 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3'  | 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG-3'  |

**Tableau 3 : Séquences d'amorces humaines**

Le calcul de la quantité relative des taux d'ARNms est déterminé par la méthode des  $\Delta\Delta Ct$  :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène référence}} - Ct_{\text{gène intérêt}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{contrôle}}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  correspond aux variations des niveaux d'ARNms dans l'échantillon par rapport au contrôle. Ct désigne le Cycle threshold, c'est-à-dire, correspondant à la valeur du nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil de base.

## F. Dosage immunoenzymatique dans les surnageants cellulaires

### 1. Les chimiokines

Les chimiokines CXCL8 (IL-8), CXCL1 (Gro- $\alpha$ ) et CCL2 (MCP-1), présentes dans les surnageants de culture, sont dosées par la méthode sandwich immunoenzymatique grâce à des Kits Duoset<sup>®</sup> ELISA Development system (R&D System<sup>®</sup>).

Les anticorps de capture de souris dirigés contre CXCL8 humain, ou contre le CXCL1 humain, ou encore contre CCL2 humain sont déposés sur une plaque pour ELISA (96 puits, EIA/RIA, Costar<sup>®</sup>), pendant toute une nuit. Ensuite, trois lavages sont réalisés avant d'ajouter 100 $\mu$ L d'échantillons ou le standard par puit en duplica.

Ces derniers sont incubés pendant 2h à température ambiante. Puis, après 3 nouveaux lavages, les anticorps de détection, sont déposés et incubés pendant 2h à température ambiante. Puis, 100  $\mu$ L de la solution Streptavidin HRP (horseradish peroxidase) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée à l'obscurité pendant 20 minutes.

Ensuite, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) préparé extemporanément, est ajouté à raison de 100 µL/puits, après lavage pendant 10 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. La réaction colorée est stoppée par l'ajout de 50 µL/puits d'une solution d'acide sulfurique à 1N. La densité optique (DO), est lue à 450 et 540 nm par un lecteur de microplaque POLARstar Omega® (BMG Labtech®). Les limites de détection sont de 31,3 à 2000 pg/mL pour CXCL8 et CXCL1, et sont de 15,6 à 1000 pg/mL pour CCL2.

## 2. La protéine MUC5AC

Pour le dosage de MUC5AC, les surnageants sont déposés sur une plaque ELISA 96 puits (96 puits, EIA/RIA, Costar®), et incubés pendant une nuit à 40°C, pour évaporation. Toutes les protéines du surnageant vont tapisser le fond du puits.

La détection de la protéine d'intérêt se fait grâce à la reconnaissance spécifique de MUC5AC par un anticorps primaire de souris anti MUC5AC humaine clone, lui-même reconnu par un anticorps secondaire anti IG1 de souris couplé à la peroxydase.

L'intensité de coloration est détectée par spectrophotométrie avec le lecteur de microplaque POLARstar Omega® (BMG LABTECH®). Ces valeurs vont permettre le calcul des pourcentages de l'intensité colorimétrique correspondant à la quantité relative de MUC5AC présent dans les surnageants de culture *versus* le milieu seul.

## G. Etude Immunohistochimique

Les cellules sont cultivées dans une chambre de culture labtek NUNC, pendant trois jours, suivis de 24h de privation de SVF. Après 24h de stimulation avec du CSE et/ou du LPS, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de Carnoy pendant 2h à 4°C. Enfin, les membranes cellulaires sont perméabilisées avec une solution de BSA-Saponine 0.5%, pendant 30 minutes à température ambiante. La coloration avec le DAB (3,3'-Diaminobenzidine) se fait *via* l'automate DISCOVERY Ultra. L'anticorps primaire de souris anti-MUC5AC clone 45M1 (ABCAM) dirigé contre la protéine de MUC5AC humaine est utilisé à une concentration située entre 1 et 2µg/mL. L'analyse des lames est réalisée *via* le scanner HAMATSU, qui permet de localiser la protéine MUC5AC grâce à la coloration brune due à la formation du complexe immun entre l'anticorps secondaire anti-IgG de souris, couplé à une HRP et le chromogène DAB.

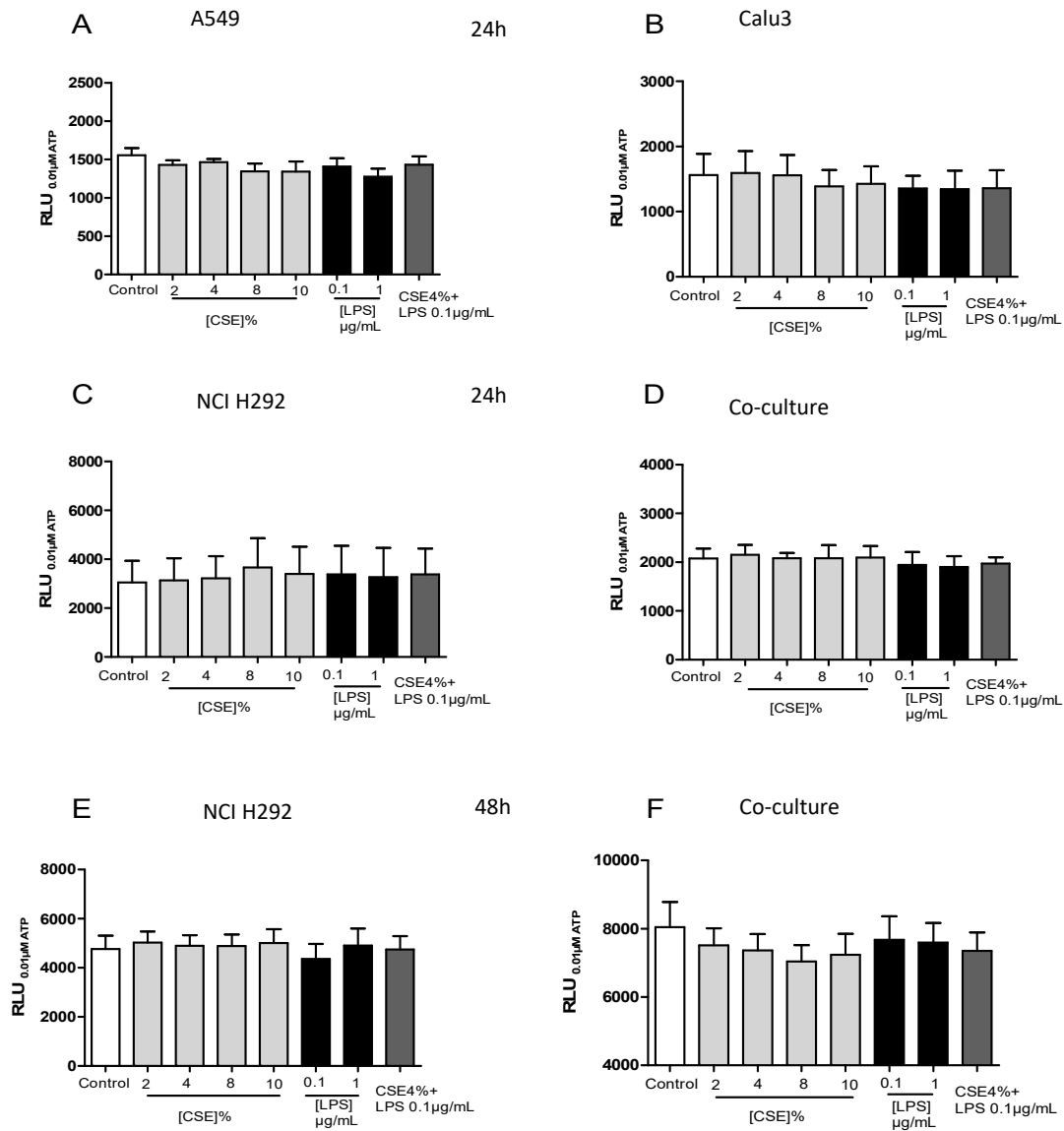
## H. Etudes statistiques

Les données sont présentées sous la forme de moyenne avec +/- SEM et ont été analysées grâce au logiciel Prism 5.0® (GraphPad Software®, La Jolla, CA). Les différences entre les échantillons ont été analysées par des tests ANOVA non paramétriques suivi d'un test de Kruskal et Wallis. Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au contrôle ;  $\alpha p < 0,05$  par rapport au traitement LPS ;  $\beta p < 0,05$  par rapport au traitement CSE).

## IV. Résultats

### A. Mesure de la toxicité du CSE et du LPS

Tout d'abord, nous avons souhaité évaluer l'éventuelle toxicité du CSE et du LPS sur les trois lignées de cellules épithéliales et la co-culture. Nous pouvons observer sur la figure 19 que les différentes concentrations de CSE ainsi que celles de LPS exposées pendant 24h n'ont pas d'impact sur la viabilité cellulaire dans les différentes lignées cellulaires et la co-culture. De même, lorsque les *stimuli* sont exposés ensemble, les résultats ne montrent pas de baisse du niveau de viabilité cellulaire par rapport au contrôle. Enfin, sur le graphique E et F, la durée d'exposition des deux stimuli est augmentée à 48h, néanmoins cela ne semble pas induire de toxicité cellulaire pour les cellules NCI H292 et la co-culture.



