

UNIVERSITE DE NANTES

---

FACULTE DE MEDECINE

---

Année 2010

N°39

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

**DES de pneumologie**

par

Marie LANGELOT

née le 11 janvier 1979

---

**LES MODELES ANIMAUX D'ASTHME**

---

Président du jury : Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN

---

Présentée et soutenue publiquement le 3 juin 2010

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>6</b>
<b>Cadre rationnel de la modélisation animale .....</b>	<b>12</b>
1. Un patrimoine biologique commun .....	12
a. Continuum phylogénétique .....	12
b. Support génétique universel .....	14
c. Systèmes physiologiques partagés .....	16
2. Un outil biologique performant .....	17
a. Possibilités techniques uniques .....	17
b. Maîtrise des paramètres expérimentaux .....	19
3. Les écueils de la modélisation .....	20
a. Difficultés de l'extrapolation : exemple de l'anti-interleukine 5 .....	20
b. Variabilité entre individus .....	21
c. Variabilité des espèces .....	23
d. Variabilité non expérimentale .....	24
4. Les limites éthiques .....	25
a. Cadre législatif .....	25
b. Poids de l'opinion publique .....	26
c. Priorité à la santé humaine ? .....	27
<b>Protocoles d'induction de l'asthme animal .....</b>	<b>31</b>
1. Diversité des modalités d'induction .....	31
a. Modèles naturels .....	31
b. Modèles artificiels allergéniques .....	33
c. Modèles artificiels génétiquement modifiés .....	34
2. Influence des différents allergènes .....	36
a. Allergènes de bas poids moléculaires .....	36
b. Allergènes de haut poids moléculaires .....	38
3. Influence des différents adjuvants .....	40
a. Définition .....	40
b. Adjuvants synthétiques : les sels d'aluminium .....	41
c. Adjuvants environnementaux .....	42
d. Modèles sans adjuvants .....	43
4. Influence des modalités d'administration des allergènes .....	46
a. Voies d'administration .....	46
b. Doses .....	50
c. Durée .....	52
5. Vers l'amélioration des modèles .....	55
<b>Modélisation de l'hyperréactivité bronchique .....</b>	<b>58</b>

1. Définition de l'hyperréactivité bronchique .....	59
2. Techniques de mesure de l'hyperréactivité bronchique.....	61
a. Résistance et compliance pulmonaires.....	61
b. Apports de la pléthysmographie.....	70
c. Apports de la technique des oscillations forcées .....	82
d. Autres techniques .....	87
3. Limites de la modélisation de l'hyperréactivité bronchique.....	91
a. Variabilité d'origine technique .....	91
b. Variabilité d'origine animale .....	92
<b>Modélisation des lésions tissulaires.....</b>	<b>98</b>
1. Lésions tissulaires de l'asthme .....	98
2. Prélèvements et principales techniques disponibles .....	99
a. Prélèvements .....	99
b. Techniques d'analyse .....	100
3. Modèles d'asthme « aigu ».....	105
a. Sensibilisation : anomalies du tissu sanguin .....	106
b. Infiltrat inflammatoire pulmonaire .....	107
c. Lésions épithéliales.....	112
4. Intérêt des modèles d'asthme « chronique ».....	114
<b>Conclusion .....</b>	<b>117</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>122</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>125</b>

## Les modèles animaux d'asthme

# Introduction

« **S**'il fallait tenir compte des services rendus à la science, la grenouille occuperait la première place ». Dès le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, Claude Bernard, le père de la médecine expérimentale, défendit l'expérimentation animale comme source indispensable d'informations pour comprendre la nature humaine. Quelques décennies plus tard, Robert Koch, microbiologiste allemand, prouva la nature infectieuse de la tuberculose en administrant le bacille qui porte aujourd'hui son nom à des moutons. A l'époque, la tuberculose était responsable d'un décès sur 10. Il ouvrit ainsi la voie à des progrès immenses pour la santé humaine et obtint le prix Nobel de médecine en 1905 (Kaufmann, 2005). Depuis, la liste des découvertes scientifiques majeures issues de l'expérimentation animale n'a cessé de s'allonger (annexe 1).

Pourtant, la perception de l'expérimentation animale par l'opinion publique est mauvaise et de nombreuses voix s'élèvent aujourd'hui pour dénoncer, parfois violemment, l'inutilité et le caractère inhumain de l'expérimentation sur les animaux. En 2004, un sondage IPSOS commandé par l'association One Voice, qui prône l'abolition de l'expérimentation animale, montrait que 64 % des français étaient défavorables à l'expérimentation animale et que 78 % d'entre eux jugeaient qu'elle entraîne une souffrance importante pour les animaux. Ce rejet est fondé sur un questionnement éthique mais aussi sur le souvenir d'épisodes

dramatiques de l'histoire de la recherche. Le thalidomide en est un exemple tristement célèbre. Ce médicament aux propriétés sédative et anti-émétique a été commercialisé au début des années 50 et prescrit à des femmes enceintes souffrant de nausées. Il a entraîné la naissance de plus de 10000 nouveau-nés porteurs de malformations graves voire létales (List, 2007). La molécule n'avait pas montré d'effet tératogène sur un modèle de gestation chez la rate mais s'est avérée tératogène chez la lapine par la suite. On touche ici à une question fondamentale qui est celle de la validité et donc de l'utilité des modèles animaux pour reproduire un phénomène biologique existant chez l'être humain.

Un modèle animal peut être défini comme une préparation expérimentale développée dans une espèce dans le but d'étudier un phénomène se manifestant chez une autre espèce (McKinney, 1984). On comprend ici la nuance entre l'expérimentation animale, qui vise à confronter une hypothèse à une réalité biologique, et la modélisation animale qui vise à créer un système dynamique reproduisant des interactions biologiques modifiables par l'expérimentation. Un modèle animal est un outil qui permet de poser des questions auxquelles on ne peut pas répondre chez l'homme pour des raisons techniques, économiques ou éthiques. Plusieurs paradoxes se dégagent de cette définition. Premièrement, un modèle animal présente l'énorme avantage scientifique de reproduire tous les niveaux d'interaction du vivant et de rendre compte de façon unique de sa complexité. Cependant, si cette assertion est valable pour les modèles animaux naturels qui développent spontanément des pathologies proches de celles de l'homme (le macaque spontanément porteur du SIV comme modèle d'infection par le VIH ou la souris SCID comme modèle naturel d'immunodéficience), elle est

plus contestable pour les modèles artificiels, induits expérimentalement ou génétiquement modifiés. La modélisation artificielle pose en effet le problème d'une simplification excessive qui peut aboutir à des modèles caricaturaux. En pathologie respiratoire par exemple, la création d'un asthme allergique chez la souris, qui est naturellement épargnée par cette pathologie, nécessite l'utilisation de protocoles agressifs qui aboutissent à une éosinophilie pulmonaire massive, dépassant largement celle existant chez l'homme. Deuxièmement, l'utilisation de modèles animaux présuppose l'existence de mécanismes biologiques universels ou, du moins, partagés par plusieurs espèces, autorisant l'extrapolation de données scientifiques de l'animal à l'homme. Ainsi, la validité théorique d'un modèle animal repose classiquement sur 3 critères principaux : l'isomorphisme ou similarité des symptômes, l'homologie ou similarité étiologique et physiopathologique et la prédictibilité ou similarité des réponses pharmacologiques (Morsink et Dukers, 2009). Or, il est souvent difficile de réunir ces 3 critères. A titre d'exemple, chez le cochon d'Inde, l'induction expérimentale d'un phénotype asthmatique s'accompagne d'une hyperréactivité bronchique majeure passant par la libération d'histamine et de leucotriènes par les mastocytes bronchiques, comme chez l'homme, alors que le profil inflammatoire peut différer car il existe une éosinophilie pulmonaire naturelle chez cet animal. Le cochon d'Inde s'avère donc être plutôt un modèle d'étude pharmacologique (Canning et Chou, 2008). A l'inverse, chez le rat, il existe une réaction inflammatoire bronchique proche de celle constatée chez l'homme mais les mastocytes bronchiques libèrent surtout de la sérotonine et il existe une hyperréactivité bronchique très modeste, ce qui fait plutôt de cet animal un

modèle d'inflammation asthmatique (Kucharewicz et al., 2009). Il n'y a donc pas de modèle animal idéal et vouloir répondre à une question à l'aide d'un modèle inadapté risque d'aboutir à une réponse erronée.

L'asthme est une maladie respiratoire chronique fréquente et grave. Sa prévalence est élevée puisqu'elle est de 6,8% dans la population adulte française. On estime aujourd'hui à environ 300 millions le nombre d'individus souffrant d'asthme dans le monde (GINA 2008) soit une prévalence 10 fois supérieure à celle de l'infection par le virus du SIDA (OMS 2007). Ces chiffres croissent constamment depuis 30 ans et on attend 100 millions d'asthmatiques supplémentaires en 2025 (GINA 2008). L'asthme est aussi une maladie grave : dans le monde, 1 décès sur 250 est attribué à l'asthme ce qui représente plus de 1000 morts par an en France (GINA 2008). Ces décès sont principalement secondaires à des exacerbations de la maladie qui sont aussi responsables de l'essentiel des coûts directs et indirects liés à l'asthme (Johnston et Sears, 2006). L'asthme est donc une pathologie encore insuffisamment maîtrisée probablement du fait de sa grande complexité. Au plan étiologique, l'asthme résulte de facteurs génétiques, environnementaux et individuels dont la conjonction peut donner naissance à un très grand nombre de phénotypes différents (Subbarao et al., 2009). Au plan physiopathologique, l'asthme est caractérisé par une hyperréactivité bronchique en réponse à des agents bronchoconstricteurs associée à des épisodes d'obstruction bronchique au moins partiellement réversibles, spontanément ou après l'administration de bronchodilatateurs. La muqueuse bronchique est également le siège de différentes lésions tissulaires (figure 1) : i) infiltration par des lymphocytes T producteurs de cytokines de type

2, ainsi que par des éosinophiles et des mastocytes, tous activés ii) hyperplasie des cellules à mucus associée une abrasion épithéliale iii) remodelage bronchique associant à des degrés variables hyperplasie musculaire lisse et des glandes muqueuses, accumulation de fibroblastes et de matrice extra-cellulaire dans la zone sous-épithéliale se traduisant par un aspect épaissi de la membrane basale (Boyce et Austen, 2005).

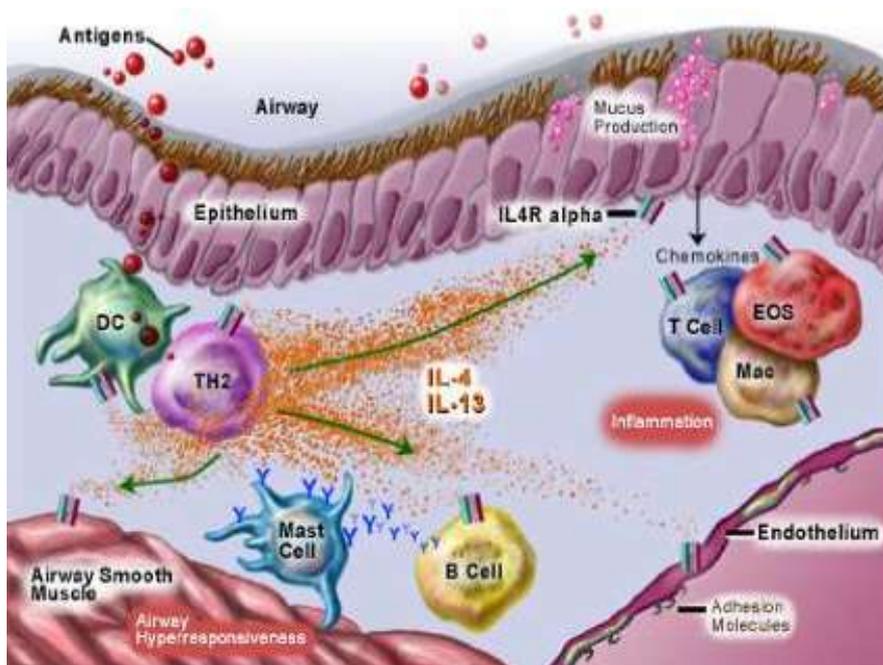


Figure 1 : acteurs de la physiopathologie asthmatique ; d'après G. Devouassoux, 2009

Si toutes ces acteurs sont désormais bien connus, leur responsabilité respective dans le processus physiopathologique de l'asthme reste floue, de même que leur implication dans les principales manifestations cliniques de la maladie que sont les exacerbations d'une part et le handicap respiratoire lié à l'installation d'une obstruction bronchique fixée d'autre part. Enfin, au plan thérapeutique, la corticothérapie générale reste la principale arme disponible dans les asthmes

sévères alors qu'elle engendre de nombreux effets secondaires et accroît la morbidité liée à la maladie.

Il reste donc de nombreuses inconnues et les efforts de recherche dans l'asthme doivent s'intensifier à tous les niveaux. Les modèles animaux d'asthme font partie du panel d'outils disponibles pour mieux maîtriser cette maladie. Compte tenu des avantages et des limites liés à l'utilisation de ces modèles, l'objectif de ce travail est de déterminer quelles informations peut apporter la reproduction expérimentale de l'asthme chez un animal et dans quelle mesure l'exploitation de modèles animaux d'asthme peut contribuer à améliorer la santé humaine. Nous discuterons donc dans un premier temps les arguments scientifiques qui sous-tendent l'utilisation de modèles animaux ; dans un second temps, nous présenterons les principaux protocoles expérimentaux utilisés pour induire un asthme chez l'animal ; nous discuterons ensuite les modalités de modélisation de l'hyperréactivité bronchique puis, dans une dernière partie, nous exposerons les possibilités de modélisation des lésions tissulaires.

# Les modèles animaux d'asthme

## Cadre rationnel de la modélisation animale

### 1. Un patrimoine biologique commun

La première question qui vient logiquement à l'esprit de quiconque utilise un modèle animal de pathologie humaine est de savoir ce qu'il peut bien y avoir de commun entre un animal de laboratoire et un être humain. *A priori*, tout sépare ces espèces et l'extrapolation de données issues de ces animaux à l'homme peut générer un certain scepticisme.

#### a. Continuum phylogénétique

Derrière l'apparente diversité du monde vivant, il existe pourtant une unité. C'est à partir de l'observation de caractères morphologiques communs, appelés homologies, que le naturaliste anglais, Charles Darwin, eut l'intuition d'une parenté entre les différentes espèces animales. En 1859, dans « L'origine des espèces », il expose sa théorie de l'évolution naturelle. Selon lui, les multiples espèces animales vivantes sont issues d'un nombre réduit d'ancêtres communs ayant subi des transformations leur conférant un avantage évolutif transmis à leur descendance qui leur a permis de survivre au cours des temps. Parallèlement, certaines espèces, plus faibles, ont évolué vers une impasse et se sont éteintes naturellement. Cette théorie de l'organisation arborescente du vivant en groupes

monophylétiques rend compte à la fois de sa diversité et de son unité originelle (figure 2).

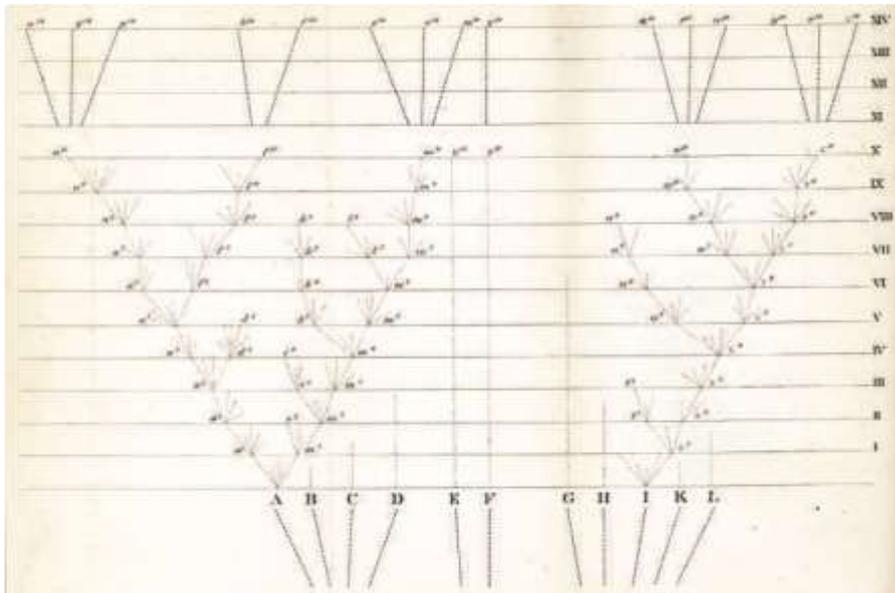


Figure 2 : l'arbre de Darwin ; d'après M. Pagel, 2009

A ce jour, la théorie darwinienne n'a pas été contredite et il existe donc bien une parenté entre des espèces aussi différentes qu'un cochon d'Inde, par exemple, et un être humain puisqu'elles appartiennent toutes deux à la classe monophylétique des mammifères. L'évolution de cette classe aurait donné naissance il y a plus de 90 millions d'années à de nombreux ordres nouveaux (figure 3). On notera la divergence précoce des rongeurs il y a environ 65 millions d'années. Cet ordre comprend notamment les souris et les rats fréquemment utilisés en laboratoire comme modèles animaux. Cette particularité évolutive pourrait expliquer les différences physiologiques, notamment pharmacologiques, existant entre ces espèces et des espèces apparues plus tardivement comme le cochon d'Inde, les lapins ou encore l'homme (Canning, 2003). On peut remarquer la proximité phylogénétique du cheval, du cochon ou du mouton par rapport à

l'homme. L'ordre des primates apparus il y a environ 20 millions d'années comporte entre autres les chimpanzés, connus pour être les animaux les plus proches de l'homme sur le plan évolutif.

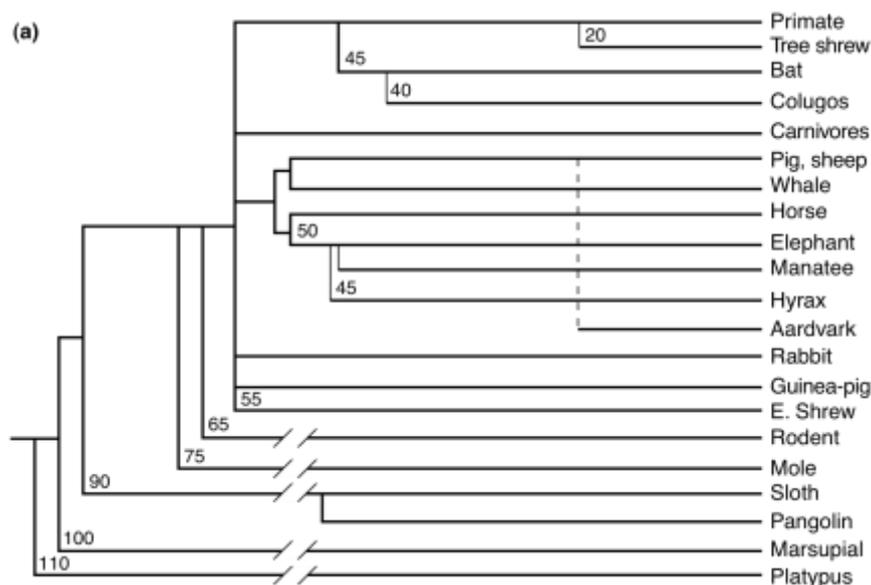


Figure 3 : évolution de la classe des mammifères ; d'après B.J. Canning, 2003

### b. Support génétique universel

Récemment, les avancées dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de montrer que même lorsqu'il existe des structures morphologiques apparemment différentes entre espèces, il peut exister une homologie plus profonde reposant sur des circuits génétiques hérités d'un ancêtre commun. Par exemple, la diversité morphologique associée aux yeux dans le règne animal (figure 4) est en contradiction avec le caractère très conservé des gènes de la famille *Pax*, impliqués dans la morphogénèse oculaire et retrouvés chez des insectes comme la mouche ou encore chez des vertébrés comme la souris ou l'être humain (Shubin et al, 2009).



Figure 4 : diversité morphologique des yeux dans le règne animal, des organismes les plus rudimentaires (amphioxus, à droite) aux plus complexes (homme au milieu et insectes à gauche) ; d'après Z. Kozmik, 2008

En fait, il existe dans presque tout le règne animal un support moléculaire commun à l'origine de tous les phénotypes existants : il s'agit de l'acide désoxyribonucléique ou ADN. En 1944, Oswald Avery et ses collègues américains publient les résultats de leurs expérimentations qui montrent que la nature biochimique du facteur permettant la transformation d'une souche non virulente de pneumocoque en une souche virulente n'est autre que l'ADN (Avery et al, 1944), suggérant ainsi qu'il est le support d'une information essentielle. Quelques années plus tard, James Watson, Francis Crick et Maurice Wilkins découvrent la structure hélicoïdale et appariée des 2 brins d'ADN (Watson et Crick, 1953) ; ils évoquent les possibilités de réplication de l'ADN et donc de transmission du matériel génétique à une descendance. Dans les années 60, c'est l'ARN messenger qui est isolé par François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff (Jacob et Monod, 1961) et le code génétique qui est élucidé (Crick et al, 1961). Ces découvertes fondamentales conduisent à l'idée que l'ADN est le support essentiel et universel de l'information biologique du vivant, des eucaryotes aux procaryotes les plus complexes. Ce support peut être l'objet de mutations répétées expliquant l'évolution des espèces et les liens de parenté qui les unissent encore aujourd'hui. Les dernières avancées de la génomique ont montré que plus de 99 % des gènes codants dans le génome humain ont leurs

homologues chez la souris ; dans le pourcentage qui diffère, on trouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'olfaction, la reproduction et l'immunité (Hugues, 2003).

### **c. Systèmes physiologiques partagés**

S'il existe incontestablement une unité biochimique dans le monde animal, il existe aussi une unité fonctionnelle qui s'exprime par le partage de voies physiologiques communes. Au niveau cellulaire, la communication entre les cellules qui est fondamentale dans le développement des individus, se fait via des voies de transduction de signaux extérieurs. Typiquement, ce signal est induit par un ligand qui vient se fixer à un récepteur transmembranaire, déclenchant une cascade de transducteurs cytoplasmiques qui va activer ou inhiber un ou plusieurs facteurs de transcription capables de moduler l'expression des gènes. Il est surprenant de constater que les voies de signalisation impliquées dans la transduction sont très restreintes : elles sont au nombre de 7 et extrêmement conservées chez tous les métazoaires (Pires-daSilva et Sommer, 2003). Au niveau systémique cette fois, l'immunité est un exemple de système physiologique commun retrouvé chez des espèces très différentes. Certains composants du système immunitaire inné comme les Pattern Recognition Receptors (PRR) sont communs à tout le règne animal ; le système adaptatif tel qu'il existe chez l'homme, caractérisé notamment par sa population lymphoïde, est commun à différents vertébrés et serait apparu chez les poissons cartilagineux il y a 500 millions d'années. Les IgE, qui sont très impliquées dans la physiopathologie des maladies allergiques, existent chez tous les mammifères

(Flajnik et Kasahara, 2010). Il n'est donc pas absurde d'envisager d'étudier l'allergie chez un autre mammifère que l'homme pour appréhender l'allergie chez l'homme.

## **2. Un outil biologique performant**

L'utilisation d'un modèle animal de pathologie humaine est aussi justifiée car elle offre des possibilités d'exploration scientifique inouïes. En effet, un tel modèle permet la réalisation d'expérimentations impossibles chez l'homme pour des raisons éthiques, techniques ou économiques.

### **a. Possibilités techniques uniques**

Dans le cadre d'un raisonnement scientifique, pour déterminer le rôle joué par une population cellulaire ou une molécule, il est d'un grand intérêt de pouvoir supprimer quantitativement et/ou qualitativement cette population ou cette molécule et d'étudier les conséquences de cette suppression. Alors qu'elle est techniquement possible, cette approche est éthiquement inenvisageable chez l'homme. Néanmoins, elle l'est sur un modèle animal. En effet, depuis les années 1980, on sait modifier le patrimoine génétique d'organismes vivants (organismes transgéniques) et provoquer la mutagénèse ciblée d'un gène d'intérêt (ciblage de gènes) au sein d'une lignée animale, notamment chez la souris (Carpecchi, 1989). Il est ainsi possible, par le transfert ciblé d'un gène inactif à la place du gène d'intérêt (par recombinaison homologue), de provoquer l'extinction ou knock-out de ce gène et d'en étudier les conséquences phénotypiques (figure 5). Il est également possible de transférer un gène codant pour une protéine différente mais fonctionnelle en lieu et place du gène ciblé : c'est le knock-in. A

l'inverse, il est possible en transférant un gène d'intérêt à l'aide d'un vecteur dans un organisme, un organe, un tissu voire une cellule ciblées, de provoquer la surproduction d'une protéine et d'en étudier les conséquences phénotypiques et les effets (thérapeutiques par exemple) sur la maladie de l'animal.

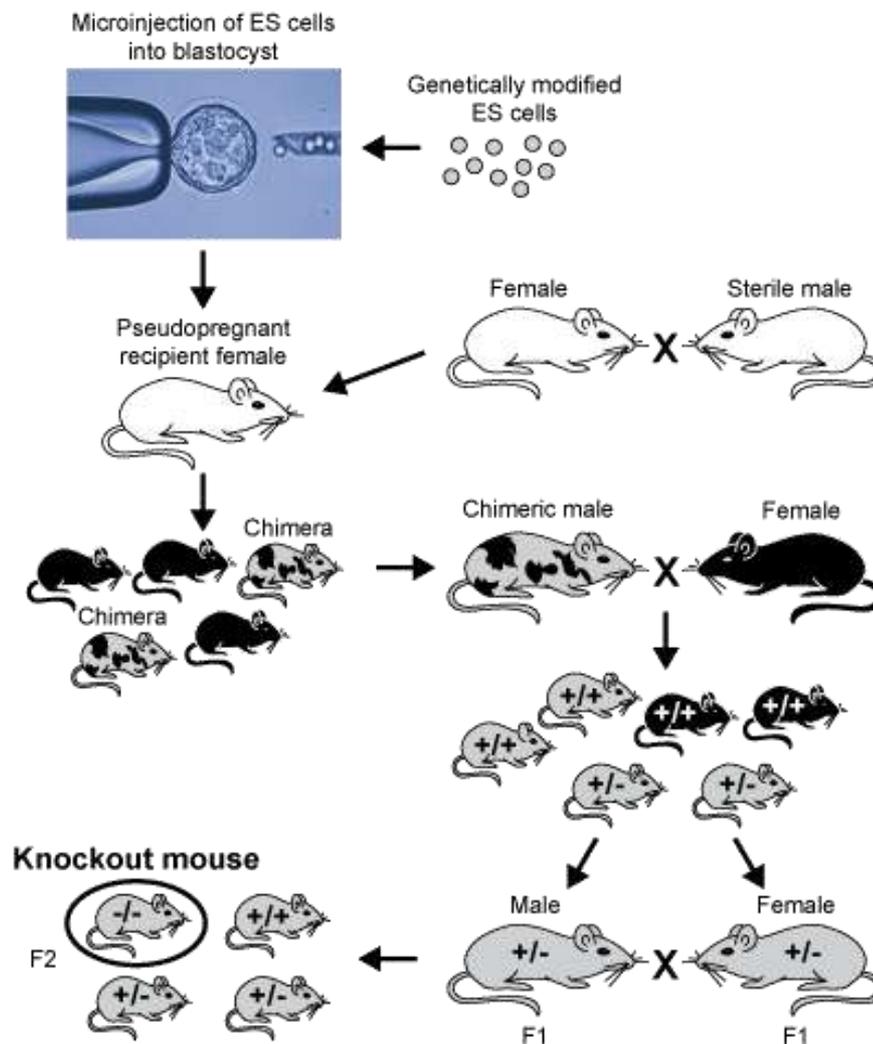


Figure 5 : obtention d'une lignée de souris knock-out ; d'après M. Forsberg, Uppsala University

De plus, sous réserve d'une souffrance animale maîtrisée, il est possible de réaliser chez l'animal des explorations invasives, répétées et/ou prolongées qui fournissent des données cinétiques précieuses. On peut par exemple réaliser une pléthysmographie continue pendant 24 heures chez une souris ce qui est

difficilement envisageable chez l'homme. Dans certains cas, on peut même envisager la réalisation de protocoles létaux.

### **b. Maîtrise des paramètres expérimentaux**

Parce qu'ils sont plus faciles à héberger et à utiliser, les petits animaux de laboratoires sont les plus utilisés, notamment les rongeurs et les lapins qui représentent plus de 90 % des effectifs utilisés (Ministère de la recherche, 2004). Ces animaux doivent obligatoirement provenir d'élevages spécialisés (Directive européenne 86/609 du 24 novembre 1986). Les fournisseurs assurent la production de lignées d'animaux consanguins qui sont disponibles pour différentes souches à l'intérieur d'une même espèce. Ainsi, on peut obtenir des animaux génétiquement très proches considérés comme autant d'individus identiques ce qui limite la variabilité des résultats obtenus à partir de tels animaux. En outre, dans un laboratoire donné, il est possible de maintenir des conditions de vie très standardisées et constantes au cours du temps, ce qui est impossible dans le cadre de la recherche sur l'homme et permet de limiter les facteurs de confusion. Enfin, il est possible de soumettre les animaux à des variations d'environnement précisément contrôlées pour en mesurer les effets. Par exemple, la création d'un modèle d'asthme induit par les acariens nécessite un environnement propre assurant l'éviction de la poussière et des acariens qu'elle contient. Dans ces conditions, il est possible d'étudier précisément l'effet de l'inhalation de différentes doses d'acariens sur le développement de l'asthme sans risque de contamination extérieure non maîtrisée.

### **3. Les écueils de la modélisation**

Si l'utilisation de modèles animaux est justifiable d'un point de vue scientifique, l'exploitation des résultats issus de ces modèles doit être extrêmement prudente comme l'a montré l'exemple du thalidomide. D'autres exemples soulignent les limites de la modélisation animale.

#### **a. Difficultés de l'extrapolation : exemple de l'anti-interleukine 5**

Le rôle fondamental joué par l'interleukine 5 (IL-5) dans la physiopathologie de l'asthme et ses applications thérapeutiques potentielles ont été évoqués chez l'animal dès le début des années 1990. Chez le cochon d'Inde (Chand et al, 1992) puis sur un modèle d'asthme chez la souris, il a été montré que la suppression de l'IL-5, soit par l'administration d'un anticorps bloquant (Hamelmann et al, 1997), soit par knock-out du gène codant pour l'IL-5 (Foster et al, 2000), atténue l'éosinophilie pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique. Cependant, les premiers essais cliniques de phase II évaluant un anticorps anti-IL-5 chez des asthmatiques peinent à démontrer une efficacité thérapeutique. La comparaison de 8 patients asthmatiques légers traités par un anticorps anti-IL-5 à 8 asthmatiques recevant un placebo a confirmé une diminution de l'éosinophilie dans le sang et l'expectoration des patients activement traités. En revanche, le traitement n'a eu aucun effet sur l'hyperréactivité bronchique spécifique ou non spécifique (Leckie et al, 2000). Le même traitement administré à des asthmatiques sévères a permis une augmentation modérée et transitoire du VEMS sans amélioration concomitante du score symptomatique (Kips et al, 2003). Les études récentes ont porté sur une sous-population de patients

porteurs d'un asthme réfractaire à éosinophiles et ayant des antécédents d'exacerbations. Dans ce sous-groupe très ciblé, un traitement d'un an par anti-IL-5 a permis une réduction significative des exacerbations de 3,4 à 2 épisodes annuels (Haldar et al, 2009). Cet exemple montre l'incapacité d'un modèle artificiel d'asthme murin à rendre compte de la complexité de l'asthme humain et notamment de la diversité des phénotypes existants. Le modèle animal réduit la pathologie à des mécanismes, à une relation de cause à effet qui met à l'écart la dimension individuelle de la maladie (Gachelin, 2008).

### **b. Variabilité entre individus**

Il existe un premier niveau de variabilité expérimentale qui peut rendre critiquable certains modèles de pathologie humaine. Ceci est particulièrement vrai pour les modèles animaux d'asthme. Dans les années 70, les animaux utilisés pour étudier l'asthme étaient sélectionnés sur la positivité des tests cutanés suite à l'administration d'un antigène, témoignant de la présence d'une hypersensibilité immédiate c'est à dire d'une sensibilisation naturelle à cet antigène. C'est ainsi que des chiens puis des macaques spontanément sensibilisés à un parasite (*Ascaris suum*), sans signes de parasitose évolutive, ont été utilisés. L'administration d'extraits d'*Ascaris* par voie respiratoire, en aérosols, chez des macaques sédatés déclenche bien une atteinte fonctionnelle respiratoire aigue évocatrice d'asthme et caractérisée par une augmentation du rapport durée expiratoire sur durée inspiratoire, une augmentation des résistances pulmonaires, une diminution de la compliance dynamique, du débit expiratoire maximal et de la pression artérielle en oxygène. Cependant, seuls 60 % des macaques

sensibilisés développent cette atteinte et la variabilité des réponses est encore supérieure chez le chien (Patterson et al, 1976). Quelques années plus tard, un nouveau modèle animal d'asthme a été développé chez des rats qui sont naturellement épargnés par l'allergie. Dans ce modèle, les 2 phases (sensibilisation et déclenchement de la crise) sont induites artificiellement par l'administration répétée d'un antigène et donc strictement contrôlées. En réponse, ces animaux produisent des IgE sériques. La présence d'un « asthme », suite à l'administration de l'antigène par aérosol, est affirmée s'il existe une dyspnée persistante c'est à dire une modification du profil des débits respiratoires mesurés à l'aide d'un pneumotachographe. Ce protocole d'induction de la maladie aboutit à des phénotypes très hétérogènes puisque le pourcentage d'animaux répondeurs, développant un « asthme », varie entre 10 et 70 % selon les groupes de rats (Holme et Piechuta, 1981). Il existe donc une efficacité variable d'un même protocole d'induction de la maladie qui peut entraîner une hétérogénéité phénotypique majeure et nécessite un tri entre les animaux répondeurs, qui sont jugés représentatifs de la pathologie, et ceux qui sont non répondeurs. Deux questions se posent alors. Premièrement, selon quels critères doit-on trier ces animaux ? Pour l'asthme, les tests diagnostiques utilisés chez l'homme, comme la spirométrie forcée, ne sont bien sûr pas disponibles chez l'animal. Faut-il alors évaluer un autre paramètre fonctionnel respiratoire mesurable (débit, fréquence, pression...) et faut-il prendre en compte d'autres critères (anatomopathologiques, immunologiques...) ? Deuxièmement, est-il raisonnable d'utiliser des modèles animaux lorsque le rendement des protocoles d'induction utilisés est si médiocre ? Ces questions seront discutées un peu plus loin.

### c. Variabilité des espèces

La seconde source de variabilité se situe au niveau de l'espèce. D'abord, au sein d'une même espèce, les comportements pathologiques observés peuvent varier d'une souche animale à l'autre. Par exemple, lorsque l'on compare les résultats d'un test à la métacholine chez des souris, on constate que la réactivité bronchique varie considérablement selon les souches ce qui témoigne de fonds génétiques différents (De Sanctis et al, 2001). Ces variations ont aussi été constatées chez différentes races de chiens (Hirshman et al, 1980). Ensuite, il existe entre les espèces des différences qui rendent parfois délicate l'interprétation des résultats issus de différents modèles animaux. Par exemple, l'étude de l'effet de 2 molécules anti-allergiques administrées avant l'exposition respiratoire à un allergène (*Ascaris suum*) a montré des réponses très différentes chez un modèle de rat asthmatique allergique à *Ascaris* par rapport à un modèle identique chez le singe (El-Azab et Stewart, 1977). De même, les premières études sur l'effet des agents anticholinergiques chez le chien asthmatique avaient conclu à une absence d'efficacité des aérosols d'atropine dont les dérivés sont aujourd'hui une pierre angulaire du traitement de l'asthme aigu chez l'homme (Krell et al, 1976). De toutes ces constatations, il ressort que l'utilisation de modèles animaux doit impérativement être basée sur une excellente connaissance de la pathologie humaine et de la physiologie comparée entre l'homme et l'animal.

#### d. Variabilité non expérimentale

L'expérimentation sur des modèles *in vivo* est soumise à l'influence d'un grand nombre de facteurs non expérimentaux que l'expérimentateur doit identifier car ils sont une source de variabilité importante et peuvent accroître la dispersion des résultats voire les fausser. Ils peuvent être classés en 4 catégories : facteurs liés à l'animal, facteurs physiques ou environnementaux, facteurs liés à l'entretien, aux soins et à la manipulation et facteurs liés à la manipulation à des fins de recherche (figure 6).

