



HAL
open science

Modélisation de l'asthme sévère par la technologie des cellules humaines souches pluripotentes induites (hiPSC)

Engi Ahmed, Said Assou, Florent Foisset, Carine Bourdais, Manon Vanheerswynghels, Aurélie Petit, Anne Sophie Gamez, D. Gras, P. Chanez, John de Vos, et al.

► To cite this version:

Engi Ahmed, Said Assou, Florent Foisset, Carine Bourdais, Manon Vanheerswynghels, et al.. Modélisation de l'asthme sévère par la technologie des cellules humaines souches pluripotentes induites (hiPSC). *Revue des Maladies Respiratoires*, 2024, 41 (4), pp.289-293. 10.1183/13993003.congress-2024.PA2669 . hal-04784466

HAL Id: hal-04784466

<https://hal.science/hal-04784466v1>

Submitted on 19 Dec 2024

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

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

[Modeling T2 high severe asthma using human induced pluripotent stem cells (hiPSC)]

E Ahmed ¹, S Assou ², F Foisset ², C Bourdais ², M Vanheerswynghels ³, A Petit ⁴, A S Gamez ⁴, D Gras ⁵, P Chanez ⁵, J de Vos ², H Hammad ³, A Bourdin ⁶, B Lambrecht ⁷

¹ Laboratoire d'immunologie muqueuse, centre VIB-UGent pour la recherche sur l'inflammation, université de Gand, 9000 Gand, Belgique; Département de maladies respiratoires, université de Montpellier, CHU de Montpellier, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France.

² IRMB, Université de Montpellier, INSERM, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

³ Laboratoire d'immunologie muqueuse, centre VIB-UGent pour la recherche sur l'inflammation, université de Gand, 9000 Gand, Belgique.

⁴ Département de maladies respiratoires, université de Montpellier, CHU de Montpellier, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France.

⁵ Aix-Marseille université, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France.

⁶ Département de maladies respiratoires, université de Montpellier, CHU de Montpellier, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France; PhyMedExp, université de Montpellier, INSERM, CHU de Montpellier, Montpellier, France. Electronic address: a-bourdin@chu-montpellier.fr.

⁷ Laboratoire d'immunologie muqueuse, centre VIB-UGent pour la recherche sur l'inflammation, université de Gand, 9000 Gand, Belgique; Département de médecine interne et pédiatrie, université de Gand, Gand, Belgique.

Keywords:

Asthme sévère; Bouchon muqueux; Eosinophil; Eosinophile; Epithelium; Epithélium; Galectin-10 crystals; Galectine 10; Mucus plugs; Severe asthma.

Abstract

Severe asthma patients with persistent airflow obstruction are characterized by functional obstruction due to mucus plugs containing mucins, fibrin, and eosinophil derived Charcot-Leyden crystals. The molecular mechanisms underlying this endotype are not clearly understood. Developing new models is crucial to respiratory research insofar as critical differences exist between human and rodent airway epithelium. We (and other teams) have shown that it is possible to reconstitute in vitro a complex and functional airway epithelium displaying all the features described in vivo from human-induced pluripotent stem cells (hiPSC). Our aim is to establish a human in vitro model of severe asthma that will recapitulate airway epithelium remodeling and mucus plugs.

L'endotype d'asthme avec obstruction fonctionnelle persistante & les bouchons de mucus

