

## Etude de l'influence des particules diesel sur l'activation des lymphocytes T chez l'asthmatique

Coordinateur : Antoine Magnan - Service de Pneumo-Allergologie - Hôpital Ste Marguerite

### Introduction

La prévalence de l'asthme continue d'augmenter dans les pays industrialisés. Cette maladie se manifeste par l'alternance d'exacerbations et de périodes de contrôle. Dans la grande majorité des cas, un contrôle de longue durée est obtenu sous traitement. Pourtant, une petite proportion d'asthmatiques sévères présente plusieurs exacerbations par an malgré un traitement de fond lourd associant corticoïdes inhalés à forte dose et bronchodilatateurs de longue durée d'action. Les facteurs en cause dans le déclenchement de ces exacerbations sont multiples. Les polluants atmosphériques en font partie et parmi eux les particules diesel ont été incriminées. Les mécanismes par lesquels les particules diesel agissent sur l'inflammation bronchique sont mal connus. Les lymphocytes T sont les cellules responsables de la réaction inflammatoire bronchique à éosinophiles qui caractérise l'asthme. Ces données nous ont conduit à tester l'hypothèse d'une action directe des particules diesel sur les lymphocytes T des sujets asthmatiques sévères, pendant les exacerbations et en dehors de celles-ci.

### Matériel et méthodes

Dans cette étude, nous avons voulu étudier l'impact d'une stimulation par les particules diesel sur l'activation des lymphocytes T du sang *ex vivo*, dans la population d'asthmatiques sévères de la cohorte ISEA (Induced Sputum in Exacerbations of Asthma) comparée à des volontaires sains. Les patients de cette cohorte sont des patients sévères qui, malgré un traitement de fond associant corticoïdes inhalés à forte dose (> 1000 µg/j d'équivalent beclométasone) et bronchodilatateurs de longue durée d'action, présentent plusieurs exacerbations par an nécessitant la mise sous corticoïdes par voie générale. Ils sont suivis tous les mois, de sorte que des prélèvements sont obtenus pendant et en dehors des exacerbations.

Trente deux prélèvements de 27 asthmatiques sévères ont été inclus. Les prélèvements ont été obtenus 13 fois pendant une exacerbation et 19 fois en dehors. Quatorze volontaires sains ont été inclus. Les cellules mononucléées (PBMC) ont été isolées et cultivées en présence de faibles doses de particules diesel. Les particules utilisées sont

les particules de référence du National Institute of Standard and Technology. Leur diamètre est de 120nm et leur surface spécifique de 108m<sup>2</sup>/g. Les conditions de culture optimales ont été déterminées par des courbes dose/réponse et des études de cinétique, sur l'expression de marqueurs membranaires, la production de cytokines et la prolifération cellulaire. Ces conditions ont été jugées optimales à 7 jours de stimulation par 8µg/ml de particules diesel.

L'expression des marqueurs membranaires CD69 et CD25 et la production d'IL-4 et d'IFN-g par les lymphocytes T ont été étudiées en cytométrie de flux. La prolifération des lymphocytes T a été étudiée par l'incorporation du PKH 26, un marqueur fluorescent qui s'intègre dans la membrane cellulaire et dont la décroissance de fluorescence par cellule est proportionnelle au nombre de divisions.

Les comparaisons entre les groupes (volontaires sains, patients en exacerbation, patients en dehors d'une exacerbation) ont été réalisées par une analyse de variance non paramétrique. Les groupes ont été comparés entre eux par des tests de Mann et Whitney. Les variations observées pendant les exacerbations ont été comparées à celles retrouvées en dehors des exacerbations par des tests de Mann et Whitney réalisés sur ces variations.

## Résultats

De façon inattendue, l'expression de CD69 est diminuée chez l'asthmatique sévère. L'expression de ce marqueur augmente après stimulation par les particules diesel, de façon plus importante chez l'asthmatique, notamment en exacerbation.

La proportion de cellules T CD25+ augmente uniquement dans le groupe « exacerbations ».

La proportion de cellules T productrices d'IL-4 et celle de cellules productrices d'IFN-g augmentent en réponse aux particules diesel dans les deux groupes d'asthmatiques, et de façon significativement plus importante lors des exacerbations. Ces proportions n'augmentent pas chez les volontaires sains. L'augmentation de l'IL-4 est prédominante, indiquant une activation globale orientée dans un sens Th2.

La prolifération des lymphocytes T est stimulée par les particules diesel, mais cet effet est plus important chez l'asthmatique que chez le volontaire sain et maximum lors des exacerbations.

## Conclusions

La diminution d'expression de CD69 chez les asthmatiques est surprenante mais est en accord avec certaines données récentes qui suggèrent que C69 puisse être exprimé dans les phases de résolution de l'inflammation et être plus un facteur régulateur qu'un récepteur activateur. Les autres résultats apportent des données importantes concernant l'action des particules diesel dans l'asthme :

- Ils montrent que les particules diesel sont actives sur les cellules de malades mais pas sur celles de contrôles, ce qui rejoint les données épidémiologiques qui montrent que l'exposition aux polluants est délétère chez les asthmatiques en diminuant le seuil de déclenchement des symptômes, mais sans effet chez les non malades.
- Ils montrent qu'effectivement les particules diesel sont capables d'activer les lymphocytes T, qui sont les chefs d'orchestre de la réaction inflammatoire de l'asthmatique.
- En étant retrouvés dans un groupe d'asthmatiques sévères traités par corticoïdes inhalés à forte dose, ils montrent que même sous traitement les lymphocytes T des asthmatiques conservent une « hyperréactivité immunologique ».
- En montrant clairement que l'effet des particules diesel est supérieur lors des exacerbations, nos résultats suggèrent que l'asthmatique sévère est d'autant plus vulnérable vis-à-vis de tels polluants que son asthme est mal équilibré.