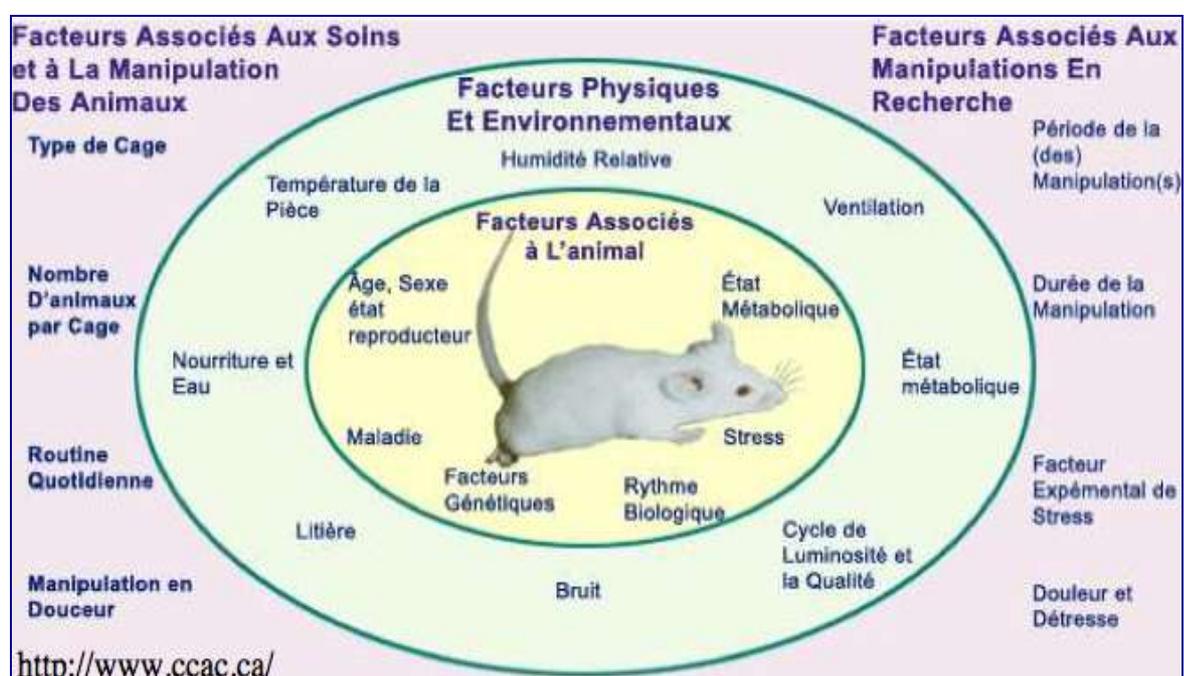


Figure 6 : facteurs non expérimentaux pouvant influencer la réponse d'un modèle animal, d'après le Conseil Canadien de Protection des Animaux

Ainsi, les résultats issus de modèles animaux de pathologies humaines sont soumis à l'influence de nombreux facteurs extrinsèques ou intrinsèques à l'animal qui sont autant de sources de variabilité pouvant fausser les données expérimentales. L'obtention de ces données ne peut donc constituer un objectif

en soi et elles ne doivent être envisagées que comme des informations complémentaires de celles pouvant être obtenues par la recherche clinique.

#### **4. Les limites éthiques**

Il n'est pas possible d'aborder la question des modèles animaux et de l'expérimentation animale sans aborder celle de la souffrance animale qui peut constituer en soi une limite, relative ou absolue, à l'utilisation des modèles.

##### **a. Cadre législatif**

Au niveau international, toutes les réglementations encouragent les alternatives à l'expérimentation animale et la prise en considération des conditions de vie des animaux lorsque l'usage de ces derniers est nécessaire. Il existe cependant des différences notables d'un pays à l'autre. Aux Etats-Unis et au Canada, ce sont les intérêts humains qui dominent nettement les intérêts animaux et inspirent une législation selon laquelle l'expérimentation animale est toujours justifiée (sous réserve qu'elle respecte le bien-être élémentaire des animaux). En Grande-Bretagne et en Suède, c'est le principe d'équilibre qui prévaut ; il peut aboutir à l'interdiction de la recherche si les bénéfices attendus pour la santé humaine sont jugés insuffisants pour justifier une souffrance animale sévère (Nordgren, 2004). Les autres pays européens suivent la Directive Européenne de 1986, modifiée en 2001, qui s'applique aux vertébrés et spécifie que le principe de balance bénéfices/risques est opposable en cas de souffrance animale sévère (Directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à

des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, J.O. N° L358 du 18 décembre 1986, page 0001-0028). En France, le texte de base encadrant l'expérimentation animale est issu du Code Rural (article R214-87) qui définit les cas d'utilisation licite d'animaux à des fins d'expérimentation. Le contrôle du respect des réglementations incombe à Direction des Services Vétérinaires.

### **b. Poids de l'opinion publique**

Depuis quelques années, malgré une législation de plus en plus stricte, les manifestations contre l'expérimentation animale se multiplient. En 2008, une vague d'intimidation lancée par des militants pour les droits des animaux s'est abattue sur l'Europe : en Belgique, l'institut de recherche de Hasselt a été incendié et en Espagne les laboratoires de la firme Novartis ont été vandalisés (Brumfiel, 2008). Ces actes violents sont l'expression extrémiste d'une opposition plus globale de la société à l'expérimentation sur les animaux avec cependant quelques nuances. En 1999, un sondage mené par Ipsos-MORI en Grande-Bretagne à la demande du journal New Scientist montrait déjà des fluctuations importantes de l'opinion publique en fonction de la façon dont la question de l'expérimentation animale était abordée. A la question brute « êtes-vous pour ou contre l'expérimentation animale en recherche scientifique ? », 24 % des sondés répondaient pour et 64 % contre. La même question avait été reformulée : « des scientifiques développent de nouveaux traitements contre la douleur et contre des maladies graves comme la leucémie et le SIDA ; en réalisant des expérimentations sur des animaux, ils pensent pouvoir faire des progrès importants et rapides ; êtes-vous pour ou contre ? ». A cette question plus

nuancée, 45 % des personnes interrogées répondaient pour et 41 % contre, traduisant ainsi une inversion de l'opinion. Les mêmes fluctuations ont été observées vis à vis du type d'espèce utilisée pour l'expérimentation animale avec une augmentation des opinions défavorables lorsqu'il s'agit de primates par rapport à des souris (Aldhous et al, 1999). Il existe donc une gradation des opinions qui repose sur une subtile évaluation de la balance bénéfique pour la santé humaine/risques pour l'animal et qui suppose obligatoirement une prise en compte des intérêts et de la souffrance de l'animal.

### **c. Priorité de la santé humaine ?**

Le cadre législatif constitue pour l'expérimentateur le minimum requis pour l'exercice de ses fonctions. Cependant, il est difficile de rester sourd aux réticences de l'opinion publique en matière d'expérimentation animale. Il appartient donc à chaque scientifique de développer une réflexion éthique et d'adopter une position plus ou moins stricte dans ce domaine. En 1978, l'UNESCO a proposé une Déclaration universelle des droits de l'animal. L'article 8 stipule que l'expérimentation impliquant une souffrance physique ou psychologique est incompatible avec les droits de l'animal et que les techniques de remplacement doivent être développées. Les termes « droits de l'animal » doivent être définis. En effet, dans la communauté humaine, l'homme qui accepte de se soumettre à des devoirs bénéficie en retour de droits absolus et inaliénables. Ce concept n'est pas transposable à l'animal qui ne peut être soumis à aucune obligation morale. Cependant, l'animal est une créature sensible, qui peut être mise en danger et éprouver de la souffrance. A ce titre,

l'homme a l'obligation morale de respecter l'intégrité de l'animal, ce qui peut être assimilé à un droit de l'animal. Considérer que les animaux bénéficient, comme les hommes de droits absolus, rend inacceptable l'expérimentation animale. Or, l'homme a aussi l'obligation morale vis à vis de ses congénères de promouvoir la santé humaine. Cette dernière obligation permet de placer les intérêts humains au-dessus de ceux des animaux dans certaines situations. L'expérimentateur doit pouvoir justifier qu'il agit dans ce périmètre éthique où l'usage d'animaux dans le but d'améliorer la santé humaine est envisageable.

Dans cette optique, le CNRS, en collaboration avec le Gircor (Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de Communication sur la Recherche), a élaboré un guide sur l'évaluation éthique en expérimentation animale (<http://ethique.ipbs.fr/sdv/index.html>). L'un des principes éthiques de base exposé est le respect de « la règle des 3 R » : 1) Réduction des expériences à celles qui sont absolument essentielles 2) Remplacement systématique, lorsque c'est techniquement possible, des animaux par des espèces non sensibles ou, mieux, des modèles non vivants 3) Raffinement c'est à dire réduction maximale de la souffrance animale (Russell et Burch, 1959). Il s'agit là de recommandations générales pour la pratique de l'expérimentation animale mais il existe aussi des outils d'évaluation de la qualité éthique des protocoles qui doivent constituer une aide à la décision de mettre en œuvre ou non une expérimentation. Bateson a proposé une évaluation tridimensionnelle de la recevabilité d'un protocole prenant en compte la qualité de la recherche, la probabilité de souffrance animale et la probabilité d'obtenir des résultats importants pour la médecine. Ainsi, une expérimentation ne doit pas être conduite si la qualité scientifique est faible ou si

la souffrance animale est élevée. Si la souffrance animale est moyenne ou faible, alors la décision doit être basée sur l'évaluation combinée de la qualité scientifique et de la probabilité d'obtention de résultats (figure 7). Une proposition de recherche qui tombe dans les parties antérieures du cube doit être rejetée. Il existe aussi des scores d'évaluation de la qualité éthique d'un projet (annexe 2).

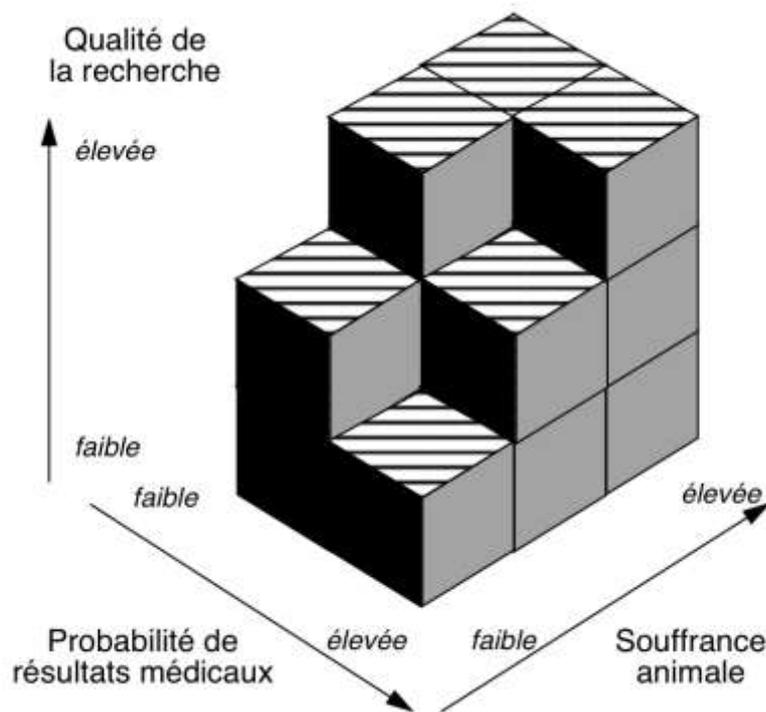


Figure 7 : appréciation tridimensionnelle de la recevabilité d'une expérimentation, d'après P. Bateson, 1986

Ces outils d'évaluation s'appuient principalement sur la mise en balance de la souffrance animale avec l'amélioration attendue de la santé ou du bien-être humain. Cependant, d'autres paramètres peuvent être considérés (conservation des espèces, environnement, objectifs de santé publique...). Les scientifiques français peuvent être accompagnés dans cette réflexion grâce à la saisine des CREEA (Comités régionaux d'éthique en expérimentation animale) dont l'avis

reste cependant facultatif. En 2005 a été créé le CNREEA (Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale) qui comprend principalement des représentants de l'État, des professionnels de l'expérimentation animale et des associations de protections des animaux. Par cette composition pluripartite, le CNREEA est un lieu d'expression des différentes sensibilités de la société et un lieu d'échanges autour de la question de l'expérimentation animale (annexe 3).

# Les modèles animaux d'asthme

## Protocoles d'induction de l'asthme animal

### 1. Diversité des modalités d'induction

Le cadre théorique de l'utilisation des modèles animaux de pathologies humaines étant défini, il s'agit maintenant de décrire les modalités concrètes et pratiques de la modélisation de l'asthme. Rappelons que la modélisation correspond à la reproduction expérimentale d'un processus biologique dans le but de l'étudier. La genèse artificielle d'un asthme repose sur l'utilisation de différents protocoles d'induction que nous allons présenter

#### a. Modèles naturels

L'asthme est une maladie purement humaine. Néanmoins, il existe des processus pathologiques proches notamment chez le chat et le cheval. Les chats peuvent développer naturellement une atteinte des voies aériennes inférieures se manifestant cliniquement par des épisodes de toux, dyspnée, rhinorrhée et sifflements paroxystiques, radiologiquement par des signes d'atteinte bronchique et, dans le lavage broncho-alvéolaire, par une éosinophilie et une neutrophilie respectivement estimées à 24 et 33 %. Ces épisodes peuvent soit céder spontanément, soit régresser après un traitement par bronchodilatateurs, antibiotiques et corticoïdes, soit parfois être fatals (Moise et al, 1989). Chez le cheval, il existe une forme d'hypersensibilité liée à l'exposition aux poussières,

moisissures et spores contenues dans le foin et qui se manifeste cliniquement par des épisodes de bronchoconstriction récurrents, histologiquement par une inflammation bronchique et une hypersécrétion de mucus et, dans le lavage, par une neutrophilie importante sans éosinophiles. Cette atteinte régresse partiellement après éviction du foin mais peut nécessiter un traitement par corticoïdes (Derksen et al, 1985). Ces animaux ont surtout été utilisés pour des études vétérinaires mais pas comme modèles naturels d'asthme humain probablement pour des raisons pratiques (animaux sauvages non issus d'élevage, pas de contrôle environnemental possible par définition, variabilité phénotypique).

Ils ont cependant servi de référence pathologique pour la création de modèles artificiels d'asthme allergique, par exemple en exposant des chats naturellement sensibilisés mais asymptomatiques à des acariens ou du chiendent par voie respiratoire. La maladie générée de cette façon est caractérisée par une production d'IgE spécifiques, une hyperréactivité bronchique, une éosinophilie pulmonaire, une surproduction de cytokines de type 2 dans le sang et le lavage broncho-alvéolaire et des signes de remodelage bronchique (Norris Reinero et al, 2004). Ces caractéristiques composent un « syndrome asthmatique » qui mime la maladie respiratoire existant chez des chats naturellement « asthmatiques » et que l'on sait aussi induire chez de nombreuses espèces différentes. Notons qu'il existe d'autres modèles naturels de sensibilisation sans asthme chez le mouton et le chien. Ce dernier développe, parallèlement à des taux d'IgE spécifiques élevées, des manifestations associant eczéma, rhinite et conjonctivite proche des manifestations atopiques chez l'homme (de Weck et al, 1997). Lorsque ces

chiens sont expérimentalement soumis, par voie respiratoire, à des allergènes auxquels ils sont sensibilisés, ils peuvent développer certaines composantes du syndrome asthmatique comme l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation allergique.

### **b. Modèles artificiels allergéniques**

A côté de ces modèles naturels difficiles à manipuler expérimentalement, les chercheurs ont cherché à recréer entièrement l'asthme chez des animaux sains (non sensibilisés), notamment chez des petits animaux de laboratoire qui présentent des avantages notables en terme de coût, de maniabilité, de reproductibilité et de possibilités techniques, comme nous l'avons vu dans la première partie. Il existe un très grand nombre de protocoles différents permettant d'induire un syndrome asthmatique. Ils reposent tous sur l'hypothèse que la maladie résulte d'expositions répétées à un antigène et génèrent une maladie apparentée à un asthme allergique ou extrinsèque. Ils ont en commun une démarche en 2 étapes. La première étape est appelée sensibilisation. Elle correspond aux premiers contacts, asymptomatiques, avec l'antigène et permet la constitution d'une mémoire immunitaire spécifique vis à vis de cet antigène. Cette phase s'accompagne en général d'une augmentation du pool de lymphocytes T spécifiques producteurs de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13 principalement) et de la production d'IgE spécifiques qui confèrent une hypersensibilité de l'animal à l'antigène utilisé. La seconde étape est appelée provocation ou challenge. Elle correspond à un nouveau contact avec le même antigène administré cette fois par voie respiratoire et qui déclenche la maladie. Cette phase s'accompagne de

l'apparition d'une hyperréactivité bronchique et de lésions pulmonaires inflammatoires qui sont transitoires et de nature variable selon les animaux (figure 8).

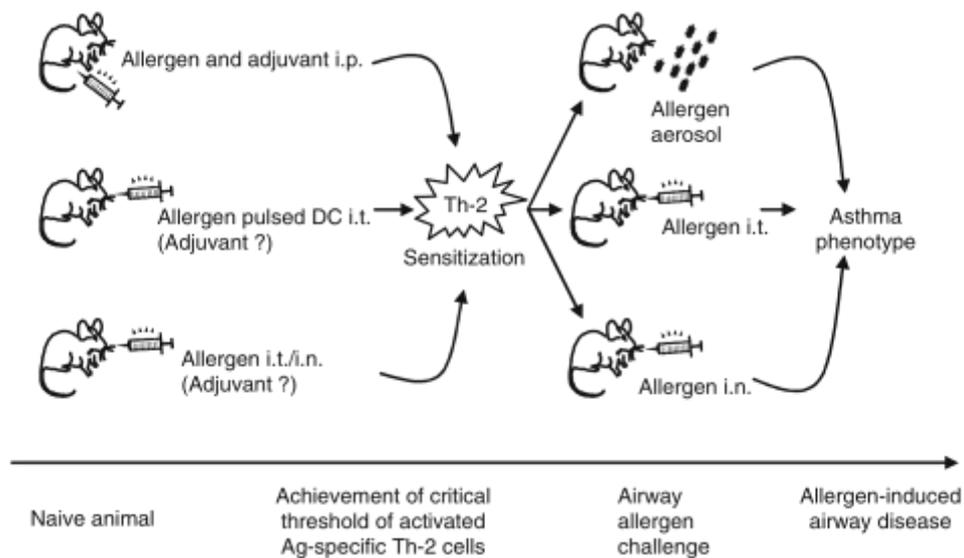


Figure 8 : processus d'induction d'un asthme allergique chez la souris, d'après Tournoy et al, 2006

Il faut noter que la réalisation de provocations respiratoires chez un animal non sensibilisé préalablement ne déclenche pas de syndrome asthmatique. Il faut aussi noter que les animaux porteurs d'un asthme induit par provocation nasale sont aussi porteurs d'une rhinite allergique et constituent à cet égard un modèle global reproduisant le caractère systémique de l'allergie.

### c. Modèles artificiels génétiquement modifiés

Les atteintes respiratoires précédemment décrites correspondent à de l'asthme allergique mais ne rendent pas compte des cas d'asthme non allergique ou intrinsèque qui représentent environ un tiers des cas d'asthme chez l'homme. Récemment, l'avènement des techniques de mutagénèse ciblée a permis de développer des modèles non allergiques. Il a été montré que les cytokines de

types 1, notamment l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), sont capables de contrecarrer la réponse de type 2 inhérente à l'asthme et d'atténuer ainsi l'hyperréactivité bronchique et l'éosinophilie pulmonaire (Huang et al, 2001). T-bet est un facteur de transcription régulant l'expression de l'IFN- $\gamma$  qui semble déficitaire dans les poumons des patients asthmatiques. Chez la souris, l'extinction du gène codant pour T-bet par knock-out, a permis de générer spontanément (sans exposition à un antigène) un syndrome asthmatique associant une inflammation pulmonaire à éosinophiles et lymphocytes, une hyperréactivité bronchique et une fibrose collagène sous-épithéliale évocatrice de remodelage bronchique (Finotto et al, 2002). Toujours chez la souris, un profil proche a pu être obtenu par knock-in du gène codant pour la molécule LAT (Linker for Activation of T cells) qui est impliquée dans la transduction des signaux d'activation du lymphocyte T. La mutation obtenue se traduit par le remplacement d'une ou plusieurs tyrosines de LAT par de la phénylalanine et induit spontanément une hypergammaglobulinémie à IgE et IgG1 polyclonales, un infiltrat pulmonaire composé de lymphocytes et d'éosinophiles ainsi qu'un haut niveau d'expression d'un récepteur aux leucotriènes (Prinz et al, 2005). Ce phénotype ressemble à celui de certains asthmes non allergiques comme le syndrome de Fernand-Widal associé à une anomalie du métabolisme de l'acide arachidonique qui se traduit par une production excessive de leucotriènes.

La diversité des modalités d'induction de l'asthme, allergique ou non, chez l'animal, reflète probablement la très grande complexité des mécanismes impliqués dans l'asthme humain. On notera que dans tous ces scénarios, le

lymphocyte T est l'acteur principal et qu'il est évidemment une cellule clé pour la compréhension de la forme humaine de cette maladie.

## **2. Influence des différents allergènes**

Dans la littérature, la plupart des modèles animaux d'asthme sont des modèles d'asthme allergique. Les allergènes utilisés sont extrêmement variés. Ils sont souvent classés en molécules de bas et de haut poids moléculaire.

### **a. Allergènes de bas poids moléculaires**

Les molécules de bas poids moléculaire (inférieur à 5000 daltons) sont le plus souvent de petites molécules chimiques. Parmi ces molécules, on trouve entre autres les isocyanates, les anhydrides d'acide et les sels métalliques qui sont responsables d'asthme professionnel chez l'homme et qui sont utilisés pour créer des modèles d'asthme professionnel chez l'animal. Ces molécules ont longtemps été considérées comme des haptènes, c'est à dire des molécules non immunogènes seules mais qui peuvent le devenir lorsqu'elles sont couplées à une molécule porteuse, comme l'albumine par exemple. L'exposition d'animaux à ces haptènes permet d'induire différents syndromes asthmatiques correspondant à des combinaisons variables de caractéristiques asthmatiques mais rarement à un tableau d'asthme complet. Par exemple, plusieurs études ont montré des profils immunologiques compatibles avec un asthme allergique mais sans atteinte de la fonction respiratoire. L'administration répétée par voie respiratoire d'anhydride phtalique couplé à de l'albumine au cochon d'Inde entraîne la production d'IgG1 sériques sans modification des paramètres respiratoires (Sarlo et al, 1994). De plus, la sensibilisation de souris par application cutanée de

diisocyanate d'héxaméthylène suivie d'un challenge par administration intranasale de la même molécule couplée à de l'albumine déclenche aussi la production d'immunoglobulines spécifiques (IgG1, IgG2a, IgE) mais s'accompagne d'une atteinte morphologique des poumons avec un infiltrat inflammatoire péri-bronchique, une hypersécrétion de mucus et une augmentation de la production de cytokines de type 1 et 2 ; à nouveau, aucune atteinte fonctionnelle respiratoire n'est décrite dans ce modèle (Herrick et al, 2002). Des modèles plus complets ont finalement été obtenus par exemple chez le rat. L'exposition de cet animal à l'anhydride trimellitique sans molécule porteuse, d'abord par voie cutanée, puis par inhalation, aboutit au développement d'un syndrome asthmatique assez complet avec une augmentation des IgE spécifiques dans le sérum, une inflammation pulmonaire à éosinophiles et une hyperréactivité bronchique spécifique comportant une phase précoce et une phase tardive, comme cela est décrit chez l'homme (Zhang et al, 2004). Notons que, contrairement aux allergènes de haut poids moléculaire, ces molécules de bas poids moléculaire sont régulièrement associées à des profils d'activation lymphocytaire mixtes, de type 1 et 2 et que les IgE spécifiques peuvent être absentes (Herrick et al, 2002 ; Vanoirbeek et al, 2006). Par ailleurs, elles peuvent déclencher des atteintes respiratoires allergiques qui ne sont pas de l'asthme (pneumonies, rhinites) et des atteintes non allergiques liées à leurs propriétés irritantes ce qui nécessite une définition rigoureuse de la validité et de la signification de ces modèles.

## b. Allergènes de haut poids moléculaires

Les allergènes de haut poids moléculaire (supérieur à 5000 daltons) inducteurs d'asthme chez l'animal sont très nombreux et disponibles sous différentes formes. Les premiers allergènes utilisés ont été extraits de parasites notamment d'espèces d'*Ascaris* qui déclenchent, physiologiquement, des réponses lymphocytaires anti-infectieuses de type 2 (Patterson et al, 1976). D'autres agents infectieux sont toujours utilisés comme *Aspergillus* (Neveu et al, 2009), *Alternaria* (Woisin et al, 2000) ou encore *Leishmania* (Julia et al, 2002). Ensuite, c'est une protéine extraite du blanc d'œuf, l'ovalbumine, qui a été testée et continue d'être utilisée pour la majorité des modèles animaux d'asthme notamment chez les rongeurs (Holme et Piechuta, 1981 ; Temelkovski et al, 1998 ; Cadot et al, 2010). Il est évident que le choix de l'ovalbumine pour appréhender l'asthme humain est critiquable dans la mesure où elle n'est pas responsable d'allergies respiratoires chez l'homme. Des allergènes plus pertinents ont donc été utilisés avec succès : acariens (O'Brien et al, 1996), blattes (Kim et al, 2001) et pollens (Sur et al, 1999 ; Conejero et al, 2007) induisent tous un syndrome asthmatique.

La majorité de ces allergènes est utilisée sous forme d'extraits totaux (par exemple les extraits totaux d'acariens sont des acariens issus d'élevage broyés et commercialisés sous forme de poudre) qui posent le problème d'une composition variable d'un lot à l'autre. Certains allergènes sont aussi disponibles sous forme de protéine purifiée ou, plus récemment, grâce aux techniques de génie génétique, sous forme de protéine recombinante correspondant le plus souvent à des allergènes majeurs. Par exemple, Bet v 1, l'allergène majeur de *Betula*

*verrucosa*, c'est à dire du pollen de bouleau, a été séquencé et cloné et il est aujourd'hui possible de le faire produire par des cultures d'*Escherichia coli* génétiquement modifiés (Ferreira et al, 1993). Il est intéressant de constater que les extraits totaux d'allergènes comme les protéines (naturelles ou recombinantes) sont capables d'induire des caractéristiques asthmatiques. Cela a été montré chez la souris avec différents allergènes. Les allergènes d'acariens administrés de façon répétée par voie nasale sous forme d'extraits totaux induisent une inflammation pulmonaire à éosinophiles, un remodelage bronchique et une hyperréactivité bronchique (Johnson et al, 2004) ; ils induisent des caractéristiques similaires lorsqu'ils sont administrés sous la forme de l'allergène majeur recombinant Der p 1 (Sarpong et al, 2003). Un profil asthmatique a également été obtenu en sensibilisant des souris par voie intra-péritonéale avec Bet v 1 recombinant puis en leur administrant des extraits de bouleau par voie intra-nasale (Wiedermann et al, 2001).

De façon plus anecdotique, certaines caractéristiques asthmatiques ont pu être induites *ex vivo* en exposant des poumons de chien à du sérum de cheval et *in vivo* en exposant des lapins à de l'albumine bovine ou encore des souris à des globules de mouton ! De tous ces travaux, il est difficile d'extraire une synthèse. Néanmoins, la diversité des agents utilisés pose la question du support moléculaire de l'allergénicité qui est aujourd'hui loin d'être résolue. Le rôle joué par la structure tridimensionnelle des protéines ou encore leur activité enzymatique (Der p 1 est une protéase) ont été évoqués pour expliquer le pouvoir allergénique de certaines protéines. Mais il y a un autre élément fondamental qui détermine la nature de la réponse immunitaire aux différents agents de

l'environnement, chez l'homme comme chez l'animal, c'est la nature des adjuvants rencontrés.

### **3. Influence des différents adjuvants**

#### **a. Définition**

De manière générale, un adjuvant est une molécule qui vise à renforcer les propriétés et l'action d'un produit, notamment d'un médicament. En immunologie, il s'agit d'un agent agissant de façon non spécifique pour accroître la réponse immunitaire spécifique d'un antigène. Dans le cas des modèles animaux d'asthme, l'adjuvant est associé à l'antigène pour faciliter l'induction d'un syndrome asthmatique. Parmi les différents adjuvants utilisés, on trouve principalement l'aluminium, qui est un adjuvant artificiel, mais aussi des substances de l'environnement comme le lipopolysaccharide (LPS), les particules de diesel, l'ozone ou la fumée de cigarette. En présence d'adjuvants, l'antigène est présenté, via les molécules du CMHI ou II, par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques notamment) au récepteur spécifique des lymphocytes T : c'est le signal 1, nécessaire à l'activation lymphocytaire spécifique. Les adjuvants seraient impliqués dans l'élaboration du signal 2 reposant sur un dialogue entre les molécules de co-stimulation de la cellule dendritique et celles du lymphocyte T qui modulerait la réponse lymphocytaire. L'élaboration d'un second signal activateur, inhibiteur ou régulateur pourrait résulter de l'interaction entre les adjuvants et les récepteurs Toll de l'immunité innée présents dans le micro-environnement. La présentation d'un antigène sans

signaux secondaires de danger entraîne une anergie lymphocytaire qui s'accompagne d'un état de tolérance vis-vis de cet antigène.

### **b. Adjuvants synthétiques : les sels d'aluminium**

Bien que l'effet adjuvant de l'aluminium soit connu depuis plus de 80 ans, son mécanisme d'action précis reste inconnu. Il est généralement utilisé sous la forme de sels injectables (hydroxyde ou phosphate d'aluminium) qui se lient aux protéines antigéniques. L'adsorption protéique se fait le plus souvent par des interactions électrostatiques qui peuvent varier en fonction des conditions du milieu (pH, tampon utilisé, nature de la protéine). Les sels d'aluminium sont capables de dévier fortement les réponses immunitaires vers une réponse de type Th2 caractérisée par une forte production d'IL-4, d'IL-5 et une sécrétion d'IgE par les lymphocytes B. A l'inverse, ils sont incapables d'induire une réponse de type Th1, caractérisée par la production d'interféron gamma et d'IgG2a notamment. Parmi les mécanismes d'action envisagés pour l'aluminium, citons une possible activation des cellules dendritiques par la stimulation de récepteurs de l'immunité innée (type récepteurs Toll), l'augmentation de la présentation antigénique, l'augmentation locale de la réponse inflammatoire par la stimulation de la production de cytokines comme l'IL-1 ou par une forte toxicité tissulaire qui induirait une apoptose au niveau du site d'injection (Brewer, 2006). Cet adjuvant a donc largement été utilisé en association à divers allergènes pour induire une réaction asthmatiforme : chez les rongeurs, l'aluminium est presque toujours associé à l'ovalbumine (Holme et Piechuta, 1981 ; Temelkovski et al, 1998) ; chez le chat, il a été utilisé en association avec des extraits totaux d'acariens (Lee-

Fowler et al, 2009) ; chez le mouton, il induit un syndrome asthmatique en association aux allergènes majeurs d'acariens Der p 1 et Der p 2 (Bischof et al, 2008).

### **c. Adjuvants environnementaux**

D'autres adjuvants ont bien sûr été développés. Le LPS est un composant naturel de la membrane externe des bactéries Gram négatif qui contient leur endotoxine. Son action immunologique est plus complexe que celle de l'aluminium. En effet, l'administration par voie intra-nasale de faibles doses de LPS associées à de l'ovalbumine entraîne un syndrome asthmatique chez la souris avec un infiltrat pulmonaire à éosinophiles, une hypersécrétion de mucus et la production de cytokines de type 2 par les lymphocytes ganglionnaires ; à l'inverse, l'administration de fortes doses de LPS dans les mêmes conditions déclenche un afflux de neutrophiles dans les poumons sans anomalies du mucus et la production d'interféron gamma (cytokine de type 1) par les lymphocytes ganglionnaires. L'effet pro-Th2 du LPS passe par la stimulation d'un récepteur de l'immunité innée appartenant à la famille des Toll, le TLR-4, qui est capable d'activer les cellules dendritiques présentant l'ovalbulmine (Eisenbarth et al, 2002). Notons qu'un effet adjuvant subtil a aussi été démontré pour les particules de diesel : associées à l'ovalbumine et administrées par voie intra-nasale, elles augmentent le nombre d'éosinophiles dans le lavage alvéolaire, la sécrétion de mucus bronchique, la production d'IL-5, d'IgE et d'IgG1 ainsi que la résistance pulmonaire (Miyabara et al, 1996). Chez des patients, des travaux antérieurs de notre équipe ont également mis en évidence un effet amplificateur des particules

de diesel *in vitro* vis à vis de l'activation des lymphocytes T ; cependant en présence de diesel, ces derniers produisent certes plus d'IL-4 mais aussi plus d'interféron gamma suggérant une action plus nuancée du diesel que celle constatée chez l'animal et aussi un profil d'activation lymphocytaire plus complexe qu'une simple réponse Th2 chez l'être humain (Mamessier et al, 2006). La fumée de cigarette (Seymour et al, 1997) et l'ozone (Depuydt et al, 2002) pourraient accentuer le syndrome asthmatique induit chez la souris, par un effet adjuvant mais peut-être aussi par un effet aggravant vis à vis d'une pathologie déjà installée.

#### **d. Modèles sans adjuvants**

L'utilisation d'adjuvants dans les protocoles d'induction d'asthme chez l'animal pose bien sûr la question de la pertinence de ces modèles qui sont « dopés » par l'adjuvant et dont les profils pathologiques sont au mieux caricaturaux, au pire biaisés. A ce stade, il est intéressant de noter qu'un certains nombres de modèles animaux ont pu être générés sans adjuvants. C'est le cas pour les modèles animaux d'asthme professionnel dont nous avons déjà parlé et qui sont associés à des profils d'activation mixtes (Th2 et Th1), mais c'est aussi le cas de modèles induits par des allergènes de haut poids moléculaire comme l'ovalbumine ou les acariens. Chez la souris, la sensibilisation par voie intra-péritonéale avec de l'ovalbumine sans adjuvant suivie de plusieurs provocations par voie intra-nasale induit un syndrome asthmatique comprenant une infiltration pulmonaire par des polynucléaires éosinophiles, une hypersécrétion de mucus, une production d'IgE spécifiques et une hyperréactivité bronchique prolongées

(Mojtabavi et al, 2002). En fait, il a été montré que même dans les échantillons commerciaux d'ovalbumine purifiée il y a toujours de faibles quantités de LPS. La présence, même discrète, de ce dernier suffit probablement pour obtenir un « effet adjuvant » et activer les cellules présentatrices d'antigène en leur fournissant un signal de danger ce qui enclenche la réaction allergique (Epstein, 2004). Il faut tout de même souligner l'intérêt de ces modèles « sans adjuvant ». En effet, l'injection d'un allergène couplé à l'aluminium entraîne la formation de dépôts locaux au site d'injection qui séquestrent l'antigène et modifient le processus de présentation antigénique (Mojtabavi et al, 2002). L'éviction de cet adjuvant pourrait donc améliorer l'homologie des modèles d'asthme allergique avec l'asthme allergique humain.

A côté des modèles classiques induits par l'ovalbumine, des modèles d'asthme ont aussi pu être établis par l'exposition à des allergènes d'acariens sans adjuvants, notamment chez la souris (Phipps et al, 2009 ; Saglani et al, 2009). Dans les extraits totaux d'acariens, il y a des quantités non négligeables de LPS pouvant expliquer en partie la réussite de ces protocoles sans adjuvants (Phipps et al, 2009). Cependant, les allergènes d'acariens ont des propriétés spécifiques qui leur confèrent un effet adjuvant intrinsèque, également qualifié d'effet « auto-adjuvant ». Plusieurs allergènes d'acariens sont doués d'une activité enzymatique de type protéase. Der p 1, un des allergènes majeurs de *Dermatophagoïdes pteronyssimus*, est une cystéine protéase. Il a été montré que cette activité enzymatique est associée à la capacité de cliver le récepteur de faible affinité pour les IgE à la surface des lymphocytes B ce qui augmenterait la synthèse des IgE spécifiques de Der p 1 et faciliterait la réponse allergique (Hewitt et al, 1995).

En outre, Der p 1 est capable de dissocier enzymatiquement les jonctions serrées unissant les cellules épithéliales bronchiques ce qui lui permet de franchir cette barrière cellulaire plus facilement et possiblement d'être plus immunogène (Wan et al, 1999). D'autres allergènes impliqués dans l'asthme comme *Aspergillus fumigatus* possèdent cette activité protéasique associée à un pouvoir allergénique chez l'animal (Kheradmand et al, 2002). Notons aussi que Der p 2 et Der p 5 sont capables d'induire *in vitro* la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 par une action non enzymatique (Kauffman et al, 2006). Enfin, il a été récemment prouvé que Der p 2, qui possède une homologie structurale avec un élément du complexe activateur de TLR-4, est capable d'activer seul ce récepteur, mimant ainsi l'effet du LPS, le ligand naturel du TLR-4 (Trompette et al, 2009).

