

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**MMP-9/CD44 : Un nouveau complexe ligand/récepteur impliqué dans la régulation
de la fonction des cellules musculaires lisses bronchiques humaines**

par
Pascal Tétreault

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Avril, 2008

© Pascal Tétreault, 2008



Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

MMP-9/CD44 : Un nouveau complexe ligand/récepteur impliqué dans la régulation
de la fonction des cellules musculaires lisses bronchiques humaines

Présenté par :

Pascal Tétreault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Calude Labbé
Président-rapporteur

Dr Karim Maghni
Directeur de recherche

Dr Sophie Laberge
Membre du jury

Résumé

Le remodelage des voies respiratoires observé dans l'asthme fait intervenir, entre autres, les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CMLBH). Les CMLBH participent à ce processus par des mécanismes d'hypertrophie et d'hyperplasie cellulaire. Cependant, les facteurs impliqués dans la régulation de ces mécanismes sont peu connus. Mon projet de maîtrise a porté sur le rôle de la métalloprotéinase (MMP) -9 dans la régulation de la fonction des CMLBH. Nos résultats montrent que la MMP-9 n'est pas exprimée par les CMLBH, mais que celle-ci se lie au récepteur CD44. Nous avons montré que ce dernier était exprimé et fonctionnel chez les CMLBH. De plus, l'activation du récepteur CD44 par la MMP-9 diminue la prolifération des CMLBH. En conclusion, le complexe MMP-9/CD44 semble jouer un rôle important dans la régulation de la fonction des CMLBH. Il pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour le contrôle du remodelage des voies respiratoires chez les sujets asthmatiques.

Mots clés : Asthme, métalloprotéinase de la matrice, remodelage des voies respiratoires, matrice extracellulaire, hyperplasie, prolifération cellulaire, récepteur membranaire, hyaluronan, inhibiteur, immunologie.

Summary

Human bronchial smooth muscle cell (HBSMC) play a major role in the process of airway remodeling observed in the physiopathology of asthma. HBSMC participate to this process by showing cell hypertrophy and hyperplasia. However, the factors controlling these mechanisms are still unclear. My master project aimed to determine the role of the matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the regulation of HBSMC function. Our results show that MMP-9 is not expressed in HBSMC, but it has the ability to bind to the CD44 receptor. We found next that this receptor is expressed and functional in HBSMC, and that MMP-9 is a ligand of CD44. Furthermore, we found that the activation of the complex MMP-9/CD44 decreases HBSMC proliferation. In conclusion, MMP-9/CD44 complex may play an important role in HBSMC function and appears as an interesting therapeutic target to control airway remodeling processes in asthma.

Key words : Asthma, matrix metalloproteinase, airway remodeling, extracellular matrix, hyperplasia, cell proliferation, membrane receptor, hyaluronan, inhibitor, immunology

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
SUMMARY	IV
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS EN FRANÇAIS.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES EN ANGLAIS.....	X
REMERCIEMENTS.....	XII
SECTION 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME	2
1.2 LE REMODELAGE DES VOIES RESPIRATOIRES.....	7
1.3 LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES BRONCHIQUES HUMAINES	8
1.4 LES METALLOPROTEINASES DE LA MATRICE	9
1.5 LES INHIBITEURS TISSULAIRES DES METALLOPROTEINASES	11
1.6 ROLES DE MMP-9 DANS L'ASTHME.....	13
1.7 LE RECEPTEUR CD44.....	14
1.8 OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	18
SECTION 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	19
2.1 CULTURE CELLULAIRE.....	20
2.2 EXTRACTION D'ARN ET RT-PCR	20
2.3 ANALYSE PAR IMMUNOBUVARDAGE.....	21
2.4 ANALYSE PAR ZYMOGRAPHIE.....	22
SECTION 3. RÉSULTATS.....	23
3.1 ABSENCE DE TRANSCRITS D'ARNM POUR LA PRO-MMP-9 DANS LES CMLBH	24
3.2 LES EXTRAITS CELLULAIRES DE CMLBH CONTIENNENT DE LA PRO-MMP-2 ET DE LA MMP-9 ACTIVE, MAIS NE CONTIENNENT PAS DE PRO-MMP-9	25
3.3 LA PRÉSENCE DE LA FORME ACTIVE DE MMP-9 N'EST PAS DUE A UNE DEGRADATION ENZYMATIQUE DE LA PRO-MMP-9	27
3.4 DISCUSSION DE LA 1 ^{ÈRE} PARTIE	29
SECTION 4. ARTICLE	30
4.1 INTRODUCTION.....	32
4.2 MATERIALS AND METHODS	34
4.2.1 CELL CULTURE.....	34
4.2.2 RNA EXTRACTION AND RT-PCR	34
4.2.3 IMMUNOBLOT ANALYSIS	35
4.2.4 IMMUNOPRECIPITATION ANALYSIS	35
4.2.5 IMMUNOCYTOFLUORESCENCE AND DECONVOLUTION ANALYSIS.....	36
4.2.6 FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS	36
4.2.7 PROLIFERATION ASSAY.....	37
4.2.8 STATISTICAL ANALYSIS	38
4.3 RESULTS	39
4.3.1 HUMAN BRONCHIAL SMC EXPRESS A FUNCTIONAL CD44 RECEPTOR	39
4.3.2 MMP-9 ASSOCIATES WITH THE CD44 RECEPTOR AND INDUCES ITS INTERNALIZATION.....	43

4.3.3 EFFECTS OF HYALURONAN, PRO- AND ACTIVE MMP-9 ON HUMAN BRONCHIAL SMC PROLIFERATION	45
4.4 DISCUSSION.....	47
4.5 ACKNOWLEDGMENTS.....	51
4.6 DISCLOSURES.....	52
4.7 REFERENCES.....	53
4.8 FOOTNOTES	56
SECTION 5. DISCUSSION	57
SECTION 6. CONCLUSION	66
SECTION 7. RÉFÉRENCES	67

Liste des Figures

Figure 1.1 Mécanisme immunologique menant à l'asthme allergique.

Figure 1.2 Résumé des différentes causes potentielles menant au remodelage des voies respiratoires présent dans la physiopathologie de l'asthme.

Figure 1.3 Représentation schématique des différents domaines protéiques chez les membres des MMPs.

Figure 1.4 Exemples des voies d'auto et de trans-activation de certains membres de la famille des MMPs.

Figure 1.5 Illustration schématique du récepteur CD44 au niveau génomique et protéique.

Figure 1.6 Illustration schématique des deux voies de signalisation intracellulaire du récepteur CD44.

Figure 1.7 Illustration schématique de certains mécanismes immunologiques impliquant le récepteur CD44 dans le développement de l'inflammation allergique des voies respiratoires.

Figure 2.1 Détermination de l'expression de MMP-9 dans les CMLBH par RT-PCR

Figure 2.2 Détermination de l'expression de MMP-9 dans les CMLBH par zymographie et immunobuvardage

Figure 2.3 Détection de MMP-9 dans les extraits cellulaires de CMLBH traités avec l'inhibiteur à large spectre des MMPs, le GM6001.

Figure 2.4 Détection de MMP-9 dans le milieu de culture complet et dans les CMLBH cultivés dans un milieu sans sérum.

Figure 3.1 Expression of the CD44 receptor in human bronchial SMC.

Figure 3.2 Localization of the CD44 receptor in human bronchial SMC.

Figure 3.3 Quantification of CD44 receptor expression on the surface of human bronchial SMC.

Figure 3.4 Determination of the CD44 receptor functionality in human bronchial SMC.

Figure 3.5 Association between MMP-9 and the CD44 receptor.

Figure 3.6 MMP-9 induces CD44 receptor internalization in human bronchial SMC.

Figure 3.7 Effects of HA and MMP-9 on human bronchial SMC proliferation.

Liste des sigles et abréviations en français

Ag : Antigène
ARN : Acide ribonucléique
ADN : Acide désoxyribonucléique
BFA : Brefeldine A
CD : Agrégat de différenciation
c-MET : Facteur de transition mésenchymal/épithélial aussi connu sous le nom de récepteur à l'HGF
CMLBH : Cellules musculaire lisses bronchiques humaines
CMLTH : Cellules musculaire lisses trachéales humaines
CMLVH : Cellules musculaire lisses vasculaires humaines
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF : Facteur de croissance épidermal
ERK : Protéine kinase de régulation extracellulaire
EtBr : Bromure d'étidium
FBS : Sérum de veau fœtal
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FceRI : Récepteur à haute affinité pour les IgE
FITC : fluorescéine isothiocyanate
GAPDH : Glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
HA : Hyaluronan ou acide hyaluronique
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyle)-1-piperazineethanesulfonique
HGF : Facteur de croissance hépatocytaire
ICAM : Molécule d'adhésion intracellulaire
IgE : Immunoglobuline de Type E
IgG : Immunoglobuline de type G
IL- : Interleukines
M : Concentration molaire (mole/litre)
MEC : Matrice extracellulaire
MAPK Protéine kinase activé par les mitogènes
MLCK : Kinase de la chaîne légère de la myosine
MMP : Métalloprotéinase de la matrice
MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique
NF2 : Gène de la neurofibromatose-2
PBS : Tampon phosphate
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE : Phycoérythrine
PIC : Cocktail d'inhibiteur de protéase
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : espèce d'oxygène réactive
RPMI : Milieu de l'institut Roswell Park Memorial

RT-PCR : Transcription inverse – réaction de polymérase en chaîne

SDS : Sodium docécyll sulfate

SDS-PAGE : Gel de polyacrilamide contenant du SDS

SNP : Polymorphisme simple de nucléotide

TARC : thymus- and activation-regulated chemokine

TBS-T: Tampon contenant tampon Tris, NaCl et Tween-20

Th1/Th2 : Cellules T auxiliaires de type 1 et 2

TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases

TNF α ; Facteur de nécrose tumorale

VCAM : Molécule d'adhésion vasculaire

Liste des abréviations et sigles en anglais

AHR : airway hyperresponsiveness
Ag : Antigen
ARN : Ribonucleic acid
ADN : Deoxyribonucleic acid
BFA : Brefeldine A
CD : Cluster of differentiation
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
COPD : Chronic obstructive pulmonary disease
c-MET : mesenchymal-epithelial transition factor or HGF receptor
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
ECM : Extracellular matrix
EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid
EGF : Epidermal growth factor
EtBr : ethidium bromide
ERK: Extracellular regulated kinase
FBS : fetal bovine serum
FceRI : High affinity IgE receptor
FGF : Fibroblast growth factor
FITC : fluorescein isothiocyanate
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HA : Hyaluronan or hyaluronic acid
HASMCM : Human airway smooth muscle cells
HBSMC : Human bronchial smooth muscle cells
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGF : Hepatocyte growth factor
HTSMC : Human tracheal smooth muscle cells
ICAM : Intracellular adhesion molecule
IgE : Type E immunoglobulin
IB : Immunoblotting
IL- : Interleukines
IP : Immunoprecipitation
M : molar concentration (mole/litre)
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MFI : Mean fluorescent intensity
MLCK : Myosin light chain kinase
MMP : Matrix metalloproteinase
NF2 : Neurofibromatosis-2 gene
PBS : Phosphate buffered saline
PDGF : Platelet derived growth factor
PE : Phycoerythrine
PIC : Protease inhibitor cocktail

PFA : Paraformaldehyde
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF : phenylmethylsulphonyl fluoride
ROS : Reactive oxygen species
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR : Reverse Transcription- Polymerase chain reaction
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SNP : Single nucleotid polymorphism
TARC : thymus- and activation-regulated chemokine
TBS-T: Buffer containing Tris buffer, NaCl, and Tween-20
Th1/Th2 : T cell helper type 1 and 2
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF α :Tumor necrosis factor α
VCAM : Vascular adhesion molecule

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier d'une manière toute particulière mon directeur de recherche, le docteur Karim Maghni. Je lui suis reconnaissant de m'avoir accepté au sein de son équipe, une première fois lors de mon stage d'été et par la suite pour ma maîtrise. Je le remercie de m'avoir transmis ses connaissances, son souci du détail ainsi que sa grande rigueur scientifique. Toujours disponible, Dr Maghni a eu à cœur de m'enseigner comment devenir un scientifique de haut calibre.

Je veux aussi remercier les membres du laboratoire que j'ai côtoyés. J'ai apprécié les premiers assistants de recherche, Bertrand et Philippe, qui m'ont initié aux rudiments du travail en laboratoire, et particulièrement Bertrand pour son aide précieuse en microscopie. J'adresse un merci particulier au Dre Mélanie Welman, associée de recherche, qui m'a permis de perfectionner mes techniques de laboratoire. Finalement, je ne voudrais pas oublier les autres étudiants, Sandra, Bruno et les différents stagiaires d'été, avec qui j'ai eu la chance d'avoir des discussions enrichissantes tout au long de mon séjour au laboratoire.

Merci également à ma famille, mes amis et ma copine Fanny, qui tous m'ont aidé, supporté et encouragé à leur façon. Ils ont été présents à tout moment pour moi et m'ont permis de réaliser ma maîtrise dans les meilleures conditions.

Je veux finalement remercier les organismes subventionnaires qui m'ont soutenu financièrement durant mon programme de maîtrise. Tout d'abord le Centre asthme et travail pour l'octroi de ma bourse de stagiaire d'été et le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) pour la bourse de formation de maîtrise que j'ai obtenue.

Section 1 : Introduction

1.1 La physiopathologie de l'asthme

L'asthme est un syndrome respiratoire majeur affectant un nombre grandissant de personnes. D'après les données recueillies par Statistique Canada en 2005, près de 2,25 millions de Canadiens âgés de plus de 12 ans étaient atteints d'asthme, comparativement à environ 1,77 million en 1996. Une progression similaire peut être observée dans la plupart des pays industrialisés. Cependant, il n'a pas fallu attendre la période industrielle pour étudier la maladie. En effet, le premier traité sur l'asthme écrit au XIII^e siècle par Moses Maimonides ¹, établissait une association entre l'asthme et les facteurs psychologiques. Cette maladie a même été considérée, jusque dans les années 1950 ², comme étant psychosomatique. Ce n'est qu'en 1968 que Andor Szentivanyi élabore la théorie bêta adrénergique sur l'asthme qui décrit les composantes physiopathologiques de la maladie ³. L'aspect psychologique, bien que réel, a depuis été relégué en second plan.

L'asthme fait partie des maladies dites à traits complexes, c'est-à-dire qu'il est le résultat de nombreux facteurs, tant génétiques qu'environnementaux. La modulation de ces paramètres peut faire varier le niveau de sévérité de la maladie chez les patients ainsi que la qualité de leur réponse aux traitements ⁴. Plusieurs facteurs environnementaux sont inclus dans « l'hypothèse hygiéniste » proposée en 1989 par David P. Strachan ⁵. Brièvement, cette hypothèse stipule que le manque d'exposition à différents types d'agents infectieux chez les jeunes enfants module le développement du système immunitaire et augmente la susceptibilité de développer des maladies allergiques. En effet, les maladies allergiques, comme certains types d'asthme, sont principalement induites par une réponse immunitaire inappropriée à des antigènes inoffensifs. Cette réponse excessive est conduite par une forte réplique immunitaire de type Th2. Comme plusieurs bactéries et virus induisent des réponses immunitaires de type Th1, provoquant alors une diminution de la réponse Th2, un manque d'exposition à ces agents favorise une augmentation de l'activité Th2. Toutefois, d'un point de vue évolutif, l'immunité de type Th2 était surtout impliquée lors d'infections parasitaires. Bien que de nos jours, ce

type d'infection soit presque éradiqué dans les pays développés, il a été observé que des enfants ayant une forte activité Th2 et un niveau d'IgE élevé suite à des infections parasitaires n'étaient pas prédisposés à développer plus de syndrome allergique. Au contraire, ces enfants semblaient protéger dû à une réponse Th2 adéquatement dirigé. Des études récentes portant sur l'IL-10 viennent éclaircir le rôle de la réponse Th2 et ainsi nuancer la théorie hygiéniste. En effet, l'IL-10, produite entre autres par les cellules T régulatrices ⁶, a été identifié comme un régulateur critique de l'immunité de type Th2 et serait un médiateur anti-inflammatoire important ⁷. D'autres considérations environnementales comme la pollution atmosphérique et la fumée du tabac peuvent influencer le développement de l'asthme. Cependant, malgré les nombreuses études démontrant un lien entre les facteurs environnementaux et l'asthme ^{8,9}, la composante environnementale seule ne peut expliquer la prévalence de cette maladie dans la population.

À la composante environnementale s'ajoute l'aspect génétique de la maladie. En effet, plus de 100 gènes ont été associés à l'asthme dans au moins une étude d'association génétique ¹⁰. Parmi ces gènes, environ 25 sont retrouvés dans plus de six populations différentes. Plusieurs de ces gènes sont reliés de près ou de loin au système immunitaire ou à la modulation de l'inflammation. Encore une fois, la composante génétique ne peut expliquer à elle seule l'ampleur de la physiopathologie de l'asthme, car ces gènes de prédisposition ne sont pas associés à l'asthme dans tous les cas. Tout porte à croire qu'il existe une interaction gène-environnement intrinsèque, comme tend à le montrer une étude récente portant sur le SNP C-159T du gène CD14. Les auteurs ont montré que le risque de développer de l'asthme varie à la fois en fonction de la variation génétique d'un individu et de son niveau d'exposition à des endotoxines ou à des sources domestiques de bactéries ¹¹.

Le syndrome de l'asthme comporte de nombreuses particularités sur le plan physiopathologique. Les principales caractéristiques physiologiques sont l'obstruction bronchique, l'hyperréactivité bronchique non spécifique ainsi que la présence d'une

inflammation chronique des voies respiratoires, combinées avec une hypersécrétion de mucus¹². Ces symptômes sont dus à un grand nombre de facteurs¹². Parmi ceux-ci, on retrouve notamment certains virus, comme le virus respiratoire syncytial (VRS), et le rhinovirus (RV). Il est alors question de bronchite asthmatique virale¹³. Bien que certains virus puissent avoir un effet protecteur à long terme, comme le propose la théorie de Strachan, d'autres peuvent provoquer des problèmes respiratoires ponctuels et chez certains enfants, ces infections peuvent conduire au développement de l'asthme¹³. Il est intéressant de noter que certains médicaments, comme l'aspirine et certains anti-inflammatoires, peuvent provoquer des crises d'asthme chez des individus prédisposés¹².