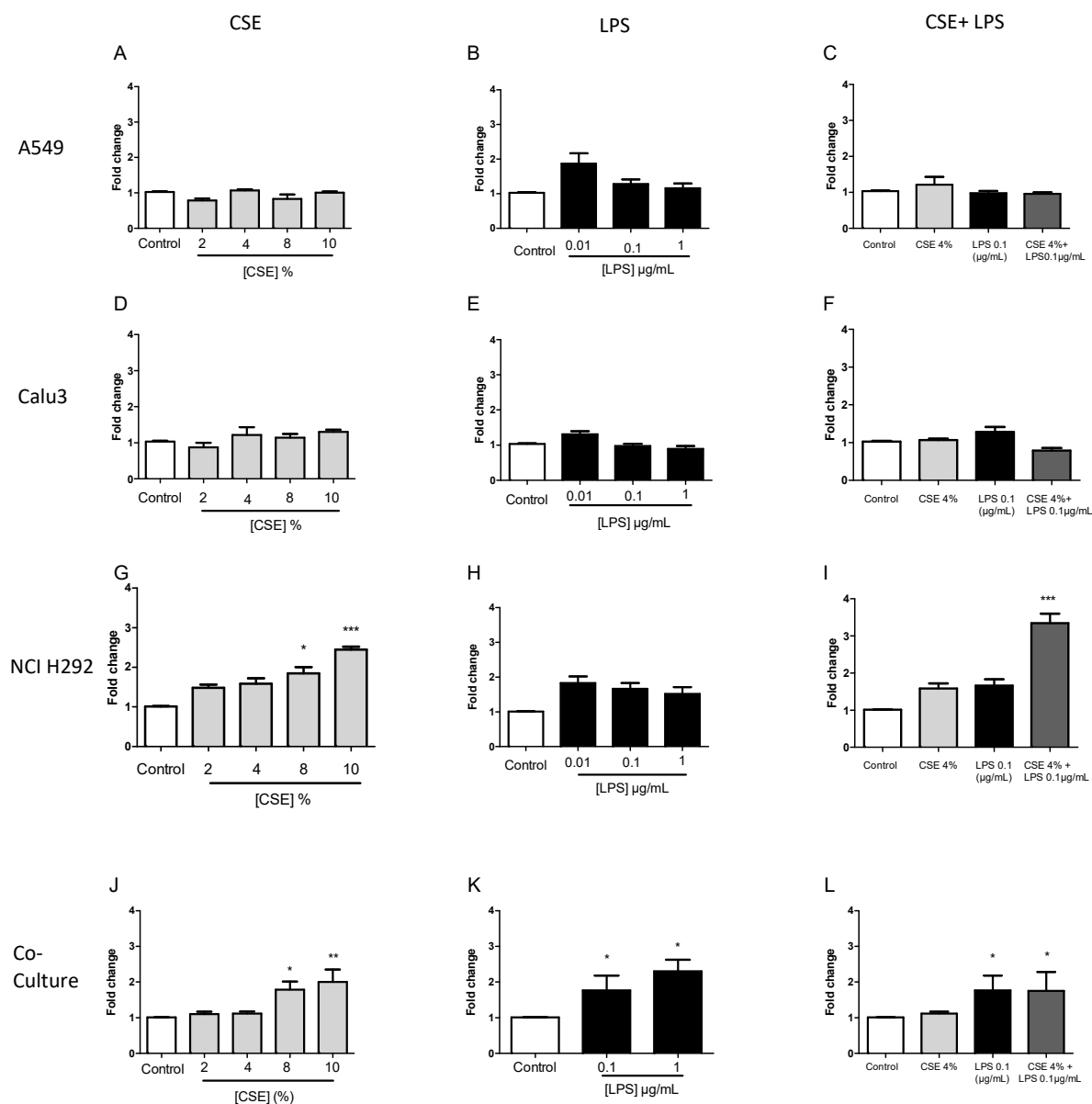
**Figure 19 : Mesure de la toxicité du CSE et du LPS sur différentes lignées de cellules épithéliales après 24h et 48h d'exposition** : Les cellules A549 (A), Calu3 (B), NCI H292 (C et E) et la co-culture (D et F) ont été exposé à des doses croissantes de CSE et de LPS, ainsi que le CSE associé au LPS pendant 24h (A, B, C et D) et 48h (E et F). Les données représentent la moyenne +/- SEM de 3 à 5 expériences. Les valeurs correspondent à la quantité d'ATP présent, proportionnel à la quantité de cellules viables où 0.01µM d'ATP équivaut à approximativement 50 cellules métaboliquement actives.

## **B. Expression de mucine (MUC5AC)**

Dans un premier temps pour valider notre modèle nous avons mesuré l'expression de *MUC5AC* par PCR. Les résultats de la figure 20 montrent que dans les lignées A549 et Calu3, leur taux en ARNm de *MUC5AC* après exposition à des doses croissantes de CSE et/ou LPS, n'augmentent pas. En effet, leurs taux en ARNm de *MUC5AC* restent inchangés par rapport au contrôle. Concernant la lignée NCI H292, son taux en ARNm de *MUC5AC* augmente de façon dose-dépendante par rapport à la stimulation du CSE. De plus, lorsque les deux stimuli sont associés, l'expression en *MUC5AC* est induite sur les cellules NCI H292. Enfin, le système co-cultivé montre une augmentation du taux d'ARNm de *MUC5AC* après expositions aux doses les plus élevées de CSE, mais aussi après expositions à différentes doses de LPS, en comparaison avec le contrôle.

Aucun effet synergique ou additif de l'association de CSE au LPS n'été pu être observé sur les trois lignées cellulaires.



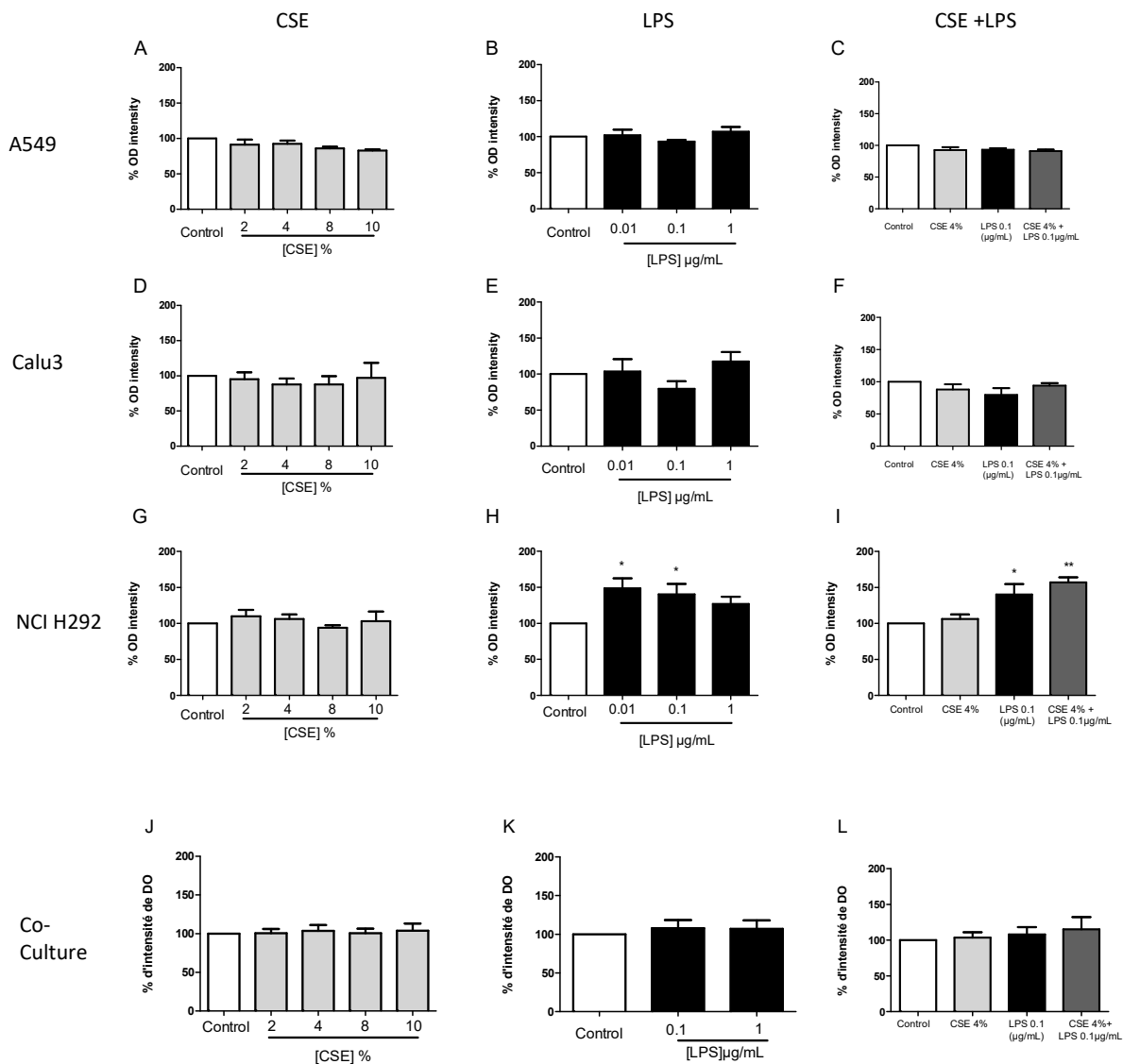


**Figure 20 : Comparaison du taux d'ARNm de *MUC5AC* après exposition de CSE et/ou LPS pendant 24h par différentes lignées de cellules épithéliales.** Les cellules A549 (A, B et C), Calu3 (D, E et F), NCI H292 (G, H et F) et la co-culture de NCI H292 et Calu3 (J, K et L) ont été exposé à des différentes concentrations de CSE et LPS, ainsi que le CSE associé au LPS, pendant 24h. Les données représentent la moyenne +/- SEM de 3 à 4 expériences. L'expression des ARNs de *MUC5AC* a été normalisée par rapport à la *GAPDH*. Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au contrôle)

### **C. Sécrétion de mucine (MUC5AC)**

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité déterminer l'impact de l'exposition du CSE et/ou du LPS sur le niveau de sécrétion protéique de MUC5AC de ces trois lignées et la co-culture. Pour cela, nous avons dosé la présence de mucine dans les surnageants des expériences de cultures décrites précédemment, par la méthode directe d'ELISA. Le niveau de sécrétion de MUC5AC est mesuré de façon relative par rapport au contrôle, correspondant au milieu seul.

En figure 21, les résultats montrent que l'exposition aux deux stimuli, seuls ou associés ne permettent pas d'induire d'augmentation de la sécrétion de MUC5AC dans les surnageants des lignées A549 et Calu3. Contrairement à elles, la lignée NCI H292 est impactée par l'exposition au LPS aux plus faibles concentrations, et subit une induction plus importante lorsque le LPS est associé au CSE. Enfin, pour le système de co-culture, l'exposition avec les deux stimuli seuls ou associés n'augmente pas le niveau de sécrétion de MUC5AC.