L'asthme est une maladie chronique se caractérisant par une inflammation des voies aériennes [1,2]. L'asthme est sévère lorsqu'il n'est pas contrôlé malgré la prise de traitements inhalés à dose maximale, et une prise en charge optimale des comorbidités et des autres facteurs aggravants de l'asthme. Cette forme d'asthme ne concerne qu'environ 5 % à 10 % des asthmatiques [3]. L'asthme est une pathologie hétérogène caractérisée par de multiples phénotypes liés à des mécanismes physiopathologiques différents appelés endo-types [4]. L'inflammation présente dans les voies aériennes est dite de type T2 chez 60 à 80 % des patients [5]. Cette dernière se caractérise par la présence d'éosinophiles, de lymphocytes T de type T2 et de cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2). Par ailleurs, il a été décrit un phénotype de patients asthmatiques sévères se caractérisant par un trouble ventilatoire obstructif dit persistant « ou obstruction fonctionnelle persistante » [6,7]. Ces patients ont un taux d'éosinophiles sanguins plus élevé que les patients sans obstruction fonctionnelle persistante [8] et présentent un taux annuel d'exacerbations significativement plus élevé [9]. Historiquement, l'obstruction des voies aériennes distales par le mucus a été décrite pour l'asthme aigu grave dans le cadre de séries autopsiques [10]. Cette obstruction fonctionnelle est majoritairement liée à une obstruction des voies aériennes distales par des bouchons de mucus (mucusplugs) contenant des mucines, mais également de la fibrine, de l'ADN et des cristaux de Charcot-Leyden (CLC) dérivés des éosinophiles. Ces bouchons de mucus persistent dans le temps et sont retrouvés dans les mêmes bronches sous segmentaires au scanner thoracique lors de suivi réalisé sur des périodes de 3 ans chez des patients asthmatiques sévères [7]. Sous certaines conditions, les éosinophiles vont être activés de façon spécifique et former des structures appelées « eosinophil extracellular traps » [EET] [11]. Les EET sont composés d'un réseau de fibres d'ADN et de protéines de granules d'éosinophiles, telles que la protéine basique majeure (MBP) et la protéine cationique d'éosinophiles (ECP) mais également de CLC. Ces derniers sont constitués d'une protéine dénommée galectine-10 (Gal-10). De façon intéressante, nous avons récemment confirmé la présence d'éosinophiles et de leurs cristaux de CLC marqués par un anticorps anti Gal-10 au sein des bouchons de mucus dans pratiquement tous les cas d'une série autopsique de patients décédés d'asthme sévère. Ces éosinophiles Gal-10 positifs étaient principalement observés autour des voies aériennes contenant des bouchons, alors que les voies aériennes non-obstruées ne présentaient pas d'accumulation de ces éosinophiles. Les travaux réalisés chez la souris dans un modèle humanisé d'asthme ont démontré que l'injection intratrachéale de cristaux de galectine-10 était capable d'induire la présence de bouchons de mucus au sein de certaines voies aériennes des souris, une inflammation de type T2, la synthèse d'immunoglobulines E (IgE) et une hyperréactivité bronchique [12].

Les biothérapies ont révolutionnées la prise en charge de l'asthme sévère et semblent avoir des résultats prometteurs par rapport aux bouchons de mucus. La compréhension des mécanismes biologiques responsable de ces bouchons de mucus est donc primordiale en vue du développement de nouvelles thérapeutiques.

Mise au point d'un modèle d'asthme sévère de type T2 par les cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSC)

Si les modèles animaux de maladies respiratoires chroniques ont largement contribué à notre connaissance de la biologie dans ce domaine, la transposition des résultats chez l'Homme et le développement de cibles thérapeutiques reste limités. Les cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSC) représentent une alternative et un outil complémentaire dans la modélisation des bronchopathies chroniques, notamment dans l'asthme sévère. Les hiPSC sont obtenues à partir de cellules somatiques (dans notre cas, à partir de cellules mononucléées du sang périphérique) par reprogrammation. La reprogrammation cellulaire est obtenue par l'expression forcée et transitoire de quatre facteurs de transcription embryonnaires (OCT4, SOX2, KLF4 etc-MYC) qui permettent de réactiver des gènes et les signaux embryonnaires de dédifférenciation et de prolifération, caractéristiques d'une cellule souche pluripotente [13]. À l'instar des cellules souches embryonnaires, les hiPSC sont caractérisées par une capacité d'auto-renouvellement, de prolifération, et de différenciation vers tout type cellulaire, notamment dans notre étude, nous permettant de produire de façon illimitée de l'épithélium bronchique.

La modélisation de l'épithélium bronchique à partir d'hiPSC est un modèle d'étude novateur et prometteur des maladies chroniques des voies aériennes. En effet, les hiPSC ont le potentiel de modéliser les mécanismes du développement pulmonaire, ce qui permet de mieux comprendre les voies de différenciation des cellules souches vers les tissus entièrement différenciés. En outre, elles permettent d'étudier les mécanismes d'apparition de la maladie, et de modéliser la trajectoire de chaque patient. Un gène d'intérêt dans une maladie (variants retrouvés de façon récurrente dans une étude d'association pangénomique par exemple) pourra également être manipulé génétiquement afin d'être invalidé ou sur exprimé afin d'en étudier les effets spécifiques [14]. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que les changements épigénétiques en lien avec la pathologie (l'environnement inflammatoire T2 dans l'asthme par exemple) seront probablement effacés au cours du processus de reprogrammation, ce qui entraîne la perte de ces marqueurs en tant que phénotype de la maladie. Les hiPSC constituent donc un système de modélisation pour étudier les effets de l'exposition environnementale sur le système respiratoire et révéler d'importantes interactions gène-environnement notamment

