

Rôle des métalloprotéinases MMP-2 dans l'asthme

Role of metalloproteinases MMP-2 in asthma

Sonia Toujani¹, Nadia Mehiri¹, Kamel Hamzaoui², Hela Hadded², Nozha Ben Salah¹, Meriem Mjid¹, Yacine Ouahchi¹, Bechir Louzir¹, Jalloul Daghfous¹, Jouda Cherif¹, Majed Beji¹

1- Service de pneumologie- Hôpital La Rabta, , unité de recherche 12SP06 / Université de Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis

2-Laboratoire de biologie -Faculté de médecine de Tunis- Université Tunis EL Manar- Unité de recherche 99/UR/0840 : Expression moléculaire des interactions cellulaires et leurs modes de communications. / Université de Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis

R É S U M É

Introduction : De nombreuses métalloprotéinases (MMPs) joueraient un rôle crucial dans la pathogénie et la modulation de la sévérité de la maladie asthmatique. La plus connue est la MMP-9 mais d'autres MMPs sont impliquées dont la MMP-2.

But : Déterminer le rôle du polymorphisme nucléotidique du gène codant pour MMP-2 dans la susceptibilité à la maladie asthmatique et sa sévérité.

Méthodes : Il s'agit d'une étude de type cas-témoins ayant inclus prospectivement 150 patients asthmatiques et 120 sujets sains. Nous avons déterminé au sein des 2 groupes les génotypes correspondant au polymorphisme MMP2 en position -735C/T à l'aide d'une amplification en chaîne par polymérase associée à une technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Résultats : La comparaison des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme étudié entre les patients et les contrôles a montré qu'il n'existait pas une association entre le SNP-735C/T et la susceptibilité de la maladie asthmatique et sa sévérité.

Conclusion : Le rôle des MMP-2 demeure peu clair et aucune étude n'a porté sur le polymorphisme de la région promotrice de la MMP-2 au cours de l'asthme. Cette étude ne permet pas d'infirmer une telle association. D'autres études sont nécessaires pour clarifier leur rôle exact dans la pathogenèse de l'asthme.

M o t s - c l é s

Asthme- métalloprotéinases- inflammation

S U M M A R Y

Background : Many metalloproteinases (MMPs) play a role in the pathogenesis and modulation of the severity of asthma. MMP-9 is the predominant in asthma but other MMPs are involved such as the MMP-2.

Aim: To determine the role of single nucleotide polymorphism of the gene MMP2 in susceptibility to asthma and its severity.

Methods: Study case-control with prospectively enrolled patients with asthma and healthy subjects. We determined within two groups genotypes corresponding to the MMP2 polymorphism in -735C / T position, using a polymerase chain amplification technique associated with a polymorphism in the length of restriction fragments.

Results: We included 150 patients with asthma and 150 healthy controls. Comparison of allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms between patients and controls showed that there was no association between the SNP-735C / T and susceptibility to asthma and its severity.

Conclusion: The role of MMP 2 in asthma remains unclear and no study has been conducted till date, to determine the role of MMP-2 -735C/T gene polymorphism in asthma. This study does not disprove such association. Further studies are needed to clarify the exact role the pathogenesis of asthma.

Key - words

Asthma- metalloproteinases- inflammation

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des bronches dont la prise en charge a bénéficié de progrès considérables (1-6). Toutefois, environ 10% des asthmatiques présentent une dégradation progressive et irréversible de leur fonction respiratoire due à un remodelage des voies aériennes (1). Parmi les éléments concourant au développement du remodelage bronchique, les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs physiologiques joueraient un rôle crucial (2-10). Les métalloprotéinases sont en effet des enzymes qui dégradent les différents composants de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont synthétisées et secrétées par de nombreux types cellulaires et jouent un rôle important dans tous les processus de remaniements tissulaires normaux ou pathologiques (1,4). De nombreuses métalloprotéinases sont incriminées dans la pathogénie de la maladie asthmatique mais aussi dans la modulation de sa sévérité. En effet, au cours de l'asthme, les MMPs sont impliquées dans l'extravasation de cellules inflammatoires à partir des vaisseaux sanguins de l'interstitium. La dégradation de la MEC par les MMPs permet la migration de cellules inflammatoires vers l'épithélium. La libération de taux importants de MMPs peut aboutir à la destruction de tissu sain. Plusieurs MMPs ont un effet sur les chémokines et les cytokines pro-inflammatoires (5). Le rôle des MMPs et des tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMPs) a été étudié dans les formes modérées à sévères de l'asthme durant les exacerbations de l'asthme et après stimulation allergénique (6-11). La plus connue est la MMP-9 mais la MMP-1, MMP-2, MMP-8 et MMP-12 sont de plus en plus impliquées quoique leur rôle exact ne soit pas clair (3,4). La MMP-2 est une métalloprotéase dont l'expression est augmentée dans l'asthme. Elle est produite par les cellules musculaires lisses et stimule la prolifération de ces cellules de façon autocrine. Ceci contribue probablement à une augmentation de la masse musculaire lisse (12). De plus, cette protéase est capable, tout comme la MMP-9, de dégrader la membrane basale. Cette dégradation est suivie d'une réparation altérée entraînant finalement des dépôts de collagènes de types I, III et V et de fibronectine désorganisés. Ce sont vraisemblablement ces cycles de dégradation/réparation qui provoquent la formation de la zone de fibrose sous-épithéliale. Peu d'études ont concerné le rôle des MMP2 dans la pathogénie de l'asthme et les études sont d'autre part contradictoires. Le but de l'étude était de déterminer le rôle du polymorphisme nucléotidique du gène codant pour la MMP-2 dans la susceptibilité à la maladie asthmatique et sa sévérité chez un groupe de patients asthmatiques tunisiens.