**Figure 21 : Comparaison du taux de sécrétion relatif de la protéine MUC5AC après exposition de CSE et/ou LPS par différentes lignées de cellules épithéliales.** Les sécrétions de MUC5AC sont analysées par la méthode directe d'ELISA. Les cellules A549 (A, B et C), Calu3 (D, E et F), NCI H292 (G, H et I), et la co-culture de NCI H292 et Calu3 (J, K et L) ont été exposé à différentes concentrations de CSE et de LPS, ainsi que le CSE associé au LPS, pendant 24h. Les données sont présentées sous forme de moyenne avec +/- SEM de 3 à 4 expériences. Les valeurs représentent les pourcentages d'intensité colorimétrique correspondant à la quantité relative de MUC5AC présent dans les surnageant cellulaires versus le milieu seul (contrôle). Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  par rapport au contrôle)

#### **D. Production de médiateurs inflammatoires**

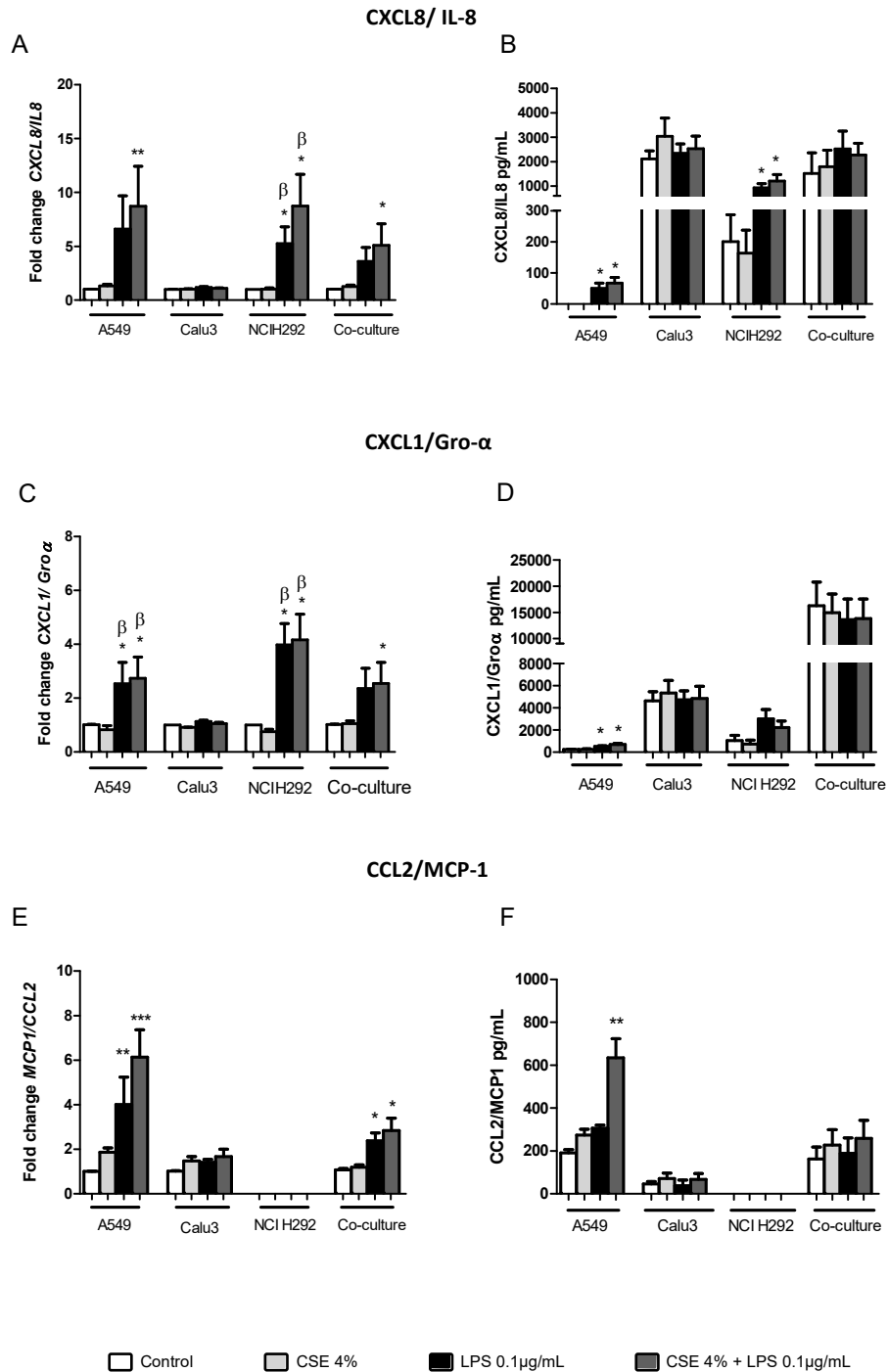
Après avoir déterminé la capacité d'induction de sécrétion de mucine, nous nous sommes intéressés à la réponse inflammatoire des trois lignées épithéliales et de la co-culture. Pour cela nous avons mesuré l'expression et la sécrétion de trois chimiokines, indicateurs de la réponse inflammatoire : CXCL8/IL-8, CXCL1/Gro- $\alpha$  et CCL2/MCP-1.

Premièrement, sur la figure 22A, les résultats nous montrent que pour la lignée A549 et la co-culture, l'exposition au CSE associé au LPS permet d'augmenter significativement le taux d'ARNm de CXCL8/IL-8. En revanche, lorsque la lignée Calu3 est seule, l'exposition aux deux stimuli, associés ou non, ne semble pas avoir d'impact sur ce taux d'ARNm. Quant à la lignée NCI H292, l'exposition au LPS permet d'induire une augmentation du taux d'ARNm de CXCL8/IL-8, et ce de manière d'autant plus importante lorsque le LPS est couplé avec du CSE à 4%. Concernant les sécrétions protéiques de CXCL8/IL-8, représentées sur le graphique 22B ; nous pouvons observer que la lignée A549 est capable de sécréter CXCL8/IL-8 seulement en présence de LPS, même si le niveau de sécrétion reste relativement faible dans ces cellules. Cependant, pour la lignée Calu3, ainsi que lorsqu'elle est co-cultivée, le niveau basal de sécrétion de CXCL8/IL-8 est très élevé, ainsi l'exposition aux différents stimuli ne semble pas avoir d'effet sur le taux de sécrétion de CXCL8/IL-8 dans ces cellules. En revanche, pour les cellules NCI H292, la présence de LPS permet d'augmenter la sécrétion de CXCL8/IL-8 mais pas la stimulation par le CSE seul.

Ensuite, nous nous sommes penchés sur la deuxième chimiokine : CXCL1/Gro- $\alpha$ . Les résultats de la figure 22C, montrent que l'exposition aux deux stimuli associés ou non, n'induit pas de modification du taux des ARNm de cette chimiokine sur la lignée Calu3. Néanmoins, l'exposition avec le LPS permet d'augmenter de façon significative le niveau d'ARNm de CXCL1/Gro- $\alpha$ , sur les lignées A549 et NCI H292, ainsi que sur la co-culture. Puis, au sujet de la sécrétion de CXCL1/Gro- $\alpha$ , seule la lignée A549, est capable d'augmenter significativement son niveau de sécrétion de CXCL1/Gro- $\alpha$ , après exposition à du LPS (Figure 22D). Enfin, concernant la lignée Calu3 et la co-culture, leur niveau basal de sécrétion étant très élevé, les stimuli ne permettent pas d'induire une augmentation de la sécrétion de cette chimiokine dans leur surnageant.

A la suite à ces observations, nous nous sommes intéressés à une troisième et dernière chimiokine : CCL2/MCP-1 ; dont les résultats sont représentés en figure 22E et 22F. La figure 22E nous montre que la lignée NCI H292 n'exprime pas le gène de *CCL2/MCP-1*. Par ailleurs, l'exposition aux deux stimuli sur la lignée Calu3, ne semble pas impacter le niveau d'expression des ARNm de *CCL2/MCP-1*. Cependant, la stimulation par le LPS sur la lignée A549, et sur la co-culture induit une augmentation de son taux d'ARNm de *CCL2/MCP-1*.

Néanmoins, l'association des deux stimuli ne permet pas un effet additif sur le taux d'ARNm produit par ces derniers. Enfin, sur la figure 22F, nous observons que la lignée NCI H292 ne sécrète pas de CCL2/MCP-1. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus montrant l'absence d'ARNm de *CCL2/MCP-1* chez cette lignée. En revanche, la lignée A549, est capable d'induire une augmentation de la sécrétion de CCL2/MCP-1 suite à l'exposition de CSE associé au LPS, mais pas avec le LPS seul. Par contre, à propos de la lignée Calu3 et lorsqu'elle est co-cultivée avec NCI H292, la stimulation du CSE et ou du LPS n'entraîne pas d'augmentation de la sécrétion de CCL2/MCP-1.



**Figure 22 : Comparaison du taux d'ARNm et de sécrétion protéique des trois chimiokines après exposition à une dose de CSE à 4% et/ou de LPS pendant 24h.** Les sécrétions des trois chimiokines sont analysées par la méthode indirecte d'ELISA. Les graphiques représentent le taux d'ARNm de CXCL8/IL-8 (A) et son niveau de sécrétion protéique (B), le taux d'ARNm de CXCL1/Gro-α (C) et son niveau de sécrétion protéique (D), et le taux d'ARNm de CCL2/MCP-1 (E) et son niveau de sécrétion protéique (F) quantifiés sur les trois lignées et la co-culture. Les données représentent la moyenne +/- SEM de 3 à 4 expériences. L'expression des ARNm de chaque chimiokine a été normalisée par rapport à la GAPDH. Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au contrôle; β  $p < 0,05$  par rapport au traitement CSE).

## **E. Production de mucine et de chimiokines après 48h de stimulation**

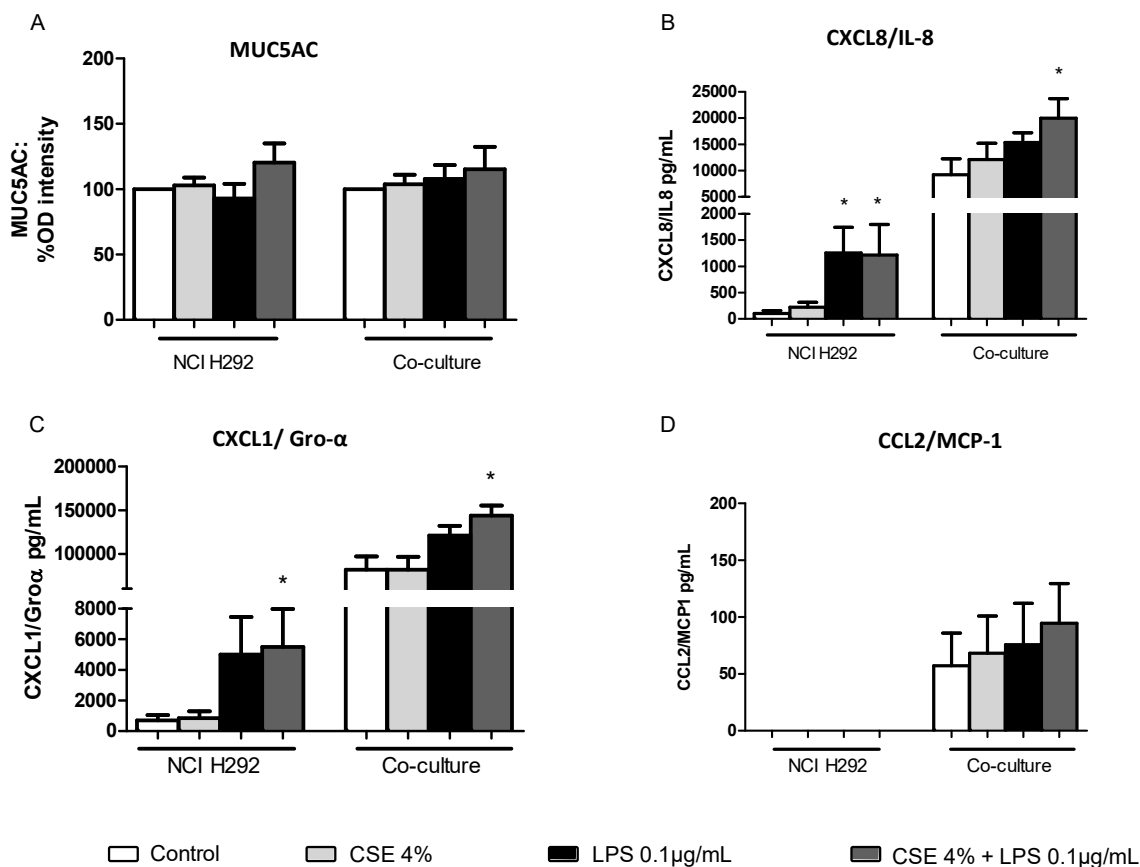
Suite aux résultats obtenus précédemment, nous avons souhaité déterminer si le niveau de sécrétion protéique de mucine et des chimiokines pouvaient s'accroître en prolongeant la durée d'exposition du CSE et ou du LPS jusqu'à 48h. Nous avons donc réalisé les dosages protéiques sur la lignée NCI H292 et sa co-culture avec Calu3, car ils se présentent comme les deux modèles les plus appropriés pour cette étude.