L'asthme allergique, quant à lui, est causé par une exposition à un antigène, soit saisonnier ou permanent, qui provoque des exacerbations périodiques des symptômes. Les mécanismes sous-jacents à l'asthme allergique sont complexes. Tout d'abord, lorsqu'un antigène pénètre dans l'organisme pour la première fois, il est endocyté par les cellules présentatrices d'antigènes et présenté aux cellules T naives. Chez un individu non atopique, cette présentation sera ignorée. Par contre, chez un individu allergique, les cellules T se transformeront en Th2 qui commenceront à produire des cytokines comme l'interleukine (IL-) 4 et l'IL-13. Ces interleukines activeront les cellules B qui entreront dans une phase de maturation, notamment conduite par un phénomène appelé commutation isotypique. La commutation provoque un changement des isotypes produit par les cellules B, qui passeront du type IgM et IgD vers les types IgG, IgA ainsi que les IgE. Par la suite, les cellules B se transformeront en plasmocytes, qui sont spécialisés dans la production d'un grand nombre d'anticorps non-membranaire. Les IgE libérés iront ensuite se lier aux récepteurs à haute affinité des IgE, appelés FCεRI, qui sont principalement exprimés à la surface des mastocytes et des basophiles. Une fois le récepteur lié, les mastocytes et les basophiles sont amorcés : on parle alors de « *IgE primed mast/basophil cells* ». Lorsque l'individu entre en contact avec le même allergène pour la deuxième fois, l'allergène sera alors reconnu par le sous-type particulier d'IgE dirigé contre lui, ce qui induira une dimérisation de deux complexes IgE/FCεRI. Cette dimérisation active le mastocyte et le basophile et provoque une

dégranulation qui libère différents médiateurs comme l'histamine, des leucotriènes, des cytokines et des prostaglandines. Cette libération de médiateurs est responsable de l'induction des effets physiopathologiques qui se divisent en deux phases, l'une dite immédiate et l'autre semi-retardée ¹⁴. Tout d'abord, la phase immédiate est caractérisée par des bronchospasmes, de l'œdème, une obstruction respiratoire, une sécrétion de mucus, et une contraction des cellules musculaires lisses. Cette phase se résorbe généralement dans les 3 heures suivant l'apparition des premiers symptômes. La réponse semi-retardée, qui est présente chez environ 60% des patients ¹⁵, intervient en général de 4 à 8 heures après la première réaction ¹⁴. Elle est causée par la production de cytokines (ex. : IL-4, IL-5, IL-13) et chimiokines (ex. : éotaxines et TARC) par les cellules inflammatoires comme les macrophages et les cellules résidentes comme les cellules épithéliales ¹⁶. Ceci provoque le recrutement et l'activation d'autres cellules inflammatoires comme les éosinophiles qui vont libérer plusieurs médiateurs (par exemple le cystéinyl-leucotriène C4) provoquant un bronchospasme. Cette réponse se traduit, en plus de l'obstruction respiratoire, par une inflammation et une hyperréactivité des voies respiratoires ¹⁷. Chez certains individus, le niveau sanguin d'IgE total et spécifique est plus élevé que la moyenne; cet état se nomme l'atopie. Sans être nécessaire à la pathogénèse de l'asthme, les individus atopiques sont prédisposés à développer des maladies allergiques telles que l'eczéma, la rhinite allergique et l'asthme¹⁸.

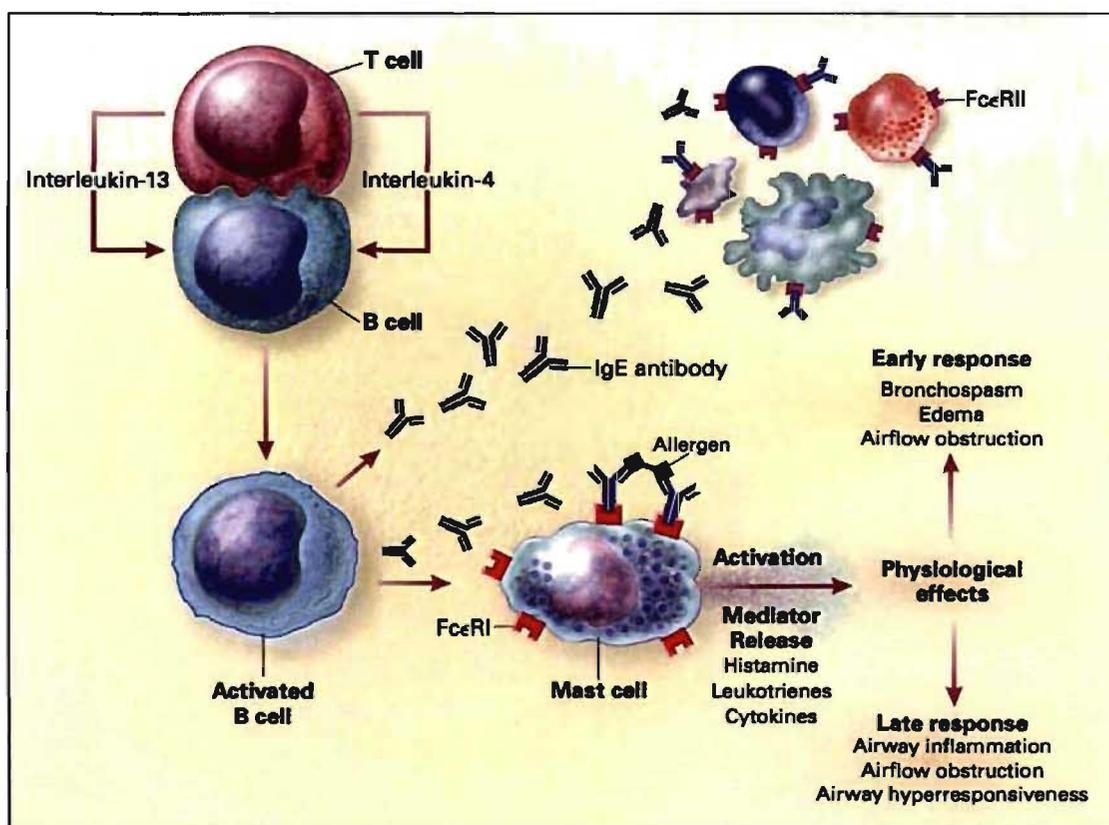


Figure 1.1. Mécanisme immunologique menant à l'asthme allergique; les effets physiologiques sont médié par la dégranulation des mastocytes suite à la dimérisation de deux complexes IgE/FCεRI, induite par la présence d'un allergène. Busse et Lemanske, *The New England Journal of Medecine*, 2001¹⁷

Une autre variante moins connue du syndrome asthmatique est l'asthme professionnel qui se développe chez certains travailleurs à la suite d'une exposition continue à des substances volatiles retrouvées dans leur environnement de travail^{19,20}. Ces agents sont regroupés en deux catégories : les agents de haut poids moléculaire (ex. : les composés protéiques comme la farine, la levure de boulanger, la gomme de guar, etc.) et les agents de faible poids moléculaire (ex. : les produits chimiques comme les isocyanates, le formaldéhyde, etc.)^{21,22}. Les symptômes de l'asthme professionnel peuvent survenir soit pendant l'exposition aux substances volatiles, immédiatement après, ou encore longtemps après la première exposition.

L'asthme ne doit pas être confondu avec la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), qui en partage plusieurs symptômes. La MPOC consiste en un ensemble de maladies respiratoires qui comprend principalement la bronchite chronique et l'emphysème. Elle est caractérisée par une obstruction chronique des voies aériennes, généralement irréversible, contrairement à l'asthme. Bien que ces deux pathologies ont en commun de nombreux critères physiopathologiques, il en va tout autrement de leurs causes. En effet, la MPOC résulte principalement de l'exposition à la fumée de cigarettes^{23,24}.

1.2 Le remodelage des voies respiratoires

Le remodelage des voies respiratoires est un des événements les plus importants observé dans la physiopathologie de l'asthme. Bien qu'en théorie, le remodelage puisse avoir a des effets physiologiques bénéfiques, ils sont nettement surpassés par les effets délétères causés par le rétrécissement des voies respiratoires²⁵. Le remodelage est principalement caractérisé par un épaissement de la membrane basale, parfois associé à des lésions épithéliales, et par une angiogénèse²⁶. De plus, une hyperplasie, une hypertrophie et une métaplasie des fibroblastes et des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CMLBH) peuvent être observées^{27,28}. L'épaissement de la couche de muscle lisse fait partie des changements observés durant le remodelage associé à l'asthme²⁹. Le volume de muscle lisse ainsi retrouvé dans les parois bronchiques est plus élevé chez les patients asthmatiques que chez les sujets sains. Deux mécanismes cellulaires ont été proposés, soit l'hyperplasie et l'hypertrophie^{30,31}. Les mécanismes régulant l'hyperplasie des cellules de muscle lisse sont encore mal compris, mais ce phénomène pourrait être causé par une prolifération cellulaire exagérée³², une réduction de l'apoptose ou encore une migration cellulaire²⁵.

Étant donné les contradictions existantes sur le sujet depuis les dernières années, il est légitime d'imaginer un mécanisme d'hyperplasie faisant intervenir les trois phénomènes à la fois. Plusieurs études suggèrent par contre que l'hypertrophie des

cellules de muscle lisse bronchique serait le facteur principal menant à l'épaississement de la couche de muscle lisse ^{28,31}. Pour ajouter à la complexité des mécanismes de remodelage, des études ont montré qu'il était possible d'observer une augmentation de la quantité de matrice extracellulaire (MEC) aux alentours des cellules musculaires lisses ^{33,34}. En effet, les cellules musculaires lisses de patients asthmatiques possèdent une plus grande capacité à synthétiser des protéines de la MEC ^{35,36}. Selon ces études, ce changement de composition extracellulaire pourrait contribuer de façon plus marquante à l'épaississement de la couche de muscle lisse que l'hypertrophie et l'hyperplasie.

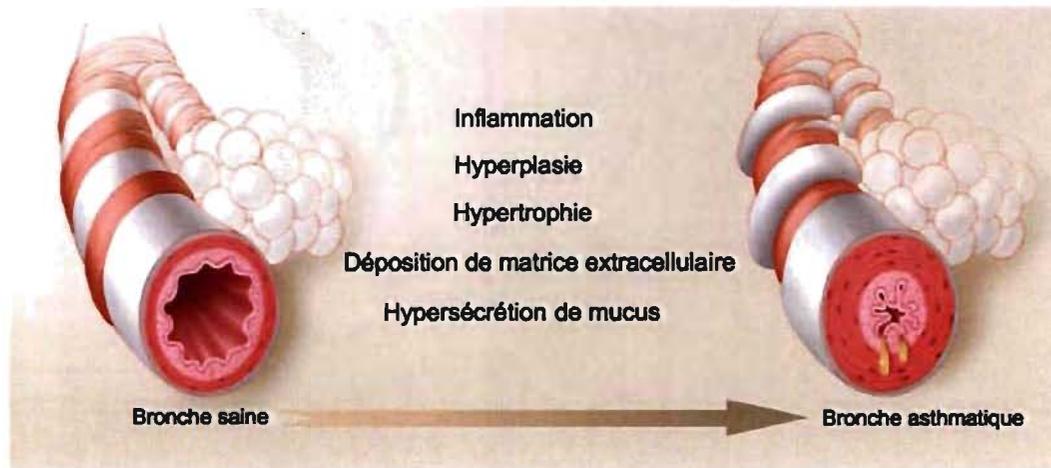


Figure 1.2. Résumé des différentes causes potentielles menant au remodelage des voies respiratoires présent dans la physiopathologie de l'asthme. Modifié de Shore, *The New England Journal of Medicine*, 2004³⁷

1.3 Les cellules musculaires lisses bronchiques humaines

Parmi les différents types cellulaires impliqués dans le processus de remodelage, les CMLBH jouent un rôle prépondérant ^{38,39}. En effet, l'augmentation du volume des CMLBH a un effet direct sur la diminution de la lumière des voies respiratoires en accentuant la constriction bronchique ⁴⁰; le phénomène affecte évidemment les fonctions respiratoires des patients asthmatiques. Ces cellules possèdent, de façon générale, trois phénotypes distincts ⁴¹. Il est possible de les différencier, en culture, selon leur profil d'expression génétique et leurs réponses à différents stimuli. Le phénotype

sécrétoire/prolifératif est caractérisé par la production et la sécrétion de divers médiateurs cellulaires comme des facteurs de croissances (PDGF, EGF, etc.) et des cytokines (interleukines et autres) ⁴². De plus, ces cellules possèdent une grande activité mitotique mais une capacité de contraction limitée. Le phénotype contractile, quant à lui, est défini par l'expression de plusieurs protéines contractiles, comme l' α -actine des muscles lisses et la myosine ^{43,44}, en plus de certains marqueurs spécifiques comme la smootheline ^{45,46}. Les CMLBH possédant ce phénotype répondent aux divers stimuli par une forte activité contractile; cette activité se fait cependant au détriment de leur activité mitotique. Le troisième phénotype n'est observable, pour l'instant, que dans des conditions *in vitro*. On l'obtient à la suite d'une déprivation en sérum pendant une période prolongée ⁴⁷. Ce phénotype particulier, appelé hypercontractile, est caractérisé par une surexpression de certaines protéines contractiles, comme la *myosin light chain kinase* : il s'ensuit une contraction plus rapide et plus forte que chez les cellules contractiles normales ⁴¹. La présence d'une telle modulation phénotypique dans le remodelage des CMLBH observé dans l'asthme n'a pas encore été démontrée clairement. L'apparition potentiellement simultanée du phénotype sécrétoire/prolifératif et du phénotype hypercontractile pourrait complexifier l'identification de ces phénotypes *in vivo*. Toutefois, des études suggèrent la présence de ce type de modulation phénotypique dans la physiopathologie de l'asthme ⁴¹.

1.4 Les métalloprotéinases de la matrice

Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) sont une famille d'enzymes dont le rôle principal est de dégrader certaines protéines de la MEC. Cette famille se compose de plusieurs sous-classes. Ceci inclut les collagénases MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-15, MMP-18 et MMP-21; les stromélysines MMP-3, MMP-10, MMP-19 et MMP-20; les gélatinases MMP-2 et la MMP-9; les élastases MMP-7, MMP-12 et MMP-26, et les MMP de types membranaires (MT-MMP) MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP) et MMP-25 (MT6-MMP) ⁴⁸. Chaque MMP a un substrat spécifique, malgré certains

recouvrements, surtout entre les membres d'une même famille. Par exemple, les gélatinases MMP-9 et MMP-2 dégradent principalement le collagène de type IV, qui est un des principaux constituants de la MEC des voies respiratoires ⁴⁹.

Les pro-MMPs comportent différents domaines ayant chacun une fonction particulière. On retrouve ainsi le propeptide qui est une séquence importante permettant l'inactivité des MMPs. *In vivo*, cette séquence d'acides aminés nécessite un clivage enzymatique; *in vitro*, le clivage peut être obtenu par divers agents chimiques tels le SDS, le glutathion oxydé, et les ROS (*Reactive oxygen species*) ⁴⁸. Une fois le propeptide clivé, le domaine catalytique, contenant un ion de zinc propre à toutes les métalloprotéinases, peut remplir sa fonction principale de dégradation des substrats spécifiques à chaque MMP. Plusieurs autres domaines sont présents chez les MMPs, comme le domaine hémapexine, présent entre autres chez la MMP-9, qui est responsable de la liaison avec TIMP-1 (section 1.5) et qui joue également un rôle dans la dimérisation de MMP-9 ⁴⁹. L'analyse approfondie des différents domaines des MMPs a été réalisée par VISSE et NAGASE en 2003, mais ils ne seront pas discutés en détail ici. La figure qui suit fait mention de la plupart des domaines qu'il est possible d'observer chez les MMPs.

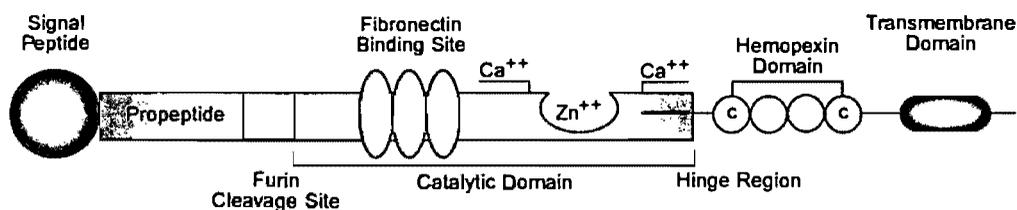


Figure 1.3. Représentation schématique des différents domaines protéiques chez les membres des MMPs; notons le propeptide dans la région N-terminale, ainsi que le domaine catalytique, contenant un ion de zinc, au centre de la protéine. Rosenberg, *Glia*, 2002⁵⁰

Certaines MMPs possèdent des localisations cellulaires particulières, par exemple, les MMPs membranaires sont retrouvées à la surface cellulaire tandis que d'autres, comme la pro-MMP-9, ont une localisation cytosolique et peuvent être sécrétées par la suite dans le milieu extracellulaire ^{48,49}.

Les MMPs doivent être régulées de façon très stricte pour ne pas dégrader de façon excessive la matrice extracellulaire. C'est pourquoi ces enzymes possèdent leur inhibiteur spécifique (les TIMP, section 1.5). En plus de ces inhibiteurs particuliers, plusieurs MMPs peuvent s'activer et/ou se réprimer mutuellement, par exemple, la MT1-MMP est responsable de l'activation de la MMP-2^{51,52}. D'autres MMPs peuvent s'autocatalyser pour donner des fragments protéiques tronqués soit plus actifs, ou encore inactifs. La figure qui suit résume quelques-unes des interactions observées dans la grande famille des MMPs (figure 1.4).