Pour terminer sur les modèles sans adjuvants, certains protocoles ont utilisé des structures vivantes notamment des cellules de l'immunité innée pour induire l'asthme : chez la souris, l'administration systémique de cellules dendritiques chargées d'ovalbumine suivie d'une challenge respiratoire par de l'ovalbumine seule a permis de déclencher un syndrome asthmatique avec cependant une atteinte alvéolaire associée (Graffi et al, 2002). De même, la co-administration d'ovalbumine et d'un ligand des cellules NKT qui sont des lymphocytes T de spécificité restreinte impliqués dans l'immunité innée, semble pouvoir induire un asthme chez la souris (Jo et al, 2004). Si la réponse spécifique à l'allergène est importante dans la physiopathologie de l'asthme, ces derniers protocoles prouvent aussi le rôle fondamental de l'immunité innée

## 4. Influence des modalités d'administration des allergènes

### a. Voies d'administration

Commençons par discuter l'impact des nombreuses voies d'administration utilisées dans les différents protocoles d'induction de l'asthme chez l'animal. La phase de challenge est le plus souvent et logiquement réalisée par voie respiratoire et consiste à administrer les allergènes par voie intra-nasale, intra-trachéale ou encore sous forme d'aérosols. Par contre, il existe une grande variété dans les voies de sensibilisation développées : cette phase peut en effet être réalisée soit par voie systémique, par injection intra-péritonéale, intra-veineuse ou contact cutané, soit par voie locale, par administration intra-nasale, intra-trachéale ou par aérosols. La voie de sensibilisation historique et la plus largement utilisée est la voie intra-péritonéale, notamment chez les rongeurs (figure 9). Elle permet l'administration rapide et sans anesthésie de l'allergène éventuellement couplé à son adjuvant ; le plus souvent, il s'agit du couple du couple ovalbumine-aluminium.



Figure 9 : injection intra-péritonéale chez la souris

Cependant, il est évident que cette voie de sensibilisation n'est pas physiologique et ne reproduit en rien le mode de sensibilisation naturel vis à vis des allergènes impliqués dans l'asthme humain. En effet, l'administration d'ovalbumine couplée à de faibles doses de LPS par voie nasale déclenche un syndrome asthmatique caractérisé par une activation lymphocytaire Th2 ; ce même protocole appliqué à des souris déficientes en TLR4 (récepteur naturel du LPS) ne déclenche pas de réponse asthmatique Th2 car il existe alors un défaut de maturation et donc un défaut d'activation des cellules dendritiques pulmonaires liés à l'absence de signaux de danger. Par contre, l'administration, par voie intra-péritonéale cette fois, du même couple ovalbumine-LPS à des souris déficientes en TLR4 rétablit la réponse Th2. La comparaison du phénotype des cellules dendritiques pulmonaires et péritonéales montre que les premières sont immatures alors que les secondes sont naturellement matures et aptes à présenter des antigènes indépendamment de la présence de signaux de danger comme le LPS (Piggott et al, 2005). Les poumons, comme la peau, sont des organes directement exposés aux nombreux antigènes du milieu extérieur vis à vis desquels ils doivent pouvoir maintenir un état de tolérance la plupart du temps mais aussi élaborer une réaction immunitaire défensive appropriée en cas d'agression. Il est donc indispensable qu'il y ait un système de régulation immunitaire fin dans ces organes et le maintien des cellules dendritiques pulmonaires dans un état immature assure cette homéostasie en empêchant la présentation tous azimut d'antigènes aériens ou d'autoantigènes inoffensifs. A l'inverse, la cavité intra-péritonéale, qui n'a physiologiquement aucun contact direct avec des antigènes extérieurs, renferme des cellules dendritiques plus matures et plus faciles à

activer. L'utilisation de la voie péritonéale comme voie de sensibilisation allergénique court-circuite donc, au moins partiellement, les mécanismes immunitaires innés impliqués dans l'asthme et est de ce fait hautement critiquable.

D'autres voies de sensibilisation ont été exploitées. Les contacts cutanés avec des allergènes, par administration intra-dermique ou par application épicutanée, permettent d'obtenir une sensibilisation efficace dans les modèles d'asthme professionnel (Rattray et al, 1994) mais aussi dans les modèles induits par l'ovalbumine seule (Herrick et al, 2000). La voie respiratoire est une voie de sensibilisation plus difficile à manier. En effet, l'administration d'ovalbumine marquée par radioactivité en aérosols à des souris vigiles entraîne un dépôt de plus de 80% de l'antigène sur la muqueuse nasale (figure 10).

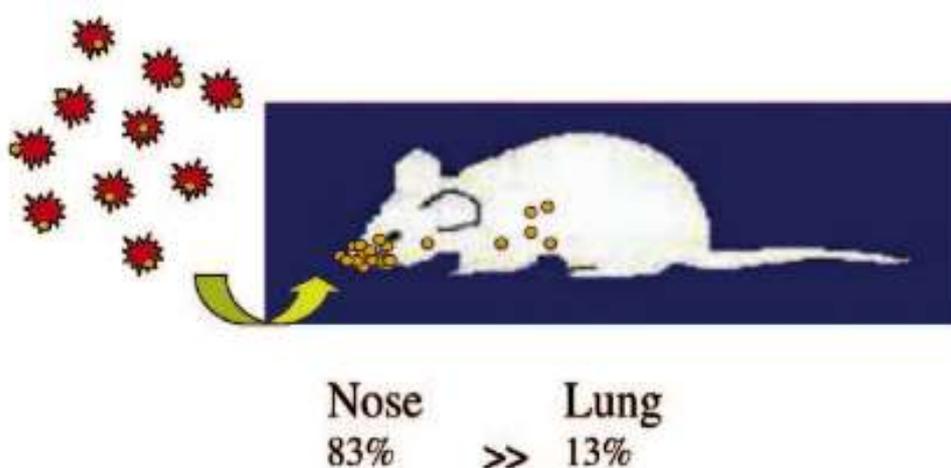


Figure 10 : dépôt majoritairement nasal d'allergènes administrés par aérosols ; d'après Hellings et Ceuppens, 2004

Le pourcentage de dépôt pulmonaire semble pouvoir augmenter lorsque l'ovalbumine est administrée en solution par voie intra-nasale à des souris anesthésiées (Tomaki et al, 2000). En fait, seule la voie intra-trachéale permet un

contrôle strict des doses déposées dans les voies aériennes inférieures. Malgré ces limitations, l'administration répétée d'ovalbumine par voie intra-nasale (à titre de sensibilisation et de challenge) peut induire une réponse lymphocytaire pulmonaire Th2 de type asthmatique chez la souris (Herrick et al, 2000). De même, des aérosols d'ovalbumine successifs peuvent générer une hyperréactivité bronchique chez le cochon d'Inde (Arima et al, 1995). Cependant, la comparaison des voies de sensibilisation respiratoire et cutanée semble montrer une supériorité de cette dernière. L'administration d'anhydride trimellitique par inhalation en chambre à des rats provoque une sensibilisation efficace qui se traduit par une augmentation des IgE et des IgG spécifiques ; comparativement, l'application cutanée du même allergène entraîne une réponse humorale plus vigoureuse avec une augmentation des taux sériques de ces immunoglobulines plus importante, plus prolongée dans le temps et plus constante entre les animaux (Warbrick et al, 2002). De façon similaire, chez la souris, l'administration d'ovalbumine par voie intra-nasale ou par voie épicutanée sans adjuvant déclenche, dans les 2 cas, une sensibilisation efficace permettant l'induction secondaire d'une réponse inflammatoire pulmonaire de type Th2. Cependant, ces 2 sites de sensibilisation ne mettent pas en jeu les mêmes voies immunitaires puisque la voie intra-nasale est dépendante de la présence d'IL-4 alors que la voie épicutanée ne l'est pas. La voie cutanée semble générer une immunisation plus précoce et plus puissante car moins dépendante de la présence de certaines cytokines de type 2 comme l'IL-4 (Herrick et al, 2000). La sensibilisation cutanée, qui existe probablement pour la plupart des pneumallergènes humains, semble donc être une voie efficace et pertinente pour

la pathologie humaine ; associée à un challenge respiratoire, elle rend probablement mieux compte de l'immunopathologie de l'asthme humain. Nos travaux ont d'ailleurs permis de créer un nouveau modèle d'asthme murin allergique induit par une sensibilisation cutanée et un challenge respiratoire par des extraits totaux de *Dermatophagoïdes farinae* (figure 11).

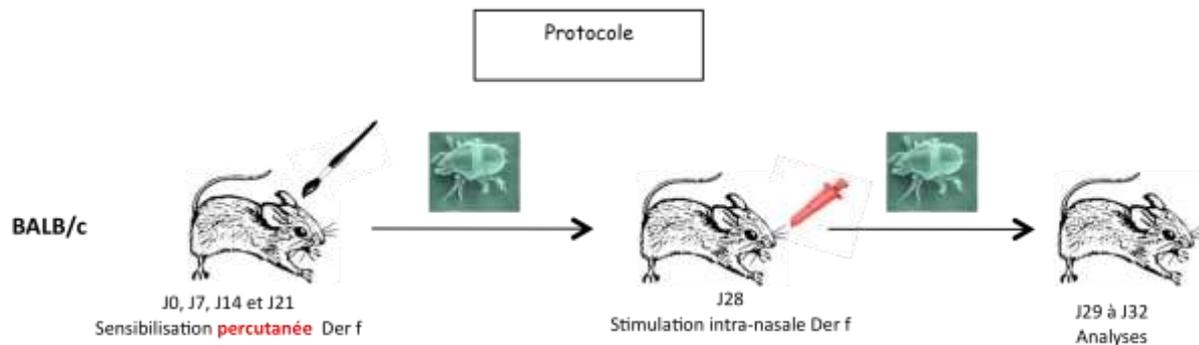


Figure 11 : protocole d'induction d'un asthme allergique aux acariens par voie d'exposition mixte à l'allergène

Pour conclure sur les voies d'administration, il faut noter que l'administration d'ovalbumine par voie orale avant les phases de sensibilisation et de challenge a un effet de protecteur et empêche le développement d'un asthme expérimental chez les souris (Russo et al, 2001).

### **b. Doses**

Outre la voie d'administration, la dose d'allergène est un paramètre qui varie d'un protocole à l'autre et qui peut influencer le syndrome asthmatique engendré chez l'animal. Plusieurs études *in vitro* tendent à montrer que l'exposition du système immunitaire à de faibles doses d'antigène favorise son orientation vers une réponse de type Th2 (Constant et Bottomly, 1997). Les mécanismes de cette déviation immunitaire en présence de faibles concentrations

antigéniques ne sont pas précisément connus : ils pourraient reposer sur l'existence d'interactions de basse affinité entre les cellules dendritiques présentant l'antigène et les lymphocytes T, soit à cause d'une faible densité des molécules du CMH à la surface des cellules dendritiques soit à cause d'une faible migration de ces mêmes cellules vers les ganglions lymphatiques locaux (Lambrecht et al, 2001). *In vivo*, la dose d'allergène influence aussi la réponse obtenue. La sensibilisation de souris avec 10 µg d'ovalbumine dilués dans 2 mg d'aluminium, administrés à 3 reprises par voie intra-péritonéale (J1, J10 et J26), suivie de 6 provocations respiratoires à l'aide d'ovalbumine à 6 % administrée en aérosol (J82, J83, J85, J86, J88 et J89) génère un syndrome asthmatique assez complet caractérisé par une augmentation des IgE et IgG1 spécifiques, une infiltration pulmonaire à éosinophiles retrouvée dans le lavage broncho-alvéolaire et une augmentation de la résistance pulmonaire globale ; le même protocole répété avec une dose de sensibilisation de 10 mg génère un syndrome asthmatique beaucoup moins marqué (Aguilar-Pimentel et al, 2009). Aux faibles niveaux d'exposition antigénique, une relation entre la dose sensibilisante et l'intensité du syndrome asthmatique a également été décrite avec des doses croissantes d'allergène recombinant de blatte et d'acarien variant de 0,01 à 10 µg, administrées par voie intra-péritonéale en association avec de l'aluminium et suivies d'un challenge respiratoire (Sarpong et al, 2003).

L'impact des doses utilisées pour les provocations est moins bien connu. Notons cependant que les modèles murins d'asthme aigu qui présentent une atteinte respiratoire après un ou plusieurs challenges allergéniques rapprochés utilisent des doses de provocation considérées comme élevées si on les compare au

niveau de l'exposition humaine naturelle et si on les ramène aux doses inhalées par kilo de poids corporel. Alors que l'asthme expérimental aigu résulte d'une exposition brève à de fortes doses d'allergènes, l'asthme humain découlerait plutôt d'une exposition prolongée à de faibles doses. Chez la souris, cette exposition allergénique massive génère une atteinte histologique caractérisée par un infiltrat inflammatoire essentiellement composé de polynucléaires éosinophiles et de lymphocytes rappelant les lésions histologiques constatées chez l'homme. Cependant, ces expositions aiguës peinent à induire du remodelage bronchique qui est une caractéristique essentielle de l'asthme humain (Kumar et Foster, 2001).

### **c. Durée**

C'est dans l'optique de perfectionner ces modèles d'asthme aigus que des protocoles longs ont été mis au point. En effet, la durée de l'exposition à l'allergène est un paramètre susceptible de conditionner fortement la nature du syndrome asthmatique obtenu. On distingue classiquement 2 types de modèles d'asthme : les modèles aigus qui sont en général obtenus en moins d'un mois par l'exposition de l'animal à des doses antigéniques élevées et les modèles chroniques caractérisés par une exposition prolongée avec des provocations respiratoires s'étalant en général sur plusieurs mois (annexe 4). Les modèles aigus posent le problème de la faible longévité des lésions engendrées. L'analyse de plusieurs modèles d'asthme induits par l'ovalbumine de durée variable montre que, dans tous les protocoles, l'inflammation des voies aériennes disparaît totalement en 3 semaines, l'hypersécrétion de mucus s'estompe au bout d'un

mois et l'hyperréactivité bronchique ne persiste que 10 jours après le dernier challenge respiratoire (Epstein, 2006). Même s'il persiste sans doute une mémoire immunitaire silencieuse, les protocoles aigus génèrent donc des lésions transitoires éloignées des anomalies chroniques de l'asthme humain.

Afin de mimer l'exposition allergénique chronique qui existe chez l'homme, les chercheurs ont mis au point des modèles d'asthme chronique qui posent néanmoins des difficultés importantes. En effet, il a été montré que l'exposition prolongée à certains allergènes aboutit paradoxalement à un état de tolérance qui s'accompagne d'une régression voire d'une disparition des lésions asthmatiformes. L'application à différentes souches de souris d'un protocole d'induction sur 2 semaines comprenant l'administration d'ovalbumine par voie nasale suivie d'un challenge par aérosol engendre un syndrome asthmatique classique avec une éosinophilie dans le lavage, un infiltrat pulmonaire lymphocytaire, une augmentation de la production de cytokines de type 2 ainsi qu'une hyperréactivité bronchique. La prolongation de ce protocole sur 4 semaines entraîne une régression presque complète de ce syndrome. De plus, lorsque les splénocytes des souris issues du protocole de 2 semaines sont mis en culture avec de l'ovalbumine, ils produisent des cytokines de type 2 en plus grande quantité que les splénocytes des souris issues du protocole de 4 semaines ce qui témoigne ici de l'existence d'une mémoire immunitaire plus vive en cas d'exposition allergénique brève (Swirski et al, 2006). De même, l'administration d'ovalbumine en aérosols pendant 10 semaines à des souris sensibilisées par voie intra-péritonéale s'accompagne d'une diminution du taux

d'IgE sériques, de l'éosinophilie pulmonaire et de l'hyperréactivité bronchique par rapport à des souris exposées pendant 3 semaines (figure 12).

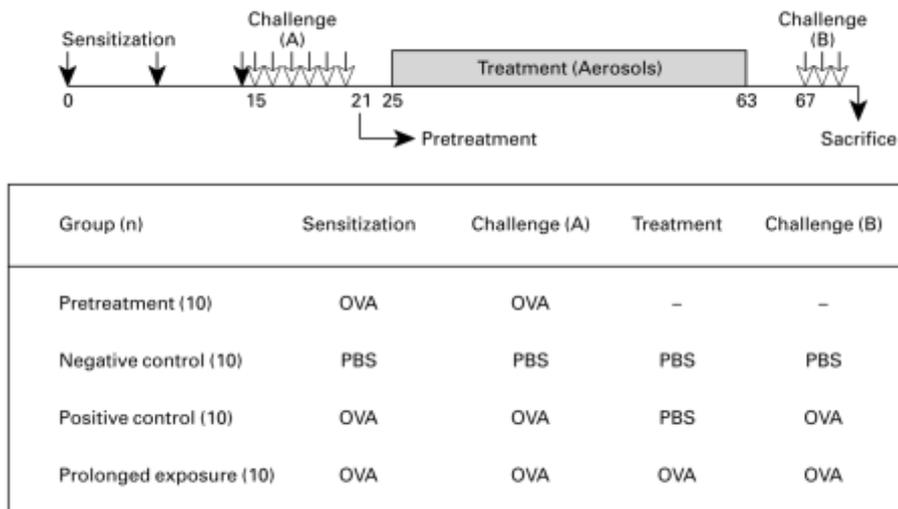


Figure 12 : le groupe « pretreatment » est sacrifié à 3 semaines et le groupe « prolonged exposure » est sacrifié à 70 jours après 6 semaines d'exposition à l'allergène ; d'après Sakai et al, 2001

Cependant, dans ce modèle, des lésions de remodelage associant une hypersécrétion de mucus et une fibrose des voies respiratoires sont induites et persistent après l'exposition prolongée (Sakai et al, 2001). Notons que, contrairement à l'ovalbumine, les autres allergènes, notamment les acariens, administrés de façon prolongée, ne semblent pas engendrer de tolérance, sans que l'on sache pourquoi.

Il existe malgré tout des modèles d'asthme chronique induits par l'ovalbumine porteurs de lésions de remodelage bronchique. L'administration par voie intranasale et sans adjuvant de 50 µg d'ovalbumine diluée, 3 fois par semaine, pendant 12 semaines aboutit à une éosinophilie durable associée à la présence de cytokines Th2 dans la lavage, une hyperréactivité bronchique persistant jusqu'à 3 mois et des lésions de remodelage bronchique prouvées par

l'épaississement des parois bronchiques, la persistance d'un infiltrat inflammatoire péribronchique, l'augmentation de la quantité de collagène total dans les poumons, le développement des cellules à mucus et de la couche musculaire lisse (Shinagawa et Kojima, 2003). Temelkovski a également mis au point un modèle d'asthme chronique assez proche de l'homme sur le plan histologique en exposant des souris BALB/c à des aérosols répétés d'ovalbumine après une sensibilisation intra-péritonéale avec adjuvant au cours d'un protocole de 12 semaines. Ces souris développent un syndrome asthmatique avec du remodelage (Temelkovski et al, 1998). En créant des caractéristiques asthmatiques supplémentaires, ces modèles prolongés ont permis d'explorer des voies physiopathologiques différentes et d'obtenir des informations que les modèles aigus sont incapables de fournir, comme par exemple l'implication du TGF- $\beta$  dans les phénomènes de fibrose et de remodelage bronchique (Shinagawa et Kojima, 2003) ou le rôle joué par les voies aériennes distales dans l'asthme (Wegmann et al, 2005). Ajoutons, pour terminer, que d'autres paramètres peuvent influencer la nature du syndrome asthmatique induit chez l'animal comme l'âge des premières expositions, puisqu'il semble que les singes sensibilisés précocement aux acariens soient plus sévèrement atteints (Van Scott et al, 2004), ou encore le sexe des animaux avec un possible effet protecteur des hormones femelles décrit chez la souris (Chang et Mitzner, 2007).

## **5. Vers l'amélioration des modèles**

Une bonne connaissance des différents protocoles disponibles et des caractéristiques des animaux utilisés est donc indispensable pour ne pas faire

dire à un modèle d'asthme ce qu'il ne veut pas dire. Par exemple, si une souris « asthmatique » ne répond pas à un test de provocation par l'histamine, ce n'est pas que l'histamine est un médiateur négligeable dans l'asthme, c'est que les mastocytes de la souris n'en fabriquent pas et produisent de la sérotonine à la place... La connaissance de la maladie humaine est un autre préalable à l'expérimentation animale car elle permet d'orienter efficacement les recherches scientifiques et d'améliorer les modèles expérimentaux pour les rapprocher de la maladie naturelle.

L'invention de nouveaux modèles animaux plus pertinents doit donc permettre l'abandon progressif des modèles anciens comme ceux induits par l'ovalbumine associée à de puissants adjuvants artificiels comme l'aluminium ou ceux déclenchés par des sensibilisations parentérale et intra-péritonéale. De même, la dichotomie classique entre modèles aigus et chronique doit être dépassée car l'asthme est en fait une maladie inflammatoire chronique dont l'évolution est intimement liée à la survenue d'incidents respiratoires aigus. A ce titre, la mise au point récente d'un modèle murin d'asthme aigu sur fond d'asthme chronique est remarquable : des souris de type BALB/c exposées, après sensibilisation, de manière prolongée, à de faibles concentrations d'ovalbumine puis à une seule provocation avec de plus fortes doses développent plus rapidement un syndrome asthmatique plus sévère que des souris n'ayant pas subi cette dernière provocation. Ce protocole permet donc de modéliser le phénomène d'exacerbation de l'asthme, ce qui n'avait jamais été fait auparavant (Siegle et al, 2006).

La complexification des modalités d'induction de l'asthme est une autre voie possible pour améliorer les modèles. L'asthme est une pathologie complexe qui résulte d'interactions nombreuses avec l'environnement et notamment avec les pneumallergènes. Récemment, un modèle de polysensibilisation a été élaboré chez des souris exposées pendant 8 semaines par voie nasale à un mélange de 3 allergènes associant des extraits d'acariens, d'ambroisie et d'*Aspergillus* sans adjuvant. Ce protocole induit un syndrome asthmatique complet avec remodelage bronchique et prolongé contrairement à l'administration d'un seul de ces allergènes qui entraîne un état de tolérance. Il est intéressant de noter que le traitement curatif de souris asthmatiques allergiques à l'ovalbumine avec des anticorps inhibant l'IL-5 et l'IL-13 fait régresser le syndrome asthmatique alors que le même traitement administré à des souris polysensibilisées n'a pas d'effet (Goplen et al, 2009). Ce modèle, qui rend compte de la polysensibilisation fréquente des patients asthmatiques, implique donc des cytokines non Th2 et permet de questionner le dogme Th2 dans l'asthme. Dans le même esprit, un modèle murin d'asthme induit par l'exposition simultanée à l'ovalbumine (qui génère une réaction inflammatoire à l'origine d'un épaissement de la paroi bronchique) et à la poly-L-lysine (capable d'induire une contraction musculaire lisse), permet de créer une hyperréactivité bronchique multifactorielle (Bates et al, 2007). Ce modèle innovant permet d'envisager la mise en jeu de plusieurs mécanismes concomitants impliqués dans l'hyperréactivité bronchique ce qui reflète probablement mieux la physiopathologie de l'asthme humain sévère qu'une simple exposition allergénique.

# Modèles animaux d'asthme

## Modélisation de l'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique est une caractéristique essentielle de l'asthme humain. La mesure de la réactivité bronchique par les tests de provocation représente, avec le VEMS et la surveillance du débit de pointe à domicile, un des paramètres fondamentaux permettant de poser le diagnostic d'asthme chez l'homme. Par ailleurs, on sait depuis longtemps que l'hyperréactivité bronchique est corrélée à la sévérité et au mauvais contrôle de l'asthme (Juniper et al, 1981). Cependant, cette anomalie n'est pas spécifique puisqu'elle est également retrouvée dans d'autres pathologies respiratoires telles que la BPCO post-tabagique ou la mucoviscidose même si le profil de la réponse bronchique est alors légèrement différent. La présence d'une hyperréactivité bronchique ne suffit donc pas à affirmer la validité d'un modèle d'asthme bien qu'elle soit probablement une des caractéristiques les plus faciles à reproduire chez l'animal. De plus, les paramètres de mesure nécessitant une coopération comme le VEMS ou le débit de pointe sont bien sûr indisponibles pour l'expérimentateur. Grâce aux évolutions technologiques récentes, il est néanmoins possible d'évaluer de plus en plus finement la fonction respiratoire et notamment la réactivité bronchique chez l'animal. Dans cette partie, nous allons donc discuter l'intérêt de ces différentes techniques.

## 1. Définition de l'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique peut se définir comme une réaction bronchique «excessive» ou «démessurée» à une grande variété de stimuli (physiques, chimiques ou pharmacologiques) par rapport aux sujets normaux. La mesure de la réactivité bronchique, c'est-à-dire de la capacité des voies aériennes à développer une obstruction en réponse à la stimulation, est importante pour différencier les sujets normaux de ceux qui présentent une hyperréactivité. La réactivité bronchique traduit donc la relation entre un stimulus bronchique quantifiable et une réponse bronchique obstructive mesurable qui s'exprime sous la forme d'une courbe dose-réponse. L'hyperréactivité bronchique est une modification de cette courbe. Elle est la résultante de 3 phénomènes : i) une hypersensibilité qui est définie par une réponse bronchique constrictive pour des doses de stimulus plus faibles qu'un sujet normal ii) une hyperréactivité à proprement parler qui correspond à une pente plus abrupte de la courbe dose-réponse iii) une réponse d'amplitude exagérée représentée par une intensité supérieure de la constriction bronchique. Chez l'homme, la mise en évidence d'une hyperréactivité bronchique repose sur la réalisation d'un test de provocation standardisé (ATS, 2000). Il s'agit, en dehors de tout traitement bronchodilatateur, de stimuler les bronches en faisant inhaler des concentrations progressivement croissantes d'un agent bronchoconstricteur et de mesurer, dose après dose, le VEMS. Si le VEMS chute de plus de 20 % à une dose donnée, le test est considéré comme positif pour cette dose et arrêté ; la PC20 est la concentration d'agent entraînant une chute du VEMS d'au moins 20 %. Ce test n'entraîne pas de diminution des débits bronchiques chez un sujet normal (figure 13).

CATEGORIZATION OF BRONCHIAL RESPONSIVENESS	
PC <sub>20</sub> (mg/ml)	Interpretation*
> 16	Normal bronchial responsiveness
4.0-16	Borderline BHR
1.0-4.0	Mild BHR (positive test)
< 1.0	Moderate to severe BHR

Figure 13 : : interprétation de la PC20 lors d'un test de provocation à la métacholine ; ATS, 2000

Parmi les stimuli utilisés, on distingue les agents non spécifiques comme les agonistes bronchoconstricteurs (histamine et métacholine principalement) et les agents spécifiques comme les allergènes environnementaux et professionnels. Chez l'homme, les premiers agissent directement sur le muscle lisse bronchique par l'activation d'un récepteur membranaire, muscarinique M3 pour la métacholine (qui est un analogue synthétique de l'acétylcholine) et histaminique H1 pour l'histamine. Notons que ces agonistes peuvent aussi réduire le calibre bronchique par le biais de la stimulation des sécrétions des glandes séro-muqueuses. Les allergènes agissent eux indirectement sur les cellules musculaires lisses : en se fixant sur les IgE mastocytaires, ils déclenchent leur dégranulation et la libération de médiateurs bronchoconstricteurs comme l'histamine ou les dérivés lipidiques (leucotriènes et prostaglandines) qui sont à l'origine d'une réaction bronchique quasiment immédiate, qualifiée de précoce ; l'allergène déclenche également, dans les 4 à 6 heures qui suivent l'exposition, un afflux leucocytaire bronchique composé de polynucléaires et de lymphocytes, associé à une hyperréactivité bronchique qualifiée de tardive.

Chez l'animal, la mise en évidence d'une hyperréactivité bronchique repose aussi sur la réalisation de tests de provocation bronchique mais les protocoles ne sont pas du tout standardisés. La plupart des études utilisent, à des doses très

variables, des allergènes administrés par voie respiratoire ou des agents pharmacologiques bronchoconstricteurs comme l'acétylcholine, la métacholine, l'histamine (inactive sur les bronches des souris) ou la sérotonine, ces agents pouvant être administrés par voie intra-veineuse ou respiratoire sous forme d'aérosols. On peut déjà signaler que l'hétérogénéité des protocoles de provocation bronchique chez l'animal rend difficile la comparaison des résultats obtenus par des équipes différentes et entraîne une perte de puissance des études pourtant nombreuses sur l'hyperréactivité bronchique.

## **2. Techniques de mesure de l'hyperréactivité bronchique**

En l'absence du paramètre fondamental qu'est le VEMS, l'étalon or en matière d'évaluation de la réactivité bronchique chez l'animal est la mesure de la résistance et de la compliance dynamique des poumons ; ces 2 paramètres sont très spécifiques de l'obstruction bronchique qui est associée à une augmentation de la résistance pulmonaire et, à l'inverse, à une diminution de la compliance (Hoymann et al, 2006). Cependant, la mesure de ces paramètres nécessite une sédation et surtout une intubation trachéale, qui s'avère délicate chez certains animaux notamment chez les plus petits comme la souris. D'autres techniques de mesure, déjà utilisées chez l'homme, ont donc été développées et adaptées à l'animal comme la pléthysmographie ou la technique des oscillations forcées avec des avantages et des inconvénients que nous allons discuter.

### **a. Résistance et compliance pulmonaires**

La résistance  $R$  peut être définie comme la force qui s'oppose à l'écoulement d'un fluide dans un système clos. D'un point de vue physique, il

s'agit du rapport entre la variation de pression  $\Delta P$  et la variation de débit  $\Delta V'$  liées à l'écoulement gazeux dans le système thoraco-pulmonaire, exprimé en cmH<sub>2</sub>O/L/s :

$$R = \Delta P / \Delta V'$$

Dans les poumons, lors des mouvements respiratoires, l'écoulement gazeux rencontre 3 types de résistances : la résistance thoracique liée à la pression exercée par la cage thoracique, la résistance des voies aériennes liée au passage de l'air à travers l'arbre bronchique et la résistance tissulaire des poumons qui résulte de la friction des différentes couches de tissu les unes sur les autres. En l'absence de pathologie du parenchyme pulmonaire, la résistance tissulaire est quasiment négligeable et la résistance pulmonaire totale est principalement représentée par la résistance des voies aériennes. De plus, la résistance thoracique peut être exclue en réalisant des mesures intra-thoraciques. C'est ainsi que la mesure de la résistance pulmonaire totale chez l'animal permet d'obtenir une estimation de la résistance des voies aériennes. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les relations entre résistance et débits sont complexes : dans les bronches de petit calibre (bronchioles), l'écoulement gazeux est laminaire et la pression nécessaire pour vaincre la résistance à l'écoulement est bien proportionnelle au débit (relation linéaire) ; dans les conduits de gros calibre (trachée et bronches), l'écoulement gazeux est turbulent, le débit est plus élevé et les résistances sont plus fortes si bien que la pression nécessaire pour vaincre ces résistances est proportionnelle au carré du débit (relation non linéaire ; figure 14).



Figure 14 : écoulement laminaire (A) et écoulement turbulent (B)

De plus, la résistance des voies aériennes varie avec le calibre bronchique (elle est inversement proportionnelle au rayon bronchique) et dépend donc du volume pulmonaire ce qui peut avoir une importance capitale lorsque les mesures sont effectuées chez des animaux soumis à une ventilation artificielle volumétrique.

Le second paramètre habituellement mesuré pour rendre compte de la réactivité bronchique est la compliance dynamique pulmonaire  $C_{dyn}$ . Elle peut être définie comme la capacité du système thoraco-pulmonaire à se laisser déformer par les gaz. D'un point de vue physique, il s'agit du rapport de la variation de volume  $\Delta V$  obtenue sur la variation de pression  $\Delta P$  développée lors d'un mouvement respiratoire, exprimé en mL/cmH<sub>2</sub>O :

$$C_{dyn} = \Delta V / \Delta P$$

Elle peut être divisée en une composante thoracique, pariétale, facilement éliminée par la réalisation de mesures intra-thoraciques, et en une composante pulmonaire qui dépend des propriétés élastiques du poumon et de la tension de surface alvéolaire. Il n'y a pas d'atteinte alvéolaire dans l'asthme mais la bronchoconstriction des voies aériennes distales s'accompagnerait d'une altération des propriétés élastiques du poumon périphérique expliquant la diminution de la compliance pulmonaire constatée lors des tests de provocation

bronchique. Notons aussi que la compliance dynamique (par opposition à la compliance statique qui nécessite une pause dans le cycle respiratoire) est influencée par la résistance des voies aériennes (qui n'ont pas le temps de se vidanger complètement si le cycle respiratoire n'est pas suspendu).

La mesure de ces 2 paramètres est facilement réalisable chez des gros animaux. En effet, après une anesthésie adaptée, il est possible d'intuber ces animaux par voie oro-trachéale. La plupart du temps, il gardent une ventilation spontanée suffisante pour assurer une hématoxose correcte, la ventilation artificielle étant possible mais pas nécessaire. La mise en place d'une sonde de mesure de la pression dans la trachée permet de mesurer la pression trachéale reflétant la pression alvéolaire. L'extrémité proximale de la sonde est reliée à un pneumotachographe qui mesure les débits ventilatoires et fournit, par intégration de la courbe des débits en fonction du temps, une mesure des volumes respiratoires (figure 15).

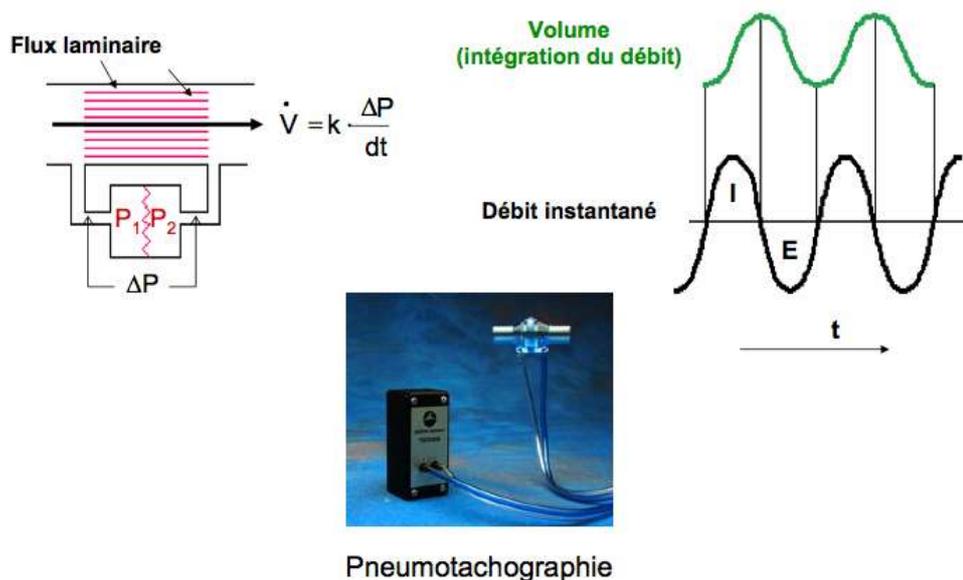


Figure 15 : mesure des volumes pulmonaires par pneumotachographie. La création d'un flux laminaire à travers la valve du pneumotachographe permet de calculer les débits aériens à partir des variations de pression  $\Delta P$  ; d'après S. Launois-Rollinat, faculté de médecine de Grenoble

Une sonde oesophagienne permet de mesurer parallèlement la pression oesophagienne intra-thoracique qui reflète la pression pleurale (figure 16). Cette dernière peut aussi être mesurée par la mise en place d'un cathéter intra-thoracique.

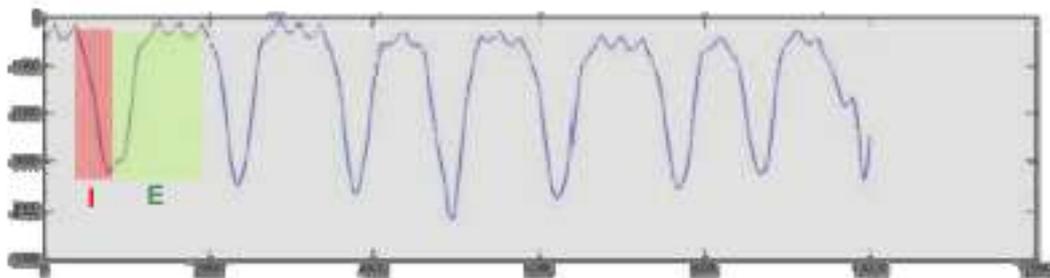


Figure 16 : cathéter et courbe de pression intra-oesophagiens ; d'après S. Launois-Rollinat, faculté de médecine de Grenoble

La différence entre la pression trachéale et la pression oesophagienne donne la pression trans-pulmonaire (figure 17) dont les variations permettent de calculer la résistance et la compliance dynamique pulmonaires (en supposant les flux respiratoires laminaires). La sonde d'intubation trachéale peut être équipée d'un dispositif d'aérosolisation si bien que ces valeurs peuvent être obtenues à l'état

basal et après inhalation d'agents bronchoconstricteurs spécifiques ou non spécifiques.

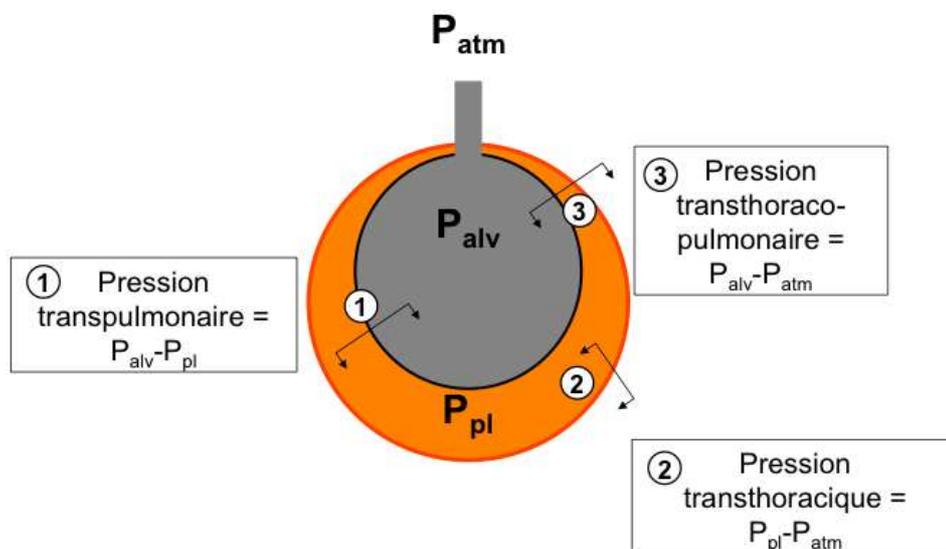


Figure 17 : pression transpulmonaire et pressions impliquées dans la mécanique ventilatoire ; d'après S. Launois-Rollinat, faculté de médecine de Grenoble.