La figure 23 est un comparatif des sécrétions de chimiokines des deux cultures, NCI H292 seule ou co-cultivée avec Calu3, pendant 48h d'exposition. La figure 23A montre que même une exposition pendant 48h ne permet pas d'augmenter le niveau de sécrétion de MUC5AC, dans la lignée NCI H292 seule mais aussi en co-culture avec Calu3.

A propos de la sécrétion de CXCL8/IL-8 présentés sur la figure 23B ; l'exposition en présence de LPS seul ou associé au CSE permet une augmentation de la production de cette chimiokine chez la lignée NCI H292. Néanmoins, seulement l'association du CSE avec le LPS exposés pendant 48h, permet une augmentation de la concentration du taux de CXCL8/IL-8, sur la co-culture.

Par ailleurs, nous pouvons observer que la lignée NCI H292, en présence de LPS et CSE pendant 48h, est capable d'augmenter son taux de sécrétion de CXCL1/Gro- $\alpha$ . Cependant, seule l'association du CSE+LPS augmente de manière significative la sécrétion de CXCL1/Gro- $\alpha$  dans la co-culture.

Enfin, concernant le CCL2/MCP-1 (figure 23D) nous avons observé, une absence de sécrétion de CCL2/MCP-1 pour la lignée NCI H292 contrairement à la co-culture de NCI H292/ Calu3. Toutefois, les résultats montrent que l'exposition aux stimulations pendant 48h ne permet pas d'induire d'augmentation de la sécrétion de CCL2/MCP-1 dans la co-culture.



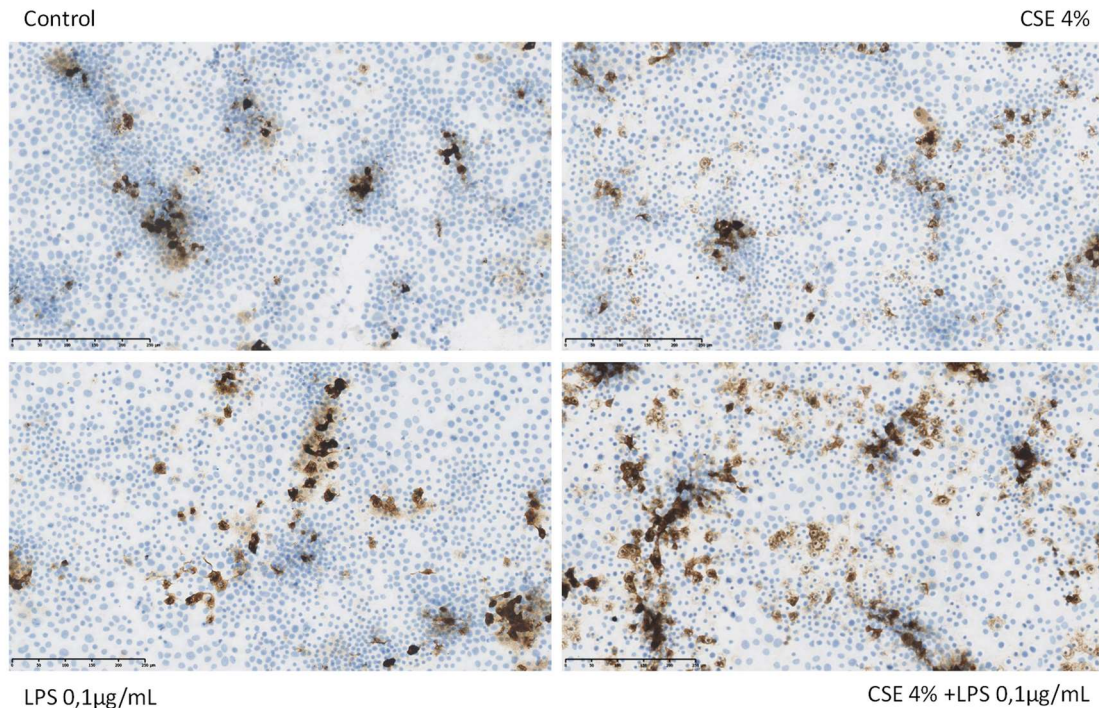
**Figure 23 : Comparaison du niveau de sécrétion protéique de MUC5AC et des trois chimiokines.** Exposition à une dose de CSE à 4% et/ou de LPS à 0.1µg/mL sur la lignée NCI H292 et lorsqu'elle est co-cultivée avec Calu3, pendant 48h. Les sécrétions de MUC5AC (A), de CXCL8/IL-8 (B), de CXCL1/Gro-α(C) et de CCL2/MCP-1 (D) sont analysées par la technique de l'ELISA. Les données représentent la moyenne avec +/- SEM, selon 3 ou 4 expériences. Les valeurs de MUC5AC représentent les pourcentages d'intensité colorimétrique correspondant à la quantité relative de MUC5AC présent dans les surnageants cellulaires versus le milieu seul (contrôle). Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives (\*  $p < 0,05$  par rapport au contrôle).

## F. Etude de l'induction de mucine chez NCI H292

Dans un premier temps, afin d'appuyer nos résultats sur la pertinence du choix de la lignée NCI H292, nous avons réalisé une étude de la présence de MUC5AC par immunohistochimie dans différentes conditions. La lignée a été exposé ou non au CSE4 %, au LPS 0,1µg/mL ou les deux associés pendant 24h. Nous pouvons observer sur la figure 24, que dans la condition contrôle, la lignée NCI H292 possède un niveau basal relativement faible en MUC5AC. Il en est de même suite à l'exposition aux deux stimuli réalisés séparément. Cependant, suite à la

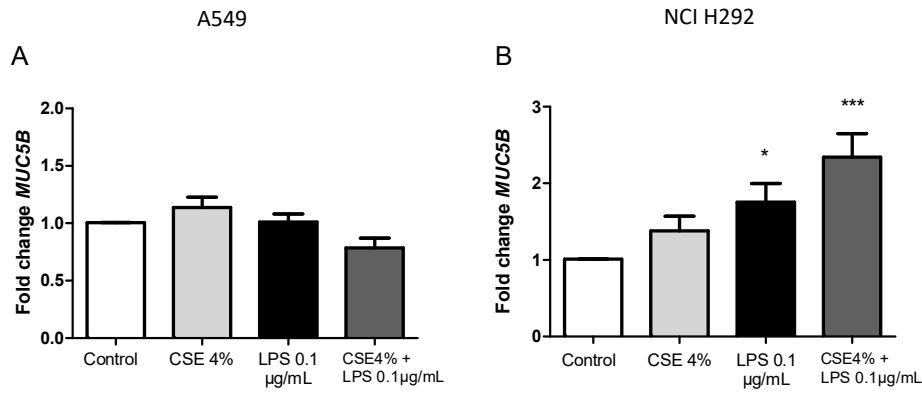


stimulation du CSE associé au LPS la production de MUC5AC est augmentée. Ces résultats confirment ceux observés précédemment à propos des niveaux d'induction des ARNms et de protéines de MUC5AC chez NCI H292.



**Figure 24 : Induction de la production de MUC5AC chez NCI H292.** Les cellules ont été mise en culture, puis exposées au CSE 4 %, au LPS 0,1 µg/mL ou les deux associés, pendant 24h. Puis après fixation, elles sont marquées par un anticorps anti-MUC5AC qui sera révélé par la coloration de DAB.

Dans un second temps, nous avons souhaité savoir si l'association des deux stimuli permet d'induire également l'augmentation de l'expression d'une autre mucine sécrétée : MUC5B. Nous avons donc comparé l'éventuelle induction des ARNms de MUC5B sur la lignée A549, et la lignée NCI H292, toujours selon les mêmes conditions d'exposition. Les résultats en figure 25 montrent que pour la lignée A549, les différentes conditions d'exposition associées ou non ne permettent pas d'induire une augmentation du taux d'ARNms de MUC5B. En revanche, sur la lignée NCI H292, l'exposition par le LPS seul induit une augmentation des ARNms de MUC5B et de manière d'autant plus importante lorsqu'il est associé au CSE. Ces données appuient la pertinence dans le choix de NCI H292 comme modèle *in vitro* le plus adéquat pour cette étude.