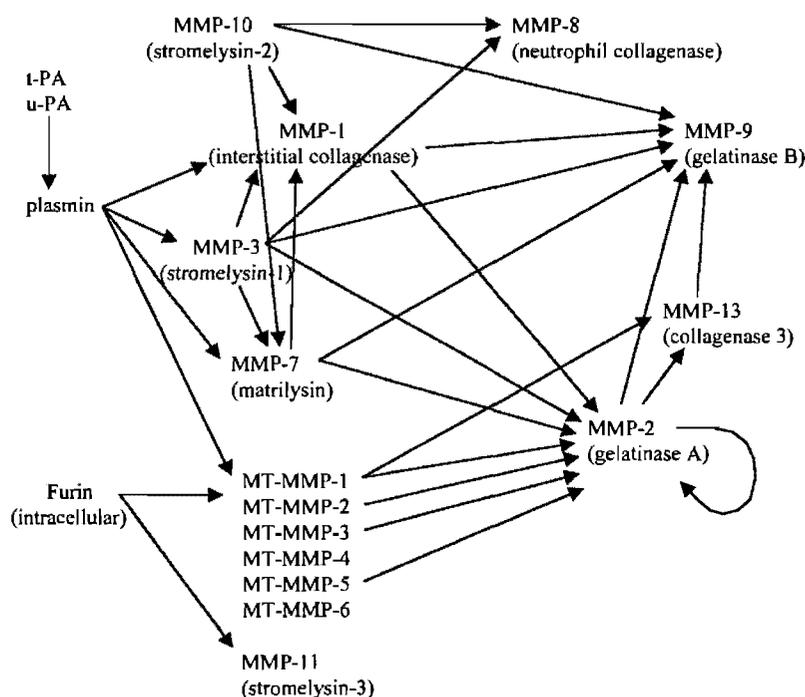


Figure 1.4. Exemples des voies d'auto et de trans-activation de certains membres de la famille des MMPs; notons que la MMP-2 et la MMP-9 représentent des points centraux et peuvent être activées par au moins six MMP différentes. Van Den Steen *et al*, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2002

1.5 Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases

Comme cité plus haut, les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) détiennent le pouvoir d'inhiber les MMPs en se liant de façon non-covalente avec celles-ci⁴⁹. Seulement quatre TIMPs (TIMP-1 à 4) sont connus à ce jour et sont nécessaires

afin d'inhiber toutes les MMPs. De façon générale, les MMPs et les TIMPs s'associent dans un rapport stoechiométrique de 1:1. C'est ainsi que TIMP-1 se lie avec une forte affinité à la MMP-9 afin d'inhiber son activité, tandis que TIMP-2 et 3 peuvent se lier, mais avec une affinité moins grande. En comparaison, TIMP-2, 3 et 4 se lient avec une forte affinité à la MMP-2 ⁴⁹. La régulation de l'expression des TIMPs est également sujette à une étroite régulation. On note que TIMP-1 est une protéine inductible dans certains types cellulaires, contrairement à TIMP-2 qui est, en général, exprimé de façon constitutive ⁵³. Suite à des études de délétion des domaines C-terminal de TIMP-1 et de MMP-9, Murphy, Goldberg, ainsi que leurs collègues respectifs, ont montré que la liaison de ces deux protéines se faisait vraisemblablement par leur domaine C-terminal ^{54,55}. La liaison entre ces deux types de protéines permet de contrôler le processus de renouvellement de la matrice extracellulaire ⁴⁸. Ces inhibiteurs sont donc fréquemment étudiés en étroite relation avec les MMPs.

Différentes études ont montré un déséquilibre du ratio MMP-9 : TIMP-1 retrouvé dans l'expectoration induit de patients asthmatiques, favorisant la MMP-9 par rapport à TIMP-1 ⁵⁶⁻⁵⁸. Ces mêmes études suggèrent que ce phénomène pourrait être associé à une exacerbation des symptômes asthmatiques. Dans une autre étude, les auteurs ont montré que le ratio MMP-9:TIMP-1 sérique était un bon prédicteur de la réponse d'un patient à un traitement de corticostéroïde dans l'asthme ⁵⁹. Cependant, d'autres chercheurs ont trouvé que ce même ratio était au contraire plus faible chez les patients asthmatiques et les sujets atteints de bronchite chronique que chez des individus sains ⁶⁰. L'analyse bibliographique des travaux portant sur le déséquilibre du ratio MMP-9:TIMP-1 démontre que le rôle de ces protéines dans la physiopathologie de l'asthme suscite encore beaucoup de controverse. Les différents auteurs conjecturent entre leur rôle bénéfique ou négatif dans la pathogenèse de la maladie et hésitent à les considérer comme une conséquence ou une cause de l'apparition de la chronicité de l'asthme.

Les travaux portant sur le remodelage des voies respiratoires analysent surtout l'augmentation ou la diminution de l'expression de la MMP-9 comme ayant un rôle sur

l'augmentation ou la diminution de la dégradation de la MEC. Par ailleurs, Johnson et Knox ont montré que la MMP-2 était non seulement exprimée par les CMLBH mais que cette enzyme, en plus de son activité gélatinase, induisait de façon autocrine la prolifération des CMLBH ⁶¹. Cette étude pionnière a jeté les bases d'une nouvelle approche d'analyse fonctionnelle de ces protéines au-delà de leur fonction enzymatique primaire. Jusqu'à maintenant, aucune recherche de ce type n'a été faite concernant la MMP-9. De plus, les études portant sur l'expression de la MMP-9 dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires sont contradictoires. Foda et ses collègues ont montré que les CMLTH (cellules musculaires lisses trachéales humaines) exprimaient la MMP-2 de façon constitutive mais que ces cellules nécessitaient une stimulation par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) et le TNF- α pour produire la MMP-9 ⁶². Plus récemment, l'étude d'Elshaw et collaborateurs a au contraire montré que la MMP-9, la MMP-2 et TIMP-1 étaient exprimés chez les CMLTH ⁶³.

1.6 Rôles de MMP-9 dans l'asthme

Le rôle précis de la MMP-9 dans la physiopathologie de l'asthme reste encore à définir. Différentes études chez des souris transgéniques avec une délétion du gène MMP-9 ont présenté des résultats contradictoires. Ainsi, l'étude de Lim et collaborateurs a montré que, suite à une exposition aux allergènes, ces souris avaient une diminution de la fibrose péribronchique. Ils conclurent que la MMP-9 n'a pas de rôle significatif dans l'épaississement des muscles lisses, pas plus que dans la réactivité des voies respiratoires et l'activité de la muqueuse bronchique ⁶⁴. Par contre, dans un modèle d'asthme expérimental similaire à celui utilisé par Lim, McMillan et collaborateurs ont montré une augmentation de l'inflammation des voies respiratoires induite par l'exposition à l'allergène ⁶⁵. Ils conclurent alors que la MMP-9 joue un rôle critique dans la régulation du recrutement des éosinophiles et l'établissement de la réponse Th2 au niveau pulmonaire. L'ensemble de ces études permettent de suggérer que la MMP-9 pourrait jouer un rôle dans la physiopathogénèse de l'asthme, indépendamment de son activité enzymatique intrinsèque, en activant, par exemple, une entité réceptorielle.

1.7 Le récepteur CD44

Le récepteur CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de classe I ayant été identifiée à l'origine comme une molécule d'adhésion et d'activation des cellules T ⁶⁶. Ce récepteur est impliqué dans la régulation de la croissance, la survie, la motilité ainsi que la différenciation cellulaire ⁶⁷. Le récepteur CD44 est exprimé sous plusieurs isoformes qui sont les résultats de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Ces isoformes, exprimés de façon différentielle selon le type cellulaire, le sont également en fonction du phénotype cellulaire ⁶⁷⁻⁶⁹. Ces variations génétiques se situent intégralement dans la tige extracellulaire du récepteur, comme illustrées à la figure 1.5.

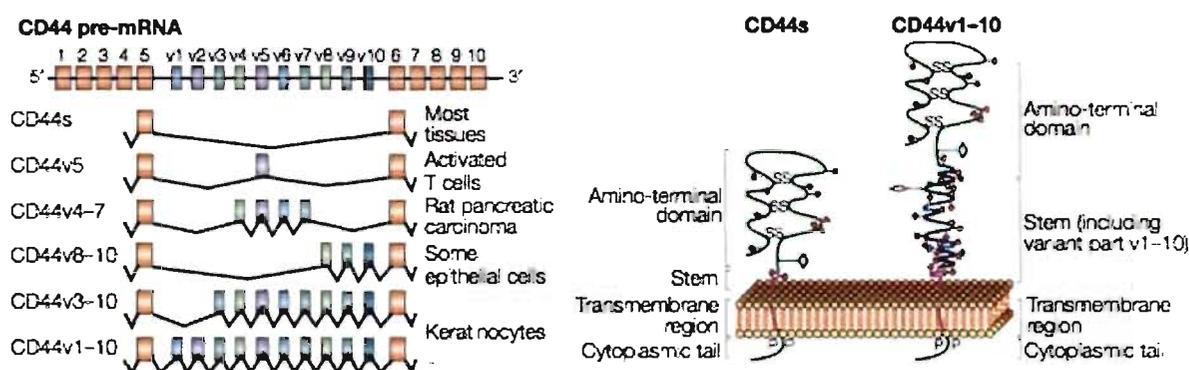


Figure 1.5. La figure de gauche illustre la localisation des différents variants du récepteur CD44 ainsi que l'expression différentielle de ces variants selon le type cellulaire; la figure de droite illustre la structure du récepteur CD44 sous sa forme courte (CD44s) ainsi que l'emplacement dans la tige extracellulaire des variants (CD44v1-10).
Ponta, 2003 ⁶⁷

Le ligand orthostérique du récepteur CD44 est glycosaminoglycane nommé hyaluronan (HA) ^{70,71}. Cependant, le récepteur CD44 peut être activé par plusieurs ligands différents et ainsi participer à une grande variété de mécanismes de signalisation cellulaire ⁷². Ainsi, la MMP-9 a été identifiée comme étant un ligand potentiel du récepteur CD44 dans des cellules de mélanome humain ⁷³ ainsi que des cellules endothéliales microvasculaires humaines ⁷⁴. Il y a déjà 14 ans que l'expression de CD44 a été rapportée dans les CMLTH ⁷⁵. Dans cette étude, Lazaar et son équipe ont observé

que l'interaction des lymphocytes T aux CMLTH, par l'intermédiaire du récepteur CD44, induisait la synthèse d'ADN chez les CMLTH. Peu de temps après, le laboratoire du Dr Halayko a montré que CD44 semblait être plus fortement exprimé chez les cellules en phase de prolifération ⁴⁴. Cependant, depuis la publication de ces deux dernières études, aucune analyse n'a été faite sur le rôle de CD44 dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires. Ainsi, la possibilité que la MMP-9 soit un ligand pour CD44 et module les fonctions des cellules musculaires lisses bronchiques humaines n'a pas été étudiée.

La cascade de signalisation intracellulaire empruntée par le récepteur CD44 suit deux voies distinctes, l'une menant à la prolifération cellulaire et l'autre induisant une inhibition de la croissance cellulaire ⁷². Ces voies impliquent essentiellement deux types de protéines, toutes impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, ainsi que dans la mobilité et l'architecture cellulaire ^{76,77}. D'un côté, les protéines de la famille des ERM (pour Ezrin, Radixin et Moesin) sont requises lorsque CD44 est associé à un récepteur de facteur de croissance afin d'induire la prolifération cellulaire ⁶⁷. De l'autre côté, le produit du gène suppresseur de tumeur *neurofibromatosis-2* (NF2), une protéine appelée merline, est requis afin d'inactiver la voie des MAPK et alors induire une inhibition de la croissance cellulaire ⁷². Ces voies sont résumées dans la figure suivante.

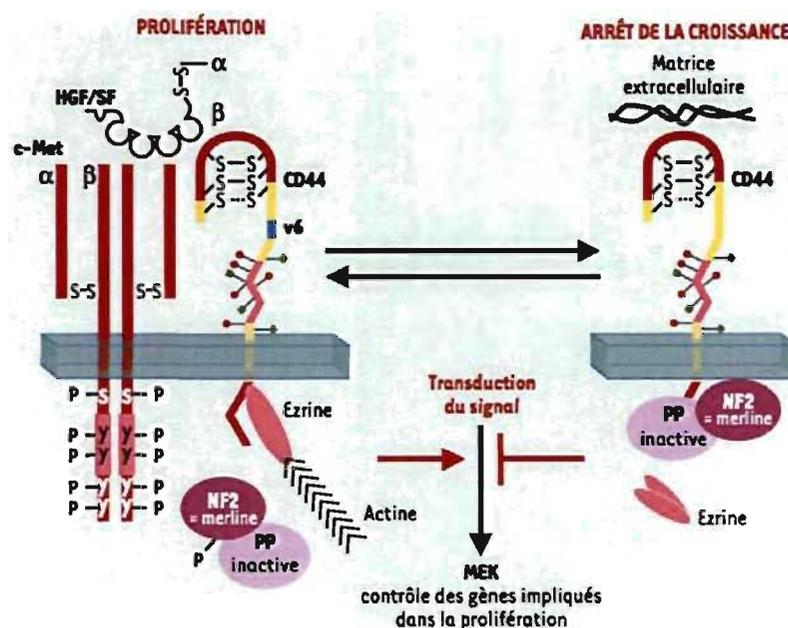


Figure 1.6. La section de gauche présente la dimérisation du récepteur CD44 contenant le variant 6 avec le récepteur c-Met suite à la liaison du facteur de croissance HGF et montre l'implication de la protéine Ezrine dans l'activation de la transduction du signal afin de promouvoir la prolifération cellulaire; la section de droite présente l'interaction du récepteur CD44 avec la matrice extracellulaire et montre l'implication de la protéine merline dans l'inactivation de la transduction du signal afin d'inhiber la prolifération cellulaire. Orian-Rousseau, Médecine/Science, 2003 ⁷²

Selon l'approche classique, les événements d'adhésion menant à la migration lymphocytaire vers les sites d'inflammation misaient sur le rôle des médiateurs chimioattractants solubles. Toutefois, certaines composantes de la MEC peuvent fortement influencer le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires ⁷⁸. Par exemple, le HA et la fibronectine peuvent directement influencer le chimiotactisme, la survie et la fonction des éosinophiles ⁷⁸. Comme CD44 semble être un récepteur lymphocytaire important pour le HA, il pourrait ainsi jouer un rôle dans la pathogenèse de l'asthme ⁷⁹. Une étude, réalisée par Katoh et collaborateurs, portant sur le rôle de CD44 dans deux modèles distincts d'asthme expérimental, a montré des effets inhibiteurs doses dépendants ⁸⁰. Ces effets ont été obtenus suite à l'altération des fonctions de CD44 à l'aide d'anticorps monoclonaux. Plusieurs manifestations physiopathologiques de l'asthme ont été diminuées de façon significative dont le recrutement leucocytaire, la production de cytokines de type Th2 (mais pas de type Th1)

et l'augmentation de l'hyperréactivité bronchique. Cette étude suggère fortement un rôle pro-inflammatoire du récepteur CD44. Par contre, une étude de Teder et collaborateurs, parue en 2002 dans *Science*, sur des souris déficiente en CD44 (CD44^{-/-}) a montré une inflammation pulmonaire exagérée dans un modèle de blessure pulmonaire non-infectieux. Ces souris CD44^{-/-} avaient des niveaux élevés de leucocytes pulmonaires (neutrophiles, macrophages et lymphocytes), de chimiokines et de HA, suggérant, dans ce cas-ci, un rôle protecteur anti-inflammatoire du récepteur CD44 au niveau pulmonaire⁸¹. Bien que ces deux études aient utilisé des méthodologies différentes, la divergence de leurs conclusions confirme que le rôle précis du récepteur CD44 est complexe et qu'il n'a pas été établi clairement dans la physiopathologie de l'asthme.

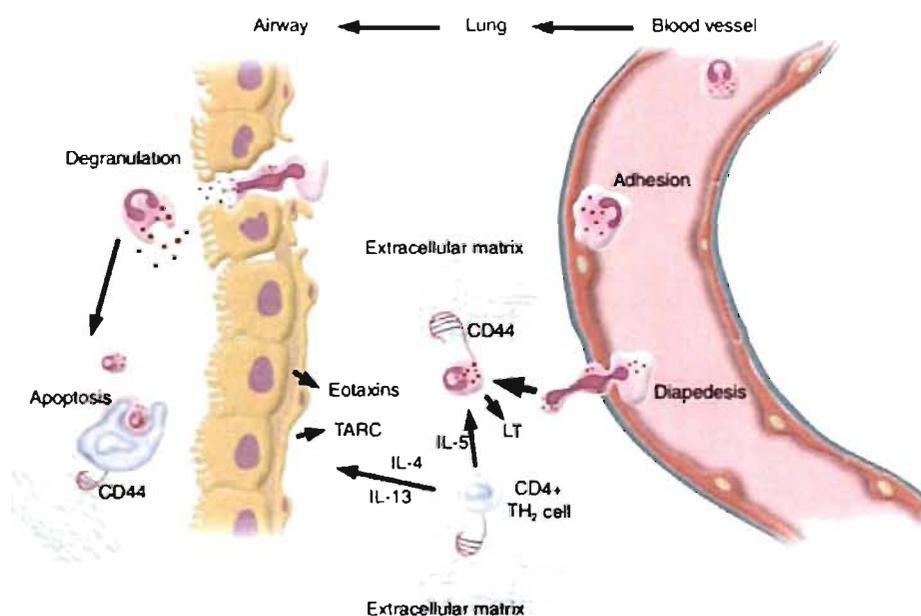


Figure 1.7 : Illustration schématique de certains mécanismes immunologiques impliquant le récepteur CD44 dans le développement de l'inflammation allergique des voies respiratoires. Rothenberg, *The Journal of Clinical Investigation*, 2003⁷⁹

Comme mentionné précédemment, très peu d'études démontrent une interaction fonctionnelle entre le récepteur CD44 et la MMP-9. Cependant, de plus en plus de chercheurs rapportent leur colocalisation à la surface cellulaire; il est à noter que ces études sont principalement réalisées dans des lignées cellulaires cancéreuses^{73,82-84}.

Seules quelques études font mention d'une telle interaction dans des cellules primaires
74,85

1.8 Objectifs de recherche

Du fait de la controverse sur l'expression de MMP-9, mon projet de maîtrise avait pour but, dans un premier temps, de déterminer l'expression de la MMP-9 dans les CMLBH. Les résultats issus de cette première partie de mon projet sont présentés dans une section indépendante de l'article. Dans un deuxième temps, mes travaux de recherche ont porté sur l'expression, la localisation et la fonction du récepteur CD44 chez les CMLBH. Finalement, j'ai étudié le rôle de la protéine MMP-9 sur la fonction des CMLBH ainsi que sa possible interaction avec le récepteur CD44. Les résultats obtenus dans cette deuxième phase de mon projet ont mené à l'écriture d'un article original inclus dans ce mémoire et qui sera soumis prochainement au « Journal of Allergy and Clinical Immunology ».