Ce dispositif a été utilisé chez le mouton asthmatique : l'administration d'agents bronchoconstricteurs non spécifiques comme les agonistes cholinergiques (carbachol), l'histamine, les sulfites (métabisulfite), les leucotriènes D4, la bradykinine, l'élastase ou encore l'air froid entraîne une augmentation des résistances pulmonaires supérieure à celle constatée chez des moutons sains, témoignant d'une hyperréactivité bronchique non spécifique (Abraham, 2008). De plus, l'administration d'aérosols d'Ascaris à des moutons sensibilisés déclenche, comme chez l'homme, une réponse spécifique en 2 temps avec une réponse bronchoconstrictrice précoce et une réponse tardive chez environ la moitié des animaux (figure 18). Cette bronchoconstriction déclenchée par l'allergène s'accompagne d'une hyperréactivité non spécifique pendant environ 24h chez les

moutons ayant une réponse monophasique et durant 1 à 2 semaines chez les répondeurs biphasiques, ce dernier phénotype étant donc plus sévère.

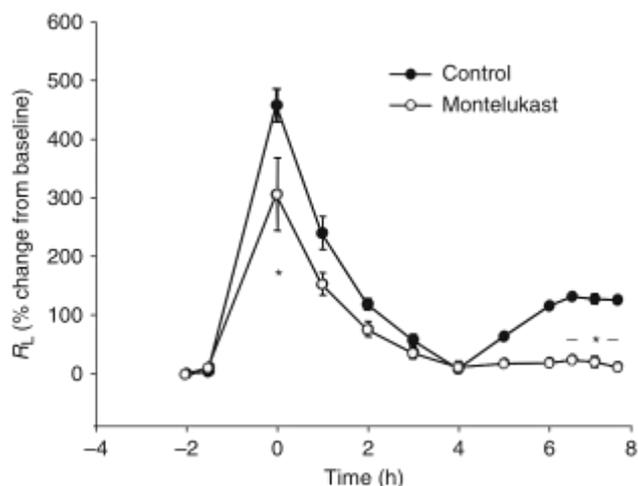


Figure 18 : augmentation de la résistance pulmonaire  $R_L$  précocément (h=0) et tardivement (h=5) après provocation par aérosols d'*Ascaris*. La réponse biphasique est ici atténuée par l'administration de Montelukast ; Shichijo et al, 2009

La distinction de 2 groupes de répondeurs différents aux tests de provocation bronchique spécifiques a permis l'étude de leur profil pharmacologique et la mise en évidence du rôle de plusieurs médiateurs également impliqués chez l'homme qui constituent des pistes thérapeutiques potentielles (figure 19).

Pharmacologic profile of the sheep model of asthma

	Sheep			Man		
	EAR	LAR	AHR	EAR	LAR	AHR
Antihistamines ( $H_1$ )	+/-	-	-	+/-	-	-
Anticholinergics	-	-	-	-	-	-
Antiallergics	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Adrenergics <sup>a</sup>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Steroids	-	+	+	+/-	+	+
Non-steroidal anti-inflammatory <sup>a</sup>	-	-	+	-	-	+
Methylxanthines	-	+	ND	-	+	ND
Cys LTD <sub>4</sub> antagonists/5-LO inhibitors	+/-	+	+/-	+/-	+	+
Tryptase inhibitors	+/-	+	+	+/-	+	-
Selectin inhibitors	+	+	+	-	+	-

+ : Yes, - : no, +/- : variable effect, ND: not determined.

Figure 19 : profil pharmacologique des modèles d'asthme chez le mouton. EAR : réponse précoce à l'allergène ; LAR : réponse tardive ; AHR : hyperréactivité bronchique non spécifique ; d'après W.M. Abraham, 2008

Il est intéressant de constater que les 2 groupes de répondeurs n'ont pas la même sensibilité aux agents pharmacologiques inhibiteurs : les anti-histaminiques sont efficaces sur la réponse précoce chez les répondeurs aigus mais pas chez les animaux ayant une réponse biphasique car chez ces derniers la réponse précoce met en jeu d'autres médiateurs comme les leucotriènes et les prostaglandines ce qui atténue l'efficacité des anti-histaminiques. Cette classe thérapeutique n'a par contre aucun effet sur la réponse tardive. A l'inverse, les anti-inflammatoires stéroïdiens ne sont efficaces que sur la réponse tardive à l'allergène et sur l'hyperréactivité bronchique non spécifique qui reposent donc sur des mécanismes spécifiques (Abraham, 2008). Les similitudes existant entre l'asthme ovin et l'asthme humain font du mouton un bon modèle d'étude pharmacologique.

Chez le lapin, l'exposition précoce (néonatale) à *Alternaria tenuis* associé à de l'aluminium, suivie de challenges respiratoires à l'aide d'aérosols d'*Alternaria*, entraîne une hyperréactivité bronchique non spécifique à l'histamine 24 heures après la provocation (figure 20) mais elle existe aussi avec la métacholine et l'adénosine. Cette hyperréactivité persiste 24 à 48 heures après les challenges. Les lapins exposés précocement présentent, comme les patients asthmatiques, une réponse bronchique spécifique à l'allergène en 2 phases, une phase précoce et une phase tardive répondant mal aux  $\beta$ -2 mimétiques. Là aussi, les similitudes physiopathologiques avec l'homme ont fait du lapin un modèle d'étude préclinique pour de nombreuses drogues anti-asthmatiques avec des résultats souvent similaires entre les 2 espèces (Keir et Page, 2008).

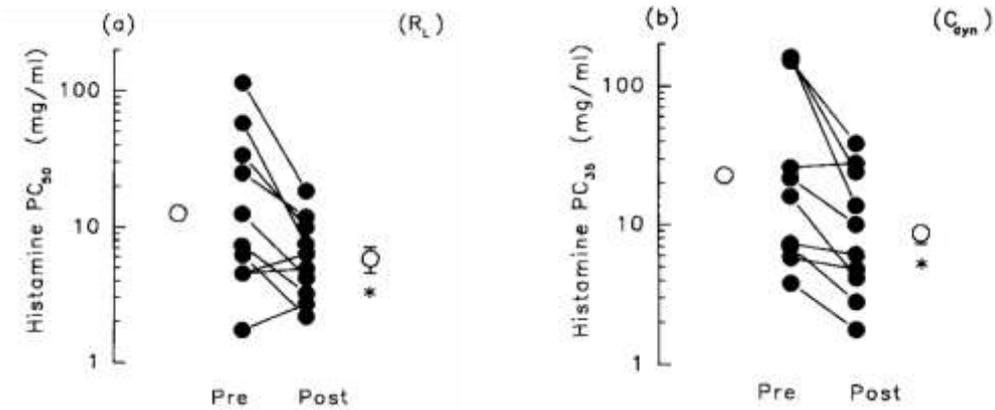


Figure 20 : tests de provocation non spécifique à l'histamine chez le lapin avant et après challenge allergénique. (a) diminution de la PC<sub>50</sub> ou concentration en histamine associée à une augmentation de 50 % des résistances pulmonaires (b) diminution de la PC<sub>35</sub> ou concentration en histamine associée à une diminution de 35 % de la compliance dynamique pulmonaire ; d'après Herd et al, 1995

Chez le chien, il existe également une hyperréactivité bronchique non spécifique et spécifique mesurable. L'inhalation d'aérosols d'ambrosie par des chiens sensibilisés déclenche une augmentation de la résistance et une diminution de la compliance pulmonaires après administration d'agents bronchoconstricteurs (figure 21).

**Table 3** Effect of ragweed challenge on  $R_L$  and  $C_{Dyn}$  in sensitized and non-sensitized dogs

	Sensitized		Non-Sensitized	
	$R_L$ (% increase)	$C_{Dyn}$ (% decrease)	$R_L$ (% increase)	$C_{Dyn}$ (% decrease)
Challenge 1	+74 ± 19*	-35 ± 4*	+2 ± 2	-6 ± 1
Challenge 2	+95 ± 24*	-37 ± 5*	+5 ± 1	-4 ± 1
Challenge 3	+64 ± 13*	-40 ± 5*	+2 ± 1	-11 ± 1

Aerosolized ragweed challenge for studies involving NKA (Challenge 1), histamine (Challenge 2), and methacholine (Challenge 3).

Values represent mean ± SEM (n = 19 for sensitized and 12 for non-sensitized).

\*P < 0.05 compared to non-sensitized.

Figure 21 : test de provocation bronchique non spécifique chez le chien asthmatique ; d'après House et al, 2001

L'hyperréactivité bronchique spécifique et notamment l'existence ou non d'une réponse tardive à l'exposition allergénique sont moins bien connues chez le

chien. Par contre, une des originalités du modèle canin réside dans la possibilité d'étudier la résistance pulmonaire périphérique qui reflète l'implication des petites voies aériennes dans l'asthme. L'existence d'un réseau de ventilation collatéral développé autorise en effet la réalisation d'une bronchoscopie rigide jusqu'au poumon distal et la mesure de la pression distale nécessaire au calcul de la résistance pulmonaire périphérique. Cette technique qui permet aussi la réalisation de challenges locaux, à travers le bronchoscope, a mis en évidence l'implication des voies aériennes distales dans l'asthme dont on sait aujourd'hui qu'elle existe aussi chez l'homme (Chapman, 2008). Enfin, la mesure invasive de la résistance et de la compliance pulmonaire a également été réalisée de façon plus anecdotique chez d'autres gros animaux comme le chat ou le singe bien que chez ce dernier la technique des oscillations forcées soit privilégiée.

L'utilisation d'un dispositif de mesure invasif pose cependant plusieurs problèmes. D'abord les animaux sont sédatés ce qui pose la question de l'influence de l'anesthésie sur la mécanique ventilatoire et de l'intérêt de données issues d'animaux non vigiles. De plus, il est difficile d'appliquer ce dispositif aux petits animaux de laboratoires pourtant de plus en plus utilisés. Ces limites ont amené les expérimentateurs à développer d'autres techniques d'étude de la fonction respiratoire.

### **b. Apports de la pléthysmographie**

La pléthysmographie est une technique permettant la mesure des volumes pulmonaires dans une enceinte close munie de capteurs de pression ; elle présente l'avantage de mesurer les volumes pulmonaires non mobilisables. Elle

repose sur la loi de Boyle et Mariotte selon laquelle, à température constante, le produit entre la pression  $P$  et le volume d'un gaz  $V$  est constant. Entre 2 volumes de gaz à même température mais à des pressions différentes, on peut écrire :

$$P1.V1 = P2.V2$$

La pléthysmographie corporelle totale, utilisée chez l'homme, consiste à enfermer un individu dans une cabine hermétique reliée à des capteurs de pression et munie d'un pneumotachographe (figure 22).

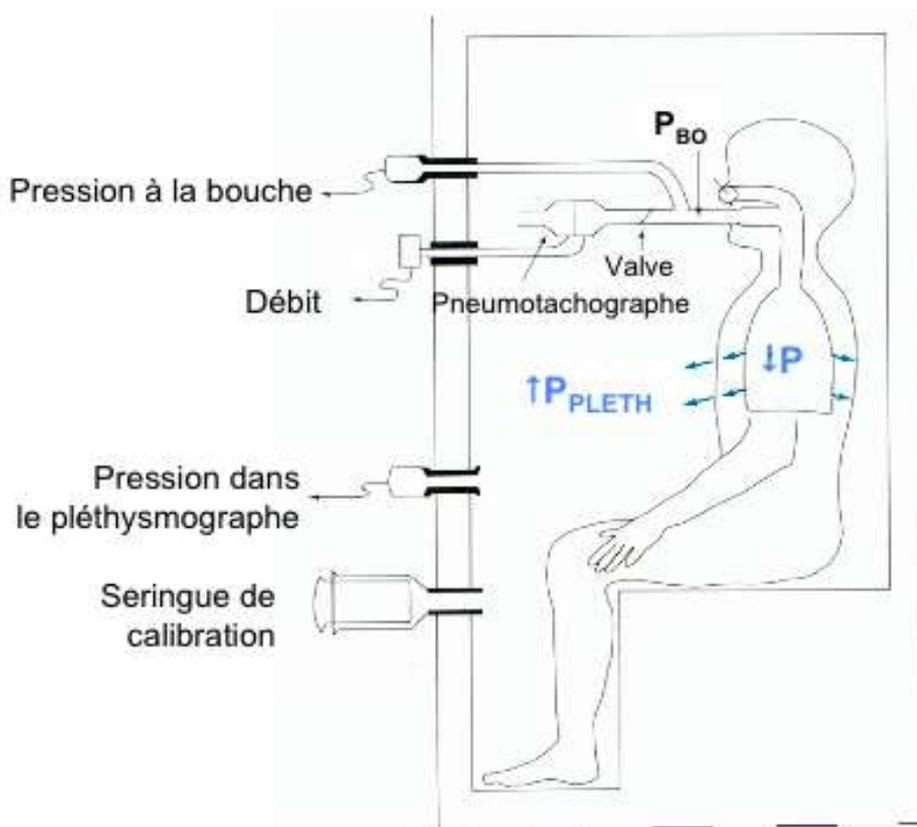


Figure 22 : pléthysmographie corporelle totale, d'après S. Launois-Rollinat, faculté de médecine de Grenoble

Les variations de volumes et de pression liées aux mouvements respiratoires peuvent ainsi être enregistrées : elles sont inversement proportionnelles dans le thorax et dans la cabine de pléthysmographie. L'effort inspiratoire déclenche qui

une dépression alvéolaire et une augmentation du volume pulmonaire entraîne, à l'inverse, une diminution du volume de gaz et une augmentation de la pression dans la cabine. La pression mesurée à la bouche reflète la pression alvéolaire. Donc, en mesurant les variations de pression et de volume dans la cabine d'une part et les variations de pression buccale d'autre part, on peut obtenir le volume gazeux thoracique (ou la CRF). De plus, la mesure du débit ventilatoire à la bouche par le pneumotachographe permet de définir la relation existant entre débit et pression qui définit la résistance des voies aériennes (figure 23).

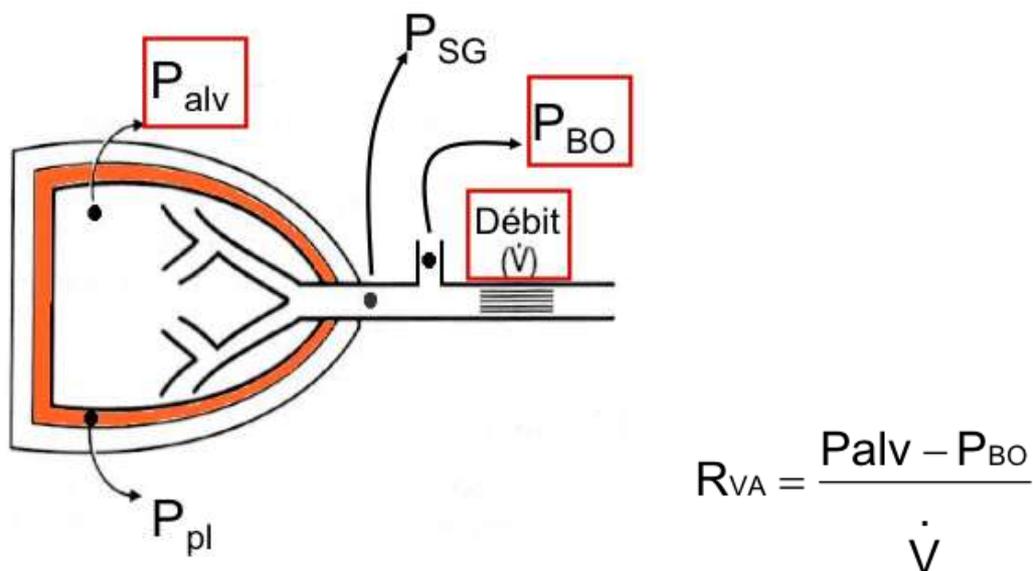


Figure 23 : mesure de la résistance des voies aériennes  $R_{VA}$  en pléthysmographie.  $P_{BO}$  pression buccale,  $P_{ALV}$  pression alvéolaire ; d'après S. Launois-Rollinat, faculté de médecine de Grenoble

Cette technique, qui nécessite la coopération du sujet, a été adaptée à l'animal pour obtenir des données interprétables. Parmi les différents dispositifs commercialisés, un des plus utilisés est la pléthysmographie corporelle totale par mesure des débits respiratoires. Elle est réalisée dans une enceinte non close divisée en 2 chambres chacune munies d'un pneumotachographe pour créer un

flux d'air laminaire et d'un capteur de pression. Les différences de pression entre les 2 chambres générées par les mouvements respiratoires de l'animal permettent de calculer les débits respiratoires (figure 24).

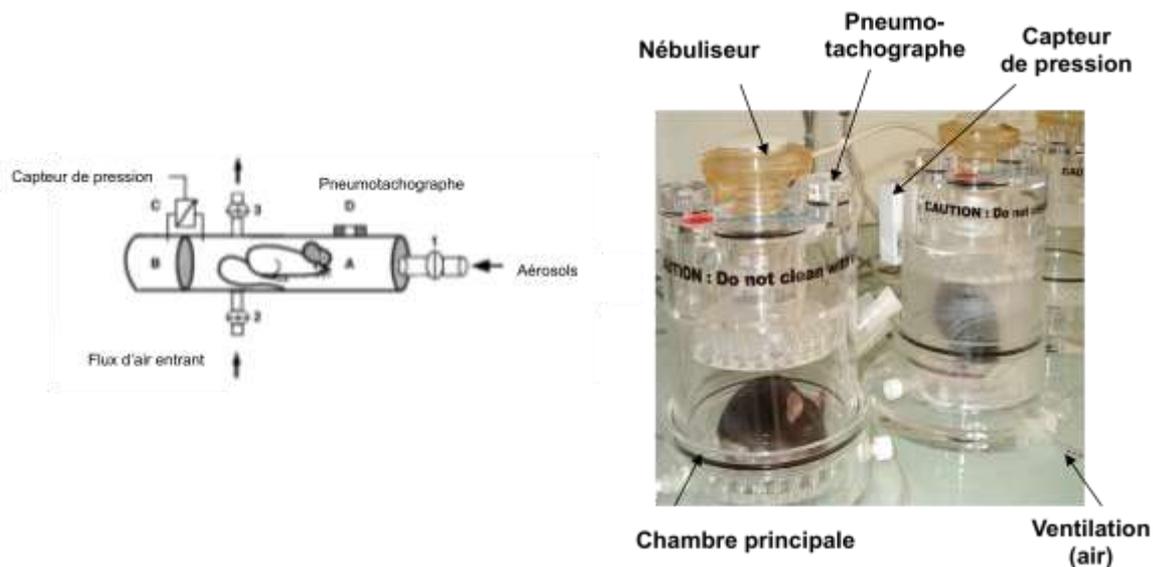


Figure 24: pléthysmographie corporelle totale chez la souris, d'après Hamelmann et al, 1997

Ce dispositif est disponible pour de nombreux animaux y compris de gros animaux et présente plusieurs avantages. Il est d'abord simple d'utilisation et permet l'étude simultanée d'un grand nombre d'animaux, contrairement aux techniques de mesures invasives. Les mesures sont effectuées dans des conditions physiologiques sur un animal vigile, peu stressé, qui ne subit ni les effets de l'anesthésie ni ceux de l'intubation. De plus, il permet une étude longitudinale des animaux qui peuvent subir des mesures répétées alors que les techniques invasives nécessitent l'euthanasie des animaux. Enfin, il fournit de nombreux paramètres respiratoires : volume courant, fréquence respiratoire, durée d'inspiration et d'expiration, pressions d'inspiration et d'expiration et un paramètre calculé, très utilisé dans les études sur l'asthme, appelé Penh (Pause

enhanced). Bien que l'abondance des données obtenues soit un argument commercial développé par les fabricants de ces pléthysmographes, une étude récente a montré, chez des souris asthmatiques, qu'aucun de ces paramètres respiratoires ne rend compte des modifications fonctionnelles associées à l'asthme, même après un test à la métacholine (Vanoirbeek et al, 2010). Dans cette étude, la Penh n'a volontairement pas été évaluée car elle a déjà fait l'objet de plusieurs publications remettant en cause sa validité.

La Penh est un index d'hyperréactivité bronchique. C'est une grandeur sans unité obtenue lors d'un test à la métacholine et calculée à partir de la partie expiratoire de la courbe respiratoire de l'animal (figure 25). La bronchoconstriction s'accompagne d'une augmentation de l'aire sous la courbe expiratoire se traduisant par un pic en début d'expiration et par une augmentation de la Penh.

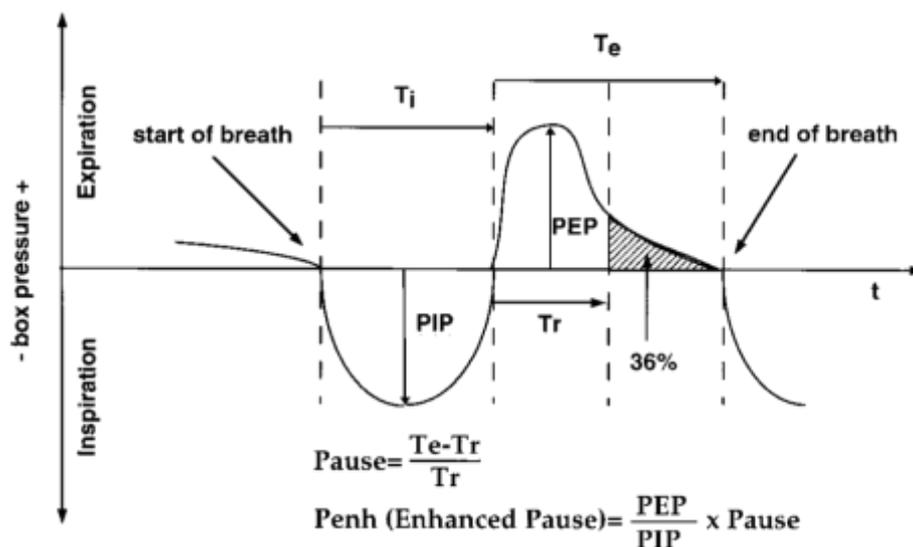


Figure 25 : calcul de la Penh ; d'après Hamelmann et al, 1997

Il été montré que la valeur basale de la Penh mais surtout son augmentation lors du test à la métacholine est supérieure chez des souris asthmatiques de souche Balb/c exposées à l'ovalbumine en comparaison avec des souris saines (figure 26).

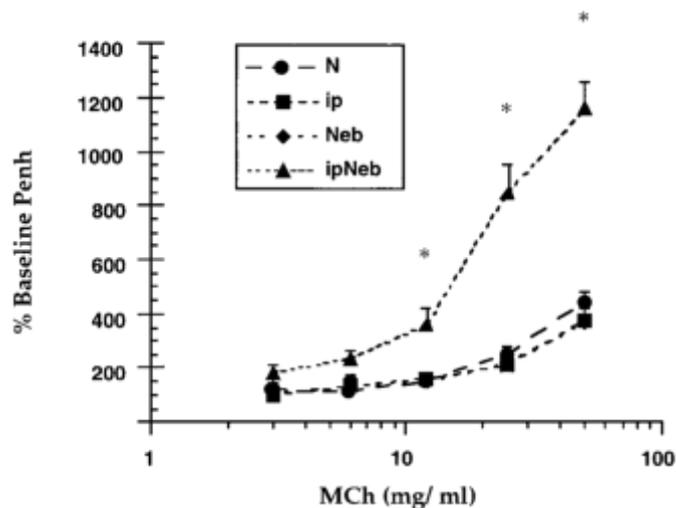


Figure 26 : test à la métacholine. Augmentation de la Penh chez des souris asthmatiques (courbe supérieure) ; d'après Hamelmann et al, 1997

Cette hyperréactivité bronchique est inhibée par l'administration de  $\beta$ -2 mimétiques. De plus, les valeurs de Penh semblent corrélées avec la résistance pulmonaire mesurée chez les mêmes souris de façon invasive (Hamelmann et al, 1997).

Ce paramètre simple a été massivement utilisé dans les travaux portant sur l'asthme animal notamment chez les petits animaux mais il a récemment fait l'objet de critiques virulentes. En effet, il faut d'abord signaler que les valeurs de Penh obtenues présentent toujours une grande variabilité : pour la réduire, chaque groupe doit comporter au moins une quinzaine de souris ce qui implique une logistique contraignante et coûteuse. Mais c'est surtout la validité de la valeur

Penh qui a été questionnée. En effet, lors de la respiration, les variations de pression enregistrées dans la chambre de pléthysmographie résultent de l'effet de 2 phénomènes physiques : le conditionnement de l'air et la résistance des voies aériennes. Lors de l'inspiration, l'air passe de la chambre de pléthysmographie dans les voies aériennes supérieures de l'animal ce qui entraîne un réchauffement et une humidification associés à une dilatation du volume inspiré et donc à une augmentation des pressions mesurées, indépendante de la résistance des voies aériennes mais dépendante des conditions ambiantes (figure 27). C'est l'effet de conditionnement.

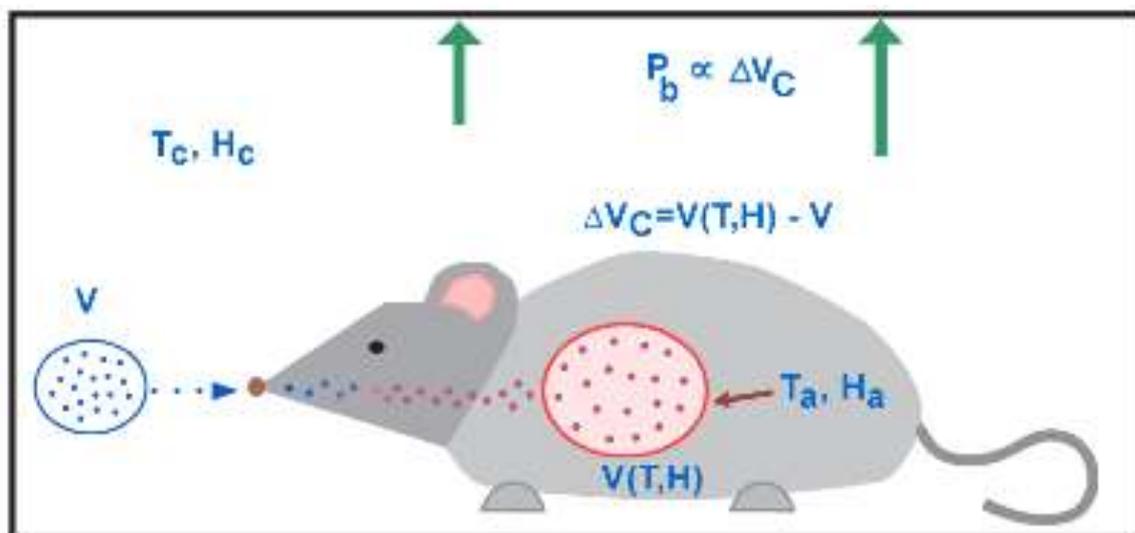


Figure 27 : effet de conditionnement de l'air ; d'après M. Lomask, 2006

Bien sûr, s'il existe une bronchoconstriction asthmatique, elle va entraîner une augmentation des résistances des voies aériennes et une augmentation supplémentaire des pressions mesurées mais il n'existe aucun moyen, en pléthysmographie corporelle totale, de faire la part entre les variations de pression générées par le conditionnement et celles liées à la résistance des voies aériennes (Mitzner et Tankersley, 2003). Cependant, dans la partie précoce de la

courbe expiratoire, à partir de laquelle est calculée la Penh, l'effet de conditionnement est moindre que pendant l'inspiration et le reste de l'expiration (Lomask, 2006). S'il existe une augmentation des résistances importante, c'est donc durant cette période qu'elle pourra être détectée. Par ailleurs, il est possible que l'augmentation des résistances des voies aériennes constatée soit en partie générée au niveau du nez notamment chez des animaux qui ne respirent naturellement que par le nez, comme les souris. Enfin, il a été montré que la Penh n'est plus corrélée à la résistance pulmonaire au-delà 5 jours après le challenge et qu'elle peut varier selon les souches de souris, Balb/c ou C57/BL6 (Adler et al, 2006). Ainsi, la Penh apparaît comme un paramètre certes simple à obtenir mais très dépendant des conditions d'expérimentation et peu sensible. Malgré sa popularité, la Penh ne doit être utilisée que comme outil de dépistage de tendances respiratoires sur de grands effectifs avec des mesures répétées et l'hyperréactivité bronchique doit être confirmée par une autre technique de mesure.

D'autres dispositifs utilisant la pléthysmographie non invasive ont été imaginés. La pléthysmographie corporelle tête exclue permet de calculer l'EF50 (tidal midexpiratory flow), exprimé en mL/s. Ce paramètre reflète la bronchoconstriction et permet d'évaluer l'hyperréactivité bronchique spécifique ou non. Il s'agit de placer un animal de petite taille dans une chambre de pléthysmographie mais en laissant sa tête sortir par un orifice hermétique. Cette chambre est munie de capteurs de pression et d'un pneumotachographe (figure 28).

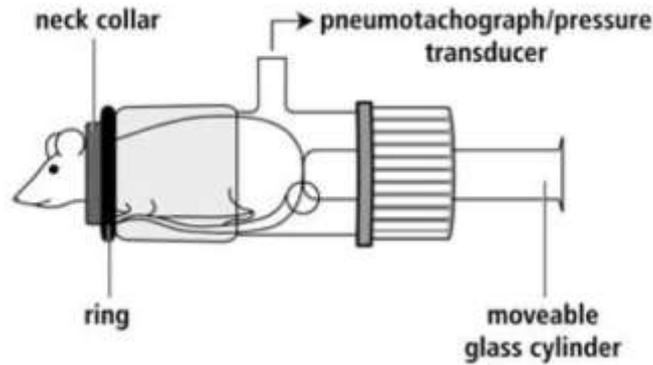


Figure 28 : pléthysmographie corporelle tête exclue ; d'après Glaab et al, 2007

Ce dispositif permet de soumettre l'animal à des aérosols et de mesurer les variations de débits inspiratoires et expiratoires qui fournissent, par intégration en fonction du temps, le volume courant. Il a été montré que la bronchoconstriction s'accompagne chez la souris d'une diminution du volume courant et de la fréquence respiratoire et d'un allongement du temps expiratoire dont la diminution de l'EF50 rend compte de manière fiable (figure 29).

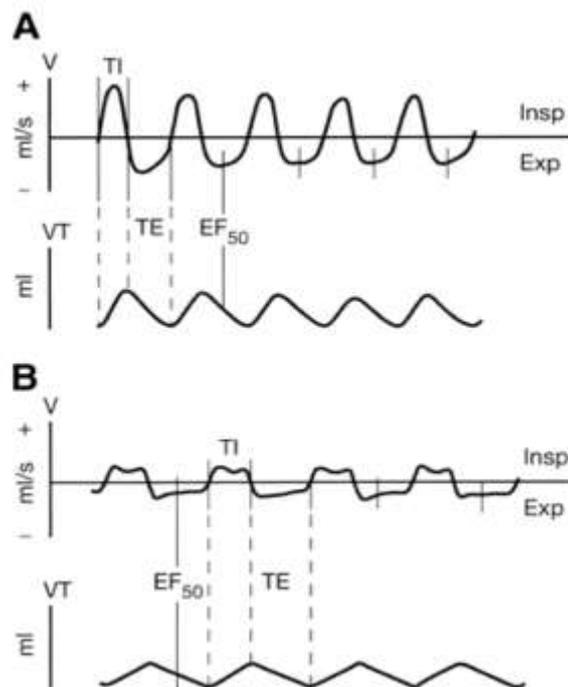


Figure 29 : paramètres respiratoires avant (A) et après (B) challenge par la métacholine ; d'après Glaab et al, 2007

Des études de validation ont mis en évidence une corrélation entre l'EF50, la résistance pulmonaire et la compliance dynamique (Glaab et al, 2007). Ce dispositif non invasif, présente donc les mêmes avantages que la pléthysmographie corporelle totale mais il fournit un paramètre respiratoire reposant sur des principes physiques clairs et non contestables. Il s'agit d'un débit, exprimé en mL/s, permettant une appréciation quantitative des modifications respiratoires et une comparaison chiffrée entre les animaux que la Penh n'autorise pas.

Un autre dispositif doit être présenté : la pléthysmographie double chambre. Il est constitué de 2 chambres : une première chambre qui contient le compartiment thoraco-abdominal de l'animal et une seconde, dite chambre nasale, qui contient la tête de l'animal ; cette dernière permet la réalisation d'aérosols. Ces 2 chambres sont reliées par un orifice hermétique entourant le cou de l'animal sans pression sur les voies aériennes. Elles sont dotées chacune d'un pneumotachographe et d'un capteur de pression différentielle permettant d'enregistrer les débits nasal et thoraco-abdominal (figure 30).

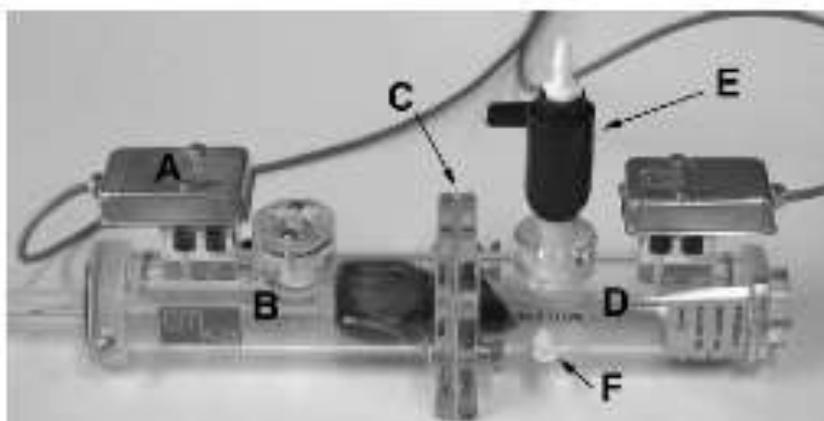


Figure 30 : pléthysmographie double chambre. A : capteur de pression. B : compartiment thoraco-abdominal. C : orifice hermétique. D : compartiment nasal; E : nébuliseur. F : orifice d'extraction de l'air expiré ; d'après Flandre et al, 2003

Plusieurs paramètres sont ainsi obtenus : temps et pressions de pic inspiratoires et expiratoires, fréquence respiratoire et volume courant. Le décalage entre les débits expiratoires nasal et thoraco-abdominal permet le calcul de la résistance des voies aériennes selon la formule de Pennock (Pennock et al, 1979). Il est également possible de calculer la Penh (figure 31).

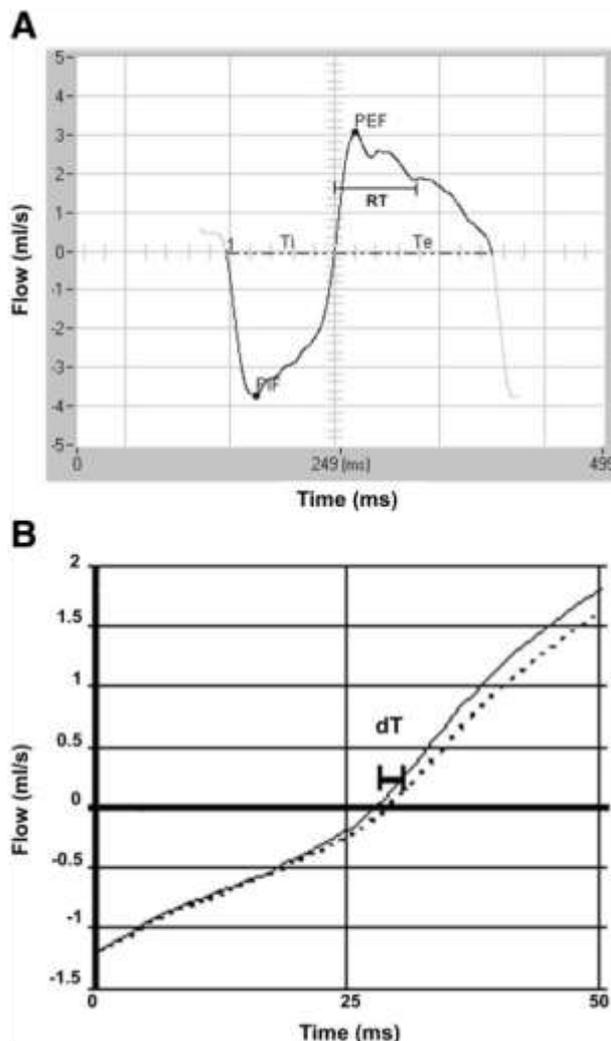


Figure 31 : débit thoraco-abdominal seul (A) et superposé au débit nasal montrant un retard expiratoire (B) ; d'après Flandre et al, 2003

Chez des souris saines, ce dispositif montre que tous ces paramètres respiratoires varient entre des souches différentes (Balb/c et C57/BL6). Par

contre, chez les souris de même souche, la résistance des voies aériennes reste comparable entre les sexes et à des âges différents, contrairement à la Penh qui est plus basse chez les mâles et diminue avec l'âge (Flandre et al, 2003). De plus, il est intéressant de noter que lors du test à la métacholine chez des souris asthmatiques, la pléthysmographie double chambre met en évidence une augmentation des résistances pulmonaires mais aussi des résistances nasales probablement par un mécanisme de vasodilatation à l'origine d'un œdème de la muqueuse. Dans ce modèle, l'augmentation des résistances nasales compte pour 50 % de l'augmentation totale des résistances soulignant ainsi l'importance de la composante rhinitique dans la résistance des voies aériennes chez ces modèles d'asthme allergique induits par voie nasale (Agrawal et al, 2008).