MÉTHODES

Il s'agit d'une étude de type cas-témoins ayant inclus prospectivement 150 patients asthmatiques suivis à la

consultation d'asthme du Service de Pneumologie de l'Hôpital La Rabta. Ces patients ont été colligés entre le 2 Janvier et le 30 Juin 2010.

Patients : Ont été inclus les patients suivis dans notre service depuis au moins 1 an, ayant un asthme intermittent ou persistant de léger à sévère, en état stable ou en exacerbation (classification de la sévérité selon GINA 2009) ; âgés de plus 18 de ans après un accord préalable.

Sujets témoins : Le groupe des témoins était composé de 120 sujets sains ne possédant aucun lien de parenté et ne présentant pas de problèmes médicaux. Il s'agit de sujets volontaires se présentant au service de don et de transfusion pour don du sang.

Le recueil des données se rapportant aux patients a été réalisé à l'aide d'un questionnaire comportant les données sociodémographiques, cliniques et para cliniques. A l'issue de ce questionnaire, un prélèvement sanguin a été effectué pour chaque patient à raison de 15 ml par patient et a été mis dans un flacon de 50 ml contenant l'EDTA. Ces prélèvements ont été acheminés au Laboratoire de Biologie à la Faculté de Médecine de Tunis.

Des tests enzymatiques de dosage de la MMP-2 selon la méthode ELISA ont été pratiqués. Les kits utilisés étaient du type (quantikine humain MMP-2). Le lecteur ELISA était de type « ELx800 auto wated microplate reader, biotek instruments (winooski, vt) ». Les tests ont été réalisés selon les recommandations du fabricant. La valeur minimale décelable de la MMP-2 était de 0,156µg /mL. Une étude du polymorphisme mononucléotidique du gène codant pour la MMP-2 à la position -735C/T a été réalisée à l'aide d'une amplification en chaîne par polymérase associée à une technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-FRLP). En effet, pour le gène MMP2, la transition C à T a pour conséquence de perturber les sites de liaison SP1 et par suite diminuer le taux de transcription et l'activité du promoteur.

Etude statistique :

La saisie des données a été faite sur le logiciel Epi INFO6. Pour l'étude sérologique, le test de Mann-Whitney, le test de Student et l'analyse de variance Anova ont été utilisés. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Pour l'étude génétique, l'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS sur Windows version 11,5. Elle a consisté à générer des fréquences et des moyennes, à faire des comparaisons de pourcentage à l'aide du test de Chi 2 et des comparaisons de moyennes à l'aide de l'analyse de variance ANOVA. Le seuil de significativité retenu a été $p < 0,05$.

RÉSULTATS

L'âge moyen des patients asthmatiques était de 42 ans avec des extrêmes de 18 à 73 ans. Soixante-neuf

pourcent des patients étaient de sexe féminin avec un sexe ratio H/F de 0,44. L'âge moyen du début de l'asthme était de 35 ans avec des extrêmes allant de 3 à 68 ans. Vingt-six patients (17,3 %) avaient débuté leur asthme avant l'âge de 20 ans et 33,3% au-delà de 40 ans. L'asthme était classé persistant léger à modéré dans 63,4% des cas et persistant sévère chez 28,6% des malades. Concernant le traitement de fond 27,3% des patients étaient sous association corticoïdes inhalés et $\beta 2$ longue durée d'action, 64,7% étaient sous corticoïdes inhalés.