**Figure 25 : Comparaison du taux d'ARNm de MUC5B après exposition au CSE et/ou au LPS pendant 24h par A549 et NCI H292.** Les cellules A549 (A), et NCI H292 (B) ont été exposé au CSE 4% ou au LPS 0,1 µg/mL, ainsi que le CSE associé au LPS, pendant 24h. Les données représentent la moyenne +/- SEM de 3 à 4 expériences. L'expression des ARNs de MUC5B a été normalisée par rapport à la GAPDH. Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au contrôle)

## V. Discussion et perspectives

Les cellules épithéliales des voies aériennes sont les premières impactées par l'exposition aux particules de l'air inhalé. Elles sont donc directement exposées aux agents toxiques et pathogènes présents dans l'air. Pour se protéger contre ces agressions, ces cellules vont produire du mucus. Ce processus de protection peut basculer en symptôme pathologique lorsque ce dernier s'accumule et obstrue les voies aériennes, caractérisant les pathologies obstructives. Par conséquent, l'effet thérapeutique des traitements administrés par voie inhalée, généralement utilisés dans le cadre de pathologies respiratoires est affectée par l'excès de mucus. Ainsi, afin de mesurer l'efficacité mucolytique et anti-inflammatoire des néo-vecteurs, un modèle pertinent pour tester ces nouvelles molécules semble nécessaire. L'objectif de cette étude a été de comparer trois lignées épithéliales humaines pulmonaires productrices ou non de mucus, afin de déterminer le modèle le plus adéquat pour la production de médiateurs inflammatoires et de mucus. Notre étude est basée sur la comparaison de plusieurs lignées épithéliales des voies aériennes, A549, NCI H292 et Calu3, stimulées par des faibles doses de fumée de cigarette et de LPS. Notre travail a pu mettre en évidence que la lignée NCI H292 semble la plus adéquate. Elle est capable d'induire une augmentation de sa production de mucus après stimulation pendant 24h avec du CSE à 4% associé au LPS à 0.1µg/mL. De plus, elle est capable d'augmenter ses taux d'expression d'ARNm de *MUC5AC* et de *MUC5B*, en réponse à l'exposition au CSE+LPS. Enfin, l'utilisation du LPS chez NCI H292, permet d'induire une augmentation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires. La fumée de cigarette est reconnue comme la principale cause responsable de Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Son exposition est associée avec l'augmentation de l'expression de *MUC5AC* et de sa production (Di, Zhao, et Harper 2012; Mebratu et al. 2011; Zhou et al. 2016; De Rose et al. 2018). D'ailleurs, il est démontré que la mucine *MUC5AC* semble jouer un rôle essentiel dans l'obstruction des voies aériennes, et dans l'hyperréactivité des pathologies allergiques alors que *MUC5B* serait plutôt liée au bon fonctionnement de la clairance mucociliaire (Evans et al. 2015).

Par ailleurs, l'utilisation du LPS d'*Escherichia coli*, permet de mimer les infections bactériennes lors des exacerbations (Liang et al. 2018).

Il va induire la sécrétion de médiateurs comme des chimiokines, dont CXCL8 et CXCL1, mais

aussi CCL2. CXCL1 et CXCL8 permettent le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de l'inflammation. Les neutrophiles sont, d'ailleurs, retrouvés de manière abondante dans les voies aériennes de patients atteints de BPCO, mucoviscidose (De Rose et al. 2018) , mais aussi d'asthme sévère (Kuruvilla et al. 2019). CCL2 est également un puissant facteur chimiotactique des monocytes et des lymphocytes T et pourrait être impliqué dans l'accumulation de macrophage au sein des poumons de patients BPCO, (Koelink et al. 2012; Barnes 2008).

Dans ce travail, nous avons pu démontrer que la fumée de cigarette induit l'augmentation du niveau des ARNm de la mucine dans la lignée NCI H292, en accord avec les résultats de plusieurs études (Takeyama et al. 2001; Montalbano et al. 2014). La lignée épithéliale bronchique NCI H292, est connue pour augmenter son expression et sa production de mucines suite à l'exposition à divers stimuli (Shao et al. 2004; Kurakula et al. 2015; Chiba et al. 2011a). D'ailleurs, cette lignée semble être la plus sensible pour la régulation de l'expression de *MUC5AC* après stimulation au CSE. Confortant nos résultats, une autre étude décrit cette lignée comme étant un modèle sensible à la fumée de cigarette tout en gardant ses caractéristiques muco-épidermales (Newland et Richter 2008). De plus, plusieurs études rapportent qu'après exposition à la fumée de cigarette, NCI H292 semble réagir de façon similaire aux cellules primaires bronchiques humaines (HBECs) ainsi qu'à l'épithélium en condition *in vivo* (Baginski et al. 2006; Newland et Richter 2008; Phillips et al. 2005; Shao, Nakanaga, et Nadel 2004).

D'autre part, nous avons pu démontrer que l'augmentation de la sécrétion protéique de MUC5AC est possible grâce à l'exposition à de faibles doses de LPS, en accord avec les résultats de l'étude de Lin et collaborateurs (Lin et al. 2018). De même, le CSE semble avoir un effet additif à la sécrétion de MUC5AC induite par le LPS. D'ailleurs, il est décrit que la fumée de cigarette augmente la production de MUC5AC *via* l'activation de la voie ERK1/2 dépendante de TLR3 dans la lignée NCI H292 (Kanai et al. 2015). Par ailleurs, l'exposition au LPS est décrit comme inducteur d'un état inflammatoire sur les cellules épithéliales bronchiques, entraînant la sécrétion de chimiokines CXCL1 et CXCL8 (Inui et al. 2019).

En accord avec ces auteurs, nos résultats montrent que NCI H292 peut induire l'augmentation de l'expression et la sécrétion de ces deux chimiokines en réponse au LPS. D'ailleurs, l'étude de B. Li et al. 2011, conforte nos résultats en démontrant qu'un inhibiteur de CCR3 permet de

diminuer la sécrétion de CXCL8 induite par le LPS chez NCI H292. De plus, il a également été démontré que cette lignée cellulaire peut libérer des cytokines après stimulation à la méthode particulière d'exposition de la fumée de cigarette (PM) (Newland et Richter, 2008). Par contre, cette même étude montre que la lignée NCI H292 ne sécrète pas de CCL2 en réponse à la PM, de façon comparable à notre étude. Pour finir, l'exposition au LPS induit l'augmentation de l'expression génique de *MUC5B*, et cela de manière d'autant plus importante lorsqu'il est associé au CSE. L'étude de Perrais et al. 2002, appuie ces résultats en décrivant que NCI H292 peut exprimer l'ARNm de *MUC5B* mais ne pourrait pas sécréter la protéine. Il semble que la sécrétion de la protéine de MUC5B n'implique pas la même voie de signalisation que pour la protéine MUC5AC. Cette dernière serait induite par l'activation de la voie MAPK Erk1/2 dépendante de l'EGFR (Perrais et al. 2002).

Ensuite, notre étude s'est penchée sur la lignée de pneumocytes de type II (A549), déjà utilisée comme modèle dans la stimulation *in vitro* de cellules épithéliales alvéolaires (Victoni et al. 2014). Après exposition au CSE et/ou au LPS pendant 24h, la lignée A549 ne semble pas être en mesure d'augmenter son niveau d'ARNm de mucine. Ces résultats sont contradictoires avec l'étude de Di et al 2012, qui montre une augmentation du niveau d'ARNm de *MUC5AC* induite par l'exposition au CSE seul (Di, Zhao, et Harper 2012). Dans cette étude, la durée d'exposition au CSE étant de 2h, cela suggère que cette durée plus courte permettrait d'obtenir une augmentation d'ARNm de MUC5AC, qui semble retourner à un état basal au bout de 24h d'exposition. De plus, une autre étude a montré que l'exposition avec du LPS de *Pseudomonas aeruginosa* semblait pouvoir induire l'augmentation de l'expression de *MUC5AC* (W. Li et al. 2013), alors que nos résultats avec l'exposition au LPS d'*Escherichia coli* ne permet pas d'induire cette augmentation. Néanmoins, d'autres études, confortant nos résultats, décrivent les A549 comme étant insensibles à l'exposition de fumée de cigarette, comparés aux cellules épithéliales pulmonaires humaines (Kode et al. 2006); mais aussi en comparaison avec la lignée NCI H292 (Newland et Richter 2008).

D'autre part, l'expression de *MUC5B* dans cette lignée, n'est pas impactée par l'exposition au CSE +/-LPS, contrairement à une autre étude dont les résultats montrent une augmentation du niveau d'ARNm de *MUC5B*, après exposition avec du PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate), en condition de culture ALI (Air-liquide) (Yuan-chen Wu et al. 2007). Ces résultats

suggèrent que le PMA semble être un meilleur régulateur de l'expression de *MUC5B* que le CSE et /ou le LPS. D'ailleurs, le PMA favorise la phosphorylation de la PKC $\delta$  (proteïn kinase C  $\delta$ ), qui serait impliquée dans la régulation de la sécrétion de mucine (Hewson, Edbrooke, et Johnston 2004; Shao et Nadel 2005). De plus, il est possible que les conditions de culture cellulaire en ALI, utilisées dans cette étude, puissent également influencer sur la production de mucus, comme c'est le cas pour certaines lignées épithéliales humaines (Kreft et al. 2015). Enfin, l'exposition au LPS pendant 24h, induit l'augmentation de l'expression des trois chimiokines: CXCL8, CXCL1 et CCL2. Et, bien que le niveau de sécrétion reste faible par rapport aux deux autres lignées cellulaires, la lignée A549 semble induire une réponse inflammatoire suite à une stimulation au LPS couplé au CSE et sécrète CXCL8, CXCL1 et CCL2. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans l'étude de Victoni et al. 2014.

A propos de la lignée épithéliale trachéo-bronchique Calu3, nos résultats montrent que l'exposition du CSE et/ou du LPS ne semble pas modifier l'activation de ces cellules. Le niveau d'expression des ARNms des trois chimiokines ainsi que celui la mucine ne fluctue pas par rapport au contrôle. D'autre part, on peut observer que les taux de sécrétion protéique des cytokines, ont un niveau basal très élevé, également retrouvé lors du dosage de la protéine MUC5AC. D'ailleurs, les résultats montrent que ces cellules semblent être activées en absence de traitements. Cependant, Calu3 est une lignée décrite comme un modèle mimant les propriétés de l'épithélium bronchique, grâce à la sécrétion de mucus, la formation des jonctions serrées surtout lorsqu'elle est cultivée en insert en conditions ALI (Jeong et al. 2019). De même, une autre étude décrit que l'exposition à de l'acroléine, composant irritant de la fumée de cigarette permet induire une augmentation de la production de MUC5AC par la lignée Calu3 (Mura et al. 2011) D'ailleurs, ces auteurs utilisent la lignée Calu3 comme modèle épithélium bronchique pour l'étude sur le transfert de nanoparticules.