Section 2. Matériels et méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les cellules musculaires bronchiques humaines (CMLBH) ont été achetées de la compagnie Cambrex (division de Lonza Group; Suisse) et maintenues en cultures dans le milieu spécifique aux CMLBH SmGM®-2 BulletKits® contenant 5% de FBS (pour Fœtal Bovine Serum) et les facteurs du BulletKits® (EGF, FGF et gentamicine/amphotericine B) dans un atmosphère contenant 5% de CO₂ à 37°C. Les cellules ont été utilisées à un passage inférieur à 15, selon la recommandation de Cambrex (un passage représentant un doublement de population et le temps approximatif de doublement est de 36 hrs). Pour le passage des cellules, une solution de PBS 1X, de trypsine (0,025%) et d'EDTA (0,01%) a été utilisée. Les cellules ont été cultivées de 30 à 90 % de confluence selon les besoins de l'expérience. La confluence cellulaire est évaluée arbitrairement en fonction du pourcentage apparent de surface de la flasque (ou du puit) qui est couvert par les cellules. La lignée cellulaire U-937 (ATCC® Number: CRL-1593.2™) provenant d'un lymphome histiocytique a été utilisée comme contrôle positif pour la détection de MMP-9. Les U-937 ont été cultivées dans le milieu de culture RPMI 1640 contenant 2mM de L-glutamine, 4,5g/L de glucose, 1,5 g/L de bicarbonate de sodium, 10mM d'HEPES, 1mM de pyruvate, 100 U/ml de pénicilline et 100ug/ml de streptomycine (P/S) et 50 ml de FBS inactivé.

2.2 Extraction d'ARN et RT-PCR

L'ARN total a été isolé des HBSMC à l'aide de la solution TRIzol (Invitrogen, Mississauga, Canada) comme décrit précédemment ⁸⁶. Par la suite, une transcription inverse a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN pour former de l'ADN complémentaire en utilisant 200 U de transcriptase inverse « SuperScript™ II » (Invitrogen), de l'inhibiteur de RNase et des oligo(dT) comme amorces. Les gènes d'intérêts ont été amplifiés à l'aide d'un PCR classique. La réaction de PCR contenait : 3 mM MgCl₂, du tampon de PCR 1X, 0,4 mM dNTP, 0,4 µM de chaque amorce sens et antisens, 0,625 U de polymérase *Taq* Platinum (Invitrogen) et 1 µl de matrice d'ADNc. Le gène MMP-9 (numéro d'accession « gene bank » NM_004994) a été amplifié avec deux séries

d'amorces : sens 5' TGGGGGGCAACTCGGC et antisens 3' CTGGGCTTAGATCATTCC, dont le design a été réalisé par notre laboratoire, et sens 5' TTGACAGCGACAAGAAGTGG et antisens 3' CCCTCAGTGAAGCGGTACAT (Elshaw, 2004). Les amorces 5' font parties de l'exon 7, tandis que les amorces 3' sont incluses dans l'exon 8. Le témoin négatif (No-RT) consiste à ajouter 1 µl d'eau plutôt que 1 µl d'ADNc. Le témoin positif a été réalisé avec l'ADNc de cellules U937 produit tel que décrit pour les CMLBH. Le programme d'amplification avait les paramètres suivants : 1. Dénaturation à 94°C (5 min), 2. Dénaturation à 94°C (45 sec), 3. Appariement à 56°C (1 min 40 sec), 4. Polymérisation à 65°C (2 min 40 sec), ensuite, les étapes 2 à 4 sont répétées pour un maximum de 40 fois, 5. Polymérisation à 65°C (10 min) et 6. Conservation à 4°C (∞). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel contenant de 1 à 2% d'agarose et 0,01% d'EtBr, suivit d'une migration à 70V. Les photos sont prises avec le système d'acquisition de Syngene permettant une exposition sécuritaire du gel au UV pendant la prise de photos.

2.3 Analyse par immunobuvardage

Les extraits cellulaires ont été récoltés dans un tampon de lyse contenant 1M Tris-HCl à pH 7,5, 0,5 M EDTA à pH 8, 1,5 M NaCl, 1 M NaF, 1 M Na₃VO₇, 50% glycerol, 1 M CHAPS, 100 mM PMSF et du PIC (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, Mississauga, Canada). En général, 15 µl de tampon de migration (Bio-Rad Laboratories Inc.) ont été ajoutés à 15 µl d'échantillon (milieu ou extrait cellulaire). Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel de SDS-PAGE contenant de 8 à 12% d'acrylamide. La Pro-MMP-9 et la MMP-9 active 82/67 kDa ont été utilisées comme contrôles positifs (Calbiochem, La Jolla, USA). Après la migration, les protéines ont été transférées sur des membranes de PVDF (Bio-Rad, Mississauga, Canada) qui ont été incubées pendant une nuit à 4°C dans 5% de lait en poudre dilué dans du TBS-T (tampon tris salin contenant 250µl de twen-20). La détection des protéines a été réalisée avec un anticorps monoclonal de souris dirigés contre la MMP-9 (clone IA5; Calbiochem; dilution 1:666). L'immunodétection a été réalisée avec l'anticorps

secondaire âne anti-souris (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, dilution 1:10000) et les réactifs « SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity » (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, USA). Pour l'analyse semi-quantitative de l'expression des MMPs, le gène conservé (*housekeeping gene*) GAPDH (ab9485; Abcam Inc. Cambridge, USA; dilution 1:5000) a été détecté suite au reconditionnement (*stripping*) des membranes avec une solution de glycine 0,1 M à pH 2,7 suivi d'un blocage dans 5% de lait en poudre dilué dans du TBS-T. L'analyse densitométrique semi quantitative des bandes immunoréactives a été réalisée à l'aide du logiciel GeneTools de la compagnie Syngene.

2.4 Analyse par zymographie

Les activités gélatinases ont été déterminées dans les extraits cellulaires et les surnageants en préparant les échantillons de la même façon que pour l'immunobuvardage. Par la suite, ils ont été déposés sur un gel « Novex® 10% Zymogram (Gelatin) » pré-coulé (Invitrogen™). Après la migration, les gels ont été révélés dans un tampon de renaturation (Novex® Zymogram Renaturing Buffer 1X) permettant d'activer les formes latentes des MMPs, suivi d'une incubation dans un tampon de développement (Novex® Zymogram Developing Buffer 1X), le tout selon les directives du fabricant. Les protéines humaines purifiées pro-MMP-9, pro-MMP-2 et MMP-9 active (Calbiochem, La Jolla, USA) ont été utilisées comme contrôles positifs. Le gel a ensuite été coloré à l'aide du colorant SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen™). Le gel ainsi obtenu est coloré en bleu de façon uniforme, sauf dans les zones où il y a eu digestion enzymatique. Ces zones plus claires varient d'intensité en fonction de l'activité enzymatique présente. Les photos ont été prises à l'aide d'un scanner conventionnel et analysées avec le logiciel Adobe Photoshop Elements 2.0.

Section 3. Résultats

3.1 Absence de transcrits d'ARNm pour la pro-MMP-9 dans les CMLBH

Notre première approche expérimentale afin d'examiner l'expression du gène pro-MMP-9 chez les CMLBH a été d'ensemencer les cellules dans des plaques de six puits à des confluences de 30, 60 et 90%. L'ARN total a été extrait pour des analyses subséquentes de RT-PCR. Une confluence de 30% correspond au phénotype prolifératif/sécrétoire des CMLBH, tandis qu'une confluence de 90% correspond à un état d'arrêt de prolifération cellulaire presque total qui mènera les cellules à acquérir leur phénotype contractile ⁸⁷. Les transcrits d'ARNm pour la pro-MMP-9 n'ont pas été détectés dans les CMLBH suite à l'utilisation de ces conditions expérimentales, quelle que soit la paire d'amorces de PCR utilisée (figure 2.1). Par contre, le gène pro-MMP-9 a été amplifié à partir de la lignée cellulaire humaine U937 ^{88,89}, validant ainsi nos conditions expérimentales.

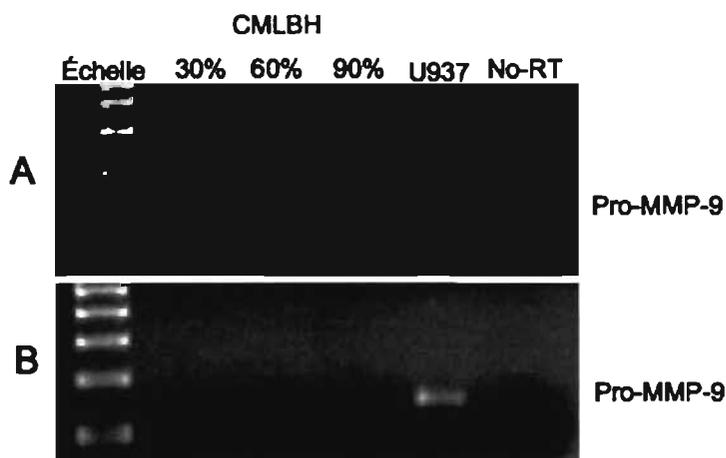


Figure 2.1. Détermination de l'expression de MMP-9 dans les CMLBH. Les analyses par RT-PCR montrent l'absence de détection de transcrits d'ARNm pour la pro-MMP-9 suite à l'utilisation (A) des amorces designées par notre laboratoire et (B) des amorces designées par le groupe de Elshaw ⁶³. Dans les deux cas, la lignée cellulaire U937 a été utilisée comme contrôle positif. No-RT = contrôle négatif.

3.2 Les extraits cellulaires de CMLBH contiennent de la pro-MMP-2 et de la MMP-9 active, mais ne contiennent pas de pro-MMP-9

Afin d'étudier l'expression du gène pro-MMP-9 au niveau protéique dans les CMLBH, l'activité gélatinase a été examinée par zymographie en fonction de la confluence cellulaire. De façon similaire aux CMLTH et aux CMLVH^{63,90}, la pro-MMP-2 (72kDa) a été détectée dans les extraits cellulaires des CMLBH (figure 2.2A). De plus, l'analyse des zymogrammes indique que les CMLBH ne contiennent pas de pro-MMP-9 (figure 2.2A). Il est intéressant à noter qu'une activité gélatinase a été détectée à un poids moléculaire d'environ 66 kDa. Cette bande peut représenter la forme active de MMP-2 à 66 kDa et/ou une forme active de MMP-9 à 67 kDa. Des analyses par immunobuvardage pour la détection de MMP-2 ont indiqué que l'activité gélatinase détectée à 66 kDa ne correspond pas à la MMP-2 (résultats non montré). Par contre, les analyses par immunobuvardage pour la détection de pro-MMP-9 révèlent une bande immunoréactive à 67 kDa et confirment l'absence d'expression de la pro-MMP-9 dans les extraits cellulaires de CMLBH (figure 2.2B). De plus, les niveaux détectés de MMP-9 à 67 kDa sont en fonction de la confluence cellulaire, étant plus élevés pour les CMLBH dans le phénotype prolifératif/sécrétoire (figre 2.2C). Toutefois, cette expression de MMP-9 à 67 kDa dans les CMLBH est très surprenante considérant que cette forme intracellulaire activée de MMP-9 n'a jamais été reportée dans des cellules des voies respiratoires ou toutes autres cellules humaines.

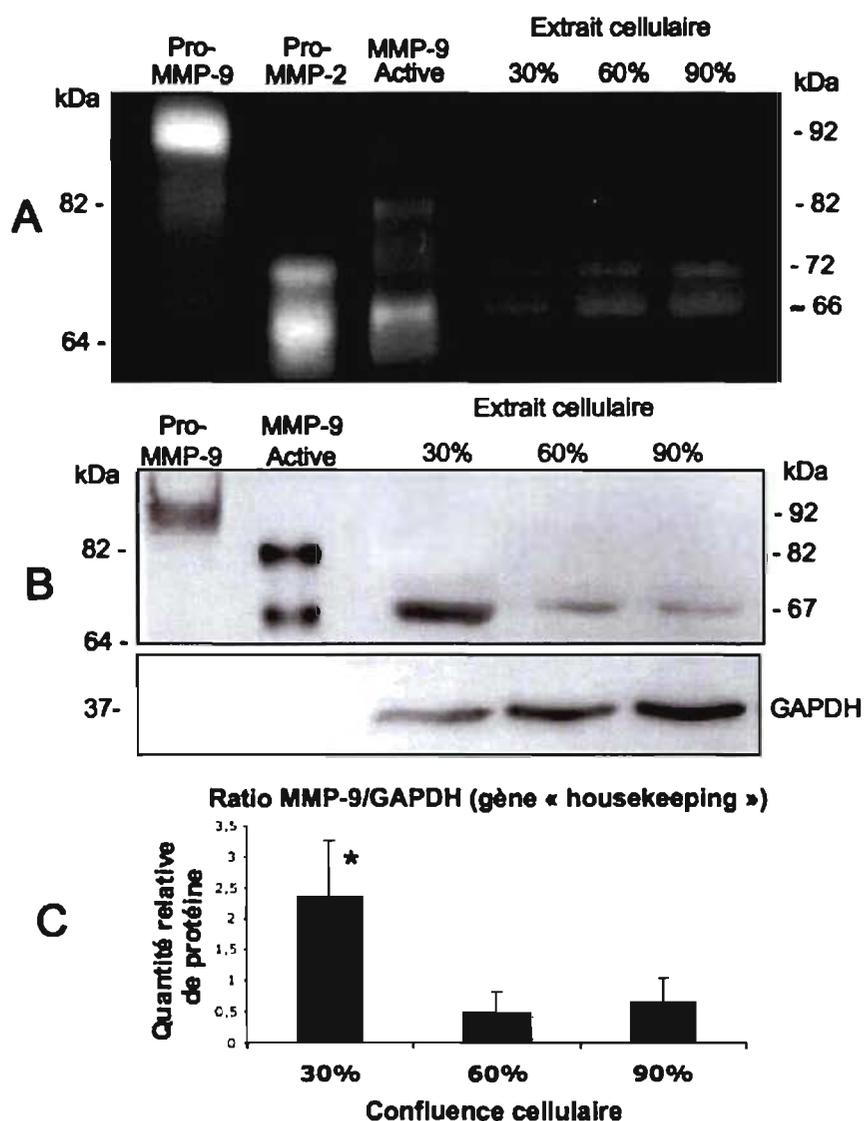


Figure 2.2. Détermination de l'expression de MMP-9 dans les CMLBH. (A) Les analyses par zymographies indiquent la présence de pro-MMP-2, mais pas de pro-MMP-9. Une activité gélatinase est détectée aux environs de 66 kDa. (B) Les analyses d'immunobuvardages de HBSMC ayant une confluence de 30, 60 ou 90% confirment l'absence de pro-MMP-9 et identifie la forme active de MMP-9 à 67 kDa. (C) L'analyse densitométrique semi-quantitative du ratio MMP-9/GAPDH indique que le niveau de détection de la MMP-9 à 67 kDa est en fonction de la confluence cellulaire (n=3).

* = Différence significative entre le ratio à 30% comparé aux ratios à 60 et 90%

3.3 La présence de la forme active de MMP-9 n'est pas due à une dégradation enzymatique de la pro-MMP-9

Il est connu que plusieurs membres de la famille des MMPs possèdent la capacité de s'auto-activer et de se trans-activer en clivant la forme pro-MMP en MMP active. Afin de déterminer si la forme active de MMP-9 détectée dans les extraits cellulaires est attribuable à une activation de la pro-MMP-9, l'inhibiteur des MMPs à large spectre GM6001 (Calbiochem, La Jolla, USA) a été ajouté à différentes concentrations au tampon de lyse avant la préparation des extraits cellulaires. Les analyses subséquentes par immunobuvardage indiquent que la bande immunoréactive à 67 kDa est toujours la seule détectée pour MMP-9 (figure 2.3). Ce résultat suggère fortement que la forme active de MMP-9 détectée par zymographie et immunobuvardage ne corresponde pas à une activation de pro-MMP-9 par d'autres MMPs.

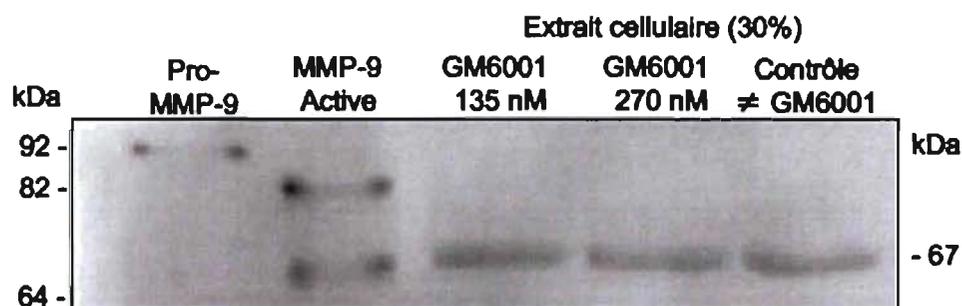


Figure 2.3. Détection de MMP-9 dans les extraits cellulaires de CMLBH traités avec l'inhibiteur à large spectre des MMPs, le GM6001. Les analyses d'immunobuvardages d'extrait de CMLBH à 30% de confluence en présence ou en absence de GM6001 indiquent que la forme de MMP-9 à 67 kDa ne provient pas du métabolisme d'activation de pro-MMP-9.

Comme la plupart des protéases sérines, cystéines, aspartiques et aminopeptidases humaines sont inhibées par le PIC utilisé dans le tampon de lyse, il est également peu probable que la forme active de MMP-9 détectée soit attribuable à une dégradation enzymatique de la pro-MMP-9. Ainsi, nous avons postulé que la forme active de MMP-9 détectée pourrait provenir du milieu de culture. Afin de vérifier cette possibilité, du milieu de culture complet a été analysé pour la détection de MMP-9. Les résultats d'immunobuvardage révèlent que le milieu de culture contient la forme active

de MMP-9 à 67 kDa (figure 2.4A). Afin de démontrer que cette forme active détectée dans les extraits cellulaires provenait bien du milieu de culture, les cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans du milieu de culture sans sérum. Comme l'indique la figure 2.4B, la forme de MMP-9 à 67 kDa n'est plus détectée dans les extraits cellulaires lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu de culture sans sérum.