L'âge moyen des témoins était de 43 ans avec des extrêmes allant de 18 à 72 ans. Le groupe des témoins était composé de 40 hommes (33,3%) et 80 femmes (66,7%) soit un sexe ratio H/F de 0,5. Les deux groupes étaient comparables en termes d'âge et de sexe ratio ($p=0,72$). L'expression de la MMP-2 sérique était significativement augmentée chez les patients asthmatiques avec une moyenne de $1,42 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ comparativement aux témoins sains où la moyenne était de $0,72 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$, ($p < 0,001$) (figure 1).

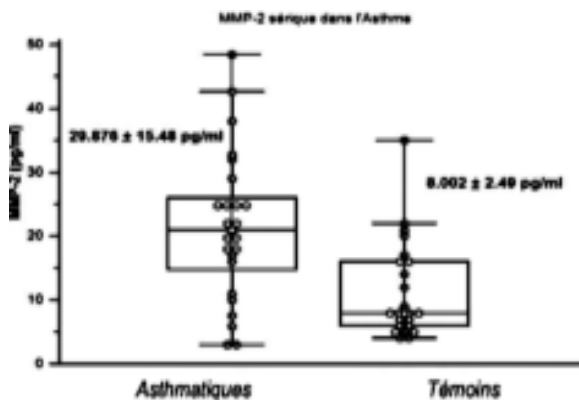


Figure 1 : Taux sérique de la MMP2 chez les asthmatiques et les sujets témoins.

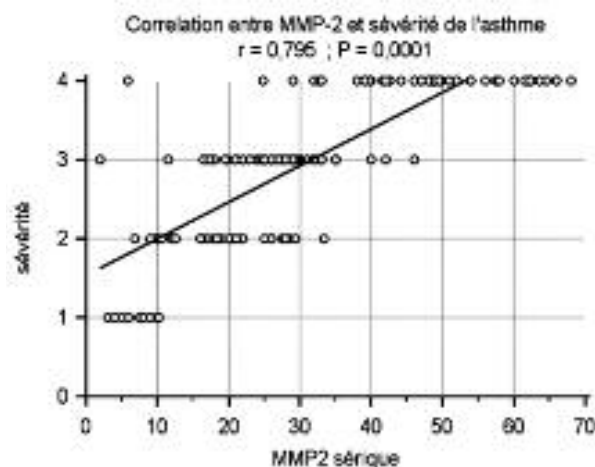


Figure 2: Corrélation entre MMP2 et la sévérité de l'asthme.

Il existait une corrélation entre le taux de la MMP-2 et la sévérité de la maladie ainsi qu'entre le taux de la MMP-2 et la valeur du VEMS ($p=0,0001$) (Figure 2). L'étude génétique a montré que la distribution allélique du SNP-735C/T parmi les asthmatiques et les sujets témoins était comparable ($p=0,48$). La fréquence des génotypes T/T, C/T et C/C était comparable entre le groupe des asthmatiques et celui des témoins (Tableau 1).

Tableau 1: Répartition des allèles et des génotypes selon l'âge de début.

Age du début	Allèles		Génotypes			P
	-735C	-735T	-735C/C	-735C/T	-735T/T	
<20 ans	47	5	21	5		
20-29 ans	53	11	22	9	1	
30-39 ans	63	13	25	13		
40-49 ans	34	6	14	6		0,65
50-59 ans	45	7	20	5	1	
>60 ans	12	4	4	4		
Total	254	46	106	42	2	
Pourcentage	84,7	15,3	70,7	28	1,3	

L'âge du début de la maladie n'était pas influencé par les types alléliques du SNP du gène codant pour la MMP-2 à la position -735 (tableau II).

Les types alléliques du SNP du gène codant pour la MMP-2 à la position -735 n'étaient pas influencés par le sexe ; $p=0,18$. La présence du SNP du gène codant pour la MMP-2 à la position -735 n'était pas associée au tabagisme ($p=0,09$). Le tabagisme n'était pas associé à l'un ou l'autre des 2 allèles du gène codant pour la MMP-2 à la position -735. Il n'existait pas d'association entre la sévérité de la maladie et la présence de l'allèle -735C ou de l'allèle-735T ni avec les différents génotypes C/C, C/T et T/T. Il n'existait pas d'association entre le SNP du gène codant pour la MMP-2 à la position -735 et le traitement anti asthmatique (tableau III).