De plus, une autre étude rapporte que la lignée Calu3 induirait une augmentation des transcrits de *MUC5AC* ainsi qu'une augmentation de sécrétion de CXCL8 mais après traitement au LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (Morin et al. 2015). Dans notre étude, nous avons utilisé du LPS d'*Escherichia coli*, qui ne semble pas induire une réponse de cette lignée. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les conditions de culture de Calu3 en immergée ne semblent pas optimales pour induire une stimulation avec le CSE et ou le LPS. De même, il est possible

que les stimuli utilisés dans notre étude ne semblent pas adéquats pour induire une réponse par cette lignée. Peu de données sont répertoriées sur les effets de la fumée de cigarette et la lignée Calu3. Néanmoins, une étude sur la cigarette électronique a montré une induction de la production de cytokines IL-6 et CXCL8, mais dans le cadre d'une co-culture de fibroblastes et de la lignée Calu3 en insert en contact de l'air (ALI) (Vasanthi Bathrinarayanan et al. 2018). Pour finir, nous avons décidé de mettre en place un système de co-culture avec les cellules NCI H292 et Calu3, et de mesurer la production de mucine, ainsi que la réponse inflammatoire. Notre hypothèse était que les deux lignées pourraient interagir et augmenter les différentes inductions en réponse aux diverses stimulations. Cependant, les résultats ne vont pas dans ce sens. Même s'ils montrent une induction de l'expression des ARNms de *MUC5AC* et des cytokines après exposition au CSE combiné au LPS, les sécrétions protéiques ne semblent en aucun cas impactées par les différentes stimulations. Il semble que chaque lignée cohabite sans interagir en co-culture dans les réponses mesurées après stimulation par CSE+/-LPS. Elles semblent montrer les deux profils de chaque lignée cultivée séparément. Ainsi, l'expression des ARNms semble se rapprocher du profil de la réponse de NCI H292, quant à la sécrétion des protéines, la tendance se rapproche de celle de la lignée Calu3.

En conclusion, ce travail nous a donc permis de déterminer que la lignée NCI H292 semble être le meilleur modèle pour tester l'effet mucolytique et anti-inflammatoire des néo-vecteurs. En effet, cette lignée peut induire une sécrétion de mucus ainsi qu'une réponse inflammatoire après exposition au CSE associé ou non au LPS. Il nous reste néanmoins, à tester l'efficacité de ces nouveaux vecteurs sur ce modèle. A ce jour, nous avons réussi à transférer de façon stable la lignée NCI H292, avec un plasmide contenant une GFP. (*Green Fluorescent Protein*). Ainsi, nous pourrions dans un premier temps, déterminer l'efficacité de transfert des lipoplexes mucolytiques par mesure d'extinction de la fluorescence de la lignée GFP+, grâce à l'aide de siRNA cible des ARNm de la GFP, en absence et en présence de mucus. Puis, dans un second temps, l'efficacité thérapeutique des lipoplexes sera mesurée par l'utilisation de siRNA intégrés aux lipoplexes et dirigés contre le gène de la *MMP12*, jouant un rôle clé dans la physiopathologie de la BPCO, et *p65*. Les MMPs jouent un rôle important dans les processus d'inflammation pulmonaire et dans le remodelage tissulaire. Elles semblent être induites par de nombreux stimuli comme la fumée de cigarette (J.-W. Park et al. 2016). Quant à la protéine

p65, elle est une des sous unités du facteur NFκB, qui est fortement impliqué dans la régulation de nombreux gènes de cytokines inflammatoires ainsi que dans la production de mucus. D'ailleurs, il a été démontré que le facteur NFκB serait impliqué dans l'expression de *MUC5AC*, induite par le TNF-α chez NCI H292 (Kurakula et al. 2015). La régulation de la production de MMP12 induite par l'exposition au CSE et/ou le LPS, dans les cellules NCI H292, devra être étudiée. D'après une étude de J.-W. Park et al. 2016, il semble que NCI H292 exprime les gènes de la *MMP12* et de la *MMP13*, de façon dépendante de la phosphorylation de p65, suite à la présence de toxines de *Pseudomonas aeruginosa*.

Par ailleurs, il pourrait être intéressant de déterminer, les voies de signalisation impliquées dans la sécrétion des deux protéines : MUC5AC et MUC5B, chez NCI H292. Selon certains auteurs, les voies de signalisation impliquées seraient différentes. La sécrétion de MUC5AC semble être induite de la voie MAPK Erk1/2 dépendante de l'EGFR (Perrais et al. 2002). Alors que la sécrétion de MUC5B serait induite par l'activation des voies p38/JNKs indépendante de l'activation de l'EGFR (Yuan-chen Wu et al. 2007).

Ainsi, pour conclure, ce modèle d'étude *in vitro* d'exposition des cellules NCI H292 au CSE+LPS va permettre de mesurer de façon stable et reproductible l'efficacité des vecteurs, sur une lignée épithéliale humaine. Par ailleurs, il serait intéressant de confirmer la validité des lipoplexes mucolytiques sur des modèles de cultures primaires de cellules épithéliales humaines des voies aériennes, afin d'observer au plus près des réponses physiologiques *in vivo*, induite par cette nouvelle génération de vecteurs de thérapie génique.



## Bibliographie

Arabipour, Iman, Jafar Amani, Seyed Ali Mirhosseini, et Jafar Salimian. 2019. « The Study of Genes and Signal Transduction Pathways Involved in Mustard Lung Injury: A Gene Therapy Approach ». *Gene* 714 (septembre): 143968.

Baginski, Tomasz K., Karim Dabbagh, Chiradath Satjawatcharaphong, et David C. Swinney. 2006. « Cigarette Smoke Synergistically Enhances Respiratory Mucin Induction by Proinflammatory Stimuli ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35 (2): 165-74.

Barnes, Peter J. 2008. « The Cytokine Network in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 118 (11): 3546-56. <https://doi.org/10.1172/JCI36130>.

Barnes, Peter J. 2016. « Inflammatory Mechanisms in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (1): 16-27.

Barnes, Peter J. 2017. « Cellular and Molecular Mechanisms of Asthma and Copd ». *Clinical Science* 131 (13): 1541-58.

Barnes, Peter J. 2018. « Targeting Cytokines to Treat Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Nature Reviews Immunology* 18 (7): 454-66.

Barnes, Peter J. 2019a. « Inflammatory endotypes in COPD ». *Allergy*, n° 7: 1249.

Barnes, Peter J. 2019b. « Small Airway Fibrosis in COPD ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 116: 105598.

Barnes, Peter J, et Trevor T Hansel. 2004. « Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease ». *The Lancet* 364 (9438): 985-96.

Bérubé, Julie, Céline Bourdon, Yu Yao, et Simon Rousseau. 2009. « Distinct Intracellular Signaling Pathways Control the Synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 Activated Human Airway Epithelial Cells ». *Cellular Signalling* 21 (3): 448-56.

Bhusal, Ram Prasad, Simon R. Foster, et Martin J. Stone. 2020. « Structural Basis of Chemokine and Receptor Interactions: Key Regulators of Leukocyte Recruitment in Inflammatory Responses ». *Protein Science* 29 (2): 420-32.

Bonser, Luke R., et David J. Erle. 2017. « Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B ». *Journal of Clinical Medicine* 6 (12): 112.

Bui, S., V. Boisserie-Lacroix, F. Ceccato, H. Clouzeau, S. Debeleix, et M. Fayon. 2012. « L'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose ». *Archives de Pédiatrie, La Mucoviscidose*, 19 (mai): S8-12.

Burgel, P-R., et J. A. Nadel. 2008. « Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Innate Immune Responses and Their Roles in Airway Diseases ». *European Respiratory Journal* 32 (4): 1068-81.

Caramori, Gaetano, Paolo Casolari, Adam Barczyk, Andrew L. Durham, Antonino Di Stefano, et Ian Adcock. 2016. « COPD immunopathology ». *Seminars in Immunopathology* 38 (4): 497-515.

Chanoine, Sébastien, Pierrick Bedouch, Christophe Pison, et Isabelle Pin. 2018. « Chapitre 27 - Traitement de l'asthme (à l'exception de la désensibilisation) ». In *Pharmacie Clinique et Thérapeutique (Cinquième Édition)*, 439-469.e1. Paris: Elsevier Masson.

Chen, Yajun, Lindsay M. Garvin, Tracey J. Nickola, Alan M. Watson, Anamaris M. Colberg-Poley, et Mary C. Rose. 2014. « IL-1 $\beta$  induction of MUC5AC gene expression is mediated by CREB and NF- $\kappa$ B and repressed by dexamethasone ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 306 (8): L797-807.

Chiba, Takahito, Hiroshi Uchi, Gaku Tsuji, Hisaki Gondo, Yoichi Moroi, et Masutaka Furue. 2011a. « Arylhydrocarbon Receptor (AhR) Activation in Airway Epithelial Cells Induces MUC5AC via Reactive Oxygen Species (ROS) Production ». *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 24 (1): 133-40.

Clunes, Lucy A., Arlene Bridges, Neil Alexis, et Robert Tarran. 2008. « In Vivo Versus In Vitro Airway Surface Liquid Nicotine Levels Following Cigarette Smoke Exposure ». *Journal of analytical toxicology* 32 (3): 201-7.

De Rose, Virginia, Kevin Molloy, Sophie Gohy, Charles Pilette, et Catherine M. Greene. 2018. « Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD ». *Mediators of Inflammation* 2018: 1-20.

Delneste, Yves, Céline Beauvillain, et Pascale Jeannin. 2007. « Immunité naturelle: Structure et fonction des *Toll-like receptors* ». *médecine/sciences* 23 (1): 67-74.

Di, Y. Peter, Jinming Zhao, et Richart Harper. 2012. « Cigarette Smoke Induces MUC5AC Protein Expression through the Activation of Sp1 ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (33): 27948-58.

Doyle, Sarah L., et Luke A.J. O'Neill. 2006. « Toll-like Receptors: From the Discovery of NF $\kappa$ B to New Insights into Transcriptional Regulations in Innate Immunity ». *Biochemical Pharmacology* 72 (9): 1102-13.

Dutta, Rajib Kumar, Srinivasan Chinnapaiyan, et Hoshang Unwalla. 2019. « Aberrant MicroRNAomics in Pulmonary Complications: Implications in Lung Health and Diseases ». *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 18 (septembre): 413-31.

Ekman, Anna-Karin, et Lars Olaf Cardell. 2010. « The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils ». *Immunology* 130 (1): 55-63.

Evans, Christopher M., Dorota S. Raclawska, Fani Ttofali, Deborah R. Liptzin, Ashley A. Fletcher, Daniel N. Harper, Maggie A. McGing, et al. 2015. « The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity ». *Nature communications* 6 (février): 6281.

Folkerts, G, A Kraneveld, et F Nijkamp. 2008. « New Endogenous CXC Chemokine Ligands as Potential Targets in Lung Emphysema ». *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (4): 181-85.

Ganong, William F, et Michel Jobin. 2012. *Physiologie médicale*. Bruxelles: De Boeck

Ha, Emily V. S., et Duncan F. Rogers. 2016. « Novel Therapies to Inhibit Mucus Synthesis and Secretion in Airway Hypersecretory Diseases ». *Pharmacology* 97 (1-2): 84-100.

Hallstrand, Teal S., Tillie L. Hackett, William A. Altemeier, Gustavo Matute-Bello, Philip M. Hansbro, et Darryl A. Knight. 2014. « Airway Epithelial Regulation of Pulmonary Immune Homeostasis and Inflammation ». *Clinical Immunology* 151 (1): 1-15.