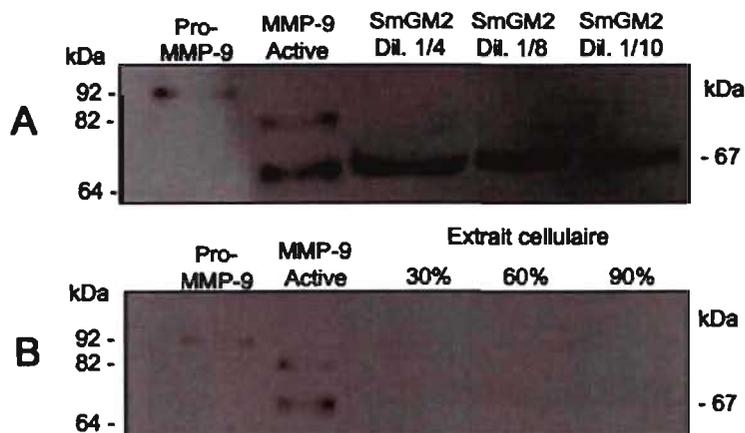


Figure 2.4. Détection de MMP-9 dans le milieu de culture complet et dans les CMLBH cultivés dans un milieu sans sérum. (A) Les analyses d'immunobuvardages de dilutions du milieu de culture complet indiquent que le sérum contient la forme active de MMP-9 à 67kDa puisque (B) cette forme n'a pas été détectée dans les extraits cellulaires de CMLBH à 30, 60 ou 90% cultivées pendant 24 h en milieu déprivé en sérum. SmGM2 = Smooth muscle growth medium 2

3.4 Discussion de la 1^{ère} partie

L'ensemble des résultats de cette première partie de notre étude suggère fortement que la forme de MMP-9 à 67 kDa présente dans le sérum se lie aux CMLBH. Ainsi, nous proposons que la MMP-9 à 67 kDa détectée dans les extraits cellulaires est le résultat de sa liaison à un récepteur membranaire. En regard de la littérature, il semble que le récepteur CD44 possède la capacité de lier la MMP-9^{73,74}. La suite de ce projet, qui est présentée dans l'article suivant, porte sur l'expression du récepteur CD44 chez les CMLBH, de son interaction avec MMP-9 et du rôle de MMP-9 en tant que ligand de CD44 dans la modulation de la fonction des CMLBH.

Section 4. Article

MMP-9/CD44: A novel ligand/receptor complex involved in the regulation of human bronchial smooth muscle cell function

P. G. Tétreault, M. Welman, B. Lefort, K. Maghni

Research Center, Sacré-Cœur Hospital of Montreal, Laboratory of Asthma Neuroimmunology, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

Background: The matrix metalloproteinase (MMP) -9 is believed to be implicated in the process of airway remodeling in asthma. However, studies in MMP-9 knock out mice indicated that MMP-9 deficiency promotes allergen-induced airway inflammation, which finding suggests that MMP-9 may act as a negative regulator in asthma pathogenesis. Furthermore, this unexpected role of MMP-9 in the modulation of allergic airway inflammation suggests that MMP-9 may have roles in asthma that are independent of its intrinsic enzyme activity. Interestingly, recent studies have reported that MMP-9 is a ligand of the CD44 receptor.

Objective: To determine the expression and functionality of the CD44 receptor in human bronchial smooth muscle cells (SMC), and to examine whether MMP-9 is a ligand for the CD44 receptor and regulates cell function.

Methods: CD44 receptor expression was determined by RT-PCR, immunoblot (IB) and flow cytometry. The interaction between MMP-9 and the CD44 receptor was assessed by immunoprecipitation (IP) followed by IB for the detection of MMP-9 or CD44. The functionality of the CD44 receptor was assessed by the quantification of receptor internalization in response to stimuli. Cell growth was assessed using the CyQUANT NF proliferation kit.

Results: RT-PCR analysis showed that CD44 is expressed, at least, as the v6 and v8 variants in human bronchial SMC. Immunoblot and flow cytometric analysis confirmed the expression of the CD44 receptor. Interestingly, both analyses indicated that CD44 receptor expression is a function of cell confluency, being highly expressed in cells in the proliferating phase. IP/IB analyses revealed the formation of a MMP-9/CD44 complex, and both pro-MMP-9 and active MMP-9 induce the internalization of the CD44 receptor. These findings indicate that both forms of MMP-9 are likely to be ligands of this receptor. Very interestingly, we found that active MMP-9, and to a lesser extent pro-MMP-9, act as negative regulators of airway SMC growth.

Conclusion: Our study is the first report on MMP-9/CD44 as a new ligand/receptor complex involves in the regulation of human bronchial SMC growth, which finding provides new insights on the potential role of MMP-9 in airway remodeling in asthma.

4.1 Introduction

Airway remodeling is one of the hallmarks of asthma pathophysiology, and includes mainly increase in smooth muscle mass, subepithelial fibrosis and neovascularisation^{1, 2}. Changes in smooth muscle mass are attributable to hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscle cells³. There is growing evidence that human airway smooth muscle cells (SMC) may directly participate in the pathological changes observed in allergic airways by releasing a variety of mediators such as neuropeptides⁴ and matrix metalloproteases (MMPs)⁵⁻⁷. MMPs are an enzyme family responsible for the degradation and regeneration of the extracellular matrix which are likely to be involved in the process of airway remodeling in asthma^{8, 9}. Among its members, pro-MMP-9 is believed to play an important role in airway remodeling because its release is increased in the airways of mild to severe asthmatic subjects, or following allergen challenges in asthmatic airways¹⁰⁻¹². Surprisingly, studies in MMP-9 knock out mice indicated that MMP-9 deficiency potentiates allergen-induced airway inflammation¹³. This finding argues for a role of MMP-9 as a negative regulator of the development of allergic airway responses. Furthermore, this unexpected role of MMP-9 in the modulation of allergic airway inflammation suggests that MMP-9 may have roles in asthma pathogenesis that are independent of its intrinsic enzyme activity.

Recent studies have reported that MMP-9 is a ligand of the CD44 receptor on human melanoma cells and human microvascular endothelial cells^{14, 15}. CD44 receptor is a class I transmembrane glycoprotein which was first identified as an homing molecule for leukocyte adherence and T-cell activation¹⁶. CD44 receptor is involved in the regulation of cell growth, survival, motility and differentiation^{17, 18}. This receptor is expressed as multiple isoforms, which is the result of alternative splicings of its pre-mRNA, and these isoforms are differentially expressed as a function of cell type and cell phenotype¹⁹. Moreover, the CD44 receptor can be activated by various ligands and therefore participate in a wide variety of cell signaling responses. The expression of the

CD44 receptor was reported in human tracheal SMC^{17, 20}. A role was found for the CD44 receptor in human tracheal SMC-T lymphocytes interaction-induced SMC proliferation¹⁷. However, the other roles of the CD44 receptor in the modulation of airway SMC function are unknown. Furthermore, whether MMP-9 is a ligand of the CD44 receptor and modulates airway SMC function is also unknown.

The aim of this study was to determine the expression of the CD44 receptor in human bronchial SMC, to examine whether MMP-9 is a ligand of the CD44 receptor and to determine the role of the CD44/MMP-9 complex in human bronchial SMC function. Our study provides the first evidence that human bronchial SMC expressed a functional CD44 receptor, and indicates a new role for MMP-9 unrelated to its intrinsic metalloproteinase activity.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Cell culture

Human bronchial smooth muscle cells were purchased from Cambrex (division of Lonza Group; Switzerland) and maintained in specific human bronchial SMC media SmGM®-2 BulletKits® containing 5 % FBS and growth factors in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were used at 15 or less passages as recommended by Cambrex (one passage represent one population doubling and the approximate doubling time is 36 hrs). For cell passages, PBS 1X, trypsin (0.025%) and EDTA (0.01%) solution was used. Cells were grown from 30% to full confluency depending on the experimental conditions.

4.2.2 RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from human bronchial SMC using TRIzol reagent (Invitrogen, Mississauga, Canada) as previously described⁴. Briefly, RNA (2 µg) was reverse transcribed into cDNA using 200 U of SuperScript™ II Reverse transcriptase (Invitrogen), RNase inhibitor and oligo(dT) as primer. Genes of interest were then amplified using conventional PCR. The PCR mixture consisted of : 3 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 0,4 mM dNTP, 0,4 µM of each sense and antisense primer, 0,625 U of *Taq* Platinum polymerase (Invitrogen) and 1 µl of the cDNA template. CD44 gene was amplified using PCR primers that correspond to the gene sequence common to all CD44 isoforms: sense (exon 5): 5'GCAGCACTTCAGGAGGTTACA3' and antisense (exon 15): 5'GGGTGGAATGTGTCTTGGTC3' (gene bank number NM_000610), and PCR primers specific for the CD44 variant 6 antisense (exon 10): 5'TCTGTTGCCAAACCACTGTTC3' and variant 8 (exon 12): 5'GCTGCGTTGTCATTGAAAGAG. Negative control consists of adding 1 µl of water into test tube instead of cDNA. PCR samples were electrophorized at 70 Volt on 2%

agarose gel and 0,01% EtBr. Gel revelation were performed using Syngene safe UV exposition acquisition system and GeneTools software (Syngene).

4.2.3 Immunoblot analysis

Cell extracts were collected in lysis buffer containing 1M Tris-HCl at pH 7.5, 0.5 M EDTA at pH 8, 1.5 M NaCl, 1 M NaF, 1 M Na₃VO₇, 50% glycerol, 1 M CHAPS, 100 mM PMSF and PIC (protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich, Mississauga, Canada). Samples were electrophorized on 8 to 12% SDS-PAGE. Human pro-MMP-9 and active 82/67 kDa MMP-9 were used as positive controls (Calbiochem, La Jolla, USA). After migration, proteins were transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad, Mississauga, Canada) and then incubated over night in 5% powder milk in TBS-T. Immunoblotting was performed using mouse monoclonal antibodies against MMP-9 forms (clone IA5; Calbiochem, Darmstadt, Germany; dilution 1:666), the CD44 receptor (clone MEM-85; BioVendor Laboratory Medicine, Inc. Czech Republic; dilution 1:666) or phosphorylated MAPK Erk1/2 (clone E10; Cell Signalling, Denver, USA; dilution 1:1000). Immunodetection was done using a donkey anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, dilution 1:10000) and SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate system (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, USA). For semi-quantitative analysis of proteins expression, the housekeeping gene GAPDH (ab9485; Abcam inc. Cambridge, USA; dilution 1:5000) was detected after stripping membranes with a solution of glycine 0,1M (pH 2.7) followed by blocking in 5% powder milk in TBS-T. The densitometry analysis of immunoreactive bands was performed using GeneTools software from Syngene.

4.2.4 Immunoprecipitation analysis

To examine the interaction between MMP-9 and CD44, immunoprecipitation experiments were performed prior to WB analysis. Cell extracts were collected in the same lysis buffer as for immunoblotting, and protein levels were quantified using Bio-Rad DC protein assay reagents (Bio-Rad, Mississauga, Canada). Briefly, protein A

agarose beads (30 μ l) were first incubated for 1h at 4°C with 5 μ g of CD44 primary antibody (clone MEM-85) then washed with PBS 1X. A minimum of 25 μ g of proteins were added to the mixture and left over overnight at 4°C. After washing steps, beads were resuspended in 60 μ l of Laemmli sample buffer and boiled at 120°C for 5 minutes. Beads were then collected by microcentrifuge pulse and supernatant fraction was collected for immunoblot analysis.

4.2.5 Immunocytofluorescence and deconvolution analysis

To determine the localization of the CD44 receptor in human bronchial SMC, cells were seeded on sterile cover slide placed into 6 well plates. Once cells reached the desired confluence, cells were fixed with 2% PFA (in sterile PBS) for 15 minutes at room temperature (RT) then blocked with Image-It Fx enhancer (Invitrogen™) for another 15 minutes at RT. Slides were then incubated overnight with CD44 primary antibody (clone MEM-85 1:250) and isotype control (1:125) in wet chamber at 4°C. After 1h of incubation with chicken anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor® 488 (1:2000). Nuclei were stained with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000). ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen™) was used to prevent photobleaching of Alexa molecules. Slides were analyzed using the automated inverted epifluorescence microscope Olympus IX-81 (Olympus, Canada). Images were captured with the camera CoolSNAP-pro cf monochrome (Roper Scientific, Tucson, USA) and Image-Pro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, USA), and treated for deconvolution analysis using SharpStack Plus 3D Blind deconvolution software (Media Cybernetics).

4.2.6 Flow cytometric analysis

Human bronchial SMC were grown in complete culture medium at different cell confluency (30 to 90 %). After trypsinization, cells were resuspended at a concentration of 10⁶ cells/ml, washed in PBS, and then incubated for 30 minutes at 4°C with 10 μ g/ml of CD44 primary antibody (clone MEM-85). Isotype control antibody was incubated with cells as described above. Chicken anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor®

488 (1 μ g/ml) was used as secondary antibody. In other series of experiments, the expression of the CD44 receptor on cell surface was examined using HA (1000 μ g/ml) conjugated to FITC (Carbomer, San Diego, California, USA). Flow cytometric analysis was performed using the Epics XL from Beckman Coulter and Expo32 software. For CD44 receptor internalization experiments, trypsinized human bronchial SMC were incubated for 4h with either HA (10 mg/ml), MMP-9 67 kDa (250 ng/ml) or pro-MMP-9 92 kDa (250 ng/ml) prior to cell labeling for the detection of the CD44 receptor or control isotype as described above.

4.2.7 Proliferation assay

To determine the effects of MMPs and hyaluronan (HA) on human bronchial SMC growth, cells were left for adhesion in sterile 96-well Microlon Fluotrac 600 black plate (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) for at least 12 hrs. Culture medium was then discarded and replaced by complete medium with 1.25 % (MMPs) or 2.5 % (HA) FBS containing various concentrations of hyaluronan, MMP-9 67 kDa or pro-MMP-9. Cell proliferation was assessed 72 hrs later using the CyQUANT NF kit (Invitrogen), which assay is based on the incorporation of a fluorescent DNA binding dye using a plasma membrane permeabilization reagent allowing dye to reach cell nuclei. This assay was selected over several because it uses a non-radioactive compound that avoids to wash cells after the incorporation of the fluorescent DNA binding dye, and it is more suitable for the determination of airway smooth muscle cell growth than other assays ²¹. The incorporation of fluorescence was quantified using POLARstar optima microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). At the time of cell growth quantification, a standard curve was drawn by adding into wells of the same culture plate known concentrations of trypsinized human bronchial SMC (from 5000 to 100,000 cells/well) and the fluorescent DNA binding dye. Data are expressed as the percentage of cell growth or cell growth inhibition compared to control conditions.

4.2.8 *Statistical analysis*

Data are represented as mean \pm SEM. Statistical comparison was performed using the Student's *t* test. A difference was considered to be statistically significant when the *P* value was less than 0.05.

4.3 Results

4.3.1 Human bronchial SMC express a functional CD44 receptor

To the best of our knowledge, only two studies have reported the expression of the CD44 receptor in human airways, more precisely in tracheal SMC^{17, 20}, and only one of these studies described a role for this receptor. In the present study, we have first addressed the issue of CD44 receptor expression in human bronchial SMC. RT-PCR analysis indicated that human bronchial SMC express the CD44 receptor, at least, as the variant 6 and 8 (figure 3.1A). Immunoblot analysis revealed that human bronchial SMC express the CD44 receptor as a mature protein (figure 3.1B). The immunoreactive band detected around 80 kDa is likely to represent the smallest variant of the CD44 receptor (figure 3.1B). Interestingly, we found that the expression of the CD44 receptor was a function of cell confluency, being higher for human bronchial SMC in the proliferating phase (figure 3.1). Epifluorescence microscopy with deconvolution analysis indicated that the CD44 receptor is expressed on cell membrane of the human bronchial SMC (figure 3.2). To further confirm the expression of the CD44 receptor on cell surface and to quantify its level of expression, two different flow cytometric labeling approaches were used. With a pan-antibody recognizing all variants of the CD44 receptor, we found that this receptor is markedly expressed on the surface of human bronchial SMC (figure 3.3A). This finding was confirmed using hyaluronan (HA), an orthosteric ligand of the CD44 receptor, conjugated to FITC (figure 3.3B). Furthermore, flow cytometric analysis confirmed immunoblot findings by showing that the expression of the CD44 receptor decreased when cells were confluent (figure 3.3C).

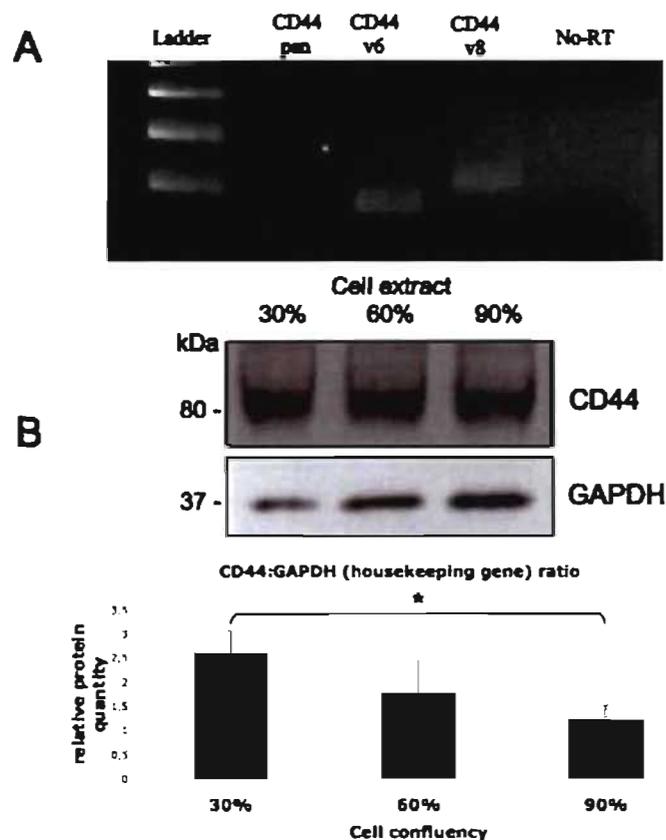


Figure 3.1. Expression of the CD44 receptor in human bronchial SMC.
 (A) RT-PCR analysis indicated that CD44 receptor is expressed, at least, as the isoform 6 and 8. (B) Immunoblot and semi-quantitative densitometric analysis of CD44 receptor expression as a function of cell confluency indicated that it is highly expressed in human bronchial SMC in the proliferating phase (30% confluency).



Figure 3.2. Localization of the CD44 receptor in human bronchial SMC. Epifluorescence microscopy and deconvolution analysis indicated the presence of immunoreactivity for the CD44 receptor (colorized in green) on the cell membrane of human bronchial SMC. Negative control: isotype matched IgG₂A. Nuclei were stained using DAPI molecule (colorized in blue).