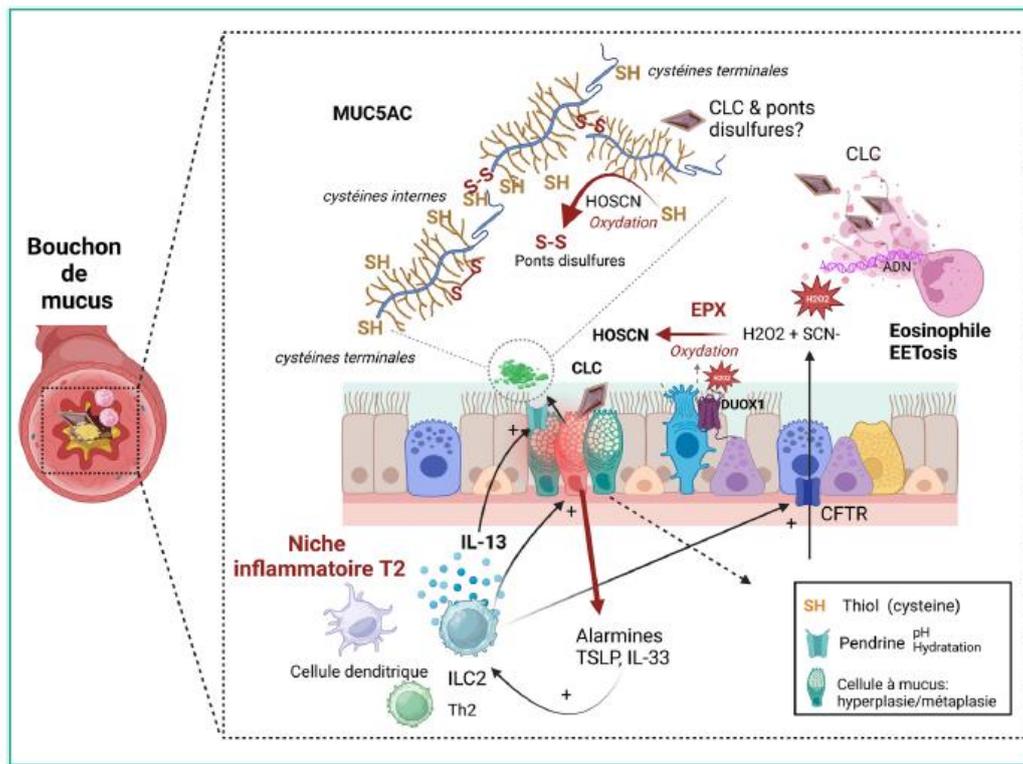
lors de la présence de polymorphismes génétiques singuliers [15]. Ainsi, les hiPSC et les techniques d'édition du génome pourraient jouer un rôle essentiel dans l'élucidation des mécanismes d'interaction entre les gènes et l'environnement et dans la compréhension de la variabilité individuelle de la susceptibilité aux effets de l'environnement.

Hypothèse de travail, méthodes et données préliminaires

Notre hypothèse de travail est que l'obstruction persistante des voies respiratoires dans l'asthme est causée par une réponse immunitaire de type 2 anormale, chronique mais très localisée autour des voies respiratoires obstruées par les bouchons de mucus, qui peut être considérée comme une « niche de type 2 » (Fig. 1). Les bouchons de mucus tenaces contenant des mucines, de la fibrine, des cellules mortes, de l'ADN et des cristaux de type CLC créeraient ainsi une niche favorable aux cellules immunitaires qui perpétueraient la maladie et constitueraient un facteur de risque d'exacerbation.