Hatada, Eunice N, Daniel Krappmann, et Claus Scheidereit. s. d. « NF- $\kappa$ B and the Innate Immune Response », 7.

Hetland, R. B, F. R Cassee, M Refsnes, P. E Schwarze, M Låg, A. J. F Boere, et E Dybing. 2004. « Release of Inflammatory Cytokines, Cell Toxicity and Apoptosis in Epithelial Lung Cells after Exposure to Ambient Air Particles of Different Size Fractions ». *Toxicology in Vitro*, Festschrift in Honour of Iain N H Purchase, 18 (2): 203-12.

Hewson, Christopher A., Mark R. Edbrooke, et Sebastian L. Johnston. 2004. « PMA Induces the MUC5AC Respiratory Mucin in Human Bronchial Epithelial Cells, via PKC, EGF/TGF- $\alpha$ , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-Dependent Mechanisms ». *Journal of Molecular Biology* 344 (3): 683-95.

Hulina-Tomašković, Andrea, Marija Grdić Rajković, Dubravko Jelić, Martina Bosnar, Lucija Sladoljev, Tihana Žanić Grubišić, et Lada Rumora. 2019. « Pro-Inflammatory Effects of Extracellular Hsp70 on NCI-H292 Human Bronchial Epithelial Cell Line ». *International Journal of Experimental Pathology* 100 (5-6): 320-29.

Inui, Toshiya, Masato Watanabe, Keitaro Nakamoto, Mitsuru Sada, Aya Hirata, Masuo Nakamura, Kojiro Honda, et al. 2019. « Bronchial epithelial cells produce CXCL1 in response to LPS and TNF $\alpha$ : A potential role in the pathogenesis of COPD ». *Experimental Lung Research* 44 (janvier): 1-9.

Jeong, Mi Ho, Ha Ryong Kim, In Jae Bang, So Hee Yoo, Sang Jin Lee, Kyu Hong Lee, et Kyu Hyuck Chung. 2019. « In Vitro Model for Predicting Acute Inhalation Toxicity by Using a Calu-3 Epithelium Cytotoxicity Assay ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 98 (juillet): 106576.

Jouan, Y., M. Si-Tahar, et A. Guillon. 2016. « Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation ». *Médecine Intensive Réanimation*, novembre.

Kanai, Kuninobu, Akira Koarai, Yutaka Shishikura, Hisatoshi Sugiura, Tomohiro Ichikawa, Takashi Kikuchi, Keiichiro Akamatsu, et al. 2015. « Cigarette Smoke Augments MUC5AC Production via the TLR3-EGFR Pathway in Airway Epithelial Cells ». *Respiratory Investigation* 53 (4): 137-48.

Kawai, Taro, Ken Takahashi, Shintaro Sato, Cevayir Coban, Himanshu Kumar, Hiroki Kato, Ken J. Ishii, Osamu Takeuchi, et Shizuo Akira. 2005. « IPS-1, an Adaptor Triggering RIG-I- and Mda5-Mediated Type I Interferon Induction ». *Nature Immunology* 6 (10): 981-88.

Kode, Aruna, Se-Ran Yang, et Irfan Rahman. 2006. « Differential Effects of Cigarette Smoke on Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokine Release in Primary Human Airway Epithelial Cells and in a Variety of Transformed Alveolar Epithelial Cells ». *Respiratory Research* 7 (1): 132.

Koelink, Pim J., Saskia A. Overbeek, Saskia Braber, Petra de Kruijf, Gert Folkerts, Martine J. Smit, et Aletta D. Kraneveld. 2012. « Targeting Chemokine Receptors in Chronic Inflammatory Diseases: An Extensive Review ». *Pharmacology & Therapeutics* 133 (1): 1-18.

Koff, Jonathan L., Matt X. G. Shao, Iris F. Ueki, et Jay A. Nadel. 2008. « Multiple TLRs Activate EGFR via a Signaling Cascade to Produce Innate Immune Responses in Airway Epithelium ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (6): L1068-1075.

Kohri, Kazuhiro, Iris F. Ueki, et Jay A. Nadel. 2002. « Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (3): L531-40.

Kossmann, Céline Mongaret, Pauline Quillet, et François Lebargy. 2018. « Chapitre 28 - Traitement de l'insuffisance respiratoire chronique ». In *Pharmacie Clinique et Thérapeutique (Cinquième Édition)*, 471-493.e1. Paris: Elsevier Masson.

Kramer, Elizabeth L., et John P. Clancy. 2018. « TGF $\beta$  as a Therapeutic Target in Cystic Fibrosis ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 22 (2): 177-89.

Kreda, Silvia M, Seiko F Okada, Catharina A van Heusden, Wanda O'Neal, Sherif Gabriel, Lubna Abdullah, C William Davis, Richard C Boucher, et Eduardo R Lazarowski. 2007. « Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells ». *The Journal of Physiology* 584 (Pt 1): 245-59.

Kreft, Mateja Erdani, Urška Dragin Jerman, Eva Lasič, Neli Hevir-Kene, Tea Lanišnik Rižner, Luka Peternel, et Katja Kristan. 2015. « The Characterization of the Human Cell Line Calu-3 under Different Culture Conditions and Its Use as an Optimized in Vitro Model to Investigate Bronchial Epithelial Function ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 69 (mars): 1-9.

Kurakula, Kondababu, Anouk A. Hamers, Pieter van Loenen, et Carlie J.M. de Vries. 2015. « 6-Mercaptopurine Reduces Cytokine and Muc5ac Expression Involving Inhibition of NF $\kappa$ B Activation in Airway Epithelial Cells ». *Respiratory Research* 16 (1): 73.

Kuruvilla, Merin E., F. Eun-Hyung Lee, et Gerald B. Lee. 2019. « Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 56 (2): 219-33.

Laing, Kerry J., et Christopher J. Secombes. 2004. « Chemokines ». *Developmental and Comparative Immunology* 28 (5): 443-60.

Lakshmi, Sowmya P., Aravind T. Reddy, Asoka Banno, et Raju C. Reddy. 2018. « Airway Epithelial Cell Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Regulates Inflammation and Mucin Expression in Allergic Airway Disease ». *The Journal of Immunology* 201 (6): 1775-83.

Lee, Jae-Won, Ji-Won Park, Ok-Kyoung Kwon, Hee Jae Lee, Hye Gwang Jeong, Jae-Hong Kim, Sei-Ryang Oh, et Kyoung-Seop Ahn. 2017. « NPS2143 Inhibits MUC5AC and Proinflammatory Mediators in Cigarette Smoke Extract (CSE)-Stimulated Human Airway Epithelial Cells ». *Inflammation* 40 (1): 184-94.

Li, Bo, Chunling Dong, Guifang Wang, Huiru Zheng, Xiangdong Wang, et Chunxue Bai. 2011. « Pulmonary Epithelial CCR3 Promotes LPS-Induced Lung Inflammation by Mediating Release of IL-8 ». *Journal of Cellular Physiology* 226 (9): 2398-2405.

Li, Wen, Fugui Yan, Hongbin Zhou, Xiaoping Lin, Yinfang Wu, Ce Chen, Niya Zhou, Zhihua Chen, Jiandong Li, et Huahao Shen. 2013. « P. Aeruginosa Lipopolysaccharide-Induced MUC5AC and CLCA3 Expression Is Partly through Duox1 In Vitro and In Vivo ». *PLOS ONE* 8 (5): e63945.

Liang, Xue, Jian Wang, Ruijuan Guan, Li Zhao, Defu Li, Zhen Long, Qian Yang, et al. 2018. « Limax Extract Ameliorates Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Mice ». *International Immunopharmacology* 54 (janvier): 210-20.

Lin, Xiao-Ping, Cheng Xue, Jia-Min Zhang, Wei-Jing Wu, Xiao-Yang Chen, et Yi-Ming Zeng. 2018. « Curcumin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Mucin 5AC Hypersecretion and Airway Inflammation via Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 ». *Chinese Medical Journal* 131 (14): 1686-93.

Lundien, Matthew C., Kamal A. Mohammed, Najmunnisa Nasreen, R. S. Tepper, Joyce A. Hardwick, Kerry L. Sanders, Robert D. Van Horn, et Veena B. Antony. 2002. « Induction of MCP-1 Expression in Airway Epithelial Cells: Role of CCR2 Receptor in Airway Epithelial Injury ». *Journal of Clinical Immunology* 22 (3): 144-52.

Martin, Claude, Benoît Vallet, et Bruno Riou. 2017. *Physiologie humaine appliquée (2e édition)*. Arnette - John Libbey Eurotext.

Mebratu, Yohannes A., Kurt Schwalm, Kevin R. Smith, Mark Schuyler, et Yohannes Tesfaigzi. 2011. « Cigarette Smoke Suppresses Bik to Cause Epithelial Cell Hyperplasia and Mucous Cell Metaplasia ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (11): 1531-38.

Mims, James W. 2015. « Asthma: definitions and pathophysiology ». *International Forum of Allergy & Rhinology*, n° S1: 2.

Montalbano, Angela Marina, Giusy Daniela Albano, Giulia Anzalone, Anna Bonanno, Loredana Riccobono, Caterina Di Sano, Rosalia Gagliardo, et al. 2014. « Cigarette Smoke Alters Non-Neuronal Cholinergic System Components Inducing MUC5AC Production in the H292 Cell Line ». *European Journal of Pharmacology* 736 (août): 35-43.

Montalbano, Angela Marina, Giusy Daniela Albano, Anna Bonanno, Loredana Riccobono, Caterina Di Sano, Maria Ferraro, Liboria Siena, et al. 2016. « Autocrine Acetylcholine, Induced by IL-17A via NFκB and ERK1/2 Pathway Activation, Promotes MUC5AC and IL-8 Synthesis in Bronchial Epithelial Cells ». *Mediators of Inflammation* 2016.

Morin, Caroline, André M. Cantin, Éric Rousseau, Marco Sirois, Chantal Sirois, Edmond Rizcallah, et Samuel Fortin. 2015. « Proresolving Action of Docosahexaenoic Acid Monoglyceride in Lung Inflammatory Models Related to Cystic Fibrosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 53 (4): 574-83.

Mura, Simona, Hervé Hillaireau, Julien Nicolas, Saadia Kerdine-Römer, Benjamin Le Droumaguet, Claudine Deloménie, Valérie Nicolas, Marc Pallardy, Nicolas Tsapis, et Elias Fattal. 2011. « Biodegradable Nanoparticles Meet the Bronchial Airway Barrier: How Surface Properties Affect Their Interaction with Mucus and Epithelial Cells ». *Biomacromolecules* 12 (11): 4136-43.

Newland, Nik, et Audrey Richter. 2008. « Agents Associated with Lung Inflammation Induce Similar Responses in NCI-H292 Lung Epithelial Cells ». *Toxicology in Vitro* 22 (7): 1782-88.