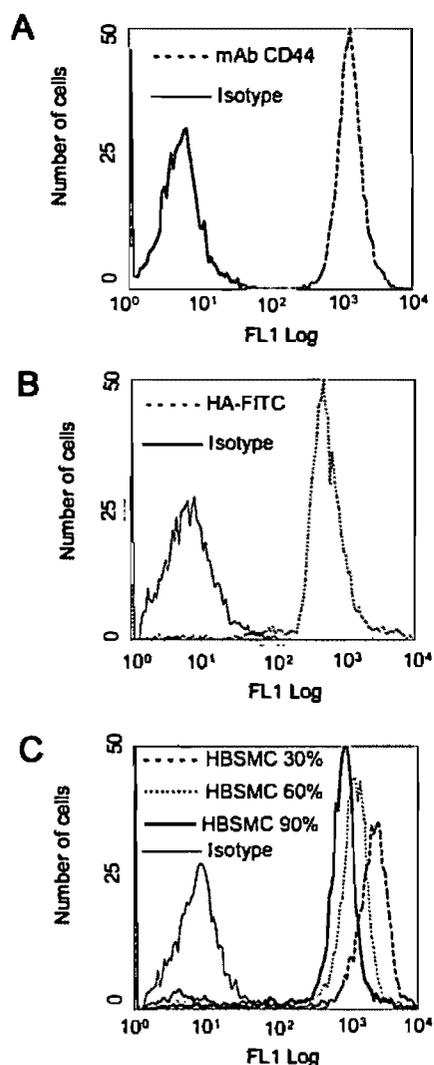


Figure 3.3. Quantification of CD44 receptor expression on the surface of human bronchial SMC. (A) Flow cytometric analysis of CD44 expression using a mouse anti-human CD44 monoclonal antibody, and (B) in cells labeled with 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HA-FITC. (C) Flow cytometric analysis of CD44 receptor expression on human bronchial SMC as a function of cell confluency. Negative control: isotype matched IgG₂A.

To demonstrate that the CD44 receptor expressed on human bronchial SMC is functional, the internalization of this receptor in response to stimuli was examined by flow cytometry. The incubation of human bronchial SMC with HA (10 mg/ml) for 4 hrs induced the internalization of CD44 receptors with a decrease in the mean fluorescence intensity (MFI) by 48.0 \pm 11.3% as compared to control unstimulated cells (figure 3.4).

These data suggest that the CD44 receptor expressed on human bronchial SMC is likely to be functional.

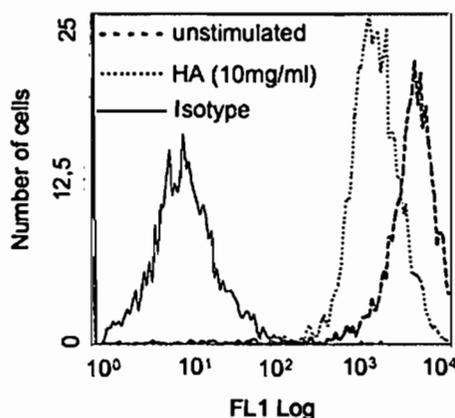


Figure 3.4. Determination of the CD44 receptor functionality in human bronchial SMC. Flow cytometric analysis of CD44 internalization in response to HA (10 mg/ml) was determined as a marker of receptor functionality. Negative control: isotype matched IgG₂A.

4.3.2 MMP-9 associates with the CD44 receptor and induces its internalization

To provide evidence that pro-MMP-9 is a ligand of the CD44 receptor in human bronchial SMC, we first incubated cells with pro-MMP-9 and then immunoprecipitated CD44 receptor from cell lysates for the detection of MMP-9 or CD44. As expected, positive controls showed the detection of free monomers of MMP-9 or the CD44 receptor (figure 3.5). Immunoblot analysis for the detection of the CD44 receptor or MMP-9 in cell extracts both revealed a CD44/MMP-9 complex around 250 kDa instead of a complex expected at 172 kDa (figure 3.5). Because the CD44 receptor is known to form both homo-dimer and hetero-dimer with various growth factor receptors^{19, 22, 23}, it is possible that the immunoreactive band detected at 250 kDa correspond to such complexes.

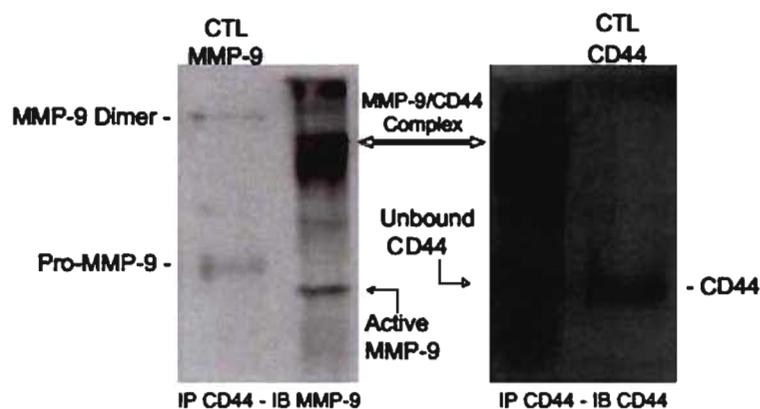


Figure 3.5. Association between MMP-9 and the CD44 receptor. Immunoprecipitation (IP) of CD44 receptors in cell extracts and immunoblotting (IB) for either (A) MMP-9 or (B) CD44. A MMP-9/CD44 complex at 250 kDa was detected.

We next examined whether the pro- and the active form of MMP-9 can induce the internalization of CD44 receptors in human bronchial SMC. We found that pro-MMP-9 produced a significant higher internalization of CD44 receptors as compared to MMP-9 67 kDa with a fall in MFI by 30.7 +/- 4.4 % and 16.6 +/- 7.6 % for pro-MMP-9 and its active form, respectively (figure 3.6). These data indicate that pro- and active forms of MMP-9 are likely to act as ligands of the CD44 receptor in human bronchial SMC.

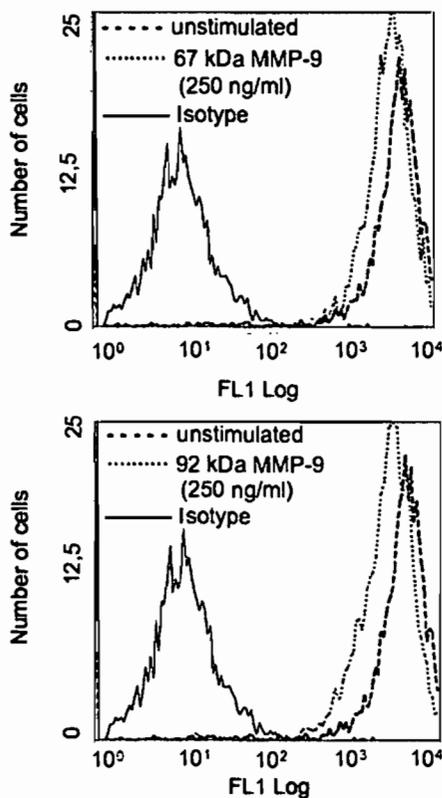


Figure 3.6. MMP-9 induces CD44 receptor internalization in human bronchial SMC. Flow cytometric analysis of CD44 receptor expression on cells surface in response to stimulation with (A) 250 ng/ml of 67 kDa MMP-9 or (B) 250 ng/ml of pro-MMP-9. Negative control: isotype matched IgG₂A.

4.3.3 Effects of hyaluronan, pro- and active MMP-9 on human bronchial SMC proliferation

Because we found that CD44 receptor expression is a function of human bronchial SMC confluency, we next addressed whether hyaluronan and both forms of MMP-9 modulate serum-induced cell growth. To address this issue, the effect of pro- and active MMP-9 on cell proliferation was assessed using a fluorescent DNA labeling-based assay, and was compared to the effect of HA. Our data indicate that HA acts as a weak mitogenic factor by increasing human bronchial SMC growth by nearly 20 % for 500 μ g/ml of HA (figure 3.7A). These data confirm that the CD44 receptor expressed on

human bronchial SMC is functional. In contrast, active MMP-9 inhibited human bronchial SMC growth in a concentration-dependent manner with a maximal decrease of nearly 50 % for 400 ng/ml of MMP-9 67 kDa (figure 3.7B). Interestingly, pro-MMP-9 also decreased human bronchial SMC growth but to a lesser extent with a maximal decrease of nearly 25 % for 400 ng/ml of pro-MMP-9 (figure 3.7C).

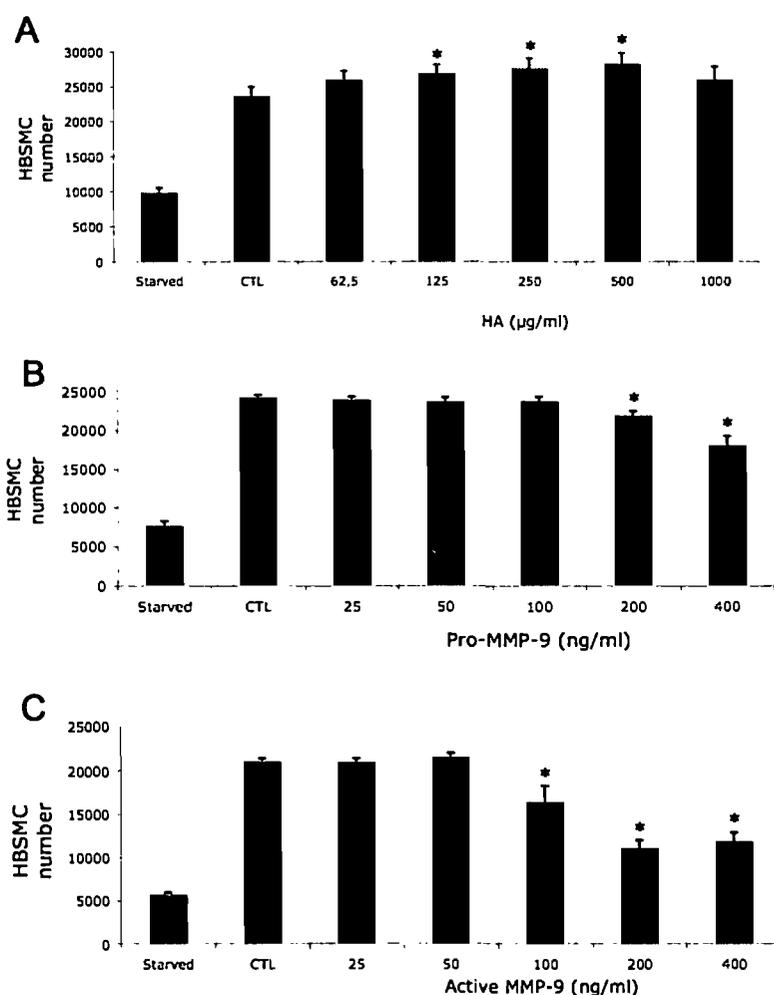


Figure 3.7. Effects of HA and MMP-9 on human bronchial SMC (HBSMC) proliferation. 2500 cells/well were incubated with (A) HA (62.5 to 1000 µg/ml), (B) pro-MMP-9 (25 to 400 ng/ml) in culture and (C) MMP-9 67 kDa (25 to 400 ng/ml). Cell proliferation was determined using the CyQUANT NF kit. * $P < 0.05$ as compared to the control condition.

4.4 Discussion

In the present study, we provide the first evidence that human bronchial SMC express a functional CD44 receptor. We also found that the CD44 receptor is highly expressed in human bronchial SMC in the proliferating phase; its expression being lower in confluent cells. This finding strongly suggests that the CD44 receptor may have a role in human bronchial SMC growth. Furthermore, we also provide the first evidence that MMP-9 constitutes a complex with the CD44 receptor and induces the internalization of this receptor. Finally, we found that the active 67 kDa form of MMP-9, and to a lesser extent pro-MMP-9, act as repressor of human bronchial SMC proliferation.

Given that pro-MMP-9 levels are increased in induced sputum and plasma of asthmatic patients¹⁰⁻¹², we and others have examined whether human airway SMC may be a source of pro-MMP-9 in the lungs. We found that human bronchial SMC do not express pro-MMP-9 (unpublished data). This finding is consistent with the observation of Foda *et al.*^{5, 6} showing that human tracheal SMC do not express pro-MMP9 but that this gene is induced by various pro-inflammatory cytokines. The role of MMP-9 in asthma physiopathology is still unclear. Lim *et al.* found that MMP-9 deficient mice have reduce peribronchial fibrosis following allergen challenge, and also concluded that MMP-9 has not a significant role in mucus expression, smooth muscle thickness or airway responsiveness²⁴. In marked contrast, the study of McMillan *et al.* showed that knocking out MMP-9 in mice resulted in enhanced allergen-induced airway inflammation. They also conclude that MMP-9 is critically involved in the recruitment of eosinophil and Th2 cells to the lung following allergen challenge, and in the development of airway hyperreactivity¹³. Interestingly, they found that the resolution of airway inflammation is slower in the absence of MMP-9 which finding strongly suggests that MMP-9 acts as a negative regulator of the development of chronic airway inflammation, and subsequently of the remodeling process.

The role of CD44 in asthma is nearly as blurry as MMP-9. Using various monoclonal antibodies to disturb CD44 function, Katoh et al.²⁵ demonstrated a dose-dependent inhibition of multiple aspects of allergic airway responses, including leukocyte recruitment, Th2 cytokines production, and AHR. In contrast, CD44^{-/-} deficient mice developed an exaggerated lung inflammatory response in bleomycin-induced lung injury. Furthermore, these mice showed increase levels of lung leukocytes, chemokines and hyaluronan fragments. This latter study indicates a critical role for the CD44 receptor in resolving lung inflammation²⁶. Collectively, these studies indicate that the role of the CD44 receptor in asthma pathogenesis remains unclear. However, the CD44 receptor is likely to be involved in the process airway remodeling because the study of Lazaar et al.¹⁷ have shown that this receptor participates in the process of DNA synthesis in human tracheal SMC, and that the complex HA/CD44 is involved in this process. In the present study, we have shown that human bronchial SMC express the CD44 receptor, and that its expression is a function of cell confluency; being highly expressed in proliferating cells. This finding suggests a role for the CD44 receptor in human bronchial SMC growth. In agreement with Lazaar's study, we found that HA activates the CD44 receptor expressed on human bronchial SMC, and acts as a moderate growth factor. This finding suggests that the HA/CD44 complex may contribute to changes in smooth muscle mass in asthma.

Recent studies have identified MMP-9 as a ligand for the CD44 receptor on various cells type, mainly cancerous cells^{14, 15, 27-29}. In the present study, we found that MMP-9 forms a complex with the CD44 receptor on human bronchial SMC, which complex is unlikely to be composed of MMP-9/CD44 in a ratio 1:1. The CD44 receptor is known to form homo-dimer and also hetero-dimer with various growth factor receptor^{19, 22, 23}. Thus, it is plausible that the MMP-9/CD44 complex detected at 250 kDa correspond to the binding of pro-MMP-9 to a dimeric form of the CD44 receptor. Interestingly, we found that pro-MMP-9 induces the internalization of CD44, but to a lesser extent than HA. We postulate that MMP-9 binds to specific isoforms of CD44

whereas HA is well known to activate all CD44 isoforms. Interestingly, active MMP-9 provokes a lower CD44 internalization than pro-MMP-9, however, it is a stronger repressor of human bronchial SMC growth. It is plausible that the higher levels of CD44 receptor internalization in response to pro-MMP-9 stimulation is also a mechanism to control pro-MMP-9 activation in the extracellular milieu for limiting its action. In fact, such a mechanism is likely to occur if one of the CD44 receptor variant of CD44 acts as a decoy receptor. Similar mechanisms have been reported for the receptor IL-13 α 2 and IL-13³⁰, the receptor VEGFR-1 and VEGF³¹, and also for the soluble form of the CD44 receptor and HA^{14, 32}. Thus, the existence of a decoy receptor for CD44 may be a mechanism for modulating MMP-9 agonistic activity in the process of airway remodeling in asthma.

The autocrine production of MMP-2, another member of the gelatinase family, is required for human tracheal SMC proliferation³³. This study and our provides the first evidence that although MMP-9 and MMP-2 are both member of the gelatinase family, their biological role unrelated to their intrinsic metalloproteinase activity is different even though opposite. The intracellular signaling cascade of the CD44 receptor follows principally two distinct pathways, one leading to cell proliferation, and the other one inducing growth inhibition. These pathways involve mainly two types of protein. In one hand, the protein family ERM (Ezrin, Radixin and Moesin) are required when the CD44 receptor is associated with a growth factor receptor to induce cell proliferation³⁴. In another hand, the neurofibromatosis-2 (NF2) tumor suppressing gene product, a protein called merlin, is required to inactivate the MAPK pathway for inducing growth inhibition³⁵. Our preliminary data indicated that active MMP-9 has reduced serum-induced MAPK ERK 1/2 phosphorylation (data not shown). However, whether the anti-proliferative effects of MMP-9 involves the protein merlin remains to be determined.

In conclusion, we have demonstrated that human bronchial SMC express a functional CD44 receptor which upon activation by its orthosteric ligand HA provokes moderate cell growth. We provide the first evidence that both the inactive and active form of MMP-9 are a ligand for the CD44 receptor, and act as negative regulators of human bronchial SMC growth. Taken together, this study identified the complex MMP-9/CD44 as a new regulatory element of human bronchial SMC function, and raised the possibility that this complex may be an important participant in the control of airway smooth muscle mass in asthma.

4.5 Acknowledgments

This work was supported through a grant from the Institut de Recherche en Santé et Sécurité au Travail (IRSST). K. Maghni is a Chercheur Boursier from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). P. Tétreault has a master studentship from the FRSQ.

4.6 Disclosures

The authors have no conflicting financial interests.