Figure 1. Il existe une « niche » inflammatoire de type 2 au sein des voies aériennes des patients asthmatiques favorisant la persistance des bouchons de mucus. Le mucus des asthmatiques est riche en mucine de type MUC5AC, produite par les cellules à mucus des voies aériennes, en partie sous l'influence de l'interleukine IL-13. La polymérisation et la réticulation des mucines, en particulier la mucine MUC5AC conduit à un gel très élastique et visqueux, intimement et solidement attaché aux voies respiratoires. Plusieurs paramètres au sein de la voie aérienne peuvent influencer les propriétés viscoélastiques du mucus. Les transports ioniques et par conséquent l'état d'hydratation et le pH du mucus et du liquide de surface péri-ciliaire modifie l'osmolarité et la réticulation de ces derniers. La pendrine est un transporteur d'anions présent au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. Elle contrôle le niveau d'hydratation et l'équilibre acido-basique via la sécrétion de HCO_3^- et la réabsorption de NaCl . La pendrine est un gène dont l'expression génique est la plus induite par l'IL-13. La concentration de mucines modifie également la polymérisation du mucus. L'IL-13 augmente l'expression à l'échelle de l'ARN et de la protéine de MUC5AC, majorant la viscoélasticité du mucus. La structure des mucines peut être modifiée, favorisant la polymérisation entre les mucines elles-mêmes, notamment via l'oxydation de MUC5AC. L'oxydation peut survenir sous l'affluence des éosinophiles et des neutrophiles, produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les voies aériennes de patients asthmatiques. L'épithélium bronchique peut également produire de l' H_2O_2 via la NADPH oxydase DUOX1 (dual oxydase 1), surexprimée dans l'asthme. Le thiocyanate SCN^- pénètre dans la cellule épithéliale par l'intermédiaire de transporteurs tels que le CFTR situés à la membrane basolatérale et atteint la lumière bronchique. L'IL-13 favorise le transport transmembranaire du SCN^- . Une fois dans la lumière bronchique, le SCN^- est oxydé par le H_2O_2 et forme l'hypothiocyanite (HOSCN), une réaction catalysée par l'EPX (eosinophil peroxydase). Le HOSCN va alors cibler les groupes cystéine-thiol des mucines et provoquer la formation de ponts disulfures covalents entre les mucines, favorisant leur polymérisation. La cystéine est un acide aminé présent dans la structure des mucines qui se caractérisent par la présence d'un groupe sulfhydryle—SH formant un thiol. Son oxydation conduit à la cystine, qui consiste en deux molécules de cystéine unies par un pont disulfure. Par ailleurs, les éosinophiles peuvent également subir une forme d'activation conduisant à la formation d'« eosinophilic extracellular traps » appelé EETosis. Les éosinophiles relarguent alors leur contenu dans le milieu extra-cellulaire, notamment les granules, de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, la galectine-10, qui formera les cristaux de Charcot-Leyden (CLC). Les CLC sont fréquemment retrouvés dans les bouchons de mucus, en contact étroit avec les cellules épithéliales bronchiques. Notre hypothèse est que les CLC peuvent créer des lésions épithéliales, affecter l'intégrité de la barrière épithéliale, induisant probablement la production d'alarmines par les cellules épithéliales telles que le TSLP, l'IL-33. L'activation des cellules épithéliales va également favoriser le recrutement de cellules inflammatoires de type 2 (éosinophiles, cellules dendritiques, ILC2). Cette « niche » dans laquelle les bouchons de mucus contenant les cristaux agissent comme un stimulus pour le recrutement et l'activation de

l'épithélium, mais également d'autres cellules inflammatoires, ce qui contribue ensuite à la production de mucus.
Figure créée avec Biorender.



L'objectif de ce travail est de comprendre les effets biologiques des cristaux de galectine-10 sur l'épithélium bronchique reconstitué *in vitro* et dérivé à partir de patients asthmatiques sévères, notamment sur la production de mucus et l'hyperplasie ou métaplasie de cellules à mucus. Il est important de souligner que seule l'espèce humaine exprime dans son génome le gène codant pour la protéine de la galectine-10, ce qui rend une modélisation avec des échantillons humains indispensable afin d'en comprendre les effets biologiques. Pour cela, nous avons dérivés trois lignées hiPSC à partir de patients asthmatiques sévères (étude MOSAIC [*Modeling Bronchial Epithelium in Severe Asthma With Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)*], NCT05616338, Promoteur CHU de Montpellier) et deux sujets témoins sains ont été inclus. Nous avons également produit des cristaux de la protéine Gal-10 recombinante, biochimiquement et structurellement biosimilaires aux CLC extraits d'échantillons cliniques. Ces derniers ont la capacité d'activer les cellules dendritiques, d'agir comme adjuvants pour l'amorçage d'une réponse inflammatoire polarisée T2 et de promouvoir l'inflammation des voies respiratoires et de stimuler la production de MUC5AC [12].