Une des applications récente et notable de la pléthysmographie est la pléthysmographie invasive (figure 32).

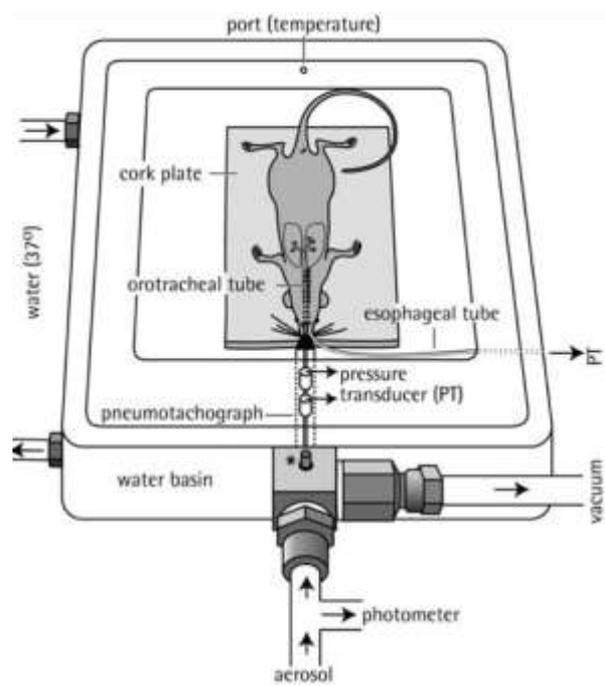


Figure 32 : pléthysmographie invasive chez la souris ; d'après Glaab et al, 2003

Cette technique est principalement réalisée sur des animaux de petite taille (rats, cochons d'inde et souris), anesthésiés, le plus souvent trachéotomisés (mais une intubation oro-trachéale est possible) et ventilés artificiellement. Ce système fournit les mesures classiques de résistance pulmonaires et de compliance dynamique ; il permet aussi de contrôler la ventilation de l'animal et de réaliser des manœuvres forcées : la manœuvre de la CRF utilise la loi de Boyle et Mariotte pour mesurer la CRF ; la manœuvre de pression-volume quasi-statique fournit les autres volumes pulmonaires et une mesure de la compliance pulmonaire statique ; enfin, la manœuvre de débit-volume forcés permet de calculer le FEV<sub>100</sub>, c'est à dire le volume expiratoire forcé pendant 100 ms. Ce dernier paramètre est particulièrement intéressant car il équivaut au VEMS humain. Il est également possible de rapporter le FEV<sub>100</sub> à la capacité vitale forcée pour obtenir un rapport de Tiffeneau adapté à la souris. Ces 2 paramètres reflétant l'obstruction bronchique sont significativement diminués lors du test à la métacholine chez des souris asthmatiques par rapport à des souris saines et constituent, dans une optique préclinique, des marqueurs très pertinents (Vanoirbeek et al, 2010).

### **c. Apports de la technique des oscillations forcées**

Le système respiratoire est un système oscillatoire caractérisé par une fréquence et des propriétés mécaniques propres. La technique des oscillations forcées consiste à appliquer au système respiratoire des forces oscillatoires externes et à étudier sa réponse pour en déduire des propriétés mécaniques. Le paramètre de réponse étudié est l'impédance,  $Z_{rs}$ , qui est déduite de la relation

instantanée entre pression et débit respiratoires. La force oscillatoire appliquée au système respiratoire peut être générée de plusieurs façons : par un haut-parleur placé devant la bouche et relié aux voies aériennes par un circuit fermé chez l'homme ou l'animal (figure 33), par un ventilateur artificiel muni d'un piston relié au circuit respiratoire et qui pousse périodiquement de l'air à la fréquence voulue chez l'animal (système flexiVent®, figure 34) ou encore par l'application cutanée sur le thorax d'un signal oscillatoire.

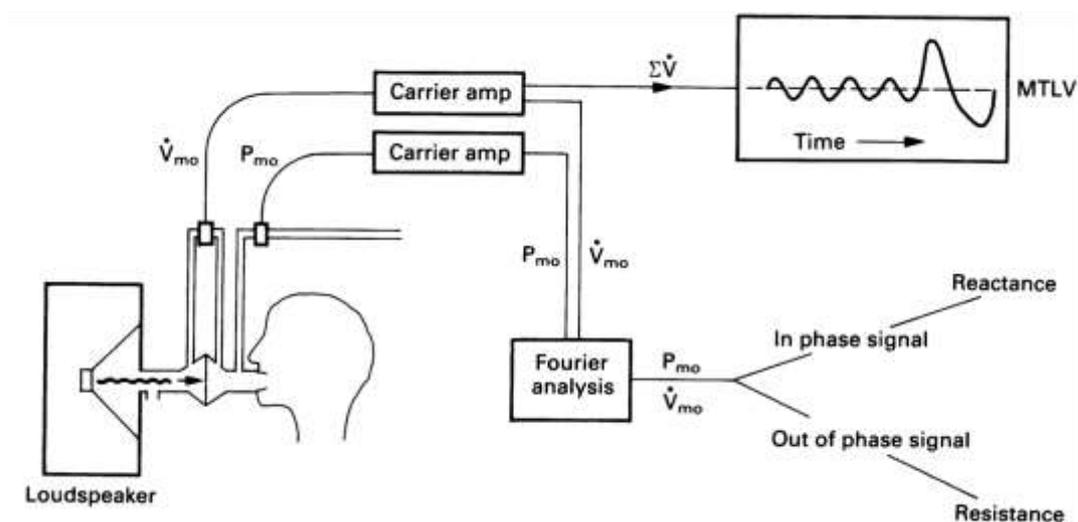


Figure 33 : technique des oscillations forcées : étude de l'impédance entrante par la mesure non invasive de la pression et du débit buccaux ; d'après N.B. Pride, 1992

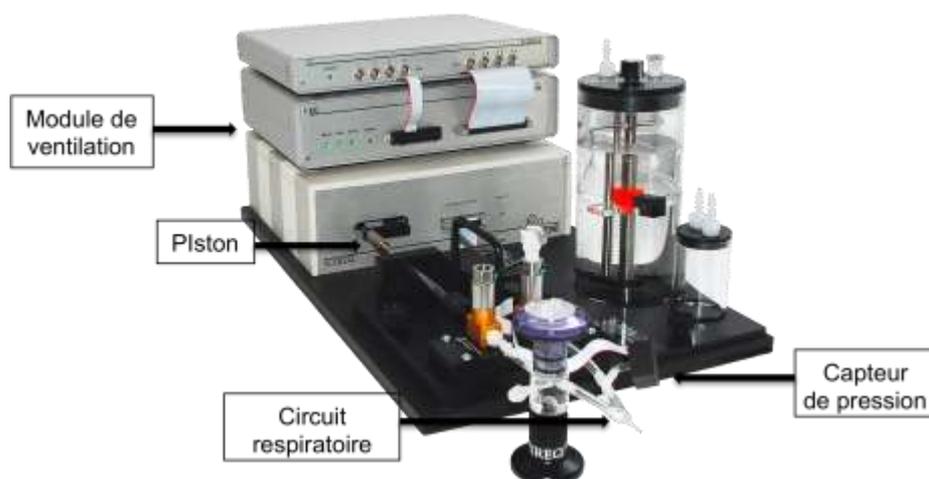


Figure 34 : technique des oscillations forcées : étude de l'impédance entrante par la mesure invasive de la pression et du débit buccaux ; système flexiVent

La réponse du système respiratoire à ces perturbations oscillatoires est enregistrée, en terme de pression et de débit, au niveau buccal et permet la mesure de l'impédance entrante ( $Z_{in}$ ) lorsque la force oscillatoire est appliquée au niveau des voies aériennes et de l'impédance de transfert ( $Z_{tr}$ ) lorsque la force est appliquée au niveau du thorax. Le recueil des valeurs de pression et de débit respiratoires peut être fait de manière non invasive (figure 33) ou invasive (figure 34). L'impédance de transfert nécessite l'utilisation d'une chambre de pléthysmographie. Le signal oscillatoire externe peut avoir une fréquence unique (figure 35), plusieurs fréquences fixes appliquées successivement ou une multitude de fréquences différentes appliquées au hasard, l'analyse de la réponse pression-volume nécessitant alors l'utilisation de la transformation de Fourier qui permet l'étude d'un grand nombre de fréquences simultanément.

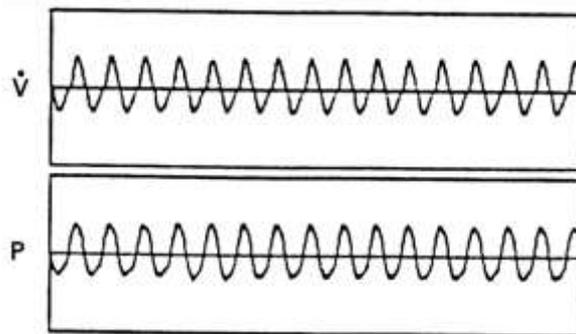


Figure 35 : exemple de réponse du système respiratoire lors de l'application d'une perturbation monosinusoidale (débit en haut et pression en bas), d'après N.B. Pride, 1992

L'utilisation de la technique des oscillations forcées chez l'homme comme chez l'animal repose sur une constatation simple : les propriétés mécaniques du système respiratoire, représentées par l'impédance, varient avec la fréquence des oscillations et ces variations sont amplifiées dans certains états pathologiques comme l'asthme. L'interprétation de l'impédance repose sur

l'utilisation d'un modèle mathématique dit « de constance de phase ». Dans ce modèle, le système respiratoire est assimilé à une structure simple associant un compartiment pulmonaire caractérisé par des propriétés visco-élastiques relié à une voie aérienne caractérisée par sa résistance (figure 36).

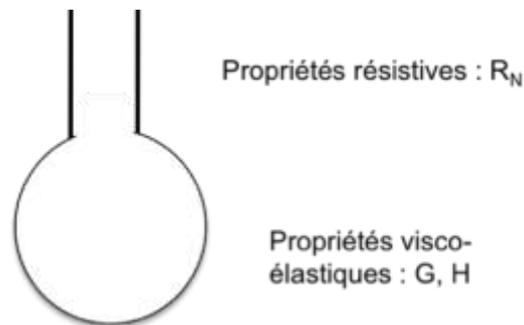


Figure 36 : modèle pulmonaire bicompartmental

$R_N$  est la résistance newtonienne c'est à dire la résistance des voies aériennes,  $G$  est la conductance des tissus c'est à dire l'inverse de la résistance et  $H$  est l'élastance des tissus c'est à dire l'inverse de la compliance. L'impédance du système respiratoire,  $Z_{in}$ , lie  $R_N$ ,  $G$  et  $H$  en fonction de la fréquence des oscillations :

$$Z_{in}(f) = R_N + i2\pi fI + \frac{G - iH}{(2\pi f)^\alpha}$$

Cette fonction complexe peut être séparée en deux fonctions indépendantes : la première partie, ou partie réelle, est appelée résistance et reflète la résistance des voies aériennes, c'est à dire le poumon central ; la seconde partie, ou partie imaginaire, est appelée réactance et reflète les propriétés élastiques du poumon, c'est à dire le poumon périphérique. De plus, dans des poumons pathologiques, l'existence d'inhomogénéités ventilatoires régionales (bronchoconstriction) entraîne une augmentation plus importante de  $G$  que de  $H$  après un test à la

métacholine (figure 37) ; à l'inverse, s'il existe plutôt un phénomène de dérecrutement (atélectasie), G et H augmentent proportionnellement et le rapport G/H, également appelé hystérèse, reste inchangé.

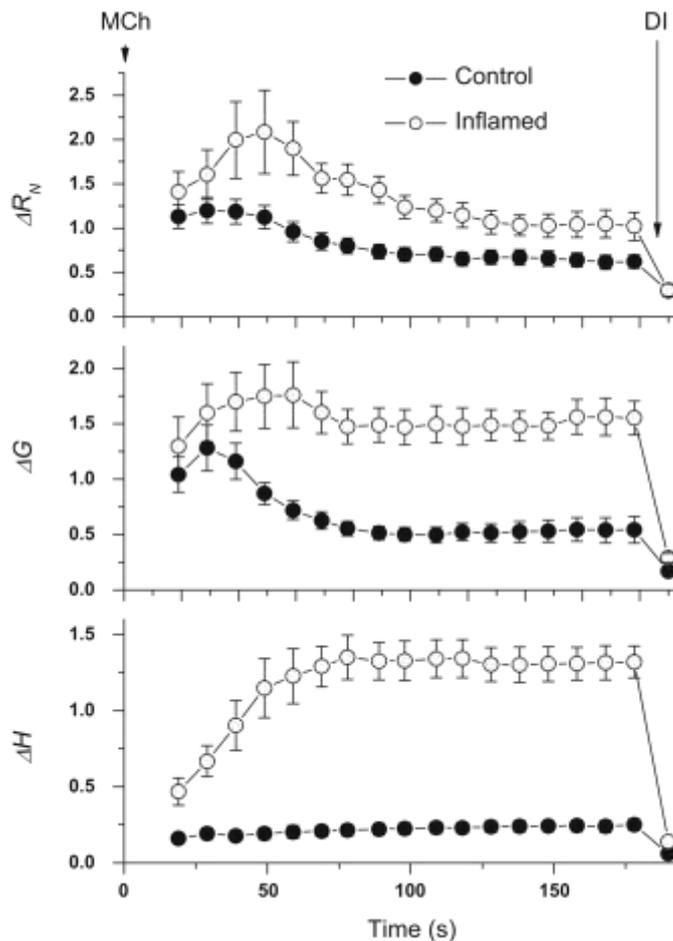


Figure 37 : augmentation significative de  $R_N$ , et surtout de G et de H après administration de métacholine à des souris asthmatiques suggérant l'implication du poumon périphérique probablement par dérecrutement d'unités pulmonaires (G/H stable) ; d'après Bates et al, 2009

La technique des oscillations forcées permet donc de distinguer l'implication des voies aériennes centrales et celle du poumon périphérique dans l'hyperréactivité bronchique, ce que les autres techniques ne peuvent pas faire. Elle fournit aussi des indications sur les mécanismes impliqués (inégalités ventilatoires régionales ou dérecrutement d'unités pulmonaires) par l'étude de l'hystérèse (Bates et al,

2009). Ces dernières données peuvent être confirmées par des techniques d'imagerie dont nous allons reparler. Notons que l'APTI (airway pressure time index) qui représente l'air sous la courbe de pression respiratoire en fonction du temps est aussi une mesure d'impédance pulmonaire. Ce paramètre simple est obtenu de manière invasive chez des animaux soumis à un agent bronchoconstricteur et est parfois utilisé pour rendre compte de la réactivité bronchique. Mais il est associé à un modèle pulmonaire unicompartmental et ne permet pas de séparer les résistances centrales et périphériques (Zosky et Sly, 2007).

La technique des oscillations forcées est utilisable chez les petits animaux, notamment la souris. Elle nécessite alors une passivité parfaite de l'animal obtenue par sédation et curarisation ce qui implique bien sûr le sacrifice des animaux et l'impossibilité de réaliser des études longitudinales. Les oscillations forcées ont été beaucoup utilisées pour étudier l'hyperréactivité bronchique chez le singe. Elles ont permis de montrer que les modifications des propriétés mécaniques après challenge par *Ascaris* chez le singe sont très proches de celles obtenues chez l'homme par la même technique, ce qui fait de cet animal un excellent modèle d'hyperréactivité bronchique (Black et al, 2001).

#### **d. Autres techniques**

L'évaluation de l'hyperréactivité bronchique par des techniques plus modernes reposant sur l'imagerie du petit animal ou encore sur la modélisation *in silico* a permis d'apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes impliqués.

L'application de l'imagerie par résonance magnétique à la souris est vrai défi technique du fait de la petite taille et du faible volume courant de ces animaux (environ 200  $\mu$ L). L'IRM au  $^3\text{He}$  repose sur l'administration d'hélium par voie respiratoire avant et après un challenge à la métacholine et constitue un outil très sensible fournissant une cartographie broncho-pulmonaire précise à partir de laquelle il est possible de mesurer les calibres bronchiques et la ventilation pulmonaire. Cette technique d'imagerie suggère que l'hyperréactivité bronchique est un phénomène hétérogène au sein du poumon et qu'il existe simultanément des zones saines et des zones de bronchoconstriction associées à un collapsus pulmonaire en aval (figure 38). Il s'agit en outre d'un outil de recherche translationnelle intéressant car ces techniques d'imagerie sont applicables à l'homme (Driehuys et al, 2007).

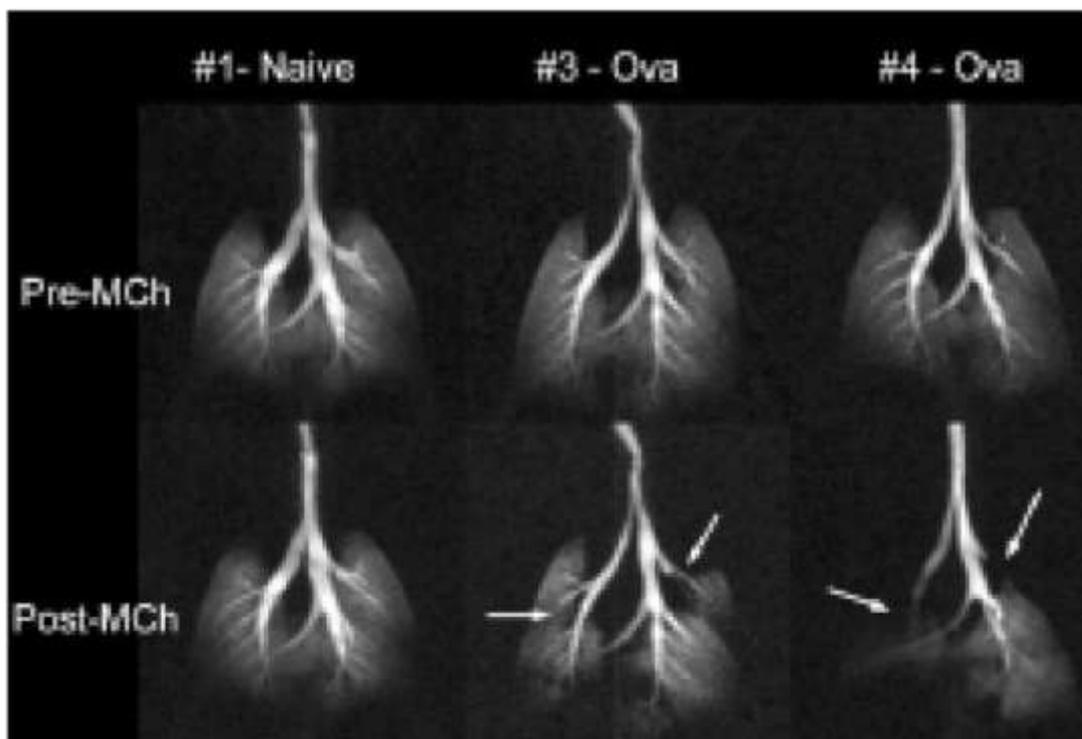


Figure 38 : morphologie broncho-pulmonaire normale avant et après challenge chez une souris saine (gauche) ; bronchoconstriction et collapsus d'aval après challenge chez des souris asthmatiques (milieu et droite) ; d'après Driehuys et al, 2007

L'autre technique apportant des informations nouvelles sur les mécanismes de l'hyperréactivité bronchique est la modélisation *in silico*. Elle consiste à élaborer des programmes informatiques permettant de reproduire les données obtenues *in vivo* et même de les prolonger en produisant des données issues de conditions extrêmes auxquelles les animaux ne survivraient pas comme par exemple les exacerbations mortelles de l'asthme. Elle permet aussi d'additionner virtuellement les effets de plusieurs mécanismes d'hyperréactivité bronchique pour mieux la comprendre. Chez la souris, on sait que l'allergie respiratoire induite par l'ovalbumine est associée à un épaissement de la paroi bronchique, responsable, au moins en partie, de l'augmentation des résistances lors d'un test à la métacholine. En outre, on sait que l'administration de poly-L-lysine, qui reproduit les effets de la protéine éosinophile cationique, provoque une hypercontractilité musculaire lisse également associée à une hyperréactivité bronchique chez la souris. Enfin, l'administration de poly-L-lysine à des souris allergiques provoque une hyperréactivité bronchique majeure voire fatale témoignant d'un effet synergique des 2 traitements lorsqu'ils sont conjugués. En utilisant un modèle informatique d'anatomie pulmonaire murine, il est possible de reproduire le profil d'augmentation des résistances constaté lors du test à la métacholine. Pour les souris uniquement traitées par poly-L-lysine cette augmentation est simulée par le rétrécissement progressif des voies aériennes à chaque dose de métacholine. Pour reproduire fidèlement les valeurs obtenues *in vivo*, il faut inclure une fermeture totale des voies aériennes lorsque leur calibre devient trop faible ce qui correspond à la modélisation informatique du phénomène de dérecrutement. Pour les souris traitées par l'ovalbumine, un

épaississement de la paroi bronchique permet de rendre compte des valeurs obtenues ; il faut y ajouter une fermeture plus précoce des voies aériennes censée modéliser la réduction du calibre bronchique liée à l'hypersécrétion de mucus. La combinaison virtuelle de ces 2 effets permet de reproduire les données obtenues chez les souris ayant subi les 2 traitements (figure 39).

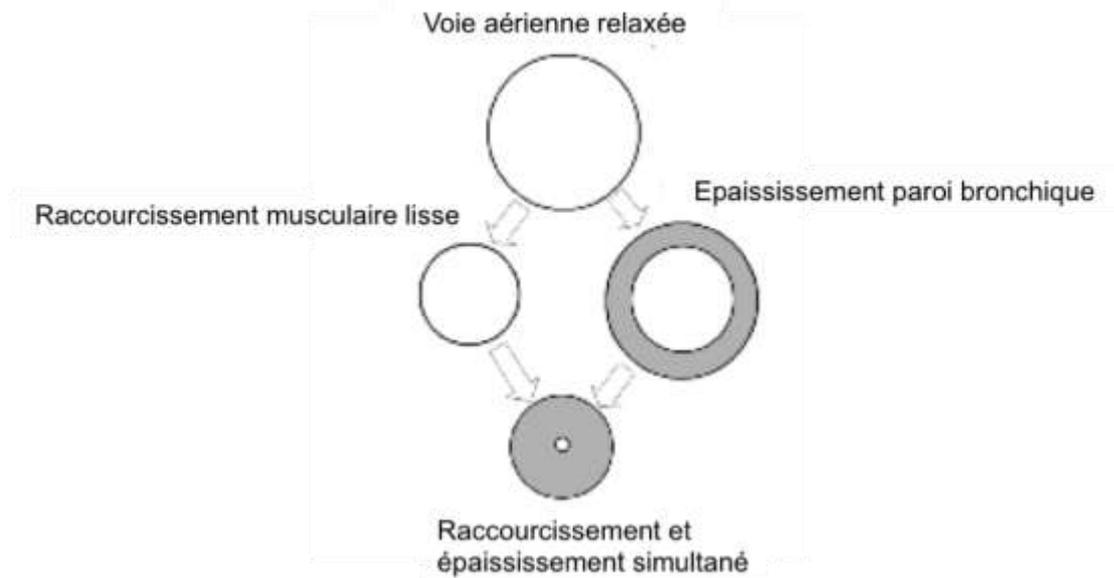


Figure 39 : modélisation du raccourcissement musculaire et de l'épaississement bronchique ; d'après Bates et al, 2008

La modélisation *in silico* permet ici de souligner l'implication du phénomène de dérecrutement par fermeture des voies aériennes dans l'hyperréactivité bronchique. Elle permet aussi une analyse fine des différents mécanismes impliqués comme l'hypercontractilité musculaire, l'épaississement des parois bronchiques et l'hypersécrétion de mucus qui sont inextricables *in vivo*. Elle permet enfin de mesurer la part de chacun de ces mécanismes dans l'effet final observé *in vivo* (Bates et al, 2008).

### **3. Limites de la modélisation de l'hyperréactivité bronchique**

Malgré les développements technologiques les plus récents, la modélisation de l'hyperréactivité bronchique chez l'animal ne permet toujours pas d'avoir une vision complète des mécanismes qui sous-tendent l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme humain. Les résultats obtenus chez l'animal sont en effet marqués par une grande variabilité qui peut être d'origine technique ou animale.

#### **a. Variabilité d'origine technique**

La variabilité technique peut intervenir à différents niveaux dans la modélisation. Nous avons déjà discuté l'influence du protocole d'induction de l'asthme sur la longévité de l'hyperréactivité bronchique. La nature de l'exposition allergénique peut également influencer l'origine anatomique de l'hyperréactivité. Par exemple, l'exposition aiguë de souris sensibilisées à de fortes concentrations d'ovalbumine en aérosol ( $>100 \text{ mg/m}^3$ ) entraîne une augmentation de la résistance tissulaire G et de l'élastance H mesurées par la technique des oscillations forcées lors d'un test à la métacholine (modèle bi-compartimental) ; à l'inverse, la résistance des voies aériennes n'augmente pas, témoignant d'une hyperréactivité d'origine périphérique tissulaire. L'exposition des mêmes animaux à de faibles concentrations d'ovalbumine (10 à  $20 \text{ mg/m}^3$ ) pendant une plus longue période est associée à une augmentation de la résistance des voies aériennes alors que les paramètres tissulaires restent stables, ce qui correspond à une hyperréactivité d'origine bronchique (Collins et al, 2003). La technique de mesure peut aussi être une source de variabilité. La nature et la voie

d'administration de l'agent bronchoconstricteur choisi pour effectuer les tests de réactivité peuvent influencer les résultats : par exemple, la souche de souris AKR/J est peu sensible à la sérotonine alors qu'elle présente une hyperréactivité majeure lorsque le même test est réalisé avec de l'acétylcholine (De Sanctis et al, 2001). En outre, l'administration de métacholine en aérosol engendre une augmentation des résistances pulmonaires en agissant principalement sur la composante tissulaire alors que la métacholine intra-veineuse semble plutôt agir sur la résistance des voies aériennes (Kips et al, 2003). Enfin, les anesthésiques sont indispensables pour évaluer l'hyperréactivité bronchique invasivement. Il peut s'agir de sédatifs, d'analgésiques et éventuellement de curares. Or, ces drogues modifient la mécanique ventilatoire. On sait par exemple que le pentobarbital (barbiturique) influence considérablement les paramètres respiratoires de base (fréquence respiratoire et volume courant) mais aussi la résistance pulmonaire et la compliance dynamique chez le hamster (Skornik et Brain, 1990). Ces remarques permettent de souligner l'intérêt que pourrait représenter une uniformisation relative des protocoles techniques utilisés par les scientifiques sans quoi l'interprétation et la comparaison des nombreuses études concernant l'hyperréactivité bronchique chez l'animal restera extrêmement délicate voire impossible.

## **b. Variabilité d'origine animale**

Il existe un second niveau de variabilité inhérent à l'animal lui-même. Il faut d'abord souligner l'existence de différences majeures entre les espèces animales expérimentales d'une part et entre ces espèces et l'homme d'autre part. Une

première différence importante concerne l'hyperréactivité bronchique spécifique. Lors d'une exposition allergénique, l'homme présente la plupart du temps, une réponse en 2 phases : une phase précoce associée aux symptômes immédiats et une phase tardive se manifestant 4 à 6 heures après l'exposition et souvent plus difficile à traiter. Parmi les modèles animaux disponibles, beaucoup développent également une réponse bronchique spécifique en 2 temps qui se traduit sur le plan fonctionnel par une phase d'hyperréactivité bronchique précoce et une phase plus tardive. C'est le cas du rat, du hamster, du chien, du lapin, du mouton et du singe. Par contre, s'il existe bien une réponse précoce chez la souris, aucune réponse tardive n'a pu être mise en évidence chez cet animal, aujourd'hui l'un des plus utilisés pour étudier l'asthme (figure 40 ; Zosky et Sly, 2007).

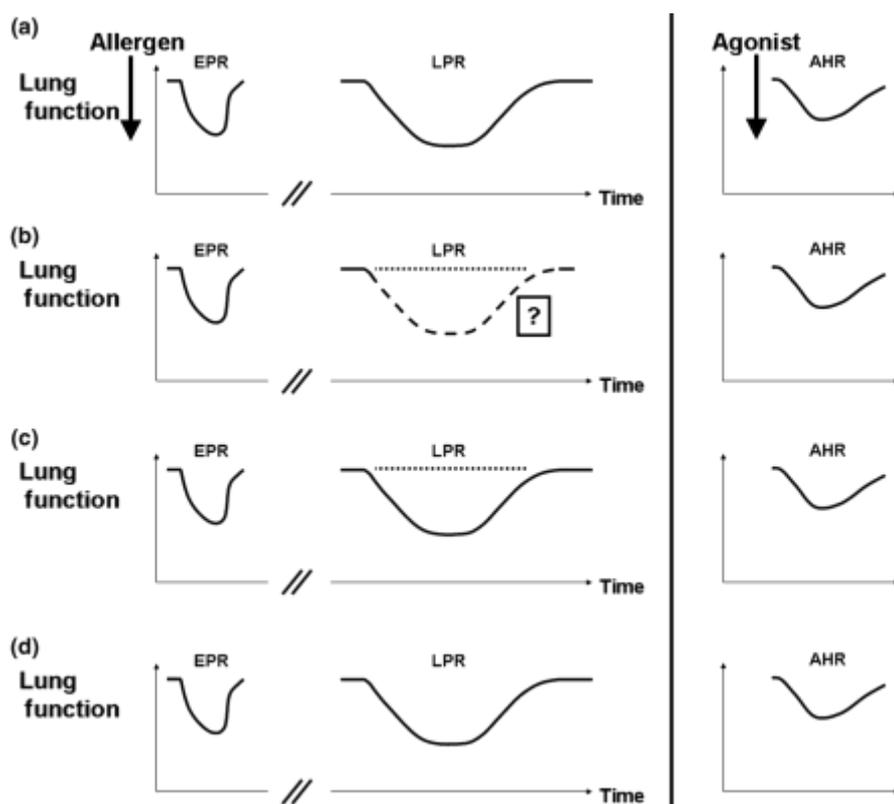


Figure 40 : réponses aux tests de provocation spécifique (colonne de gauche) et non spécifique (colonne de droite) chez l'homme (a), la souris (b), les autres rongeurs et le chien (c) et le mouton; d'après Zosky et Sly, 2007. EPR : phase précoce, LPR : phase tardive, AHR : hyperréactivité bronchique

Rappelons aussi que chez tous ces animaux, à l'exception notable du cheval, le phénotype asthmatique est affirmé sur les résultats d'explorations complémentaires mais qu'aucun symptôme n'est associé à l'exposition allergénique : la crise d'asthme n'existe pas (annexe 5 ; Karol, 1994 ).

Un autre point délicat doit être pris en compte dans la modélisation de l'hyperréactivité bronchique chez l'animal : il s'agit des différences anatomiques entre les espèces. La première différence évidente entre les espèces expérimentales et l'homme est que les mammifères sont des quadrupèdes (à l'exception des primates). Or, la gravité influence les volumes pulmonaires (Bettinelli et al, 2002). Et il a été démontré que les variations de volumes pulmonaires sont un déterminant important de la résistance des voies aériennes (Irvin, 2003). Ainsi, toutes les mesures de réactivité bronchique effectuées sous ventilation artificielle doivent être interprétées à la lumière du volume courant choisi. La structure de l'arbre bronchique varie aussi entre l'homme et les autres espèces : les divisions bronchiques sont dichotomiques (2 bronches de calibre égaux) chez l'homme et monopodales (2 bronches filles de calibres différents) chez les autres animaux (figure 41).

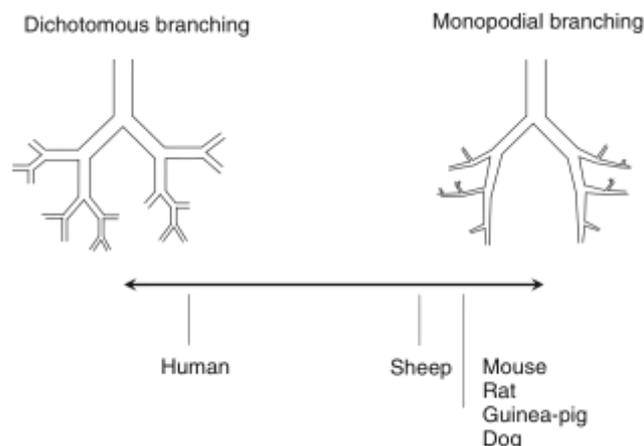


Figure 41 : divisions bronchiques selon les espèces ; d'après Zosky et Sly, 2007

Cette topographie influence la zone de dépôt des aérosols d'allergènes ou d'agents bronchoconstricteur durant les tests de réactivité (Zosky et Sly, 2007). De plus, la structure de la muqueuse bronchique des rongeurs et particulièrement des souris diffère nettement de celle des primates : elles ont une musculature très faiblement développée (jusqu'aux premières divisions bronchiques chez la souris) et très peu de cellules à mucus qui sont remplacées par des cellules de Clara. Dans les bronches les plus distales, les cellules à mucus sont inexistantes (figure 42 ; Hyde et al, 2009). La validité de cet animal pour étudier l'hypersécrétion de mucus à l'origine de la réduction du calibre bronchique impliquée dans l'hyperréactivité peut donc être discutée.

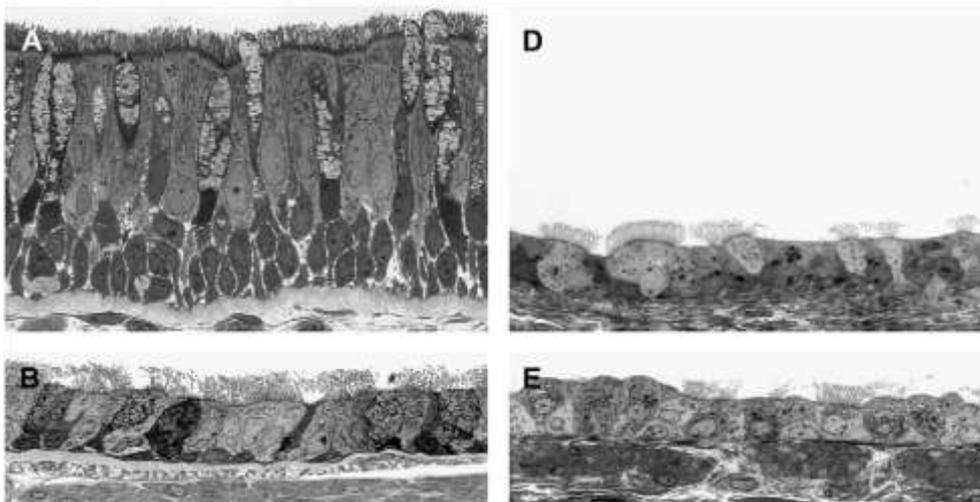


Figure 42 : histologie bronchique comparative montrant un épithélium plus complexe et une musculature plus épaisse chez le singe (A et B) que chez la souris (D et E) ; d'après Hyde et al, 2009

Enfin, les souris ont une mécanique respiratoire très différente de l'homme : elles ont un volume courant qui avoisine les 200  $\mu$ L, une fréquence respiratoire à 300/minutes et une compliance thoracique très élevée (Kips et al, 2003). Tous ces facteurs rendent délicate l'extrapolation de données animales à l'homme. Mais un degré supplémentaire de complexité est atteint lorsque l'on constate que dans

une même espèce il existe une variabilité de la réactivité bronchique entre les souches. L'étude de la réactivité bronchique chez différentes souches de souris montre que la souche A/J est la plus réactive et la souche C3H/HeJ la moins réactive ; les BALB/c et les C57/BL6 qui sont très utilisées ont une réponse intermédiaire (figure 43).