4.7 References

1. Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther* 2006; 112:474-88.
2. Lazaar AL, Panettieri RA, Jr. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:488-95; quiz 96.
3. Munakata M. Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int* 2006; 55:235-43.
4. Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, et al. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:103-10.
5. Foda HD, George S, Rollo E, Drews M, Conner C, Cao J, et al. Regulation of gelatinases in human airway smooth muscle cells: mechanism of progelatinase A activation. *Am J Physiol* 1999; 277:L174-82.
6. Lee CW, Lin CC, Lin WN, Liang KC, Luo SF, Wu CB, et al. TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292:L799-812.
7. Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, Watson SA, Buttle DJ, Johnson SR. Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2004; 142:1318-24.
8. Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:28-33.
9. Lagente V, Manoury B, Nenan S, Le Qument C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:1521-30.
10. Boulay ME, Prince P, Deschesnes F, Chakir J, Boulet LP. Metalloproteinase-9 in induced sputum correlates with the severity of the late allergen-induced asthmatic response. *Respiration* 2004; 71:216-24.
11. Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1157-61.
12. Belleguic C, Corbel M, Germain N, Lena H, Boichot E, Delaval PH, et al. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:217-23.
13. McMillan SJ, Kearley J, Campbell JD, Zhu XW, Larbi KY, Shipley JM, et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in enhanced allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* 2004; 172:2586-94.
14. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999; 13:35-48.

15. Abecassis I, Olofsson B, Schmid M, Zalzman G, Karniguian A. RhoA induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Exp Cell Res* 2003; 291:363-76.
16. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10:423-8.
17. Lazaar AL, Albelda SM, Pilewski JM, Brennan B, Pure E, Panettieri RA, Jr. T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med* 1994; 180:807-16.
18. Schultz K, Rasmussen LM, Ledet T. Expression levels and functional aspects of the hyaluronan receptor CD44. Effects of insulin, glucose, IGF-I, or growth hormone on human arterial smooth muscle cells. *Metabolism* 2005; 54:287-95.
19. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:33-45.
20. Halayko AJ, Salari H, Ma X, Stephens NL. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol* 1996; 270:L1040-51.
21. Maghni K, Nicolescu OM, Martin JG. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J Immunol Methods* 1999; 223:185-94.
22. Wobus M, Rangwala R, Sheyn I, Hennigan R, Coila B, Lower EE, et al. CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10:34-9.
23. Lesley J, English N, Charles C, Hyman R. The role of the CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in constitutive and inducible hyaluronan binding. *Eur J Immunol* 2000; 30:245-53.
24. Lim DH, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Broide DH. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291:L265-71.
25. Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. *J Clin Invest* 2003; 111:1563-70.
26. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, et al. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 2002; 296:155-8.
27. Murray D, Morrin M, McDonnell S. Increased invasion and expression of MMP-9 in human colorectal cell lines by a CD44-dependent mechanism. *Anticancer Res* 2004; 24:489-94.
28. Peng ST, Su CH, Kuo CC, Shaw CF, Wang HS. CD44 crosslinking-mediated matrix metalloproteinase-9 relocation in breast tumor cells leads to enhanced metastasis. *Int J Oncol* 2007; 31:1119-26.
29. Thanakit V, Sampatanukul P, Ruangvejvorachai P, Keelawat S. The association of co-expression of CD44v4/MMP-9 with different nodal status in high-grade breast carcinoma patients. *J Med Assoc Thai* 2005; 88 Suppl 4:S30-5.
30. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54:577-89.
31. Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ* 2002; 66:962-75.

32. Spessotto P, Rossi FM, Degan M, Di Francia R, Perris R, Colombatti A, et al. Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J Cell Biol* 2002; 158:1133-44.
33. Johnson S, Knox A. Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol* 1999; 277:L1109-17.
34. Orian-Rousseau V. [CD44 involvement as a regulator of cell proliferation]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19:405-7.
35. Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, et al. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 2001; 15:968-80.

4.8 Footnotes

¹This work was supported by grants from the Institut de Recherche en Santé et Sécurité au Travail (IRSST) du Québec. Canadian Institutes of Health Research # MOP-57742.

²Address correspondence and reprint requests to Dr. Karim Maghni, Sacré-Coeur Hospital of Montreal, Research Centre, Laboratory of Asthma Neuroimmunology, 5400, blvd. Gouin West, Montreal, Quebec, H4J 1C5, Canada. E-mail:  Laboratory's web site: <http://www.asthma-neuroimmunology.com/en/node/4>

³Abbreviations used in this paper: MMP, Matrix metalloprotease; SMC; smooth muscle cells; ECM, Extracellular matrix; TIMP, Tissue inhibitor of metalloprotease; AHR : airway hyperresponsiveness; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; MFI, Mean fluorescent intensity; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Section 5. Discussion

L'asthme est une pathologie fort complexe ayant une multitude de causes, tant génétiques qu'environnementales. Il est d'autant plus complexe que les causes environnementales et les causes génétiques peuvent interagir entre elles. Chaque étude portant sur cette maladie affectant un nombre grandissant de personnes est une pièce supplémentaire pour résoudre ce « grand puzzle » et permettre de trouver un traitement pour sa guérison. L'implication des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CMLBH) dans l'apparition des symptômes asthmatiques est connue depuis longtemps, cependant, la nature de leur rôle commence seulement à être élucidé. En effet, historiquement considérées comme étant passives et répondant uniquement aux stimuli environnants, les CMLBH sont maintenant perçues comme des acteurs importants dans la physiopathologie de l'asthme. Ainsi, des travaux récents indiquent que ces cellules participent activement, non seulement au processus de remodelage des voies respiratoires, mais également à la modulation immunologique observée dans cette pathologie⁹¹⁻⁹³. Mon projet de maîtrise rejoint en quelques sortes ces deux aspects du rôle de ces cellules.

Basés sur les travaux indiquant que les niveaux de pro-MMP-9 sont augmentés dans les expectorations induites des patients asthmatiques^{56,57}, nous avons commencé le projet par confirmer ou infirmer l'expression de la MMP-9 chez les CMLBH. Nous avons ainsi trouvé que cette protéine n'était pas exprimée chez les CMLBH mais que la MMP-2 l'était de façon constitutive. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Foda et collaborateurs sur les CMLTH⁶². L'étude de Foda avait également montré que les CMLTH produisaient de la MMP-9 à la suite d'une stimulation avec des facteurs simulant une réponse inflammatoire. Des expériences réalisées dans notre laboratoire en utilisant les mêmes conditions expérimentales n'ont pas permis de confirmer les résultats de cette étude chez les CMLBH. Ceci pourrait être expliqué par l'origine tissulaire des cellules utilisées. En effet, l'étude de Foda a été réalisée avec des cellules trachéales, donc des voies respiratoires supérieures, tandis que nous avons utilisé des cellules bronchiques, soit des voies respiratoires inférieures. Bien que ces deux types cellulaires n'aient pas été complètement caractérisés, nous savons que les cellules des voies

supérieures et celles des voies inférieures sont soumises à des contraintes physiologiques différentes pouvant influencer leur phénotype, et probablement leurs réponses cellulaires.

Dans cette première partie de notre étude, nous avons aussi montré que les extraits cellulaires des CMLBH contenaient une forme active de MMP-9, à 67 kDa. L'utilisation d'un inhibiteur à large spectre des MMPs, le GM6001, a permis de conclure que cette forme de la MMP-9 n'était pas due à une activation enzymatique causée par un autre membre de la famille des MMPs. Le tampon de lyse contenant déjà une batterie d'inhibiteurs de protéases, il devenait peu probable que cette forme active de MMP-9 soit le résultat d'une «dégradation» par une protéase autre que les MMPs. La présence de cette protéine, en absence d'évidence de son expression par les CMLBH, suggérait que la source pourrait être le sérum du milieu de culture. Nos résultats d'immunobuvardage et de zymographie ont confirmé notre hypothèse, à savoir que le milieu de culture complet contient effectivement la forme active de MMP-9 à 67 kDa. L'absence de détection de MMP-9 à 67 kDa dans les extraits des cellules cultivées dans un milieu dépourvu de sérum a aussi confirmé notre hypothèse. Nous avons alors postulé que la forme active de MMP-9 retrouvée dans les extraits cellulaires devait provenir d'une liaison de cette MMP à une protéine de surface chez les CMLBH. La MMP-9 étant un ligand pour le récepteur CD44^{73,74}, nous avons émis les hypothèses que les CMLBH expriment ce récepteur, qu'il est fonctionnel et que la MMP-9 est un ligand de ce récepteur et module les fonctions des CMLBH.

Ainsi, l'autre partie importante de mon projet de maîtrise a porté sur l'expression du récepteur CD44, de son interaction avec la MMP-9 et de leur implication dans la régulation des fonctions des CMLBH. L'investigation de ces mécanismes a mené à l'article présenté dans ce mémoire. Au mieux de notre connaissance, Il n'existe que deux études portant sur l'expression du récepteur CD44 chez les cellules musculaires lisses des voies respiratoires. Ainsi, l'étude de Lazaar et collaborateur a montré que les cellules musculaires lisses trachéales expriment de façon constitutive le récepteur CD44, et que

les lymphocytes T activés interagissaient avec les cellules musculaires lisses via ce récepteur pour induire la prolifération de ces dernières ⁷⁵. L'étude de Halayko et collaborateurs a montré que l'expression du récepteur CD44 chez les cellules musculaires lisses trachéales était fortement associée au phénotype prolifératif/sécrétoire mais ne donnait aucune information quant à son expression chez les CMLTH ayant un phénotype contractile ⁴⁴. Bien que l'étude de Lazaar semble avoir montré la fonctionnalité du récepteur CD44 dans les CMLTH en utilisant un anticorps anti-CD44 ou la hyaluronidase (l'enzyme responsable de l'hydrolyse du hyaluronan), notre étude est la première à étudier l'expression et la fonctionnalité du récepteur CD44 chez les CMLBH. Nos résultats indiquent que l'expression de ce récepteur est fonction de la confluence cellulaire et ainsi, ils vont dans le sens des travaux de Halayko et collaborateurs concernant l'association de l'expression du récepteur CD44 au phénotype prolifératif/sécrétoire. Cependant, nos résultats indiquent aussi que ce récepteur est toujours exprimé, même chez des cellules à forte confluence qui ont vraisemblablement atteint un phénotype contractile. Ce dernier résultat permet de suggérer un rôle différent pour le récepteur CD44 selon l'origine tissulaire ainsi que le phénotype des cellules musculaires lisses des voies respiratoires.

L'expression préférentielle de CD44 pour le phénotype prolifératif/sécrétoire n'est assurément pas fortuite. Comme l'a montré le groupe de Lazaar, le récepteur CD44 est impliqué dans la prolifération des CMLTH suite à leurs interactions avec les lymphocytes T activés. Cette étude a montré que ce mécanisme semblait être dépendant du hyaluronan (HA). En effet, la liaison de HA au récepteur CD44 exprimé par les cellules musculaires lisses permettrait de créer un « pont » avec le récepteur CD44 exprimé par les lymphocytes T activant ainsi le récepteur CD44 pour l'induction de la prolifération des CMLTH. Il est intéressant de noter que les études portant sur l'effet de la liaison de HA au récepteur CD44 ont montré que cette liaison induisait au contraire un effet anti-prolifératif ^{67,72}, ce qui pourrait laisser supposer, de prime abord, que l'augmentation de prolifération observé par Lazaar ne serait peut-être pas due à l'activation de CD44. Comme la liaison entre ces deux cellules par l'intermédiaire du

récepteur CD44 se fait de façon conjointe avec d'autres molécules membranaires, comme les ICAM, les VCAM et CD40⁹⁴, on pourrait présumer que l'induction de la synthèse d'ADN serait dû à l'une ou plusieurs de ces protéines. Par contre, les résultats de notre étude concernant l'activation du complexe HA/CD44 montrent que cette molécule possède un effet mitotique provoquant une augmentation modérée de la prolifération des CMLBH. Ce résultat supporte ainsi l'étude de Lazaar concernant le rôle proliférateur de CD44 médié par HA. L'ensemble de ces résultats indiquent que le récepteur CD44 joue un rôle dans la prolifération des CMLBH médiée par le HA et démontre, une fois de plus, qu'un complexe ligand/récepteur peut avoir un rôle totalement différents d'un type cellulaire à un autre.

Comme il a été mentionné dans l'introduction, le récepteur CD44 existe sous plusieurs isoformes. Nos travaux indiquent que les CMLBH expriment, au minimum, les variants 6 et 8. Le rôle spécifique de chacun de ces variant commence seulement à être bien caractérisé. Ainsi, le variant v6 du récepteur CD44 induit la prolifération des cellules de thymome EL4 en provoquant une activation persistante des MAPK⁹⁵. Il est donc possible que les isoformes du récepteur CD44 exprimés à la surface des CMLBH soient différents en fonction de leur phénotype. Nos résultats indiquent que le variant v6 du récepteur CD44 est exprimé chez les CMLBH, et nos résultats préliminaires de RT-PCR ont montré que l'ARNm de ce variant semblait toujours exprimé dans les cellules à forte confluence (résultats non-montrés). Cependant, que ce variant soit responsable de la prolifération des CMLBH, par exemple à la suite de son activation par le HA, reste encore à démontrer. Des expériences utilisant un anticorps neutralisant du récepteur CD44v6 avant la stimulation par le HA pourraient nous permettre de répondre à cette question.

Nos travaux portant sur l'étude de la formation d'un complexe entre pro-MMP-9 et le récepteur CD44 indiquent l'existence d'interaction entre ces deux protéines. Cependant, la bande principale détectée, à la suite des IB en condition non-dénaturante, se situe à environ 250 kDa, contrairement au poids attendu de 172 kDa. Ce complexe

pourrait être expliqué par le fait que le récepteur CD44 est connu pour former des homodimères ainsi que des hétérodimères avec différents récepteurs de facteur de croissance ^{67,96,97}. Le complexe de 250 kDa que nous observons pourrait ainsi être le résultat, par exemple, d'un homodimère CD44 lié à la pro-MMP-9. Nos résultats préliminaires d'analyses d'immunobuvardage en condition dénaturante ont indiqué que ce complexe se dissociait, entre autres, en les différentes molécules composant ce complexe (résultats non-montrés). Cependant, des analyses plus approfondies seront nécessaires afin de confirmer nos hypothèses concernant les éléments formant ce complexe, ainsi que le ou les variants du récepteur CD44 constituant ce complexe.

Nos résultats sur l'étude de l'internalisation du récepteur CD44, par les deux formes de MMP-9, indiquent aussi que ces protéines sont vraisemblablement des ligands du récepteur CD44. Afin de confirmer que le complexe MMP-9/CD44 est internalisé, différentes expériences pourraient être réalisées. Par exemple, l'utilisation de MMP-9 couplée à une molécule fluorescente et la détection du récepteur CD44 avec un anticorps couplé à un autre marqueur fluorescent permettrait par la technique de microscopie confocale de déterminer la co-localisation de MMP-9 et du récepteur CD44 dans ce complexe, en particulier suite à l'internalisation du complexe. La cinétique d'internalisation et de recyclage du récepteur CD44 est pratiquement inconnue. Knudson et ses collaborateurs mentionnent toutefois que l'internalisation ne se fait pas via des puits tapissés de clatherine, ni par l'intermédiaire des caveolae, ni par pinocytose ⁹⁸. Cette internalisation pourrait alors se faire par des mécanismes de phagocytose, par une endocytose non-dépendante de la clatherine, ou encore par un mécanisme inconnu qui serait spécifique à ce type de récepteur. Il serait ainsi très intéressant d'étudier, dans la suite de ce projet, les mécanismes responsable de l'internalisation du récepteur lors de son activation par HA ou MMP-9.

Nos résultats ont aussi montré que la pro-MMP-9 a induit une internalisation plus importante que la MMP-9 active. De plus, nos résultats de prolifération ont indiqué que la forme active de MMP-9 provoquait une inhibition de la croissance cellulaire plus forte

que la pro-MMP-9. Différentes hypothèses pourraient expliquer ces résultats. Le domaine de liaison de MMP-9 à CD44 n'étant pas connu, il se peut que l'affinité de la forme pro- et active pour le récepteur soit différente due à la présence ou l'absence du propeptide. Une autre hypothèse pour expliquer le fait que pro-MMP-9 induit une plus grande internalisation, mais une plus faible inhibition de la prolifération serait que cette forme inactive de MMP-9 provoquerait une « désensibilisation » du récepteur CD44 comme mécanisme de contrôle de la réponse induite par la MMP-9 active. Il serait possible de montrer l'existence d'un tel mécanisme dans une série d'expériences de prolifération où les CMLBH seraient préstimulées par la pro-MMP-9, suivit par une stimulation par la MMP-9 active. Ces expériences permettraient de montrer que l'effet induit par la MMP-9 active peut être bloqué par un prétraitement avec la pro-MMP-9 suite à une diminution du nombre de récepteur CD44 présents à la surface cellulaire. Un autre mécanisme hypothétique serait que l'un des variants du récepteur CD44 serait un récepteur de type leurre. Différentes études rapportent des phénomènes semblables, par exemple, le récepteur à l'IL-13 $\alpha 2$ pour l'IL-13 ⁹⁹, le récepteur VEGFR-1 pour le VEGF ¹⁰⁰, mais également le récepteur CD44 sous sa forme soluble pour le HA ^{73,101}. Ainsi, un variant particulier de CD44 exprimé par les CMLBH pourrait jouer un rôle de leurre afin d'internaliser la pro-MMP-9 et alors provoquer sa dégradation intracellulaire avant que ce dernier soit activé dans le milieu extracellulaire. Il est important de mentionner à nouveau que les MMPs peuvent s'auto et se transactiver (voir figure 4). Ainsi, un tel mécanisme pour la pro-MMP-9 serait très probable dans les voies respiratoires car la présence d'un récepteur CD44 leurre permettrait de minimiser les effets d'une concentration élevée en MMP-9 afin de maintenir l'homéostasie du remodelage.