Les épithélia seront exposés aux cristaux de galectine-10 et différents paramètres seront étudiés : production de mucines MUC5AC et MUC5B dans les surnageants de culture, quantification du nombre de cellules à mucus, étude des propriétés physiques du mucus dérivé des cultures (rhéologie), production d'alarmins par les cellules épithéliales (interleukine 33 (IL-33), Thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-5, Granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor (GM-CSF) etc.), intégrité et perméabilité de la barrière épithéliale par la mesure de la résistance transépithéliale (TEER), caractérisation des sous types cellulaires afin d'étudier un effet des CLC sur la différenciation de l'épithélium bronchique. Une analyse transcriptomique à l'échelle d'une cellule (single cell RNAseq) sera réalisée dans les différentes conditions (épithélium exposé/nonexposé sujets sains vs sujet asthmatiques sévères) afin de rechercher une signature spécifique dans les épithélia bronchiques induite par les cristaux de Gal-10.

L'ensemble des lignées hiPSC ont été générées et caractérisées. Nous avons différencié les hiPSC issus de patients asthmatiques sévères en épithélium bronchique d'après un protocole de différenciation mis en place au laboratoire et qui récapitule toutes les étapes du développement pulmonaire [16]. Cet épithélium présente l'ensemble des sous-types cellulaires attendus, à savoir des cellules basales, ciliées, sécrétoires (cellule Club et à mucus) et neuroendocrines. Avant toute stimulation, on ne note pas de différence quant à la production de mucus (n = 1 patient sain, et n = 1 patient asthmatique sévère). En revanche, l'exposition chronique de l'épithélium bronchique à l'IL-13 (pôle basal, 10 ng/ml pendant 7 jours) et aux cristaux de Gal-10 au pôle apical induisent de façon significative la production de MUC5AC par les épithélia de patients asthmatiques en comparaison aux sujets sains, suggérant un effet spécifique des CLC chez les sujets asthmatiques.

Conclusion

Les hiPSC constituent un modèle innovant et prometteur dans la modélisation et la compréhension de l'hétérogénéité des maladies chroniques des voies aériennes chez l'Homme. À long terme, une meilleure compréhension de l'obstruction fonctionnelle persistante dans l'asthme sévère permettra la découverte de nouveaux traitements ciblant spécifiquement les bouchons de mucus des voies aériennes distales, notamment les cristaux de galectine-10.

Déclaration des liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Casanova S, Ahmed E, Bourdin A. Definition, phenotyping of severe asthma, including cluster analysis. *Adv Exp Med Biol* 2023;1426:239—52.
- [2] Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma. *Cell* 2021;184:2521—2.
- [3] Wang E, et al. Characterization of severe asthma worldwide: data from the international severe asthma registry. *Chest* 2020;157:790—804.
- [4] Wu W, et al. Multiview cluster analysis identifies variable corticosteroid response phenotypes in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:1358—67.
- [5] Maison N, et al. T2-high asthma phenotypes across lifespan. *Eur Respir J* 2022;60:2102288.
- [6] Dunican EM, et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J Clin Invest* 2018;128:997—1009.
- [7] Tang M, et al. Mucus plugs persist in asthma, and changes in mucus plugs associate with changes in airflow over time. *Am J Respir Crit Care Med* 2022;205:1036—45.
- [8] Kole TM, et al. Predictors and associations of the persistent airflow limitation phenotype in asthma: a post-hoc analysis of the ATLANTIS study. *Lancet Respir Med* 2023;11:55—64.
- [9] Papi A, et al. Normalisation of airflow limitation in asthma: post-hoc analyses of TRIMARAN and TRIGGER. *Clin Transl Allergy* 2022;12:e12145.
- [10] Dunican EM, Watchorn DC, Fahy JV. Autopsy and imaging studies of mucus in asthma. Lessons learned about disease mechanism and the role of mucus in airflow obstruction. *Ann Am Thorac Soc* 2018;15:S184-S19.
- [11] Fukuchi M, et al. How to detect eosinophil ETosis (EETosis) and extracellular traps. *Allergol Int* 2021;70:19—29.
- [12] Persson EK, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science* 2019;364:eaaw4295.
- [13] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663—76.
- [14] Mianné J, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout and interallelic gene conversion in human induced pluripotent stem cells using non-integrative bacteriophage-chimeric retrovirus-like particles. *BMC Biol* 2022;20:8.
- [15] Chandy M, Obal D, Wu JC. Elucidating effects of environmental exposure using human-induced pluripotent stem cell disease modeling. *EMBO Mol Med* 2022;14:e13260.
- [16] Ahmed E, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells from patients with severe COPD into functional air-way epithelium. *Cells* 2022;11:2422.293