DISCUSSION

Dans notre étude dans un premier temps, nous avons trouvé que l'expression de la MMP-2 sérique était significativement augmentée chez les patients asthmatiques avec une moyenne de $1,42 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ comparativement aux témoins sains où la moyenne était de $0,72 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$, ($p < 0,001$). De plus, il existait une corrélation entre le taux de la MMP-2 et la sévérité de la maladie ainsi qu'entre le taux de la MMP-2 et la valeur du VEMS ($P=0,0001$). Corry et col (12) ont étudié le rôle des MMP2 chez les souris MMP2 Knock out après exposition allergénique. Ils ont constaté que l'absence de MMP-2 après exposition allergénique est à l'origine d'une augmentation de l'expression de plusieurs cytokines de profil TH2, une augmentation de l'infiltration cellulaire du parenchyme pulmonaire par des cellules inflammatoires

Tableau 2: Répartition des allèles et des génotypes selon la sévérité de

Sévérité	Nb	Allèles		Génotypes		
		C	T	-735C/C	-735T/T	-735T/T
Intermittent	12	23 (9%)	1 (2%)	11 (10%)	1 (2%)	0 (0%)
Persistant léger	31	54 (21%)	8 (17%)	23 (28%)	8 (19%)	0 (0%)
Persistant modéré	64	107 (42%)	21 (46%)	44 (41,5%)	19 (45%)	1 (50%)
Persistant sévère	43	70 (28%)	16 (35%)	28 (26,5%)	14 (33%)	1 (50%)
		P= 0,65		P=0,28		

Tableau 3: Répartition des génotypes selon le type de traitement

		-735C/C	-735C/T	-735T/T	p
CI	(+)	95	41	2	0,36
	(-)	9	1	0	
BLDA	(+)	29	13	0	0,62
	(-)	75	29	2	
Théophylline	(+)	34	15	2	0,13
	(-)	70	27	0	
AntiH1	(+)	36	14	0	0,59
	(-)	68	28	2	
Corticoïdes	(+)	3	1	0	0,95
	(-)	101	41	2	

et une diminution de l'activité chimotactique de ces cellules dans le LBA. Paradoxalement, ces éléments sont associés à une diminution de ces mêmes cellules inflammatoires dans le LBA intéressant en particulier les éosinophiles. Ces données permettent de conclure que MMP2 établit le gradient chimotactique nécessaire pour la migration des cellules inflammatoires vers les poumons et la prévention de l'asphyxie mortelle. Kumagai (13) en utilisant un modèle murin d'asthme allergique a observé une augmentation de la libération de la MMP-2 dans le LBA après inhalation antigénique avec infiltration lymphocytaire et éosinophile ce qui suggère que les MMP-2 ont un rôle crucial dans l'induction d'une hyperréactivité bronchique. Ce même auteur a démontré que l'administration de TIMP2 aux voies aériennes réduit l'hyperréactivité bronchique induite par l'antigène et augmente le nombre d'éosinophiles et de lymphocytes dans le sang périphérique. Ainsi l'étude sérologique de la MMP-2 chez nos patients concorde avec ces résultats puisque l'expression de la MMP-2 sérique est significativement augmentée chez les patients asthmatiques. D'autres études toutefois rapportent des résultats contradictoires. Culpitt (14) n'a pas trouvé de différence significative dans les concentrations de MMP-2 entre les patients asthmatiques et les sujets sains à l'opposé de MMP8 et MMP9 qui étaient significativement élevées chez les asthmatiques. Cataldo (9) en comparant l'expectoration induite de sujets asthmatiques avec des sujets contrôles a trouvé une augmentation de transcription d'ARNm de MMP1 et de TIMP1 mais il n'y avait pas de différences pour l'expression des

MMP2,3,7,8,9,12,13,14 et TIMP2 (9). Bergeron (12) a par ailleurs montré que l'IL4 joue un rôle dans l'inflammation et la déposition du collagène dans les bronches de sujets asthmatiques en diminuant la transcription de l'ARNm de MMP2 (11). L'influence du polymorphisme de la région promotrice de MMP2 à la position -735C/T a été étudiée dans plusieurs pathologies mais pas au cours de l'asthme. A notre connaissance, il s'agit de la première étude qui s'est intéressée à déterminer le rôle de la SNP de la région promotrice du gène codant pour la MMP2 à la position -735C/T dans la susceptibilité à la maladie asthmatique. Pinto (15), dans une étude récente concernant les enfants asthmatiques allemands âgés de 9 à 11 ans a montré que le SNP rs2664538 augmentait significativement le risque d'asthme non atopique. De plus, l'allèle rs 3918241 peut être associé à une diminution des débits expiratoires chez les enfants non atopiques. Ces résultats peuvent être expliqués par le rôle des MMP-9 dans le remodelage des voies aériennes. Dans notre étude et à l'instar des autres études nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre le SNP du gène codant pour la MMP-2 et la sévérité de la maladie. L'impact du tabagisme sur l'activité des métalloprotéinases a fait l'objet de plusieurs études mais à notre connaissance aucune d'entre elles n'a comparé l'activité des métalloprotéinases entre les asthmatiques tabagiques et les asthmatiques non tabagiques. En ce qui nous concerne, nous n'avons pas trouvé d'association à l'un des 2 allèles du gène codant pour la MMP-2 à la position -735. Vu que les corticoïdes agissent plutôt sur l'inflammation que sur le remodelage bronchique, la