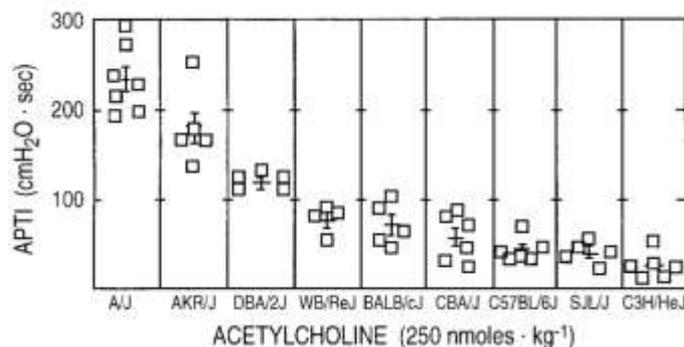


Figure 43 : réactivité bronchique à l'acétylcholine dans différentes souches de souris ; d'après Levitt et al, 1988

Cette variabilité d'une souche à l'autre, au sein d'une même espèce, suggère l'existence d'un support génétique pour l'hyperréactivité bronchique. Cette hypothèse a aussi été envisagée chez l'homme comme en témoignent les développements récents sur l'étude des polymorphismes. Il faut finalement ajouter qu'il existe aussi une variabilité inter-individuelle de l'hyperréactivité bronchique d'un animal à l'autre pourtant soumis à des conditions et des protocoles d'induction strictement identiques ce qui pose aussi des problèmes d'interprétation des résultats.

Pour clore ce chapitre consacré à la modélisation de l'hyperréactivité bronchique, on peut remarquer la rareté des études portant sur la toux qui est une manifestation classique d'hyperréactivité bronchique chez l'homme. Ceci s'explique sans doute par la difficulté à modéliser ce symptôme chez l'animal : de

nombreux animaux (rat et souris notamment) ne toussent pas et la mesure de la toux est difficile à réaliser. Enfin, on peut noter les carences des modèles animaux pour modéliser spécifiquement l'atteinte des voies aériennes distales dont l'implication a récemment été soulignée chez l'homme (Hyde et al, 2009).

# Les modèles animaux d'asthme

## Modélisation des lésions tissulaires

### 1. Lésions tissulaires dans l'asthme

Contrairement à la maladie transitoire induite dans les modèles animaux, l'asthme humain est une pathologie chronique sur laquelle se greffent des épisodes aigus. Il est caractérisé par des anomalies morphologiques permanentes des voies aériennes associant une abrasion de l'épithélium, une hyperplasie et une hypersécrétion des cellules à mucus, une fibrose à prédominance sous-épithéliale avec épaissement de la membrane basale, une hypertrophie et une hyperplasie du muscle lisse et de la vascularisation ; l'ensemble de ces anomalies constituent le tableau de remodelage bronchique qui est associé à une accumulation bronchique de lymphocytes T, plasmocytes, mastocytes et macrophages dans le chorion (figure 44). Ces anomalies concernent tout l'arbre bronchique (Kumar et Foster, 2002). Elles s'accompagnent classiquement d'anomalies du tissu sanguin représentées par une hyperéosinophilie, cependant inconstante, et d'une augmentation des IgE totales et parfois spécifiques d'allergènes. Les protocoles d'induction de l'asthme chez l'animal induisent des anomalies tissulaires qui reproduisent plus ou moins fidèlement les lésions précédentes.

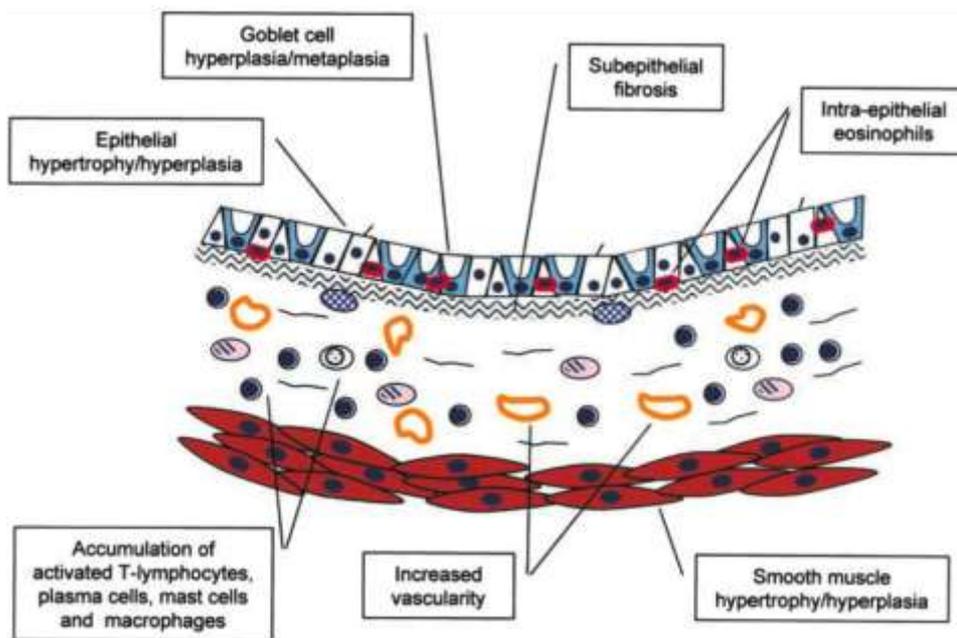


Figure 44 : principales anomalies des voies aériennes dans l'asthme humain ; d'après Kumar et Foster, 2002

## 2. Prélèvements et principales techniques disponibles

### a. Prélèvements

Différents types de prélèvements sont disponibles pour caractériser les lésions tissulaires de l'asthme expérimental animal. Comme chez l'homme, il est possible de réaliser sur l'animal des prélèvements *in vivo* qui sont néanmoins effectués sous anesthésie générale. Chez les gros animaux, le sang peut être recueilli par ponction veineuse ; chez les petits animaux, il peut être recueilli par ponction de la veine de la queue, par ponction rétro-orbitale, avec un risque non négligeable d'endophtalmie, ou encore par ponction intra-cardiaque, cette dernière technique entraînant bien sûr le décès de l'animal. Il est également possible de réaliser des lavages broncho-alvéolaires par l'introduction d'un cathéter dans une sonde d'intubation chez les gros animaux ou à partir d'une

trachéotomie chez les plus petits qui seront ensuite euthanasiés. Des biopsies bronchiques peuvent aussi être obtenues chez les gros animaux. Les prélèvements d'organes entiers, principalement poumons et organes lymphoïdes, sont effectués sur des animaux morts mais s'ils sont réalisés dans de bonnes conditions, ils fournissent une représentation instantanée des anomalies associées au syndrome asthmatique. L'expectoration induite est évidemment impossible.

### **b. Techniques d'analyses**

L'analyse de ces prélèvements repose principalement sur des techniques issues de l'histologie humaine. La plus utilisée est la microscopie optique. Elle permet l'étude des lavages broncho-alvéolaires, après fixation sur lame et coloration. Le choix de la coloration est capital car c'est elle qui permettra de visualiser les structures d'intérêt. Les lavages sont le plus souvent colorés par May Grünwald et Giemsa qui permet de différencier les populations cellulaires présentes (macrophages, polynucléaires éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes) et de déterminer la formule du lavage sur environ 300 cellules (figure 45).

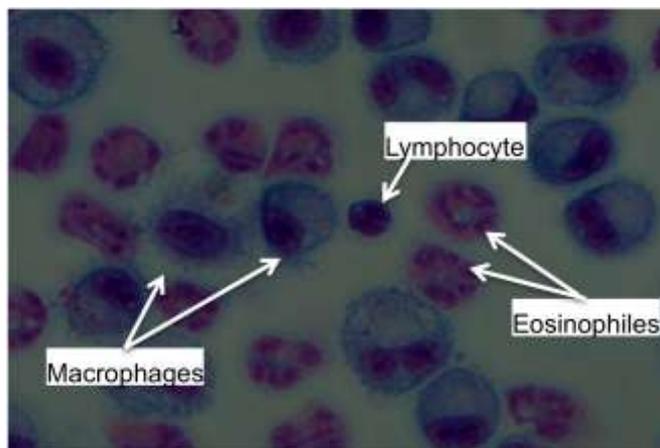


Figure 45 : exemple de lavage broncho-alvéolaire de souris coloré par May Grünwald et Giemsa ; C. Sagan, CHU de Nantes, 2009

L'étude de coupes de tissu pulmonaire est faite après fixation chimique (par du formol le plus souvent), inclusion, coupe et coloration adéquate. Les coupes peuvent faire l'objet de différentes colorations selon la structure que l'on cherche à analyser. Les 2 colorations réalisées en routine sont faites à l'hématoxyline-éosine qui permet d'étudier la morphologie des cellules (colore les noyaux en bleu foncé et les cytoplasmes en rose) et à l'acide périodique Schiff qui permet de visualiser le mucus bronchique (colore les polysaccharides en rose). Ces colorations sont utilisables chez tous les animaux et permettent respectivement d'étudier les cellules de la muqueuse bronchique et de détecter une hyperplasie des cellules à mucus (figures 46 et 47). La coloration par bleu Alcian peut aussi être utilisée pour l'étude du mucus. Notons enfin que les granules mastocytaires peuvent être colorés par le bleu de Toluidine.

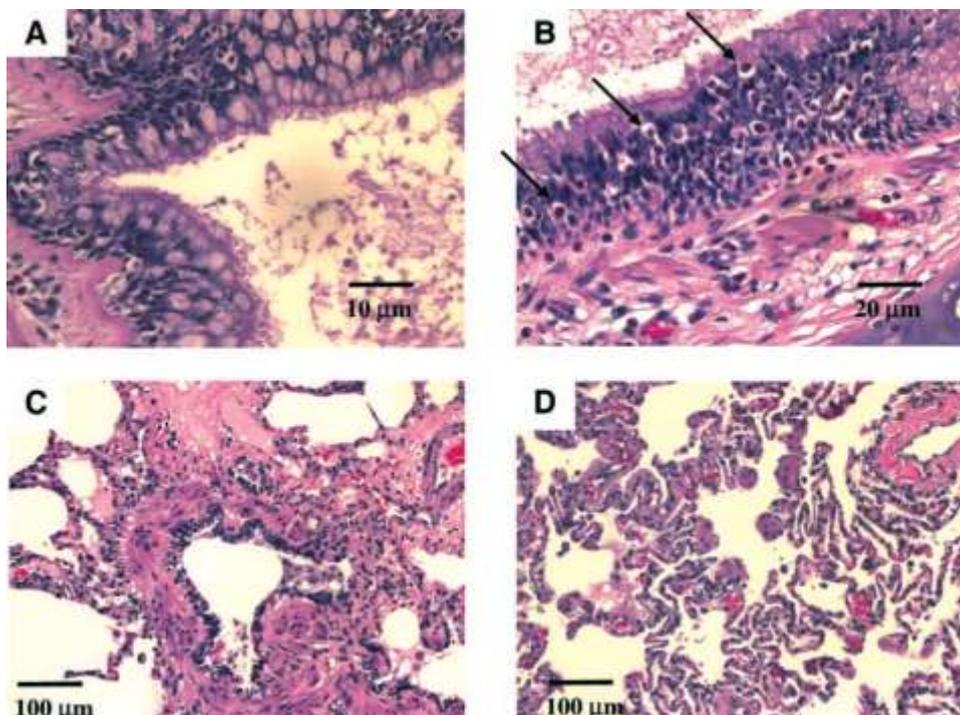


Figure 46 : coloration par hématoxyline et éosine sur des coupes de poumons de singes asthmatiques : (A) hyperplasie des cellules à mucus ; (B) éosinophiles intra-épithéliaux (flèches) ; (C) et (D) hypertrophie musculaire lisse ; d'après Van Scott et al, 2004

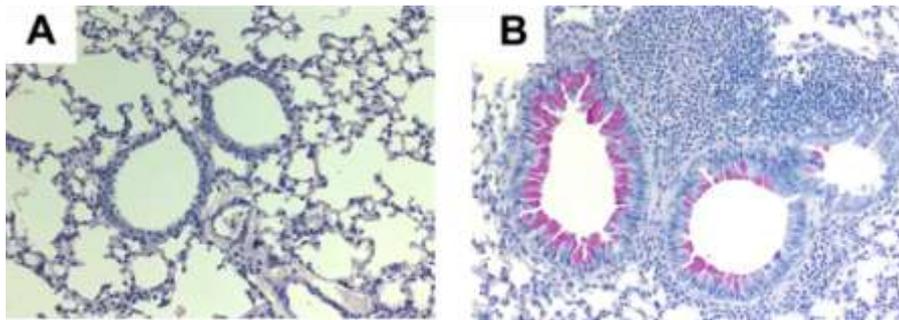


Figure 47 : coloration par l'acide périodique Schiff sur des coupes de poumons de souris : (A) souris contrôle ; (B) souris asthmatique avec hyperplasie des cellules à mucus (en rose) ; d'après Saglani et al, 2009

Il existe en outre des colorations destinées spécifiquement à étudier le tissu conjonctif et notamment le collagène dont la prolifération est caractéristique du remodelage bronchique. Les plus utilisées sont le trichrome de Masson qui colore les noyaux en bleu foncé, les cytoplasmes en rose et le collagène en vert, la coloration de Sirius qui teinte le collagène en rouge et la coloration de Gordon-Sweet qui utilise l'imprégnation argentique fait ressortir la réticuline constitutive du tissu conjonctif en noir (figure 48).

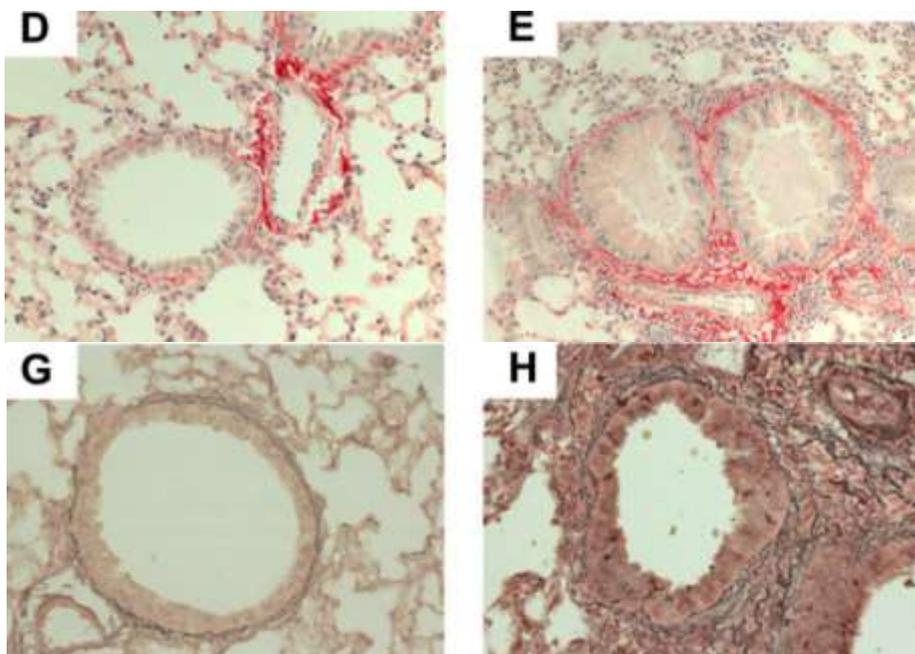


Figure 48 : coloration par rouge Sirius : (D) poumon normal, souris saine (E) fibrose péri-bronchique, souris asthmatique ; coloration de Gordon-Sweet : (G) poumon normal, souris saine (H) fibrose sous-épithéliale, souris asthmatique ; d'après Saglani et al, 2009

L'immunohistochimie permet d'obtenir un degré de résolution supplémentaire dans l'analyse structurale. Elle consiste à utiliser des anticorps pour localiser un antigène contenu dans une structure d'intérêt. Le tissu est incubé avec un anticorps primaire spécifique puis avec un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome dont le signal lumineux sera détecté analysé à l'aide d'un microscope à fluorescence muni d'un appareil photographique. Il est ainsi possible de visualiser des structures non visibles avec les colorations classiques soit parce qu'il n'existe pas de colorant spécifique soit parce qu'elles sont de trop petite taille (figure 49).

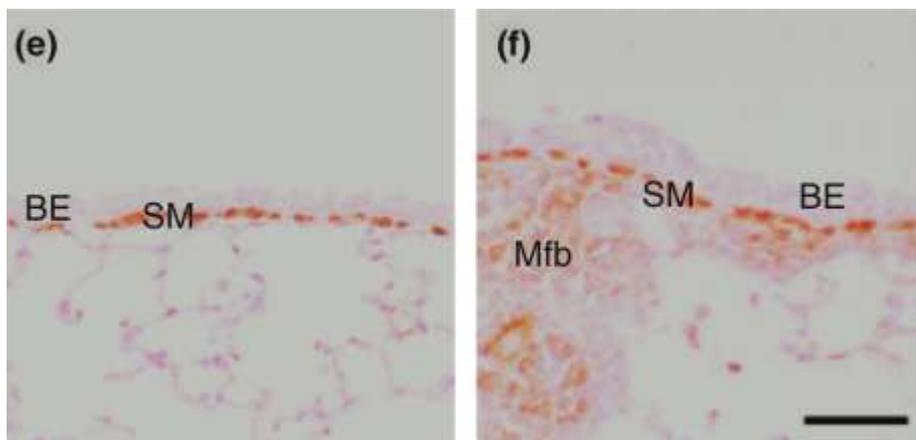


Figure 49 : marquage immunohistochimique de l'actine alpha sur une bronchiole de souris saine (e) et de souris asthmatique montrant un épaississement de la musculature (f) ; d'après Wegmann et al, 2005

Les informations obtenues en microscopie optique sont qualitatives et posent le problème de leur interprétation. En effet, il s'agit de données descriptives qu'il est, par définition, difficile de comparer entre elles ce qui soulève la question de leur objectivité. Pour pallier cette limite, des scores d'évaluation histologiques ont été mis au point. Ils reposent en général sur une évaluation semi-quantitative des anomalies structurales constatées par l'expérimentateur et permettent une comparaison statistique des groupes expérimentaux entre eux. Mais, il n'existe

pas de standardisation de ces scores de sorte que chaque équipe scientifique élabore le sien, ce qui rend difficile la comparaison des études entre elles. Le développement des logiciels de morphométrie pulmonaire pourrait permettre d'uniformiser les systèmes d'évaluation des lésions tissulaires. La morphométrie repose sur la mesure informatisée d'un paramètre histologique déterminé (épaisseur d'une structure, nombre de cellules) dans un champ microscopique délimité et reproductible d'un échantillon à l'autre. Elle fournit donc des données quantitatives objectives et comparables d'un groupe à l'autre voire d'une équipe à l'autre si les logiciels sont communs.

La seconde technique utilisée est la microscopie électronique. Son pouvoir de résolution peut être jusqu'à 1000 fois supérieur à celui de la microscopie optique et permet donc une analyse au niveau cellulaire (microscopie électronique à transmission) et en trois dimensions (microscopie électronique à balayage). Cette technique n'utilise pas de colorants et fournit des images en noir et blanc (figure 50).

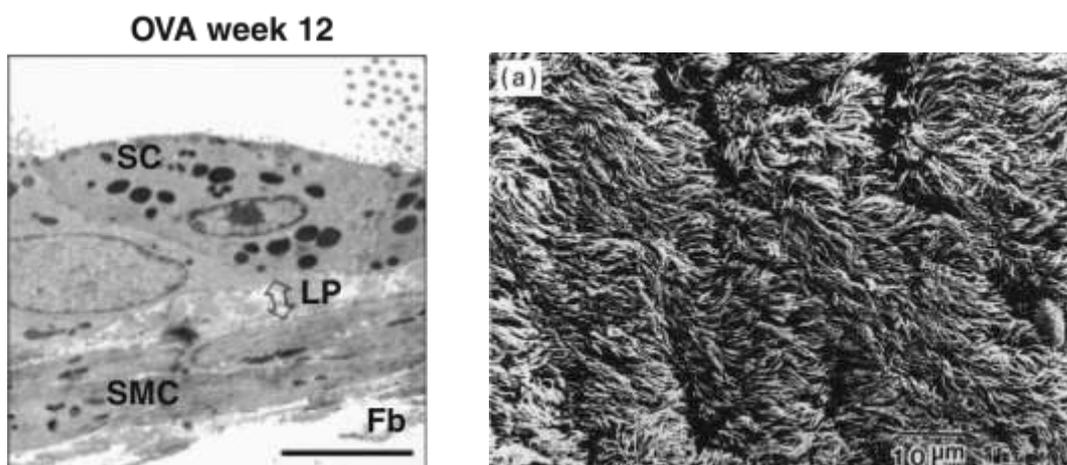


Figure 50 : à gauche, microscopie électronique à transmission : épaissement de la lamina propria (LP) chez des souris asthmatiques (SC=cellules à mucus, SMC=muscle lisse, Fb=fibroblaste) ; d'après Wegmann et al, 2005. A droite : microscopie électronique à balayage : cils de l'épithélium de hamsters asthmatiques ; d'après Tohda et al, 2001

Il est encore possible d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la microscopie électronique (mais aussi de la microscopie optique) par la microdissection. Cette technique consiste à sélectionner et à prélever, sous contrôle microscopique, une population ou une région cellulaire qui peut ensuite être analysée séparément.

Les autres techniques disponibles sont classiques et réalisées le plus souvent à partir de prélèvements réalisés sur un animal vivant ou juste après sa mort et congelés : l'ELISA est utilisable pour le dosage des immunoglobulines sériques totales ou spécifiques ou des cytokines dans le lavage broncho-alvéolaire ; l'allergie peut aussi être confirmée par la réalisation de tests allergiques cutanés et/ou la recherche d'IgE spécifiques par RAST ou immunoCAP ; enfin, la cytométrie en flux sert pour l'analyse immunologique cellulaires de tous types de prélèvements animaux. Si l'on quitte la problématique de la modélisation et que l'on s'intéresse à celle de l'expérimentation, toutes les techniques scientifiques peuvent bien sûr être utilisées pour questionner un modèle animal d'asthme, y notamment les techniques *in vitro*, dont nous ne parlerons pas.

### **3. Modèles d'asthme « aigu »**

Les modèles d'asthme « aigus » sont obtenus à l'aide de protocoles courts (le plus souvent inférieurs à 4 semaines) comportant une phase de sensibilisation et un nombre restreint de provocations respiratoires aboutissant à un syndrome asthmatique rapidement réversible. Ils sont parfois assimilés à des modèles d'exacerbation ; en réalité, ils rendent plutôt compte des phases initiales de l'asthme allergique que sont la sensibilisation et l'apparition d'anomalies pulmonaires précoces principalement représentées par un infiltrat inflammatoire

pulmonaire dont les caractéristiques peuvent être très variables d'une espèce à l'autre.

#### **a. Sensibilisation : anomalies du tissu sanguin**

La sensibilisation, nous l'avons vu, peut être naturelle ou induite expérimentalement. En effet, certains animaux, comme le singe et le mouton, sont sensibilisés à différents parasites (nématodes notamment) qui, lorsqu'ils sont administrés dans les voies respiratoires de façon aiguë, peuvent déclencher un syndrome asthmatique. Chez ces mêmes animaux et chez les petits animaux, naturellement épargnés par l'allergie (souris, cochon d'Inde, hamsters et rats), la sensibilisation peut aussi être provoquée expérimentalement (cf. seconde partie). Dans tous les cas, elle peut être détectée et mesurée par des tests cutanés (prick-tests) ou le dosage des IgE totales et/ou spécifiques qui permettent d'affirmer la sensibilisation allergique chez l'animal. La phase de sensibilisation est une caractéristique asthmatique assez facile à modéliser, y compris avec des protocoles courts. Son interprétation nécessite cependant quelques précautions. L'allergie humaine est associée à une production accrue des cytokines de type 2 comme l'IL-4 et l'IL-13 qui stimulent la réponse humorale adaptative et engendrent la production d'IgE et d'IgG4 par les plasmocytes (El Biaze et al, 2003). Chez le lapin, le rat, le chien, le mouton, le chat et le singe les anticorps impliqués dans les réactions allergiques de type I sont aussi les IgE. Chez la souris, la réponse humorale allergique est médiée par les IgE mais aussi par les IgG1. Enfin, chez le cochon d'Inde, les IgG1 sont les principaux anticorps

anaphylactiques ce qui rend plus délicate l'extrapolation des résultats à l'homme (Karol, 1994).

### **b. Infiltrat inflammatoire pulmonaire**

Les protocoles d'asthme aigu permettent aussi d'induire des anomalies morphologiques pulmonaires évocatrices d'asthme et représentées par un infiltrat inflammatoire à éosinophiles. L'éosinophilie est une caractéristique très constante des modèles animaux d'asthme aigus mais elle est très polymorphe d'une espèce à l'autre. Dans le lavage alvéolaire, elle est toujours présente mais parfois très caricaturale : certains modèles murins d'asthme induits par l'ovalbumine couplée à l'aluminium ont plus de 70 % d'éosinophiles dans le lavage (Inman et al, 1999) alors que la formule d'une souris saine n'en comporte pas (prédominance de macrophages). Chez le chat soumis à une association acarien-adjurant (aluminium et *Bordetella pertussis*) l'éosinophilie du lavage atteint 50 % (Norris Reinero et al, 2004). Chez l'homme, l'éosinophilie de lavages issus d'asthmatiques reste modeste, en général inférieure à 4 % (Van Vyve et al, 1992). Il est probable que l'éosinophilie disproportionnée constatée dans les modèles précédents résulte de l'utilisation d'adjuvants artificiels qui intensifient la réponse immunitaire. En effet, chez le mouton naturellement sensibilisé à *Ascaris* (donc indemne d'adjuvant artificiel), l'inhalation du même allergène déclenche une éosinophilie modérée de l'ordre de 3 % (Abraham, 2008). Notons que chez le cochon d'Inde, il existe une éosinophilie basale en dehors de toute exposition allergénique (Canning et Chou, 2008). Parallèlement, l'étude de l'éosinophilie

dans le parenchyme pulmonaire montre que, dans de nombreuses espèces, il existe une alvéolite allergique associée aux anomalies bronchiques (figure 51).

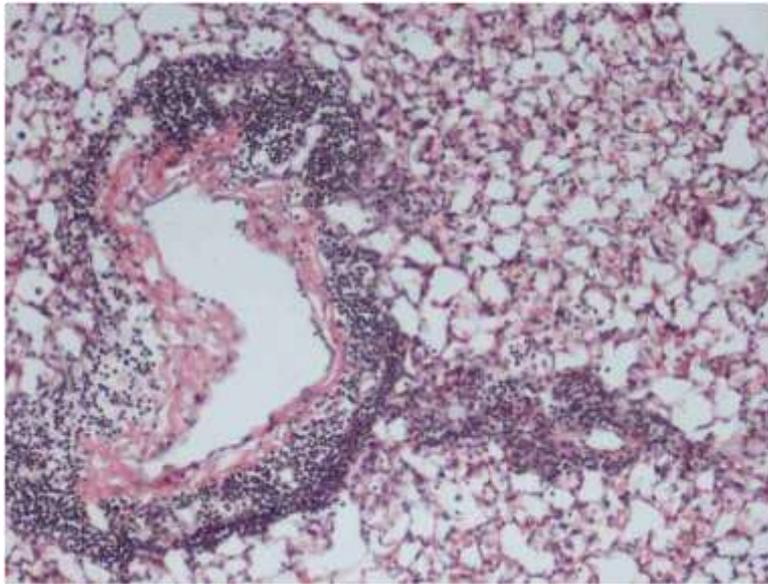


Figure 51 : infiltrat péri-bronchique associé à des lésions d'alvéolite dans un modèle d'asthme induit par les acariens chez la souris ; d'après C. Sagan, CHU de Nantes, 2009

L'existence de cette alvéolite soulève au moins 2 questions. Premièrement, il n'existe pas d'alvéolite dans l'asthme humain qui est une maladie bronchique pure. Il est donc possible de penser que les animaux (notamment les petits animaux), qui sont soumis à des doses d'allergènes élevées relativement à leur poids, développent en fait des lésions broncho-pulmonaires se rapprochant au moins autant d'une pneumopathie allergique aigue que d'un asthme ce qui remet en cause leur pertinence. En effet, une des explications évoquées pour expliquer cette alvéolite est l'utilisation de fortes concentrations d'allergènes sur de courtes périodes alors que l'asthme humain serait plutôt généré par l'exposition à des plus faibles doses allergéniques pendant une période prolongée. L'exposition de souris à de faibles concentrations d'ovalbumine peut être obtenue par l'utilisation d'un nébuliseur à air comprimé qui assure un contrôle strict de la taille et de la concentration des particules. Ce dispositif permet de maintenir le diamètre des

particules inférieur à 4  $\mu\text{m}$  et garantit ainsi leur dépôt dans l'arbre trachéo-bronchique ; il permet aussi de maintenir une faible concentration des aérosols, en moyenne 12,7  $\text{mg}/\text{m}^3$ . Les souris exposées à l'allergène dans ces conditions strictement maîtrisées développent des lésions bronchiques asthmatiformes sans alvéolite (Temelkowski et al, 1998). La deuxième question liée à la présence d'une alvéolite porte sur l'interprétation des données fonctionnelles respiratoires : s'il existe une atteinte inflammatoire du poumon distal, comment savoir si l'augmentation des résistances pulmonaires globales constatées lors d'un test de réactivité bronchique est liée à une réelle augmentation de la résistance des voies aériennes (ce qui est le cas dans l'asthme) ou si elle est générée dans le parenchyme pulmonaire (ce qui n'est plus de l'asthme) ? L'utilisation de la technique des oscillations forcées permet de surmonter cette difficulté mais elle est loin d'être utilisée en routine (Kumar et Foster, 2001).

Concernant les autres types cellulaires constitutifs de l'infiltrat inflammatoire obtenu dans les modèles animaux d'asthme, il faut souligner la grande variabilité de la neutrophilie. Dans l'asthme humain, il existe classiquement une neutrophilie modérée, inférieure à 5 % dans le lavage et de l'ordre de 12 % dans l'expectoration induite (Van Vyve et al, 1992). Alors que la souris exposée à l'ovalbumine présente un lavage presque exclusivement constitué d'éosinophiles, l'application d'un protocole d'induction proche chez le rat permet d'obtenir un lavage panaché avec une neutrophilie (et une éosinophilie) avoisinant les 25 % (Werner-Klein et al, 2008). Chez certains animaux cependant, les neutrophiles sont majoritaires. Chez le mouton sensibilisé, l'inhalation d'*Ascaris* déclenche une hyperréactivité bronchique (cf. troisième partie). Seuls les moutons qui ont une

réponse bronchique biphasique (précoce et tardive) développent une éosinophilie modeste mais tous ont une réponse inflammatoire à neutrophiles (Abraham et al, 2008). De même, chez le chien, qui peut développer des symptômes proches de l'asthme comme des sifflements, une hyperréactivité bronchique et une authentique dermatite atopique, l'exposition de l'appareil respiratoire à un allergène génère une inflammation à neutrophiles (Chapman, 2008). Alors que l'asthme est considéré, à juste titre, comme une maladie à éosinophiles, ces constatations soulèvent la question de l'implication des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la maladie et de la pertinence de la nosologie actuelle des maladies respiratoires obstructives à travers l'existence de possibles formes de transition.

Si le rôle des autres cellules de l'immunité innée, principalement mastocytes et basophiles, est prouvé dans l'asthme humain, il est assez difficile à étudier chez l'animal car ces cellules sont peu nombreuses, plus délicates à induire et à analyser. Les mastocytes ont été étudiés chez la souris. Chez cet animal, on les trouve principalement dans la trachée et les bronches souches mais là encore avec des variations importantes en fonction des protocoles d'induction utilisés. Lorsqu'on compare 2 protocoles d'induction d'asthme par l'ovalbumine administrée par voie respiratoire, l'un par aérosols, l'autre par instillations intranasales, on constate des lésions histologiques évocatrices d'asthme (avec des signes de remodelage bronchique) dans les 2 groupes mais seules les souris traitées par aérosols ont des mastocytes bronchiques plus nombreux que des souris normales (Olmez et al, 2009). De même, le nombre d'allergènes utilisés influence l'efficacité du recrutement mastocytaire : des souris exposées à un

cocktail de 3 allergènes fréquents (*Aspergillus*, ambroisie et acariens) sans adjonction d'adjuvant développent une inflammation et une hyperréactivité bronchique plus sévères que si elles sont exposées à un de ces 3 allergènes séparément ; des mastocytes intra-épithéliaux ne sont retrouvés que chez les souris ayant reçu les 3 allergènes simultanément (figure 52 ; Goplen et al, 2009).

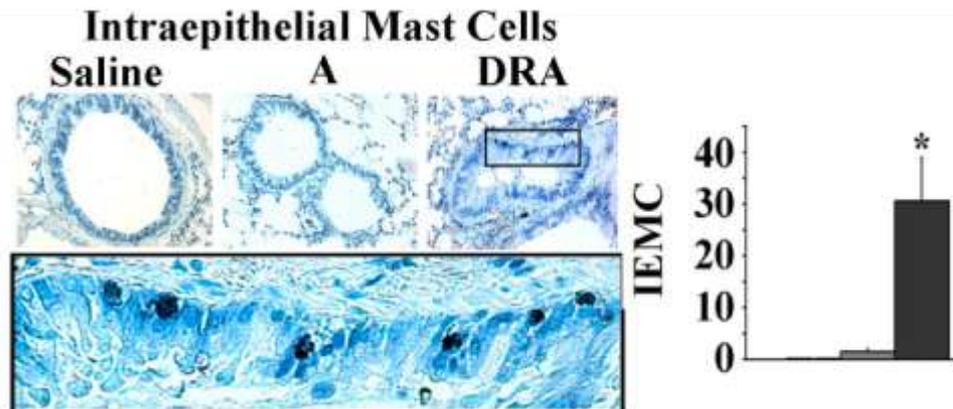


Figure 52 : coloration de poumons de souris au bleu de Toluidine montrant une infiltration épithéliale par des mastocytes chez les souris ayant reçu les 3 allergènes (DRA) par rapport aux souris contrôles (Saline et A) ; d'après Goplen et al, 2009

Notons enfin que la souche de souris utilisée peut influencer la modélisation de la mastocytose puisque, chez des souris soumises au même protocole, ces cellules sont plus nombreuses chez les BALB/c que chez les C57/BL6 (Gueders et al, 2009). La mastocytose bronchique est donc très variable selon le modèle utilisé. Cependant, lorsque les mastocytes sont présents, ils semblent nécessaires au développement d'un syndrome asthmatique complet associant hyperréactivité bronchique, inflammation pulmonaire et remodelage (Yu et al, 2006). Ajoutons, pour finir sur les cellules de l'immunité innée, que peu de travaux ont étudié les polynucléaires basophiles dans les modèles animaux d'asthme.

Concernant la modélisation de la réponse immunitaire adaptative, de nombreux modèles ont confirmé, directement ou indirectement, l'implication des

lymphocytes T, notamment de type Th2 (Mauser et al, 1995 ; Li et al, 1998 ; Wills-Karp et al, 1998). Cependant tous ces modèles ont des failles et posent à nouveau la question de l'extrapolation des résultats à l'homme. D'abord, il faut rappeler que le système lymphoïde associé aux bronches (ou BALT) est très différent selon les espèces. A l'état normal, il est absent chez les primates dont l'homme et chez le chat mais il est naturellement présent dans d'autres espèces comme le cochon d'Inde ou le lapin. Cette première différence entre espèce est fondamentale car elle conditionne la façon dont les antigènes seront intégrés et traités par le système immunitaire ainsi que la nature de la réponse enclenchée (Pabst et Gehrke, 1990). La topographie de l'infiltrat lymphocytaire est également variable : chez la souris, l'exposition à un allergène induit un infiltrat à la fois péri-bronchique et péri-vasculaire alors qu'il ne concerne que la paroi bronchique chez l'homme ; de plus, une exposition répétée induit la formation de granulomes lymphoïdes qui n'existent pas dans l'asthme humain (Kumar et Foster, 2002). Enfin, le profil cytokinique obtenu avec un même protocole peut varier considérablement d'une souche à l'autre (Shinagawa et Kojima, 2003) et en fonction de l'adjuvant utilisé (cf. seconde partie) ce qui rend l'interprétation des résultats complexe.

### **c. Lésions épithéliales**

Les protocoles d'induction de l'asthme aigu induisent aussi des anomalies morphologiques et fonctionnelles de l'épithélium. L'hyperplasie des cellules à mucus et l'hypersécrétion associée sont constamment retrouvées dans tous les modèles même chez des animaux comme la souris qui n'ont normalement plus

aucune cellule à mucus au-delà du 1/3 proximal de la trachée. Cette caractéristique est facilement évaluée par morphométrie à partir de coupes colorées par PAS et/ou bleu Alcian (figure 53).

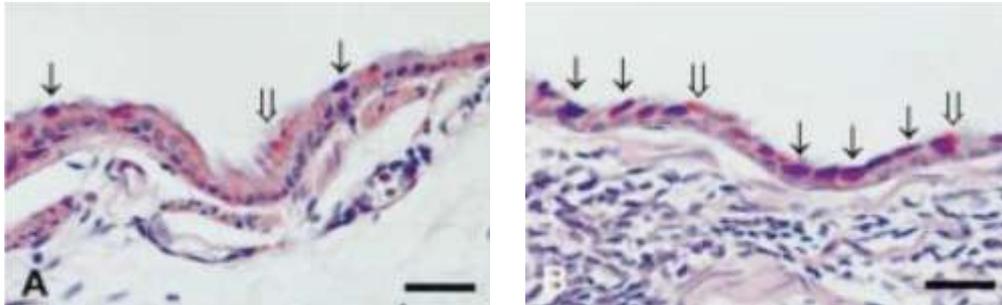


Figure 53 : coloration de bronches de souris par PAS et bleu Alcian. (A) souris contrôle présentant peu de cellules à mucus (flèches) ; (B) souris asthmatique présentant une hyperplasie des cellules à mucus avec métaplasie épithéliale ; d'après Temelkowski et al, 1998

Il s'y associe des zones de desquamation épithéliales également fréquemment décrites qui peuvent être analysées finement en microscopie électronique (figure 54).