Le rôle de CD44 dans l'asthme n'est pas encore défini clairement. Deux études ayant pour but d'analyser l'effet de CD44 dans un modèle d'asthme sont arrivées à des résultats presque diamétralement opposés, soit un rôle pro-inflammatoire dans un cas et un rôle anti-inflammatoire dans l'autre ^{80,81}. Notre étude supporte les résultats de Teder et suggère que le récepteur CD44, via son activation par la MMP-9, aurait un rôle de régulateur négatif dans la pathogenèse de l'asthme en diminuant la prolifération des

CMLBH. La signalisation intracellulaire de CD44 emploie principalement deux voies distinctes, une menant à l'inhibition de la croissance et l'autre menant à la prolifération cellulaire^{67,72}. Les deux voies ont pour principale finalité soit de bloquer ou d'activer la voie des MAPK. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, nous avons commencé à étudier cette cascade de signalisation chez les CMLBH lors de l'activation du récepteur CD44. Nos résultats préliminaires ont indiqué que la forme active de MMP-9 diminue la phosphorylation des MAPK ERK1/2 induite par le sérum. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que l'un des mécanismes responsables de l'inhibition de la croissance des CMLBH par le complexe MMP-9 active/CD44 est attribuable à une diminution de l'activité des MAPKs. Toutefois, la signalisation en amont, faisant intervenir la protéine merline¹⁰²⁻¹⁰⁴ (Figure 6) n'a pas encore été étudiée au laboratoire. Cette protéine étant active lorsque déphosphorylée^{105,106}, on devrait ainsi s'attendre à une déphosphorylation de la merline à la suite d'une stimulation par la MMP-9 active. Comme mentionné plus haut, nos résultats de prolifération avec HA ont indiqué que, contrairement à ce que rapporte la littérature dans d'autres types cellulaires, HA induit une prolifération des CMLBH. L'autre voie de signalisation du récepteur CD44, qui mène à une prolifération cellulaire, se fait par une hétérodimérisation avec certains récepteurs de facteurs de croissance, comme le récepteur c-MET. Cette voie de signalisation nécessite aussi le recrutement de protéines de la famille des ERM¹⁰⁷ qui doivent être phosphorylées pour être activées et ensuite augmenter l'activité des MAPK¹⁰⁸. Il serait donc intéressant de déterminer si cette voie de signalisation serait utilisée par HA chez les CMLBH en observant le niveau de phosphorylation des protéines ERM.

Comme il a été indiqué dans l'introduction, le rôle de la MMP-9 dans la physiopathologie de l'asthme reste encore imprécis. Les différentes études portant sur la délétion du gène de la MMP-9, dans des modèles d'asthmes expérimentaux chez la souris, démontrent que cette métalloprotéinase, tout comme le récepteur CD44, pourrait jouer un rôle autant pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire. Notre étude pourrait ainsi permettre de mieux cerner le rôle de la MMP-9 dans cette maladie complexe. Dans une phase ultérieure de ce projet, il serait intéressant d'obtenir des CMLBH de patients

asthmatiques afin d'étudier l'expression du récepteur CD44 et de ses variants, et la réponse de ces cellules suite à une stimulation par la MMP-9.

La découverte de ces nouveaux mécanismes pour MMP-9 et le récepteur CD44 chez les CMLBH nous ont amené à penser que son inhibiteur endogène spécifique TIMP-1 pourrait aussi être un ligand d'un (ou plusieurs) récepteur. Une revue de la littérature nous a permis d'apprendre que TIMP-1 est un ligand du récepteur de la famille des tetraspanins, appelé CD63, impliqué dans la survie cellulaire ¹⁰⁹. Nos analyses préliminaires de cytométrie en flux ont montré que les CMLBH expriment le récepteur CD63, et que l'expression de ce récepteur, à l'opposé du récepteur CD44, augmente en fonction de la confluence cellulaire (résultats non montrés). Bien que nous n'ayons pas encore déterminé si TIMP-1 est un ligand du récepteur CD63 chez les CMLBH et le rôle du complexe TIMP-1/CD63 dans la régulation de la fonction des CMLBH, il est possible que ce complexe soit un antagoniste physiologique de la fonction du complexe MMP-9/CD44.

Section 6. Conclusion

Ce projet de recherche a mené à la découverte d'un nouveau complexe ligand/récepteur impliqué dans la régulation de la fonction des CMLBH. La modulation de l'activité de ce complexe pourrait être utilisée dans un traitement afin de résoudre une partie du remodelage des voies respiratoires observé dans l'asthme. Toutefois, la littérature concernant le rôle de ces protéines dans l'asthme étant contradictoire, il est important de se montrer prudent dans le développement d'un traitement expérimental. Des études comme la nôtre montre que les pièces du grand puzzle de la physiopathologie de l'asthme commencent à s'assembler, en espérant que ce syndrome respiratoire sera un jour compris dans son intégralité afin de trouver un traitement permettant une guérison des sujets asthmatiques.

Section 7. Références

1. Rosner, F. Moses Maimonides' treatise on asthma. *Thorax* **36**, 245-251 (1981).
2. Opolski, M. & Wilson, I. Asthma and depression: a pragmatic review of the literature and recommendations for future research. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* **1**, 18 (2005).
3. Townley, R.G. Interleukin 13 and the beta-adrenergic blockade theory of asthma revisited 40 years later. *Ann Allergy Asthma Immunol* **99**, 215-224 (2007).
4. Choudhry, S., *et al.* Dissecting complex diseases in complex populations: asthma in latino americans. *Proceedings of the American Thoracic Society* **4**, 226-233 (2007).
5. Strachan, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed)* **299**, 1259-1260 (1989).
6. Wu, K., Bi, Y., Sun, K. & Wang, C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cellular & molecular immunology* **4**, 269-275 (2007).
7. Wilson, M.S., *et al.* IL-13 α 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2941-2951 (2007).
8. Gold, D.R. & Wright, R. Population disparities in asthma. *Annual review of public health* **26**, 89-113 (2005).
9. Gauderman, W.J., *et al.* The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *The New England journal of medicine* **351**, 1057-1067 (2004).
10. Ober, C. & Hoffjan, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and immunity* **7**, 95-100 (2006).
11. Martinez, F.D. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proceedings of the American Thoracic Society* **4**, 221-225 (2007).
12. Emond, S.D., Camargo, C.A., Jr. & Nowak, R.M. 1997 National Asthma Education and Prevention Program guidelines: a practical summary for emergency physicians. *Annals of emergency medicine* **31**, 579-589 (1998).
13. Gern, J.E. & Busse, W.W. The role of viral infections in the natural history of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **106**, 201-212 (2000).
14. Gauvreau, G.M. & Evans, M.Y. Allergen inhalation challenge: a human model of asthma exacerbation. *Contributions to microbiology* **14**, 21-32 (2007).
15. Smith, N. & Johnson, F.J. Early- and late-phase bronchoconstriction, airway hyper-reactivity and cell influx into the lungs, after 5'-adenosine monophosphate inhalation: comparison with ovalbumin. *Clin Exp Allergy* **35**, 522-530 (2005).
16. Bloemen, K., *et al.* The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology letters* **113**, 6-18 (2007).
17. Busse, W.W. & Lemanske, R.F., Jr. Asthma. *The New England journal of medicine* **344**, 350-362 (2001).
18. Haagerup, A., *et al.* Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* **57**, 680-686 (2002).

19. Malo, J.L. & Chan-Yeung, M. Occupational asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **108**, 317-328 (2001).
20. Malo, J.L., Lemiere, C., Gautrin, D. & Labrecque, M. Occupational asthma. *Current opinion in pulmonary medicine* **10**, 57-61 (2004).
21. Malo, J.L., *et al.* Natural history of occupational asthma: relevance of type of agent and other factors in the rate of development of symptoms in affected subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* **90**, 937-944 (1992).
22. Malo, J.L., Ghezzi, H. & Elie, R. Occupational asthma caused by isocyanates: patterns of asthmatic reactions to increasing day-to-day doses. *American journal of respiratory and critical care medicine* **159**, 1879-1883 (1999).
23. Boulet, L.P., *et al.* [Update on inhalation therapy in asthma and obstructive bronchopulmonary diseases]. *L'union medicale du Canada* **123**, 23-31 (1994).
24. Boulet, L.P., *et al.* Smoking and asthma: clinical and radiologic features, lung function, and airway inflammation. *Chest* **129**, 661-668 (2006).
25. Tang, M.L., Wilson, J.W., Stewart, A.G. & Royce, S.G. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacology & therapeutics* **112**, 474-488 (2006).
26. Elias, J.A., Zhu, Z., Chupp, G. & Homer, R.J. Airway remodeling in asthma. *The Journal of clinical investigation* **104**, 1001-1006 (1999).
27. Atkinson, J.J. & Senior, R.M. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **28**, 12-24 (2003).
28. Benayoun, L., Druilhe, A., Dombret, M.C., Aubier, M. & Pretolani, M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**, 1360-1368 (2003).
29. Bentley, J.K. & Hershenson, M.B. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 89-96 (2008).
30. Hirst, S.J. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* **9**, 808-820 (1996).
31. Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T. & Motomiya, M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *The American review of respiratory disease* **148**, 720-726 (1993).
32. Johnson, P.R., *et al.* Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**, 474-477 (2001).
33. Thomson, R.J., Bramley, A.M. & Schellenberg, R.R. Airway muscle stereology: implications for increased shortening in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **154**, 749-757 (1996).
34. James, A. Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have? *Clin Exp Allergy* **35**, 703-707 (2005).
35. Johnson, P.R., Black, J.L., Carlin, S., Ge, Q. & Underwood, P.A. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-

- muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *American journal of respiratory and critical care medicine* **162**, 2145-2151 (2000).
36. Tran, T. & Halayko, A.J. Extracellular matrix and airway smooth muscle interactions: a target for modulating airway wall remodelling and hyperresponsiveness? *Canadian journal of physiology and pharmacology* **85**, 666-671 (2007).
 37. Shore, S.A. Airway smooth muscle in asthma--not just more of the same. *The New England journal of medicine* **351**, 531-532 (2004).
 38. Tamm, M. & Roth, M. Defects of airway smooth muscle cell function are important in asthma. *Swiss Med Wkly* **135**, 607-613 (2005).
 39. Borger, P., Tamm, M., Black, J.L. & Roth, M. Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell? *American journal of respiratory and critical care medicine* **174**, 367-372 (2006).
 40. Oliver, B.G. & Black, J.L. Airway smooth muscle and asthma. *Allergol Int* **55**, 215-223 (2006).
 41. Munakata, M. Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int* **55**, 235-243 (2006).
 42. Howarth, P.H., *et al.* Synthetic responses in airway smooth muscle. *The Journal of allergy and clinical immunology* **114**, S32-50 (2004).
 43. Hirst, S.J., Twort, C.H. & Lee, T.H. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **23**, 335-344 (2000).
 44. Halayko, A.J., Salari, H., Ma, X. & Stephens, N.L. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *The American journal of physiology* **270**, L1040-1051 (1996).
 45. van der Loop, F.T., Schaart, G., Timmer, E.D., Ramaekers, F.C. & van Eys, G.J. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *The Journal of cell biology* **134**, 401-411 (1996).
 46. van Eys, G.J., *et al.* Smoothelin expression characteristics: development of a smooth muscle cell in vitro system and identification of a vascular variant. *Cell structure and function* **22**, 65-72 (1997).
 47. Ma, X., Wang, Y. & Stephens, N.L. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *The American journal of physiology* **274**, C1206-1214 (1998).
 48. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* **92**, 827-839 (2003).
 49. Van den Steen, P.E., *et al.* Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **37**, 375-536 (2002).
 50. Rosenberg, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* **39**, 279-291 (2002).
 51. Yu, M., Sato, H., Seiki, M., Spiegel, S. & Thompson, E.W. Calcium influx inhibits MT1-MMP processing and blocks MMP-2 activation. *FEBS letters* **412**, 568-572 (1997).

52. Peracchia, F., Tamburro, A., Prontera, C., Mariani, B. & Rotilio, D. cAMP involvement in the expression of MMP-2 and MT-MMP1 metalloproteinases in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**, 3185-3190 (1997).
53. Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. & Thorgeirsson, U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology* **74**, 111-122 (1997).
54. Goldberg, G.I., Strongin, A., Collier, I.E., Genrich, L.T. & Marmer, B.L. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *The Journal of biological chemistry* **267**, 4583-4591 (1992).
55. Murphy, G., *et al.* The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* **30**, 8097-8102 (1991).
56. Boulay, M.E., Prince, P., Deschesnes, F., Chakir, J. & Boulet, L.P. Metalloproteinase-9 in induced sputum correlates with the severity of the late allergen-induced asthmatic response. *Respiration; international review of thoracic diseases* **71**, 216-224 (2004).
57. Cataldo, D.D., *et al.* Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. *Chest* **122**, 1553-1559 (2002).
58. Tanaka, H., *et al.* Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **105**, 900-905 (2000).
59. Bosse, M., *et al.* Serum matrix metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **159**, 596-602 (1999).
60. Vignola, A.M., *et al.* Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **158**, 1945-1950 (1998).
61. Johnson, S. & Knox, A. Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *The American journal of physiology* **277**, L1109-1117 (1999).
62. Foda, H.D., *et al.* Regulation of gelatinases in human airway smooth muscle cells: mechanism of progelatinase A activation. *The American journal of physiology* **277**, L174-182 (1999).
63. Elshaw, S.R., *et al.* Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* **142**, 1318-1324 (2004).
64. Lim, D.H., *et al.* Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *American journal of physiology* **291**, L265-271 (2006).

65. McMillan, S.J., *et al.* Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in enhanced allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* **172**, 2586-2594 (2004).
66. Haynes, B.F., Telen, M.J., Hale, L.P. & Denning, S.M. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology today* **10**, 423-428 (1989).
67. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews* **4**, 33-45 (2003).
68. Kuncova, J., Kostrouch, Z., Viale, M., Revoltella, R. & Mandys, V. Expression of CD44v6 correlates with cell proliferation and cellular atypia in urothelial carcinoma cell lines 5637 and HT1197. *Folia biologica* **51**, 3-11 (2005).
69. Mackay, C.R., *et al.* Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *The Journal of cell biology* **124**, 71-82 (1994).
70. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**, 1303-1313 (1990).
71. Laurent, T.C. & Fraser, J.R. Hyaluronan. *Faseb J* **6**, 2397-2404 (1992).
72. Orian-Rousseau, V. [CD44 involvement as a regulator of cell proliferation]. *Med Sci (Paris)* **19**, 405-407 (2003).
73. Yu, Q. & Stamenkovic, I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & development* **13**, 35-48 (1999).
74. Abecassis, I., Olofsson, B., Schmid, M., Zalzman, G. & Karniguian, A. RhoA induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Experimental cell research* **291**, 363-376 (2003).
75. Lazaar, A.L., *et al.* T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *The Journal of experimental medicine* **180**, 807-816 (1994).
76. Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. & Arpin, M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *The Journal of cell biology* **120**, 129-139 (1993).
77. Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J. & Kawai, A. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *The Journal of cell biology* **126**, 391-401 (1994).
78. Ohkawara, Y., *et al.* Activation and transforming growth factor-beta production in eosinophils by hyaluronan. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **23**, 444-451 (2000).
79. Rothenberg, M.E. CD44--a sticky target for asthma. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1460-1462 (2003).
80. Katoh, S., *et al.* A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1563-1570 (2003).
81. Teder, P., *et al.* Resolution of lung inflammation by CD44. *Science (New York, N.Y)* **296**, 155-158 (2002).

82. Murray, D., Morrin, M. & McDonnell, S. Increased invasion and expression of MMP-9 in human colorectal cell lines by a CD44-dependent mechanism. *Anticancer research* **24**, 489-494 (2004).
83. Thanakit, V., Sampatanukul, P., Ruangvejvorachai, P. & Keelawat, S. The association of co-expression of CD44v4/MMP-9 with different nodal status in high-grade breast carcinoma patients. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* **88 Suppl 4**, S30-35 (2005).
84. Peng, S.T., Su, C.H., Kuo, C.C., Shaw, C.F. & Wang, H.S. CD44 crosslinking-mediated matrix metalloproteinase-9 relocation in breast tumor cells leads to enhanced metastasis. *International journal of oncology* **31**, 1119-1126 (2007).
85. Samanna, V., Ma, T., Mak, T.W., Rogers, M. & Chellaiah, M.A. Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function. *Journal of cellular physiology* **213**, 710-720 (2007).
86. Maghni, K., *et al.* Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **28**, 103-110 (2003).
87. Halayko, A.J., Tran, T. & Gosens, R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 80-88 (2008).
88. Marom, B., *et al.* Native and fragmented fibronectin oppositely modulate monocyte secretion of MMP-9. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1466-1476 (2007).
89. Zhao, Z., Fleming, R., McCloud, B. & Klempner, M.S. CD14 mediates cross talk between mononuclear cells and fibroblasts for upregulation of matrix metalloproteinase 9 by *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* **75**, 3062-3069 (2007).
90. Risinger, G.M., Jr., Hunt, T.S., Updike, D.L., Bullen, E.C. & Howard, E.W. Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *The Journal of biological chemistry* **281**, 25915-25925 (2006).
91. Shore, S. Airway smooth muscle: new tricks for an old dog. *American journal of physiology* **282**, L518-519 (2002).
92. Hirst, S.J. Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma. *Respiratory physiology & neurobiology* **137**, 309-326 (2003).
93. Martin, J.G. & Jo, T. Genetic differences in airway smooth muscle function. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 73-79 (2008).
94. Lazaar, A.L. & Panettieri, R.A., Jr. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **116**, 488-495; quiz 496 (2005).
95. Marhaba, R., Bourouba, M. & Zoller, M. CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases. *Cellular signalling* **17**, 961-973 (2005).

96. Wobus, M., *et al.* CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **10**, 34-39 (2002).
97. Lesley, J., English, N., Charles, C. & Hyman, R. The role of the CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in constitutive and inducible hyaluronan binding. *European journal of immunology* **30**, 245-253 (2000).
98. Knudson, W., Chow, G. & Knudson, C.B. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* **21**, 15-23 (2002).
99. Renauld, J.C. New insights into the role of cytokines in asthma. *Journal of clinical pathology* **54**, 577-589 (2001).
100. Polverini, P.J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of dental education* **66**, 962-975 (2002).
101. Spessotto, P., *et al.* Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *The Journal of cell biology* **158**, 1133-1144 (2002).
102. Morrison, H., *et al.* The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes & development* **15**, 968-980 (2001).
103. Morrison, H., *et al.* Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of Ras and Rac. *Cancer research* **67**, 520-527 (2007).
104. Curto, M. & McClatchey, A.I. Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact. *British journal of cancer* **98**, 256-262 (2008).
105. Okada, T., You, L. & Giancotti, F.G. Shedding light on Merlin's wizardry. *Trends in cell biology* **17**, 222-229 (2007).
106. Jung, J.R., *et al.* The Phosphorylation status of merlin is important for regulating the Ras-ERK pathway. *Molecules and cells* **20**, 196-200 (2005).
107. Orian-Rousseau, V., *et al.* Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Molecular biology of the cell* **18**, 76-83 (2007).
108. Gautreau, A., Louvard, D. & Arpin, M. Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* **150**, 193-203 (2000).
109. Jung, K.K., Liu, X.W., Chirco, R., Fridman, R. & Kim, H.R. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO journal* **25**, 3934-3942 (2006).