présence de modifications de la structure bronchique chez certains asthmatiques peut expliquer leur réponse clinique limitée aux corticoïdes. Hoshimo (16) a démontré une diminution de la déposition du collagène III, une diminution de l'expression de MMP9 épithélial sous muqueux et une augmentation des taux de TIMP-1 sous muqueux avec une diminution du nombre de cellules inflammatoires et myofibroblastes après 6 mois de traitement avec des corticostéroïdes inhalés. In vitro, les études ont montré que les corticostéroïdes inhibent la transcription des gènes de MMP et des TIMP des macrophages et des fibroblastes (17).

Aucune étude n'a concerné l'influence de la prise de corticoïdes sur l'activité des MMP-2. Notre étude n'a pas retrouvé d'association entre le SNP du gène codant pour la MMP-2 à la position -735 et la prise de corticoïdes.

Aucune association n'a également été retrouvée avec les bêta2 mimétiques, la théophylline et les antihistaminiques.

En conclusion, l'expression de la MMP-2 sérique était significativement augmentée chez les patients asthmatiques comparativement aux témoins sains avec une corrélation entre le taux de la MMP-2 et la sévérité de la maladie. Cependant, il n'y avait pas d'association entre le SNP du gène codant pour la MMP-2 à la position -735 et la maladie asthmatique. Les données de la littérature sont controversées et aucune étude n'a porté sur le polymorphisme de la région promotrice de MMP2 au cours de l'asthme. D'autres études doivent être menées concernant des populations d'asthmatiques plus homogènes pour clarifier leur rôle exact dans la pathogénie de l'asthme.

Références

- 1- Kheradmand F, Corry DB. Discovery of novel markers in allergic lung inflammation through proteomic-based technologies. *Expert Rev Proteomics* 2008;5:9-12.
- 2- Greenlee KJ, Corry DB, Engler DA, Matsunami RK, Tessier P, Cook RG et al. Proteomic identification of in vivo substrates for matrix metalloproteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol* 2006;177:7312-21.
- 3- Boulay M, 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.
- 4- Maud M, Gueders M, Foidart JM, Noel A, Cataldo D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: Potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J of Pharmacology* 2006;533:133-44.
- 5- Demedts IK, Brusselle G, Bracke KR, Vermaelen K, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Respiratory Musculoskeletal* 2005;5:257-63.
- 6- Pegorier S, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Anomalie de synthèse de facteurs impliqués dans le remodelage bronchique dans l'épithélium micro disséqué de patients asthmatiques sévères. *Rev Mal Respir* 2006;5:516.
- 7- Colombat M, Pretolani M. Etude des anomalies du muscle lisse bronchique associées au trouble ventilatoire obstructif fixé dans l'asthme. *Rev Mal Respir* 2004;2:421-40.
- 8- Benayoun L, Pretolani M. Le remodelage bronchique dans l'asthme: mécanismes et enjeux thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2003;19:319-26.
- 9- Cataldo D, Gueders M, Munaut C, Rocks N, Bartsch P, Foidart JM et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases mRNA transcripts in the bronchial secretions of asthmatics. *Lab Invest* 2004;84:418-24.
- 10- Gueders M, Balbin M, Rocks M, Foidart JM, Gosset P, Louis R et al. Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* 2005;175:2589-97.
- 11- Bergeron C, Page N, Joubert P, Barbeau B, Hamid Q, Chakir J. Regulation of procollagen I (alpha 1) by interleukin-4 in human bronchial fibroblasts: a possible role in airway remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1389-97.
- 12- Corry D, Rishi B, Kanellis, Kiss A, Song Lz LZ, Xu Jet al. Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. *Nat. Immunol* 2002;3:347-53.
- 13- Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T et al. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:325.
- 15- Pinto, Depner M, Kloppel N, Illig T, Vogelberg C, Von Mutius E et al. MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in german children. *Respir Res* 2010;11:23.
- 16- Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:356-63.
- 17- Slavin J, Unemori E, Hunt TK, Amento E. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and dexamethasone have direct opposing effects on collagen metabolism in low passage human dermal fibroblasts in vitro. *Growth factors* 1994; 11:205-13.