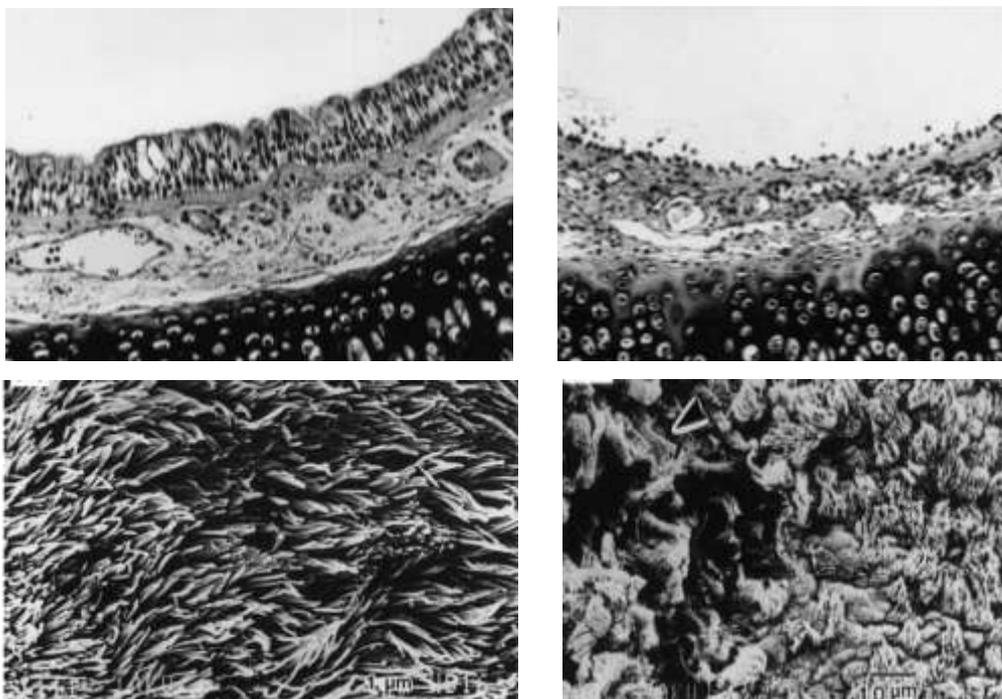


Figure 54 : microscopie électronique à transmission sur un épithélium bronchique de cobaye sain (haut gauche) et asthmatique montrant une érosion épithéliale (haut droite) ; microscopie électronique à balayage chez un cobaye sain (bas gauche) et asthmatique montrant une discontinuité des cellules ciliées (bas droite) ; d'après Tohda et al, 2001

Il faut aussi souligner l'originalité des gros animaux comme le mouton ou le singe qui permettent de modéliser les anomalies de la clairance muco-ciliaire existant dans l'asthme. En effet, avant un challenge, l'inhalation d'un aérosol de sulfure colloïdal marqué au Technetium 99 radioactif permet d'étudier le transit muco-ciliaire par mesure de la radioactivité pulmonaire à l'aide d'une gamma-caméra (figure 55).

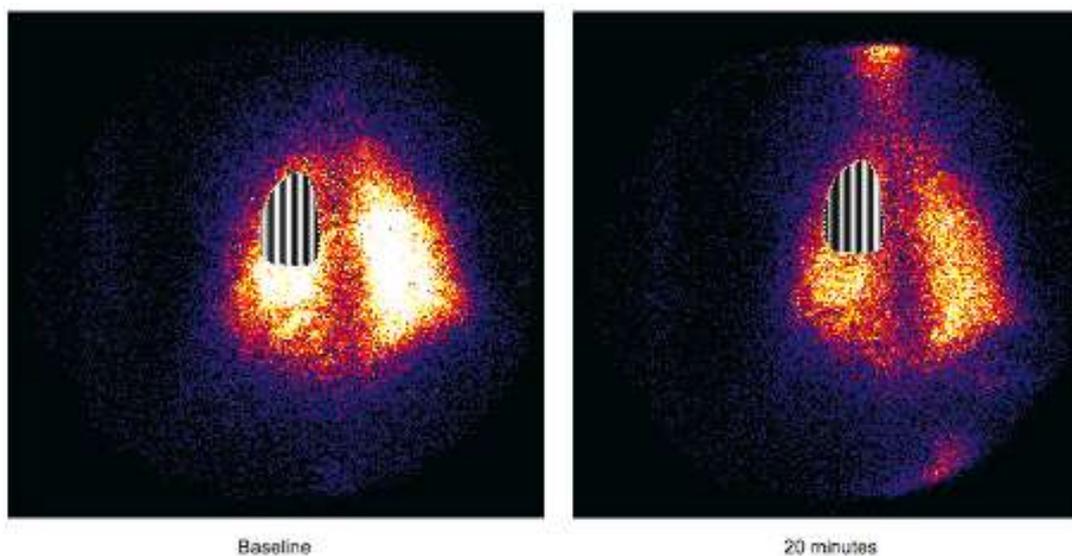


Figure 55 : étude de la fonction muco-ciliaire par scintigraphie chez le mouton avant (Baseline) et 20 minutes après un challenge allergénique ; d'après Abraham, 2008

#### 4. Intérêt des modèles d'asthme « chronique »

Une des faiblesses majeures des modèles d'asthme aigu est l'absence de lésions de remodelage. Malgré les contraintes inhérentes au développement de protocoles d'induction plus longs (parfois sur plusieurs années pour les plus gros animaux), force est de constater qu'ils génèrent des lésions morphologiquement plus proches de l'asthme humain associant en général les lésions aiguës précédemment décrites et du remodelage. Outre la durée, d'autres paramètres peuvent influencer l'apparition du remodelage. Nous avons déjà évoqué

l'importance d'un contrôle strict des modalités d'administration des allergènes en aérosols en terme de concentration et de taille des particules pour limiter les lésions d'alvéolite. Ce protocole rigoureux permet aussi de générer des lésions bronchiques très proches de celles constatées chez l'homme associant des éosinophiles intra-épithéliaux caractéristiques de l'asthme, un infiltrat du chorion par des cellules mononuclées, une hyperplasie de cellules à mucus avec métaplasie épithéliale et une fibrose sous-épithéliale. Notons que ces souris ne développent pas non plus de granulomes lymphoïdes après une exposition prolongée à l'allergène. Cependant, dans son travail, l'auteur ne précise pas s'il existe une hypertrophie du muscle lisse (Temelkowski et al, 1998). Un modèle d'asthme chronique sans adjuvant a également été mis au point : l'instillation intra-nasale d'ovalbumine sans adjuvant pendant 12 semaines à des souris permet d'induire une éosinophilie durable, une augmentation de l'épaisseur de la couche collagène une hyperplasie de cellules à mucus et réponse lymphocytaire Th2. Notons que ces lésions varient selon les souches de souris utilisées : elles sont très marquées chez les souris A/J, plus discrètes chez les BALB/c et quasiment absentes chez les C57BL/6 et les C3H/HeJ. Les auteurs concluent que les souris A/J sont les plus adaptées pour modéliser le remodelage dans l'asthme (Shinagawa et Kojima, 2003). L'existence de ces lésions a également pu être mise en évidence au niveau des voies aériennes distales chez la souris (Wegmann et al, 2005).

Les gros animaux, bien que peu étudiés mais phylogénétiquement plus proches de l'homme, développent assez facilement des lésions de remodelage. Ils peuvent subir des protocoles prolongés et autorisent un suivi plus proche de la

chronologie humaine et des analyses plus fines du fait de leur grande taille. Le mouton exposé à *Ascaris* est porteur de lésions histologiques proches de l'homme associé à un trouble ventilatoire obstructif fixé difficile à modéliser et à mesurer chez des rongeurs (Abraham et al, 2001) ; de même, les primates présentent des lésions histologiques complexes proches du remodelage humain (figure 56).



Figure 56 : coloration de Verhoeff et VanGieson sur des bronches de moutons montrant un épaisissement de la couche collagène (C), un épithélium discontinu, un infiltrat inflammatoire de la membrane basale et une hypertrophie du muscle lisse (SM) ; d'après Abraham, 2008

Finalement, mis à part la durée prolongée d'exposition à l'allergène et peut-être un contrôle plus strict des conditions d'administration respiratoire, les facteurs à l'origine du remodelage sont aujourd'hui mal connus et les modèles animaux présentant du remodelage doivent être développés car ce sont probablement les plus pertinents pour reproduire l'asthme humain.

# Les modèles animaux d'asthme

## Conclusion

Au cours des 2 dernières décennies, l'accumulation des données issues de l'expérimentation sur des modèles animaux a permis d'éclaircir les mécanismes biologiques impliqués dans l'asthme, mettant du même coup à jour l'immense complexité de cette maladie. Les applications de ces connaissances expérimentales pour la santé humaine sont principalement de 3 ordres : cognitif, diagnostique et thérapeutique. La proximité de la biologie animale et humaine et le panel d'outils d'analyse disponible ont permis de découvrir les acteurs moléculaires, cellulaires et tissulaires impliqués dans la maladie et les anomalies fonctionnelles et/ou structurales qui leur sont associées. C'est ainsi que l'immunité innée apparaît comme un protagoniste majeur à travers le rôle joué par les récepteurs Toll et les cellules dendritiques qui contrôlent l'orientation de la réponse lymphocytaire primaire et secondaire (Schröder et Maurer, 2007), par le tissu épithélial qui, autrefois confiné dans un rôle de barrière mécanique, est désormais reconnu comme un acteur immunitaire à part entière et bien sûr par les effecteurs cellulaires centraux que sont les polynucléaires éosinophiles (Ochkur et al, 2007). Tous interagissent de façon complexe avec les lymphocytes B producteurs d'IgE et avec les lymphocytes T producteurs de cytokines de type 2 (Th2 et Tc2) dont la fonction centrale est désormais prouvée chez l'animal mais aussi chez l'homme ; les autres populations lymphocytaires Th1, Th17 et T

régulatrices sont également impliquées mais leur responsabilité reste méconnue (Holt et Strickland, 2010). Concernant les anomalies fonctionnelles et structurales, le lien entre inflammation, hyperréactivité bronchique et remodelage a été suggéré à plusieurs reprises à partir de modèles animaux d'asthme allergique ou professionnel (Sagiani et al, 2009 ; Pauluhn, 2008) ; cependant, les supports moléculaires ou cellulaires sous-jacents sont toujours l'objet de débats (Siegle et al, 2006). Au niveau diagnostique, les modèles animaux peuvent être utilisés en pathologie professionnelle pour évaluer le potentiel sensibilisateur d'allergènes de bas poids moléculaire vis à vis du système respiratoire (Arts et Kuper, 2007). Enfin, au niveau thérapeutique, les applications des modèles animaux sont essentiellement représentées par l'évaluation de molécules anti-asthmatiques en phase pré-clinique. Plus récemment, la modélisation animale a trouvé des débouchés thérapeutiques importants grâce au développement de la technologie des puces (génomiques, protéomiques) qui permet de déterminer, de façon exhaustive si besoin, le profil moléculaire d'un modèle et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles (Dittrich et al, 2006).

L'intérêt scientifique et médical des modèles d'asthme est donc incontestable. Néanmoins, il faut garder à l'esprit les grandes limites inhérentes à la modélisation animale. Il n'existe pas de modèle animal complet d'asthme humain mais plutôt des systèmes expérimentaux vivants reproduisant un ou plusieurs aspects de la maladie. De cette première limitation, il découle que les modèles animaux sont forcément réducteurs par rapport à la réalité biologique de l'asthme humain et sont actuellement incapables de rendre compte de la diversité phénotypique de l'asthme telle qu'elle a été soulignée dans l'approche

épidémiologique récente par clusters (Moore et al, 2010). En outre, il faut se souvenir que la validité de ces modèles reste discutable : si la prédictibilité (similarité des réponses pharmacologiques) est un critère de validité facilement rempli par certaines espèces, l'isomorphisme (similarité des symptômes) est rare puisque la plupart des animaux utilisés n'ont pas de symptômes spontanés et l'homologie (similarité étiologique et physiopathologique) peut et doit être améliorée. Par conséquent, compte tenu de ces failles, les résultats obtenus sur des modèles animaux ne peuvent être qu'un préalable à l'élaboration de protocoles de recherche clinique qu'ils doivent orienter et simplifier. De plus, il est souhaitable de travailler à l'amélioration de la validité des modèles animaux d'asthme actuellement disponibles.

Le perfectionnement de la modélisation passe par l'amélioration de l'homologie des modèles ce qui peut être obtenu par le développement de protocoles plus proches de la physiopathologie de la maladie humaine. En pratique, il s'agit de recourir à des allergènes pertinents chez l'homme, si possible sans adjonction d'adjuvants artificiels et en utilisant des voies d'exposition naturelles comme la voie cutanée et ou respiratoire. Dans cette optique, nous développons actuellement dans l'équipe de recherche en pathologies respiratoires de l'institut du thorax (UMR 915) un nouveau modèle murin d'asthme allergique aigu induit par l'exposition cutanée et respiratoire à des extraits totaux d'acariens (*Dermatophagoïdes farinae*), sans adjuvants artificiels. Le contrôle strict des conditions d'exposition aux allergènes en terme de concentration et de durée est probablement aussi un élément déterminant pour obtenir une meilleure homologie (Siegle et al, 2006) de même que l'utilisation d'animaux

phylogénétiquement plus proches de l'être humain comme les primates. La seconde piste pour améliorer la qualité de la modélisation est de complexifier les modèles existants. Nous avons déjà évoqué l'intérêt des protocoles utilisant des expositions allergéniques multiples (Goplen et al, 2009) ou associées à des polluants atmosphériques ubiquitaires (Larsen et al, 2010). Il serait sans doute également intéressant de mettre au point des modèles de comorbidité (asthme et obésité chez la souris par exemple). Enfin, l'approche conceptuelle des résultats doit être améliorée. A cet égard, les travaux de synthèse sur les résultats des nombreuses études animales déjà réalisées doivent être encouragés mais sont forcément limités par le manque de standardisation des protocoles d'induction et des techniques d'analyse. De même, il faut souligner l'intérêt du concept d'unité trophique épithéliale et mésenchymateuse (UMTE). Selon ce paradigme, l'arbre trachéo-bronchique est constitué de différents segments qui sont autant d'entités biologiques séparées les unes des autres. Chaque entité est composée de plusieurs compartiments structuraux et fonctionnels (compartiments épithélial, interstitiel, nerveux, vasculaire et immunologique) qui sont en interaction permanente les uns avec les autres. Un dysfonctionnement dans un compartiment peut induire un déséquilibre des autres compartiments rendant compte des multiples anomalies intervenant dans la physiopathologie de l'asthme et des cycles répétitifs lésion/inflammation/réparation qui caractérisent les maladies inflammatoires chroniques des voies aériennes (figure 57).

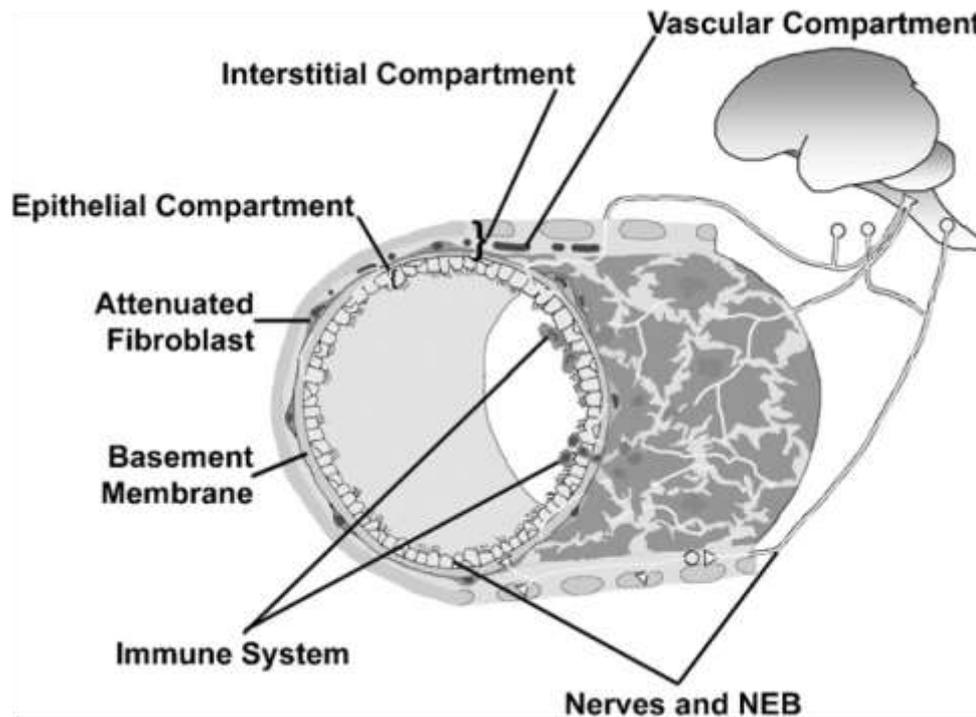


Figure 57 : représentation schématique de l'arbre trachéo-bronchique et de ses différents compartiments ; d'après Plopper et Hyde, 2008

Enfin, l'approche globale c'est à dire systémique de l'asthme et de l'allergie envisageant l'implication de différents tissus ou organes et leurs inter-relations paraît particulièrement intéressante et doit être développée (Holt et Strickland, 2010). Ces approches systémiques et multiparamétriques, complexes pour le cerveau humain, sont bien sûr largement facilitées par l'usage de l'informatique et de la modélisation *in silico* qui peut aussi nous aider à mieux appréhender la complexité du vivant.

# Bibliographie

Abraham W.M., Ahmed A., Lauredo I.T., Botvinnikova Y., Sielczak M.W., 2001. Chronic allergen challenge causes airway remodeling in sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 163:A415

Abraham W.M., 2008. Modeling asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep. *Pulm Pharmacol Ther* 21:743-54

Adler A., Cieslewicz G., Irvin C.G., 2004. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Appl Physiol* 97(1):286-92

Aguilar-Pimentel J.A., Alessandrini F., Huster K.M., Jakob T., Schulz H., Behrendt H., Ring J., de Angelis M.H., Busch D.H., Mempel M., Ollert M., 2009. Specific CD8 T Cells in IgE-mediated Allergy Correlate with Allergen Dose and Allergic Phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 181:7-16

Agrawal A., Singh S.K., Singh V.P., Murphy E., Parikh I., 2008. Partitioning of nasal and pulmonary resistance changes during noninvasive plethysmography in mice. *J Appl Physiol* 105(6):1975-9

Aldhous P., Coghlan A., Copley J., 1999. Let the people speak. *New Sci* 162:26-31

American Thoracic Society, 2000. Guidelines for metacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 161:309-29

Arima M., Yukawa T., Makino S., 1995. Effect of YM264 on the airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response in a guinea pig model of asthma. *Chest* 108(2):529-34

Arts J.H., Kuper C.F., 2007. Animal models to test respiratory allergy of low molecular weight chemicals: a guidance. *Methods* 41(1):61-71

Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 79(2):137-58

Bates J.H., Rincon M., Irvin C.G., 2009. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L401-10

Bates J.H., Cojocaru A., Haverkamp H.C., Rinaldi L.M., Irvin C.G., 2008. The Synergistic Interactions of Allergic Lung Inflammation and Intratracheal Cationic Protein. *Am J Respir Crit Care Med* 177(3):261-8

Bateson P., 1986. When to experiment on animals. *New Sci* 109(1496):30-2

- Bettinelli D., Kays C., Bailliar O., Capderou A., Techoueyres P., Lachaud J.L., Vaïda P., Miserocchi G., 2002. Effect of gravity on chest wall mechanics. *J Appl Physiol* 92(2):709-16
- Bischof R.J., Snibson K.J., Velden J.V., Meeusen E.N., 2008. Immune response to allergens in sheep sensitized to house dust mite. *J Inflamm* 20;5:16
- Black K.R., Suki B., Madwed J.B., Jackson A.C., 2001. Airway resistance and tissue elastance from input or transfer impedance in bronchoconstricted monkeys. *J Appl Physiol* 90:571-78
- Boyce J.A., Austen K.F., 2005. No audible wheezing : nuggets and conundrums from mouse asthma models *J Exp Med* 201:1869-73
- Brewer J.M., 2006. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 102:10-5
- Brumfiel G., 2008. Animal-rights activists invade Europe. *Nature* 451(7182):1034
- Cadot P., Meyts I., Vanoirbeek J.A., Vanaudenaerde B., Bullens D.M., Ceuppens J.L., 2010. Sensitization to Inhaled Ryegrass Pollen by Collateral Priming in a Murine Model of Allergic Respiratory Disease. *Int Arch Allergy Immunol* 152(3):233-42
- Canning B.J., Chou Y., 2008. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 21(5):702-20
- Canning B.J., 2003. Modeling asthma and COPD in animals : a pointless exercise. *Curr Opin Pharmacol* 3(3):244-50.
- Carpecchi M.R., 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244(4910);1288-92
- Chand N., Harrison J.E., Rooney S., Pillar J., Jakubicki R., Nolan K., Diamantis W., Sofia R.D., 1992. Anti-IL-5 monoclonal antibody inhibits allergic late phase bronchial eosinophilia in guinea pigs : a therapeutic approach. *Eur J Pharmacol* 211(1) :121-3
- Chang H.Y, Mitzner W., 2007. Sex differences in mouse models of asthma. *Can J Physiol Pharmacol* 85(12):1226-35
- Chapman R.W., 2008. Canine models of asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 21:731-42
- Collins R.A., Sly P.D., Turner D.J., Herbert C., Kumar R.K., 2003. Site of inflammation influences site of hyperresponsiveness in experimental asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 139(1):51-1
- Conejero L., Higaki Y., Baeza M.L., Fernández M., Varela-Nieto I., Zubeldia J.M., 2007. Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. *Clin Exp Allergy* 37(3):331-8

- Constant S.L., Bottomly K., 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297-322
- Crick F.H.C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R.J., 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227-32
- Darwin C., 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (John Murray)
- De Sanctis G.T., Daheshia M., Daser A., 2001. Genetics of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 108(1):11-20
- De Weck A.L., Mayer P., Stumper B., Schiessl B., Pickart L. 1997. Dog allergy, a model for allergy genetics. *Int Arch Allergy Immunol* 113(1-3):55-7
- Depuydt P.O., Lambrecht B.N., Joos G.F., Pauwels R.A., 2002. Effect of ozone exposure on allergic sensitization and airway inflammation induced by dendritic cells. *Clin Exp Allergy* 32(3):391-6
- Derksen F.J., Scott J.S., Miller D.C., Slocombe R.F., Robinson N.E., 1985. Broncho-alveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am Rev Respir Dis* 132(5):1066-70
- Devouassoux G., 2009. Physiopathologie de l'asthme. <http://allergo.lyon.inserm.fr>
- Dittrich A.M., Quarcoo D., Krokowski M., Ahrens B., Hamelmann E., 2006. Gene expression profiling as novel tool in experimental asthma research. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 2:31-3
- Driehuys B., Walker J., Pollaro J., Cofer G.P., Mistry N., Schwartz D., Johnson G.A., 2007. 3He MRI in mouse models of asthma. *Magn Reson Med* 58(5):893-900
- Eisenbarth S.C., Piggott D.A., Huleatt J.W., Visintin I., Herrick C.A., Bottomly K., 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 196(12):1645-51
- El-Azab J., Stewart P.B., 1977. The difference in effect of predosing with antiallergic compounds between the rat PCA model and the monkey asthma model. Comparison of the effects of PRD-92-Ea and disodium cromoglycate. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 55(1-6):343-9
- El Biaze S., Boniface S., Koscher V., Mamessier E., Dupuy P., Milhe F., Ramadour M., Vervloet D., Magnan A. 2003. T cell activation, from atopy to asthma : more a paradox than a paradigm. *Allergy* 58:844-53
- Epstein M.M., 2006. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol* 57(S2):41-4
- Epstein M.M., 2004. Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease? *Int Arch Allergy Immunol* 133:84-100

Ferreira F.D., Hoffmann-Sommergruber K., Breiteneder H., Pettenburger K., Ebner C., Sommergruber W., Steiner R., Bohle B., Sperr W.R., Valent P., 1993. Purification and characterization of recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. Immunological equivalence to natural Bet v I. *J Biol Chem* 268(26):19574-80

Finotto S., Neurath M.F., Glickman J.N., Qin S., Lehr H.A., Green F.H.Y., Ackerman K., Haley K., Galle P.R., Szabo S.J., Drazen J.M., De Sanctis G.T., Glimcher L.H., 2002. Development of Spontaneous Airway Changes Consistent with Human Asthma in Mice Lacking T-bet. *Science* 295(5553):336-38

Flajnik M.F., Kasahara M., 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system : genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics* 11;47-59

Flandre T.D., Leroy P.L., Desmecht D.J., 2003. Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *J Appl Physiol* 94(3):1129-36

Foster P.S., Ming Y., Matthei K.I., Young I.G., Temelkovski J., and Kumar R.K., 2000. Dissociation of Inflammatory and Epithelial Responses in a Murine Model of Chronic Asthma. *Lab Invest* 80:655-62

Gachelin G., 2008. De l'animal expérimental au modèle en recherche biomédicale. *Revue philosophique de la France et de l'étranger* 133:319-26

Glaab T., Taube C., Braun A., Mitzner W., 2007. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res* 14;8:63

Goplen N., Karim M.Z., Liang Q., Gorska M.M., Rozario S., Guo L., Alam R., 2009. Combined sensitization of mice to extracts of dust mite, ragweed, and *Aspergillus* species breaks through tolerance and establishes chronic features of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123(4):925-32

Graffi SJ, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Systemic administration of antigen-pulsed dendritic cells induces experimental allergic asthma in mice upon aerosol antigen rechallenge. *Clin Immunol* 103(2):176-84

Gueders M.M., Paulissen G., Crahay C., Quesada-Calvo F., Hacha J., Van Hove C., Tournoy K., Louis R., Foidart J.M., Noël A., Cataldo D.D., 2009. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res* 58(12):845-54

Haldar R., Brightling C.E., Hargadon B., Gupta S., Monteiro W., Sousa A., Marshall R.P., Bradding P., Green R.H., Wardlaw A.J., Pavord I.D., 2009. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* 360:973-84

Hamelmann E., Oshiba A., Loader J., Larsen G.L., Gleich G., Lee J., Gelfand E.W., 1997. Antiinterleukin-5 antibody prevents airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 155(3):819-25

Hamelmann E., Schwarze J., Takeda K., Oshiba A., Larsen G.L., Irvin C.G., Gelfand E.W., 1997. Non invasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-75

Hellings P.W., Ceuppens J.L., 2004. Mouse models of global airway allergy : what have we learned and what should we do ? *Allergy* 59:914-9

Herd C.M., Gozzard N., Page C.P., 1995. Capsaicin pre-treatment prevents the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness in neonatally immunised rabbits. *Eur J Pharmacol* 282(1-3):111-9

Herrick C.A., Xu L., Wisnewski A.V., Das J., Redlich C.A., Bottomly K., 2002. A novel mouse model of diisocyanate-induced asthma showing allergic-type inflammation in the lung after inhaled antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 109(5):873-8

Herrick C.A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R.E., Bottomly K., 2000. Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J Clin Invest* 105(6):765-75

Hewitt C.R., Brown A.P., Hart B.J., Pritchard D.I., 1995. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases 182(5):1537-44

Hirshman C.A., Malley A., Downes H., 1980. Basenji-Greyhound dog model of asthma: reactivity to *Ascaris suum*, citric acid, and methacholine. *J Appl Physiol* 49(6):953-7

Holme G., Piechuta H., 1981. The derivation of an inbred line of rats which develop asthma-like symptoms following challenge with aerosolized antigen. *Immunology* 42(1):19-24

Holt P.G., Strickland D.H., 2010. Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis: new perspectives from studies on acute exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 125(5):963-72

House A., Celly C., Young S., Kreutner W., Chapman R.W., 2001. Bronchoconstrictor reactivity to NKA in allergic dogs : a comparison to histamine and metacholine. *Pulm Pharmacol Ther* 14(2):135-40

Hoymann H.G., 2006. New developments in lung function measurements in rodents. *Exp Toxicol Pathol* 57 S2:5-11

Huang T.J., MacAry P.A., Eynott P., Moussavi A., Daniel K.C., Askenase P.W., Kemeny D.M., Chung K.F. 2001. Allergen specific Th1 cells counteract efferent

Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 166:207-17

Hughes A.L., 2003. Comparative Genomics : Genomes of mice and men. *Heredity* 90;115-6

Hyde D.M., Hamid Q., Irvin C.G., 2009. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol* 124(6 Suppl):S72-7

Inman M.D., Ellis R., Wattie J., Denburg A.J., O'Byrne P.M., 1999. Allergen-Induced Increase in Airway Responsiveness, Airway Eosinophilia, and Bone-Marrow Eosinophil Progenitors in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:473-9.

Irvin C.G., 2003. Lung volume: a principle determinant of airway smooth muscle function. *Eur Respir J* 22:3-5

Jacob F., Monod J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-56

Karol M.H., 1994. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J* 7: 555-68

Keir S., Page C., 2008. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulm Pharmacol Ther* 21:721-30

Kim J.O., Kim D.H., Chang W.S., Hong C., Park S.H., Kim S., Kang C.Y. Asthma is induced by intranasal coadministration of allergen and natural killer T-cell ligand in a mouse model. *J Allergy Clin Immunol* 114(6):1332-8

Kips J.C., Anderson G.P., Fredberg J.J., Herz U., Inman M.D., Jordana M., Kemeny D.M., Lötvall J., Pauwels R.A., Plopper C.G., Schmidt D., Sterk P.J., Van Oosterhout A.J., Vargaftig B.B., Chung K.F., 2003. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 22(2):374-82

Kozmik Z., 2008. The role of Pax genes in eye evolution. *Brain Res Bull* 18;75(2-4):335-9

Johnson J.R., Wiley R.E., Fattouh R., Swirski F.K., Gajewska B.U., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C., Ellis R., Inman M.D., Jordana M., 2004. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 169(3):378-85

Johnston N.W., Sears M.R. 2006. Asthma exacerbations. 1. Epidemiology. *Thorax* 61:722-28

Julia V., Hessel E.M., Malherbe L., Glaichenhaus N., O'Garra A., Coffman R.L., 2002. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16(2):271-83

Juniper E.F., Frith P.A., Hargreave F.E., 1981. Airway responsiveness to histamine and methacholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 36(8):575-9

Karol M.H., 1994. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J* 7:555-68

Kauffman H.F., Tamm M., Timmerman J.A., Borger P., 2006. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy* 28;4:5.

Kaufmann S., 2005. Robert Koch, the Nobel Prize, and the Ongoing Threat of Tuberculosis. *N Engl J Med* 353(23):2423-26

Kim J., Merry A.C., Nemzek J.A., Bolgos G.L., Siddiqui J., Remick D.G., 2001. Eotaxin represents the principal eosinophil chemoattractant in a novel murine asthma model induced by house dust containing cockroach allergens. *J Immunol* 167:2808-15

Kips J.C., O'Connor B.J., Langley S.J., Woodcock A., Kerstjens H.A., Postma D.S., Danzig M., Cuss F., Pauwels R.A., 2003. Effect of SCH55700, antihuman interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1655-59

Krell R.D., Chakrin L.W., Wardell J.R., 1976. The effect of cholinergic agents on a canine model of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 58(1):19-30

Kozmik Z. The rôle of Pax gene in eye évolution. *Brain Res Bull* 75(2-4):335-9

Kumar R.K., Foster P.S., 2002. Modeling allergic asthma in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:267-72

Kumar R.K., Foster P.S., 2001. Murine models of chronic asthma. *Immunol Cell Biol* 79(2):141-4

Kucharewicz I., Bodzenta-Łukaszyk A., Buczek W., 2009. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep* 60(6):783-8

Lambrecht B.N., Hoogsteden H.C., Pauwels R.A., 2001. Dendritic Cells as Regulators of the Immune Response to Inhaled Allergen : Recent Findings in Animal Models of Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 124:432-46

Larsen S.T., Matsubara S., McConville G., Poulsen S.S., Gelfand E.W., 2010. Ozone increases airway hyperreactivity and mucus hyperproduction in mice previously exposed to allergen. *J Toxicol Environ Health* 73(11):738-47

Leckie M.J., Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B.J., Walls C.M., Mathur A.K., Cowley H.C., Chung K.F., Djukanovic R., Hansel T.T., Holgate S.T., Sterk P.J., Barnes P.J., 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356(9248):2144-48

- Lee-Fowler T.M., Cohn L.A., DeClue A.E., Spinka C.M., Ellebracht R.D., Reiner C.R., 2009. Comparison of intradermal skin testing (IDST) and serum allergen-specific IgE determination in an experimental model of feline asthma. *Vet Immunol Immunopathol* 132(1):46-52
- Levitt R.C., Mitzner W., 1989. Autosomal recessive inheritance of airway hyperreactivity to 5-hydroxytryptamine. *J Appl Physiol* 67:1125-32
- Li X.M., Schofield B.H., Wang Q.F., Kim K.H., Huang S.K., 1998. Induction of pulmonary allergic responses by antigen-specific Th2 cells. *J Immunol* 160:1378-84
- List A.F., 2007. Lenalidomide – The Phoenix Rises. *N Engl J Med* 357(21):2183-86
- Lomask M., 2006. Further exploration of the Penh parameter. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 2:13-20
- Mamessier E., Nieves A., Vervloet D., Magnan A., 2006. Diesel exhaust particles enhance T-cell activation in severe asthmatics. *Allergy* 61(5):581-8
- Mauser P.J., Pitman A.M., Fernandez X., Foran S.K., Adams G.K., Kreutner W., Egan R.W., Chapman R.W., 1995. Effects of an antibody to interleukin-5 in a monkey model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 152:467-72
- McKinney W.T., 1984. Animal models of depression : an overview. *Psychiatr Dev* 2(2):77-96
- Mitzner W., Tankersley C., 2003. Interpreting Penh in mice. *J Appl Physiol* 94(2):828-31
- Miyabara Y., Takano H., Ichinose T., Lim H.B., Sagai M., 1998. Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 157(4 Pt 1):1138-44
- Moise N.S., Wiedenkiller D., Yeager A.E., Blue J.T., Scarlett J., 1989. Clinical, radiographic, and bronchial cytologic features of cats with bronchial disease: 65 cases (1980-1986). *J Am Vet Med Assoc* 194(10):1467-73.
- Mojtabavi N., Dekan G., Stingl G., Epstein M.M., 2002. Long-Lived Th2 Memory in Experimental Allergic Asthma. *J Immunol* 169(9):4788-96
- Moore W.C., Meyers D.A., Wenzel S.E., Teague W.G., Li H., Li X., D'Agostino R. Jr, Castro M., Curran-Everett D., Fitzpatrick A.M., Gaston B., Jarjour N.N., Sorkness R., Calhoun W.J., Chung K.F., Comhair S.A., Dweik R.A., Israel E., Peters S.P., Busse W.W., Erzurum S.C., Bleeker E.R.; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program., 2010. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):315-23

- Morsink M.C., Dukers D.F., 2009. Teaching neurophysiology, neuropharmacology, and experimental design using animal models of psychiatric and neurological disorders. *Adv Physiol Educ* 33(1):46-52
- Neveu W.A., Allard J.B., Dienz O., Wargo M.J., Ciliberto G., Whittaker L.A., Rincon M., 2009. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J Immunol* 183(3):1732-8
- Nordgren A., 2004. Moral imagination in tissue engineering research on animal models. *Biomaterials* 25:1723-34
- Norris Reiner C.R., Decilea K.C., Berghaus R.D., Williamse K.J., Leutenegger C.M., Walby W.F., Schelegled E.S., Hyded D.M., Gershwin L.J., 2004. An Experimental Model of Allergic Asthma in Cats Sensitized to House Dust Mite or Bermuda Grass Allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 135:117-31
- Ochkur SI, Jacobsen EA, Protheroe CA, Biechele TL, Pero RS, McGarry MP, Wang H, O'Neill KR, Colbert DC, Colby TV, Shen H, Blackburn MR, Irvin CC, Lee JJ, Lee NA., 2007. Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. *J Immunol* 15;178(12):7879-89
- Olmez D., Babayigit A., Erbil G., Karaman O., Bagriyanik A., Yilmaz O., Uzuner N., 2009. Histopathologic changes in two mouse models of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19(2):132-8.
- Pabst R., Gehrke I., 1990. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(2):131-5.
- Pagel M., 2009. Natural selection 150 years on. *Nature* 457(7231):808-11
- Patterson R., Harris K. E., Suzsko I. M., Roberts M., 1976. Reagin-Mediated Asthma in Rhesus Monkeys and Relation to Bronchial Cell Histamine Release and Airway Reactivity to Carbocholine. *J Clin Invest* 57(3):586-93
- Pauluhn J., 2008. Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI): analysis of the elicitation dose-response relationship. *Toxicol Sci* 104(2):320-31
- Pennock B.E., Cox C.P., Rogers R.M., Cain W.A., Wells J.H., 1979. A non invasive technique for measurement of changes in specific airway reactivity. *J Appl Physiol* 46(2):399-406
- Phipps S., Lam C.E., Kaiko G.E., Foo S.Y., Collison A., Mattes J., Barry J., Davidson S., Oreo K., Smith L., Mansell A., Matthaei K.I., Foster P.S., 2009. Toll/IL-1 Signaling Is Critical for House Dust Mite-specific Th1 and Th2 Responses. *Am J Respir Crit Care Med* 179(10):883-93

Piggott D.A., Eisenbarth S.C., Xu L., Constant S.L., Huleatt J.W., Herrick C .A., Bottomly K., 2005. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest* 115(2):459-67

Pires-daSilva A., Sommer R.J., 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature Reviews Genetics* 4:39-49

Plopper C.G., Hyde D.M., 2008. The non-human primate as a model for studying COPD and asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 21(5):755-66

Pride N.B., 1992. Forced oscillation techniques for measuring mechanical properties of the respiratory system. *Thorax* 47:317-20

Prinz I., Gregoire C., Mollenkopf H., Aguado E., Wang Y., Malissen M., Kaufmann S.H.E., Malissen B., 2005. The Type 1 Cysteinyl Leukotriene Receptor Triggers Calcium Influx and Chemotaxis in Mouse  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  Effector T Cells. *J Immunol* 175(2):713-9

Ratray N.J., Botham P.A., Hext P.M., Woodcock D.R., Fielding I., Dearman R.J., Kimber I., 1994. Induction of respiratory hypersensitivity to diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI) in guinea pigs. Influence of route of exposure. *Toxicology* 88(1-3):15-30

Russo M., Nahori M.A., Lefort J., Gomes E., de Castro Keller A., Rodriguez D., Ribeiro O.G., Adriouch S., Gallois V., de Faria A.M., Vargaftig B.B., 2001. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(5):518-26.