Park, Ji-Won, Yong-Jae Kim, In-Sik Shin, Ok-Kyoung Kwon, Ju Mi Hong, Na-Rae Shin, Sei-Ryang Oh, Un-Hwan Ha, Jae-Hong Kim, et Kyung-Seop Ahn. 2016. « Type III Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa* Affects Matrix Metalloproteinase 12 (MMP-12) and MMP-13 Expression via Nuclear Factor KB Signaling in Human Carcinoma Epithelial Cells and a Pneumonia Mouse Model ». *Journal of Infectious Diseases* 214 (6): 962-69.

Park, Joungjoa, Shijing Fang, Anne L. Crews, Ko-Wei Lin, et Kenneth B. Adler. 2008. « MARCKS Regulation of Mucin Secretion by Airway Epithelium *in Vitro*: Interaction with Chaperones ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 39 (1): 68-76.

Perrais, Michaël, Pascal Pigny, Marie-Christine Copin, Jean-Pierre Aubert, et Isabelle Van Seuning. 2002. « Induction of MUC2 and MUC5AC Mucins by Factors of the Epidermal Growth Factor (EGF) Family Is Mediated by EGF Receptor/Ras/Raf/Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascade and Sp1\* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 32258-67.

Phillips, Jeremy, Bruno Kluss, Audrey Richter, et Eian Massey. 2005. « Exposure of Bronchial Epithelial Cells to Whole Cigarette Smoke: Assessment of Cellular Responses ». *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 33 (3): 239-48.

« Précis de Physiologie Médicale - Guyton & Hall ». 2014. *AJAR Paris - IDF* (blog). 2 mai 2014. <http://www.ajar-online.fr/precis-de-physiologie-medicale-guyton-hall/>.

Rafeeq, Misbahuddin M., et Hussam Aly Sayed Murad. 2017. « Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches ». *Journal of Translational Medicine* 15 (avril).

Reix, Philippe, Valentine Bréant, Laudine Potie, et Gilles Aulagner. 2018. « Chapitre 30 - Traitement de la mucoviscidose ». In *Pharmacie Clinique et Thérapeutique (Cinquième Édition)*, 519-536.e1. Paris: Elsevier Masson.

Ridley, Caroline, et David J. Thornton. 2018. « Mucins: the frontline defence of the lung ». *Biochemical Society Transactions* 46 (5): 1099-1106.

Rodgman, A., C. J. Smith, et T. A. Perfetti. 2000. « The Composition of Cigarette Smoke: A Retrospective, with Emphasis on Polycyclic Components ». *Human & Experimental Toxicology* 19 (10): 573-95.

Rogers, Duncan F. 2007. « Physiology of Airway Mucus Secretion and Pathophysiology of Hypersecretion ». *Respiratory Care* 52 (9): 1134-49.

Rose, Mary Callaghan, et Judith A. Voynow. 2006. « Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease ». *Physiological Reviews* 86 (1): 245-78.

Roy, Michelle G., Alessandra Livraghi-Butrico, Ashley A. Fletcher, Melissa M. McElwee, Scott E. Evans, Ryan M. Boerner, Samantha N. Alexander, et al. 2014. « Muc5b Is Required for Airway Defence ». *Nature* 505 (7483): 412-16

Rubin, Bruce K. 2007. « Mucus Structure and Properties in Cystic Fibrosis ». *Paediatric Respiratory Reviews* 8 (1): 4-7.

Shao, Matt X. G., et Jay A. Nadel. 2005. « Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 767-72.

- Shao, Matt X. G., Takashi Nakanaga, et Jay A. Nadel. 2004. « Cigarette Smoke Induces MUC5AC Mucin Overproduction via Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Converting Enzyme in Human Airway Epithelial (NCI-H292) Cells ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (2): L420-27.
- Shimura, S., Y. Andoh, M. Haraguchi, et K. Shirato. 1996. « Continuity of Airway Goblet Cells and Intraluminal Mucus in the Airways of Patients with Bronchial Asthma ». *European Respiratory Journal* 9 (7): 1395-1401.
- Shin, Na-Rae, Chul Kim, Chang-Seob Seo, Je-Won Ko, Young-Kwon Cho, Jong-Choon Kim, Joong-Sun Kim, et In-Sik Shin. 2018. « So-Cheong-Ryoung-Tang Attenuates Pulmonary Inflammation Induced by Cigarette Smoke in Bronchial Epithelial Cells and Experimental Mice ». *Frontiers in Pharmacology* 9 (septembre): 1064.
- Song, Kyoung Seob, Won-Jae Lee, Kwang Chul Chung, Ja Seok Koo, Eun Jin Yang, Jae Young Choi, et Joo-Heon Yoon. 2003. « Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induce MUC5AC Overexpression through a Mechanism Involving ERK/P38 Mitogen-Activated Protein Kinases-MSK1-CREB Activation in Human Airway Epithelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23243-50.
- Stone, Martin J., Jenni A. Hayward, Cheng Huang, Zil E. Huma, et Julie Sanchez. 2017. « Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2).
- Takeyama, K., B. Jung, J. J. Shim, P. R. Burgel, T. Dao-Pick, I. F. Ueki, U. Protin, P. Kroschel, et J. A. Nadel. 2001. « Activation of Epidermal Growth Factor Receptors Is Responsible for Mucin Synthesis Induced by Cigarette Smoke ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 280 (1): L165-172.
- Vasanthi Bathrinarayanan, Pranav, James E. P. Brown, Lindsay J. Marshall, et Laura J. Leslie. 2018. « An Investigation into E-Cigarette Cytotoxicity in-Vitro Using a Novel 3D Differentiated Co-Culture Model of Human Airways ». *Toxicology in Vitro* 52 (octobre): 255-64.
- Victoni, Tatiana, Florence Gleonnec, Manuella Lanzetti, Hermann Tenor, Samuel Valença, Luis Cristovão Porto, Vincent Lagente, et Elisabeth Boichot. 2014. « Roflumilast N-Oxide Prevents Cytokine Secretion Induced by Cigarette Smoke Combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 Inhibition in Airway Epithelial Cells ». Édité par Rory Edward Morty. *PLoS ONE* 9 (1): e85243.
- Williams, Olatunji W., Amir Sharafkhaneh, Victor Kim, Burton F. Dickey, et Christopher M. Evans. 2006. « Airway Mucus ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 34 (5): 527-36.
- Wilmanski, Jeanette M., Tanja Petnicki-Ocwieja, et Koichi S. Kobayashi. 2008. « NLR Proteins: Integral Members of Innate Immunity and Mediators of Inflammatory Diseases ». *Journal of Leukocyte Biology* 83 (1): 13-30.
- Xu, Rui, Qi Li, Jia Zhou, Xiangdong Zhou, Juliy M. Perelman, et Victor P. Kolosov. 2014. « Secretoneurin Induces Airway Mucus Hypersecretion by Enhancing the Binding of EGF to NRP1 ». *Cellular Physiology and Biochemistry* 33 (2): 446-56.
- Yuan-chen Wu, Daphne, Reen Wu, Sekhar P. Reddy, Yong Chan Lee, et Mary Mann-Jong Chang. 2007. « Distinctive Epidermal Growth Factor Receptor/Extracellular Regulated Kinase-Independent and -Dependent Signaling Pathways in the Induction of Airway Mucin 5B and Mucin 5AC Expression by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate ». *The American Journal of Pathology* 170 (1): 20-32.

Zhou, Jie-Sen, Yun Zhao, Hong-Bin Zhou, Yong Wang, Yin-Fang Wu, Zhou-Yang Li, Nan-Xia Xuan, et al. 2016. « Autophagy Plays an Essential Role in Cigarette Smoke-Induced Expression of MUC5AC in Airway Epithelium ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 (11): L1042-1052

Zhou-Suckow, Zhe, Julia Duerr, Matthias Hagner, Raman Agrawal, et Marcus A. Mall. 2017. « Airway Mucus, Inflammation and Remodeling: Emerging Links in the Pathogenesis of Chronic Lung Diseases ». *Cell and Tissue Research* 367 (3): 537-50.

Zhu, Yan, Aaron Chidekel, et Thomas H. Shaffer. 2010. « Cultured Human Airway Epithelial Cells (Calu-3): A Model of Human Respiratory Function, Structure, and Inflammatory Responses ». *Critical Care Research and Practice* 2010.



**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES  
SCIENCES ET VIE DE LA TERRE**

**Comparaison de modèles *in vitro* de cellules épithéliales des voies respiratoires pour la sécrétion de mucus et le processus inflammatoire.**

**Bodin Aude**

**Présenté le 01 décembre 2020**

Les maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme, la BPCO ou encore la mucoviscidose sont une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Elles sont responsables de la détérioration des voies respiratoires, et sont caractérisées par une inflammation persistante ainsi qu'un excès de mucus. L'exposition au tabac est un facteur de risque majeur, et participe à l'aggravation de ces maladies. L'exposition à la fumée de cigarette affecte le système immunitaire, augmente le risque d'infections bactériennes, et induit la synthèse de mucus.

Aussi, l'excès de mucus au sein des voies aériennes altère l'efficacité thérapeutique des traitements administrables par voie inhalée, généralement utilisés lors de ces affections pulmonaires.

La thérapie génique est porteuse d'espoir, et semble être un bon moyen pour traiter ces maladies localement et sur le long terme. Néanmoins, les vecteurs utilisés sont confrontés à l'épaisse barrière viscoélastique que forme le mucus. Notre étude s'est donc attachée à comparer plusieurs lignées épithéliales pulmonaires humaines afin de déterminer un modèle *in vitro* capable de produire du mucus et des cytokines inflammatoires. Ainsi, nous avons stimulé différentes lignées avec de l'extrait de fumée de cigarette (CSE) et / ou du LPS d'*Escherichia coli* à faible dose, et mesuré l'expression et la libération des cytokines et du mucus.

Notre travail a pu mettre en évidence que la lignée NCI H292 semble la plus adéquate. Elle est la plus sensible à la production de mucus après stimulation pendant 24h avec du CSE à 4% associé au LPS à 0.1µg/mL. De plus, ses taux d'ARNm de *MUC5AC* et *MUC5B* augmentent en réponse à l'exposition au CSE+LPS. Enfin, l'utilisation du LPS chez NCI H292, permet d'induire une augmentation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires.

Ainsi, l'utilisation de ce modèle d'étude *in vitro* d'exposition des cellules NCI H292 au CSE+LPS va permettre de mesurer de façon stable et reproductible l'efficacité des vecteurs de thérapie génique sur une lignée épithéliale bronchique humaine.

MOTS CLÉS: Mucus, NCI H292, chimiokines, CSE