Russell W.M.S., Burch M.L., 1959. The principles of humane experimental technique. London, UFAW.

Sarpong S.B., Zhang L.Y., Kleeberger S.R., 2003. A novel mouse model of experimental asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 132(4):346-54

Saglani S., Mathie S.A., Gregory L.G., Bell M.J., Bush A., Lloyd C.M., 2009. Pathophysiological Features of Asthma Develop in Parallel in House Dust Mite–Exposed Neonatal Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41(3):281-9

Sakai K., Yokoyama A., Kohno N., Hamada H., Hiwada K., 2001. Prolonged Antigen Exposure Ameliorates Airway Inflammation But Not Remodeling in a Mouse Model of Bronchial Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 126(2):126-34

Sarlo K., Clark E.D., Ferguson J., Zeiss C.R., Hatoum N., 1994. Induction of type I hypersensitivity in guinea pigs after inhalation of phthalic anhydride. *J Allergy Clin Immunol* 94:747-56

Schröder N.W., Maurer M., 2007. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy* 62(6):579-90

- Seymour B.W., Pinkerton K.E., Friebertshauer K.E., Coffman R.L., Gershwin L.J., 1997. Second-hand smoke is an adjuvant for T helper-2 responses in a murine model of allergy. *J Immunol* 159(12):6169-75
- Shichijo M., Arimura A., Hirano Y., Yasui K., Suzuki N., Deguchi M., Abraham W.M., 2009. Prostaglandin D2 receptor antagonist modifies experimental asthma in sheep. *Clin Exp Allergy* 39(9):1404-14
- Shinagawa K., Kojima M., 2003. Mouse model of airway remodeling : strain differences. *Am J Respir Crit Care Med* 168:959-67
- Shubin N., Tabin C., Carroll S., 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457(7231):818-23
- Siegle J.S., Hansbro N., Herbert C., Yang M., Foster P.S., Kumar R.K., 2006. Airway Hyperreactivity in Exacerbation of Chronic Asthma Is Independent of Eosinophilic Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(5):565-70
- Skornik W.A., Brain J.D., 1990. Breathing and lung mechanics in hamsters: effect of pentobarbital anesthesia. *J Appl Physiol* 68(6):2536-41
- Subbarao P., Mandhane P.J., Sears M.R., 2009. Asthma : epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* 27;181(9):181-90
- Sur S., Wild J.S., Choudhury B.K., Sur N., Alam R., Klinman D.M., 1999. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 162(10):6284-93
- Swirski F.K., D'Sa A., Kianpour S., Inman M.D., Stämpfli M.R., 2006. Prolonged ovalbumin exposure attenuates airway hyperresponsiveness and T cell function in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 141(2):130-40
- Temelkovski J., Hogan S.P., Shepherd D.P., Foster P.S., Kumar R.K., 1998. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* 53(10):849-56
- Tohda Y., Kubo H., Ito M., Fukuoka M., Nakajima S., 2001. Histopathology of the airway epithelium in an experimental dual-phase model of bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 31:135 -43
- Tomaki M., Zhao L.L., Lundahl J., Sjöstrand M., Jordana M., Lindén A., O'Byrne P., Lötvall J., 2000. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. *J Immunol* 165(7):4040-50
- Tournoy K.G., Hove C., Grooten J., Moerloose K., Brusselle G.G., Joos G.F., 2006. Animal models of allergen-induced tolerance in asthma: are T-regulatory-1 cells (Tr-1) the solution for T-helper-2 cells (Th-2) in asthma? *Clin Exp Allergy* 36(1):8-20

- Trompette A., Divanovic S., Visintin A., Blanchard C., Hegde R.S., Madan R., Thorne P.S., Wills-Karp M., Gioannini T.L., Weiss J.P., Karp C.L., 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457(7229):585-8.
- Van Scott M.R., Hooker J.L., Ehrmann D., Shibata Y., Kukoly C., Salleng K., Westergaard G., Sandrasagra A., Nyce J., 2004. Dust mite-induced asthma in cynomolgus monkeys. *J Appl Physiol* 96(4):1433-44
- Van Vyve T., Chanez P., Lacoste J.Y., Bousquet J., Michel F.B., Godard P., 1992. Comparison between bronchial and alveolar samples of bronchoalveolar lavage fluid in asthma *Chest* 102;356-61
- Vanoirbeek J.A., Rinaldi M., De Vooght V., Haenen S., Bobic S., Gayan-Ramirez G., Hoet P.H., Verbeken E., Decramer M., Nemery B., Janssens W., 2010. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42(1):96-104
- Vanoirbeek J.A., Tarkowski M., Vanhooren H.M., De Vooght V., Nemery B., Hoet P.H., 2006. Validation of a mouse model of chemical-induced asthma using trimellitic anhydride, a respiratory sensitizer, and dinitrochlorobenzene, a dermal sensitizer. *J Allergy Clin Immunol* 117(5):1090-7
- Wan H., Winton H.L., Soeller C., Tovey E.R., Gruenert D.C., Thompson P.J., Stewart G.A., Taylor G.W., Garrod D.R., Cannell M.B., Robinson C., 1999. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104(1):123-33
- Warbrick E.V., Dearman R.J., Kimber I., 2002. IgG and IgE antibody responses following exposure of Brown Norway rats to trimellitic anhydride: comparison of inhalation and topical exposure. *Toxicology* 172(3):157-68
- Watson J.D., Crick F.H.C. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356):737-8
- Wegmann M., Fehrenbachw H., Fehrenbachw A., Held T., Schramm C., Garn H., Renz H., 2005. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 35:1263-71
- Werner-Klein M., Göggel R., Westhof A., Erb K.J., 2008. Development and characterisation of a novel and rapid lung eosinophil influx model in the rat. *Pulm Pharmacol Ther* 21:648-56
- Wiedermann U., Herz U., Baier K., Vrtala S., Neuhaus-Steinmetz U., Bohle B., Dekan G., Renz H., Ebner C., Valenta R., Kraft D., 2001. Intranasal treatment with a recombinant hypoallergenic derivative of the major birch pollen allergen Bet v 1 prevents allergic sensitization and airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 126(1):68-77
- Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X., Schofield B., Neben T.Y., Karp C.L., Donaldson D.D., 1998. Interleukin-13: Central mediator of allergic asthma.

*Science* 282:2258-61

Woisin F.E., Matsumoto T., Douglas G.J., Paul W., Whalley E.T., Page C.P., 2000. Effect of antagonists for NK(2) and B(2) receptors on antigen-induced airway responses in allergic rabbits, *Pulm Pharmacol Ther* 13(1):13-23

Yu M., Tsai M., Tam S.Y., Jones C., Zehnder J., Galli S.J., 2006. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 116(6):1633-41

Zhang X.D., Fedan J.S., Lewis D.M., Siegel P.D., 2004. Asthma-like biphasic airway responses in Brown Norway rats sensitized by dermal exposure to dry trimellitic anhydride powder. *J Allergy Clin Immunol* 113:320-6

Zosky G.R., Sly P.D., 2007. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 37:973-88

# Annexes

# Annexe 1 : avancée de la recherche médicale et expérimentation animale

## PRIX NOBEL DE MEDECINE ET DE PHYSIOLOGIE OBTENUS DEPUIS 1901 POUR DES DÉCOUVERTES S'APPUYANT SUR DES MODÈLES ANIMAUX

1901	E. A. von Behring (All.)	Développement d'un sérum anti-diphtérique	Cobayes	
1902	A. Ross (G.-B.)	Étude du cycle de l'agent du paludisme	Pigeons	
1904	J. P. Belzer (Russ.)	Physiologie de la digestion	Chiens	
1905	B. Koch (Aut.)	Étude de la tuberculose	Vaches, moutons	
1906	C. Golgi (It.), S. Ramón y Cajal (Esp.)	Étude sur le système nerveux central	Chiens, chevaux	
1907	A. Lewin (Fr.)	Travaux sur la paludisme	Oiseaux	
1908	F. Ehrlich (All.), E. Metchnikov (Russ.)	Réactions immunitaires et fonctions des phagocytes	Oiseaux, poissons, Cobayes	
1909	T. Kocher (Suisse)	Physiologie, pathologie et chirurgie de la glande thyroïde	Oiseaux	
1910	A. Kossel (Aut.)	Étude de la chimie des cellules	Oiseaux	
1912	A. Carrel (Fr.)	Suture et greffe de vaisseaux sanguins	Chiens	
1913	C. Richet (Fr.)	Mécanismes de l'anaphylaxie	Chiens, lapins	
1919	J. Bordet (Belg.)	Mécanismes de l'immunité	Cobayes, chevaux, lapins	
1920	A. Krogh (Dan.)	Contribution à l'étude de la régulation motrice des capillaires	Grenouilles	
1922	A. V. Hill (G.-B.), O. Meyerhof (Aut.)	Concomitance de l'oxygène et métabolisme de l'acide dans le muscle	Grenouilles	
1923	F. G. Banting (Can.), J. J. R. Macleod (Can.)	Découverte de l'insuline et mécanisme du diabète	Chiens, lapins, poissons	
1924	W. Eastman (P.-B.)	L'Electrocardiogramme	Chiens	
1928	C. Nicolle (Fr.)	Pathogénèse du typhus	Singes, Cobayes, rats, porcs	
1929	C. Eklman (P.-B.), F. G. Hopkins (G.-B.)	Découverte des vitamines stimulant la croissance	Poulet	
1932	C. S. Sherrington (G.-B.), E. D. Adrian (G.-B.)	Fonction des neurones	Chiens, chats	
1933	T. H. Morgan (USA)	Découverte dans le rôle des chromosomes dans l'hérédité	Drosophiles	
1934	G. H. Wipple (USA), W. P. Murphy (USA), G. R. Minot (USA)	Thérapie hépatique de l'anémie	Chiens	
1935	H. Spemann (Aut.)	Effet "organisateur" dans le développement embryonnaire	Grenouilles, crabe	
1936	H. H. Dale (G.-B.), O. Loewi (Aut.)	Transmission chimique de l'impulsion nerveuse	Chiens, grenouilles, oiseaux, reptiles	
1938	C. Heymans (Belg.)	Rôle des sinus et des mécanismes artériels dans la régulation de la respiration	Chiens	
1939	G. Domagk (Aut.)	Effets antibactériens du prontosil	Souris, lapins	
1943	E. A. Dooly (USA), H. Dam (Dan.)	Découverte de la fonction de la vitamine K	Rats, chiens, poulets, souris	
1944	J. Erlanger (USA), H. S. Gasser (USA)	Fonctions spécifiques des cellules nerveuses	Chats	
1945	A. Fleming (G.-B.), E. B. Chain (G.-B.), H. Florey (Autr.)	Découverte de la pénicilline	Souris	
1947	C. F. Cori (USA), G. T. Cori (USA), B. A. Hoody (Arg.)	Conversion catalytique du glycogène, rôle de l'hypophyse dans le métabolisme du sucre	Grenouilles, chiens, crapauds	
1949	A. C. de Abreu Soares Egan Moroz (Port.), W. R. S. Hoar (Suisse)	Organisation fonctionnelle du cerveau en tant que régulateur des organes internes	Chats	
1950	P. S. Hensch (USA), E. C. Kendall (USALT), R. S. Schoen (Suisse)	Rôle antagoniste des hormones surrénales	Vaches	
1951	M. Theiler (Sud.-Afr.)	Vaccin contre la fièvre jaune	Singes, souris	
1952	S. A. Waksman (USA)	Découverte de la streptomycine, le premier antibiotique efficace contre la tuberculose	Cobayes	
1953	H. A. Krebs (G.-B.), F. A. Lipmann (USA)	Caractérisation du cycle de l'acide citrique	Pigeons	
1954	J. F. Enders (USA), T. H. Weller (USA), F. C. Robbins (USA)	Travaux sur la poliomyélite - Développement de vaccins	Singes, souris	
1955	A. H. T. Tiselius (Suède)	Nature et mode d'action des enzymes oxydatives	Chevaux	
1957	D. Boveri (It.)	Synthèse de molécules à action inhibitrice sur le système vasculaire et les muscles squelettiques	Chien, lapin	
1960	F. M. Burnet (Autr.), P. B. Medawar (G.-B.)	Compréhension de la tolérance immunitaire acquise	Lapins	
1961	G. von Bekesy (USA)	Mécanismes physiques de la stimulation de l'oreille interne	Cobayes	
1963	A. L. Hodgkin (G.-B.), F. Huxley (G.-B.), C. Eccles (Autr.)	Mécanismes locaux impliqués dans l'excitation et l'inhibition des portions périphériques et centrales des membranes des cellules nerveuses	Chiens, grenouilles, crabes, calmars	
1964	K. E. Bloch (USA), F. Lynen (RFA)	Régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras	Rats	
1966	F. P. Rose (USA), C. B. Huggins (USA)	Virus induisant des tumeurs et traitements hormonaux des cancers	Rats, lapins, poules	
1967	R. Grant (Suède), H. R. Hartline (USA), G. Wald (USA)	Processus physiologiques et chimiques de la vision	Poulet, lapin, poisson, crabe	
1968	R. Holley (USA), G. Khourana (USA), M. Nirenberg (USA)	Interprétation du code génétique et son rôle dans la synthèse des protéines	Chats, rats	
1970	J. Axelrod (USA), B. Katz (G.-B.), U. von Euler (Suède)	Mécanismes de sécrétion et relargage des neurotransmetteurs	Chats, rats	
1971	E. Sutherland (USA)	Mécanisme d'action des hormones	Foie de mammifères	
1972	G. Edelman (USA), R. Porter (G.-B.)	Structure chimique des anticorps	Cobayes, lapins	
1973	K. Lorenz (Autr.), K. von Frisch (Autr.), N. Tinbergen (P.-B.)	Organisation sociale et comportementale des animaux en groupe	Oiseaux, poissons, abeilles	
1974	A. Claude (Belg.), C. de Duve (Belg.), G. Palade (USA)	Organisation structurale et fonctionnelle des cellules	Poulets, Cobayes, rats	
1975	H. M. Temin (USA), R. D. Baltimore (USA)	Interaction entre les virus oncogènes et le génome	Singes, chevaux, poulets, souris	
1976	C. Gajdusek (USA), B. S. Blumberg (USA)	Nouveaux mécanismes pour l'origine et la dissémination des maladies	Chimpanzés	
1977	R. Galois (USA), A. V. Schally (USA), R. Yalow (USA)	Hormones hypothalamiques	Moutons, cochons	
1979	A. M. Cormack (Afr. du S.), G. N. Hounsfield (G.-B.)	Invention de la tomographie axiale par ordinateur (TAP)	Cochons	
1980	J. Dausset (Fr.), G. D. Sidel (USA), B. Benacerraf (USA)	Découverte en étude de la fonction du complexe majeur d'histocompatibilité	Souris, Cobayes	
1981	D. H. Hubel (USA), R. W. Sperry (USA), T. N. Wiesel (Suède)	Traitement des informations visuelles par le cerveau	Chats, singes	
1982	S. K. Bergström (Suède), B. I. Samuelsson (Suède), J. R. Vane (G.-B.)	Découverte des prostaglandines	Rats, lapins, Cobayes	
1984	N. Jerne (Dan.), G. Köhler (RFA), C. Milstein (G.-B.)	Technique de formation des anticorps monoclonaux	Souris	
1985	M. S. Brown (USA), J. L. Goldstein (USA)	Découverte de la régulation du métabolisme du cholestérol	Souris, rats	
1986	S. Cohen (USA), R. Levi-Montalcini (It. et USA)	Facteur de croissance des nerfs (NGF) et facteur de croissance épidermique (EGF)	Souris, poulets, serpents	
1987	Tonegawa Susumu (Jap.)	Découverte des principes génétiques gouvernant la diversité des anticorps	Embryons de souris	
1988	J. Black (G.-B.), G. B. Elion (USA), G. H. Hitchings (USA)	Découvertes des facteurs les plus importants pour la conception de médicaments	Souris, rats, lapins	
1989	H. Bahop (USA), H. Varmus (USA)	Origine cellulaire des retrovirus oncogènes	Poulets	
1990	J. E. Murray (USA), E. D. Thomas (USA)	Techniques de transplantation d'organes	Chiens	
1991	E. Neher (Aut.), B. Sakmann (Aut.)	Communication chimique entre les cellules	Grenouilles	
1995	E. B. Lewis (USA), C. Nüsslein-Volhard (Aut.), E. F. Wieschaus (Suisse)	Contrôle génétique du développement embryonnaire précoce	Drosophile	
1996	P. Doherty (Autr.), R. Zinkernagel (Suisse)	Reconnaissance par le système immunitaire des cellules infectées par un virus	Souris	
1997	S. Prusiner (USA)	Découverte des prions	Souris, hamsters	
1998	Robert F. Foytgett, Louis J. Ignarro, Ferid Murad	Régulation de la pression sanguine par l'oxyde nitrique (NO)	Lapins	
1999	Gunter Blobel (USA)	Découverte de signaux intracellulaires des protéines permettant leur localisation et leur transport dans la cellule	Souris, rats, chiens	
2000	Arvid Carlsson (Suède), Paul Greengard (USA), Eric R. Kandel (USA)	Découvertes sur la transduction du signal dans le système nerveux	Souris, lézards	
2001	Leland H. Hartwell (USA), R. Timothy (Tim) Hunt (G.-B.), Sir Paul M. Nurse (G.-B.)	Découverte de mécanismes régulateurs de cycle cellulaire	Grenouilles	
2002	Sydney Brenner (G.-B.), John Sulston (G.-B.), Robert Horvitz (USA)	Régulation génétique du développement des organes et de la mort cellulaire	Nématodes	
2003	Paul C. Lauterbur (USA), Sir Peter Drazdoff (G.-B.)	Découverte concernant l'IRM	Grenouilles	

Rédigé en collaboration avec le CNRS - Photos A. Pugeat - Cf. Recherche au CNRS

## Annexe 2 : score éthique de Porter

### **A : Objectif de l'expérience**

1. Réduction des douleurs intenses chez l'Homme et les animaux
2. Réduction des douleurs modérées chez l'Homme et les animaux
3. Amélioration importante de la santé ou du bien-être de l'Homme ou des animaux
4. Amélioration relative de la santé ou du bien-être de l'Homme ou des animaux
5. Recherche fondamentale (sans relation avec douleur ou santé)

### **B : Capacité réelle de l'expérience à atteindre l'objectif**

1. Excellente
2. Très bonne
3. Moyenne
4. Limitée
5. Très limitée ou impossible à apprécier

### **C : Espèce animale**

1. Faible sensibilité / conscience
2. Sensibilité moyenne
3. Sensibilité mais pas de conscience
4. Sensibilité et conscience
5. Sensibilité, intelligence

### **D : Douleur probable lors de l'expérience**

1. Aucune
2. Minimale
3. Modérée
4. Considérable
5. Intense

### **E : Durée de l'inconfort ou de la détresse**

1. Nulle ou très courte
2. Courte
3. Modérée
4. Longue
5. Très longue

### **F : Durée de l'expérience**

1. Extrêmement courte ( $10^2$  espérance de vie de l'espèce)
2. Courte ( $2 \times 10^4$  espérance de vie)
3. Modérée ( $2 \times 10^5$  espérance de vie)
4. Longue ( $2 \times 10^7$  espérance de vie)
5. Très longue ( $> 2 \times 10^9$  espérance de vie)

### **G : Nombre d'animaux**

1. 1 à 5
2. 5 à 10
3. 10 à 20
4. 20 à 100
5.  $> 100$

### **H : Qualité des conditions de vie**

1. Excellente
2. Très bonne
3. Moyenne
4. Mauvaise
5. Très mauvaise

## Annexe 3 : charte nationale sur l'éthique de l'expérimentation animale



MINISTÈRE  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE

MINISTÈRE  
DE L'AGRICULTURE  
ET DE LA PÊCHE

# Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale\*

## PREAMBULE

*Considérant que les animaux sont des êtres sensibles, capables de souffrir, dotés de capacités cognitives et émotionnelles et ayant des besoins physiologiques et comportementaux propres à chaque espèce ;*

*considérant qu'il n'existe pas toujours de méthode substitutive qui puisse éviter de recourir à l'usage d'animaux pour la recherche, l'enseignement et la mise en œuvre des tests réglementaires ;*

*considérant que dans toute démarche expérimentale les hommes se doivent d'aller au delà de la seule application de la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques ;*

*considérant que, pour répondre à cette attente, des comités d'éthique en matière d'expérimentation animale ont été créés à l'initiative d'établissements publics ou privés et qu'il convient de les généraliser sur la base de principes communs ;*

*considérant que ces comités doivent prendre en compte les principes de la charte prévue par l'article R-214-122 du Code rural pour formuler leurs avis ;*

**le Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale propose la présente CHARTÉ pour servir de référence aux expérimentateurs et à leurs collaborateurs, aux institutions et aux comités d'éthique.**

## Article 1 : Respect de l'animal

L'éthique de l'expérimentation animale est fondée sur le devoir qu'a l'Homme de respecter les animaux en tant qu'êtres vivants et sensibles.

## Article 2 : Responsabilité individuelle

Tout recours à des animaux en vue d'une expérimentation engage la responsabilité morale de chaque personne impliquée.

## Article 3 : Responsabilité des institutions

Les institutions sont moralement responsables des expérimentations pratiquées, en leur sein, sur des animaux.

## Article 4 : Compétences

Cette responsabilité implique à tous niveaux d'intervention une formation éthique et des compétences réglementaires, scientifiques, techniques appropriées aux espèces utilisées et dûment actualisées.

Les compétences spécialisées sont recherchées aussi souvent que nécessaire auprès d'experts en physiologie, éthologie ou médecine, des animaux concernés.

## Article 5 : Principes généraux

Une réflexion sur le bien-fondé scientifique, éthique et sociétal du recours aux animaux doit précéder toute démarche expérimentale.

Le recours aux méthodes et techniques visant à supprimer ou à réduire au strict minimum les atteintes aux animaux doit être systématiquement recherché. Leur développement et leur promotion doivent être largement favorisés.

Le souci d'optimiser les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux utilisés doit être permanent et s'exprimer tout au long de leur vie.

Le recours à l'avis d'un comité d'éthique doit précéder toute expérimentation impliquant des animaux.

## Article 6 : La démarche éthique

Toute expérimentation impliquant des animaux doit être précédée d'une réflexion sur :

- l'utilité de l'expérimentation envisagée par rapport à des travaux conduits par ailleurs ;

\* Cette charte a été proposée par le Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale en 2008

\* L'expression « expérimentation animale » est entendue au sens de la réglementation en vigueur (articles R-214-87 à 95 du Code rural)

- la pertinence des méthodes choisies et le niveau de probabilité d'aboutissement à des résultats tangibles ;
- l'absence de méthodes substitutives adéquates pour poursuivre une finalité identique ;
- l'adéquation entre les modèles animaux envisagés et les objectifs scientifiques poursuivis ;
- l'importance des atteintes aux animaux comparée à l'intérêt des résultats attendus ;
- la prise en compte des caractéristiques biologiques et cognitives des espèces concernées ;
- la nécessité de garantir que le choix des espèces, lorsqu'il s'agit d'espèces non domestiques, ne menace pas la biodiversité ;
- la limitation du nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire ;
- le choix des conditions de vie, d'hébergement, de soins et d'utilisation des animaux, de sorte que soient respectés le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux.

**Article 7 : Rôle des comités d'éthique**

Chaque comité d'éthique constitue un lieu de dialogue et de réflexion.

Il donne des avis sur les projets d'expérimentation impliquant des animaux qui lui sont soumis, en se référant aux principes énoncés dans la présente Charte.

Ces avis sont motivés et peuvent être assortis de recommandations.

Chaque comité d'éthique participe à la promotion de l'ensemble des principes d'éthique énoncés dans la présente Charte.

**Article 8 : Composition des comités d'éthique**

Chaque comité d'éthique réunit les compétences pluridisciplinaires qui lui permettent d'émettre des avis éclairés. La société civile et la médecine vétérinaire y sont représentées.

**Article 9 : Déontologie des comités d'éthique**

Tout comité d'éthique doit être indépendant, impartial et garantir la confidentialité des dossiers qui lui sont soumis.

Il prend en compte les avis ou recommandations du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale.

## Annexe

### Les comités d'éthique en expérimentation animale

Les comités d'éthique en expérimentation animale sont des instances consultatives dont la mission est de promouvoir l'ensemble des principes et pratiques éthiques en expérimentation animale.

Dans la présente annexe, le Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale propose à ces comités, aux expérimentateurs et aux institutions dont ils dépendent des modalités de mise en application de la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale (la Charte) qu'il a édictée.

#### I - RÔLE

Le rôle fondamental d'un comité d'éthique, défini par l'article 7 de la Charte, est de donner un avis à tout expérimentateur qui souhaite entreprendre une investigation nécessitant, dans le cadre de la réglementation actuelle, le recours à des animaux vertébrés vivants. En outre, l'article 7 indique que les comités d'éthique doivent promouvoir l'ensemble des principes énoncés dans la Charte.

Tout établissement d'expérimentation animale doit relever d'un, et d'un seul, comité d'éthique. Plusieurs établissements peuvent dépendre du même comité en s'associant pour créer ce comité qui leur est commun.

## II - STRUCTURE

La composition et l'organisation d'un comité d'éthique doivent lui permettre d'assurer son indispensable **fiabilité**.

A cet effet, elles requièrent :

- \* une représentation pluridisciplinaire qui permet l'expression de la pluralité des sensibilités. A cette fin, un comité d'éthique doit être composé, *a minima*, de :
  - un chercheur,
  - une personne appelée à participer aux expériences,
  - une personne affectée à l'hébergement et aux soins des animaux,
  - un vétérinaire,
  - une personne extérieure à l' (aux) établissement(s) d'expérimentation animale et témoignant d'un intérêt pour la protection animale,
- \* une compétence qui soit en adéquation avec les domaines d'activité du ou des établissements d'expérimentation animale se référant au comité. Le cas échéant, si cela lui paraît nécessaire, le comité peut faire appel à la compétence de personnes qui lui sont extérieures,
- \* l'obligation pour ses membres de respecter la stricte confidentialité des débats et des projets d'expérimentation présentés,
- \* le caractère méthodique de ses analyses qui s'appuient à la fois sur l'état des connaissances et sur une argumentation éthique,
- \* l'indépendance et l'impartialité nécessaires à la justification et à la libre formulation de ses avis, ce qui implique que ses membres soient volontaires et ne puissent pas recevoir de rétribution spécifiquement attachée à cette mission.

## III - FONCTIONNEMENT

Les institutions dont relèvent les établissements d'expérimentation animale donneront aux comités les moyens nécessaires à leur fonctionnement.

Un comité d'éthique doit respecter des **délais de réponses** compatibles avec les impératifs de l'activité de recherche. L'organisation qui garantit cette rapidité de réponse est laissée à l'appréciation de chaque comité.

### a) Évaluation éthique

L'évaluation éthique des projets a pour but de garantir que les études sont réalisées dans les meilleures conditions possibles pour les animaux, compte tenu des connaissances du moment.

L'**expérimentateur** saisit le comité d'éthique en lui soumettant un dossier qui doit comporter les éléments nécessaires et suffisants à une appréciation rigoureuse de son projet.

Un projet doit être constitué, au minimum, d'un objectif scientifique, d'un modèle animal, d'un ou de plusieurs protocoles expérimentaux et d'une méthodologie d'obtention de résultats associée à chaque protocole.

Lors de l'évaluation éthique d'un projet, le comité analyse l'objectif scientifique afin d'apprécier l'acceptabilité éthique du choix du modèle, le protocole et la méthodologie qui y sont liés. Néanmoins, les comités ne doivent pas avoir pour vocation de se substituer aux comités scientifiques des établissements.

L'**évaluation** éthique doit porter sur les différentes facettes de l'expérimentation :

- la préparation de l'animal,
- le choix et la réalisation du modèle animal ainsi que son utilisation,
- le protocole expérimental qui doit tenir compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à l'espèce, et décrire clairement la répercussion des procédures expérimentales sur l'état physiologique et psychologique des animaux,
- les stades douloureux et les points limites qui doivent être particulièrement identifiés dans le protocole, et les mesures prévues pour la prévention et la gestion, voire la suppression, de la douleur qui doivent être documentées en s'appuyant, dans la mesure du possible, sur des référentiels reconnus,
- l'utilisation d'outils statistiques et de techniques d'analyse appropriées qui doivent permettre d'optimiser la méthodologie expérimentale mise en œuvre et d'obtenir un maximum de résultats interprétables.

L'**avis** d'un comité ayant, en principe, une validité maximale de trois ans, le comité doit donc être consulté tous les trois ans même si aucun changement opérationnel n'est intervenu dans la mise en œuvre d'un projet qui se poursuit. Cette nouvelle consultation a pour objectif, d'une part, de procéder à une évaluation rétrospective qui doit être présentée par l'expérimentateur dans le nouveau dossier et, d'autre part, de vérifier si des procédures nouvelles, qui permettraient de réaliser les interventions sur l'animal de façon plus éthique, voire de les remplacer par des méthodes alternatives, ne sont pas apparues entre-temps.

Le suivi de la mise en œuvre des protocoles relève de la responsabilité des **expérimentateurs** et des **établissements d'expérimentation animale**.

#### b) Évaluation éthique déléguée

Le comité d'éthique peut déléguer une partie de l'évaluation éthique dont il a la charge à une **antenne de proximité** propre à chacun des établissements d'expérimentation animale qui en relève.

Cette délégation n'est possible que dans les cas suivants :

- lorsqu'il s'agit de légères variantes d'un protocole qui a déjà reçu un avis favorable du comité d'éthique,
- lorsque les protocoles envisagés sont standardisés, réglementaires, régis par des règles déontologiques ou lorsqu'ils sont non-douloureux (prises de sang, euthanasie selon des techniques reconnues par le comité d'éthique).

Cette antenne de proximité doit disposer :

- de compétences scientifiques (en adéquation avec les domaines d'activité de l'établissement d'expérimentation animale concerné),
- de compétences en sciences et techniques concernant l'élevage, l'hébergement et les soins aux animaux de laboratoire.

L'antenne de proximité ne peut agir que dans le cadre d'une lettre de mission délivrée par le comité d'éthique qui lui a délégué cette part d'évaluation. La lettre de mission précise les modalités de fonctionnement, notamment en ce qui concerne les champs d'intervention et les rapports d'activité que l'antenne est tenue de faire régulièrement au comité d'éthique.

#### c) Participation à la promotion des principes éthiques

Les comités d'éthique participent à la promotion des principes éthiques contenus dans la Charte, et notamment de ceux qui sont énoncés ci-dessous :

- \* l'utilisation éthique d'animaux à des fins expérimentales implique que soient optimisées les conditions de vie, d'hébergement et de soins aux animaux en s'appuyant notamment sur les guides de bonnes pratiques ou recommandations existants et en ayant recours, autant qu'il est nécessaire, de façon ponctuelle ou pérenne, aux compétences de spécialistes du monde animal. Cette attention doit être maintenue pendant la phase d'expérimentation ainsi que tout au long de la vie de l'animal,
- \* toute démarche expérimentale impliquant des animaux doit s'attacher à développer les méthodes visant à réduire, voire à supprimer, leur utilisation et les contraintes qui lui sont liées.

Les comités s'attachent à diffuser le plus largement possible les connaissances et l'expérience acquises sur le sujet, y compris dans le cas de résultats non publiés.

### IV - RELATION AVEC LE COMITE NATIONAL DE REFLEXION ETHIQUE SUR L'EXPERIMENTATION ANIMALE

*\* Tout comité d'éthique en matière d'expérimentation animale créé à l'initiative d'un organisme public ou privé et chargé de donner un avis sur les conditions d'utilisation d'animaux à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques doit prendre en compte dans ses avis les principes énoncés dans la Charte... \**  
*Code Rural R 214-124.*

Chaque comité d'éthique est invité à adresser au secrétariat du Comité national\* son engagement de prendre en compte les principes de la Charte nationale sous forme d'une déclaration d'adhésion signée de son président. Il précisera, quelle est sa composition et quels établissements lui sont attachés en renseignant les rubriques suivantes :

- Nom du comité
- Nom du président, et coordonnées
- Intitulé de l' (des) établissement (s) d'expérimentation animale attaché (s) au comité (et numéro(s) d'agrément)
- Nombre de personnalités représentatives de chacune des cinq catégories citées dans le chapitre II de la présente annexe
- Date de création du comité
- Nombre de délégations accordées à des antennes de proximité
- Règlement intérieur, le cas échéant.

Ces données sont strictement confidentielles et seront conservées au secrétariat du Comité national ; elles ne seront en aucun cas l'objet d'une diffusion.

Les comités d'éthique feront part au Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale des progrès observés à leur niveau susceptibles d'améliorer le bien-être, d'atténuer, voire de supprimer, les contraintes des animaux de laboratoire.

Les comités d'éthique s'engagent à prendre en compte les avis que le Comité national rendra en matière d'expérimentation animale.

le 3 avril 2008

\* Secrétariat du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale  
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche  
Direction générale de la recherche et de l'innovation - A4  
1 rue Descartes - 75231 Paris Cedex 05

## Annexe 4 : protocoles d'induction de l'asthme aigu et chronique

**Table 1. Mouse models of acute allergic pulmonary inflammation**

Gender/strain	Allergen	Sensitisation	Exposure/challenge	Responses to challenge	References
Female BALB/c	OVA	OVA/alum (i.p.) on days 0 and 12	OVA aerosol on days 18-23	From day 24: AHR, increased eosinophils in BAL and lung tissue. Remodelling and Th2 cytokine induction	Lloyd et al., 2000; McMillan et al., 2002; McMillan et al., 2005
Female BALB/c	OVA	OVA + AIOH <sub>3</sub> (i.p.) on days 0 and 14	OVA aerosol on days 28-30	From day 32: AHR, increased eosinophils in BAL and lung tissue. Remodelling and Th2 cytokine induction	Tomkinson et al., 2001; Hamelmann et al., 1999a
Male BALB/c	OVA	OVA (i.p.) on 7 alternate days	OVA aerosol for 8 consecutive days (starting on day 27)	24 hours post final OVA challenge: AHR, increased eosinophils in BAL and lung tissue. Th2 cytokine induction	Hessel et al., 1995; Janssen et al., 2000
Female BALB/c	OVA	OVA + alum (i.p.) on days 0 and 14	OVA (i.n.) on days 14, 25, 26 and 27	From day 28: AHR and increased eosinophils in BAL and lung tissue. Remodelling	Henderson et al., 1996
Male BALB/c	OVA	OVA (i.p.) on 7 alternate days	OVA (i.t.) on day 42 for 3 days, each 3 days apart	24 hours post final OVA challenge: increased eosinophils in BAL and lung tissue	Blyth et al., 2000
Male A/	Bla g 2 and Der f 1	OVA + AIOH <sub>3</sub> (i.p.) on days 0 and 7	Allergen (oro-tracheal) on day 14	From day 17: AHR (only to Bla g 2) and increased eosinophils in BAL and lung tissue	Sarpong et al., 2003
Male C57BL/6	HDM	Der p 1 + AIOH <sub>3</sub> (i.p.) on day 0	HDM (aerosol) on day 14 for 7 consecutive days	AHR and BAL and lung tissue inflammation at 24 hours post final challenge	Tournoy et al., 2000
Female BALB/c	OVA	OVA + alum (i.p.) on days 0 and 14	OVA aerosol on days 28-30 and 72 days after last challenge	AHR and BAL eosinophilia on days 32, 37, 44 and 74	Kanehiro et al., 2001
Male BALB/c	OVA	OVA + AIOH <sub>3</sub> (i.p.) on days 0 and 5	2x OVA inhalations, each 4 hours apart on day 17	Following OVA challenge: AHR, EAR and LAR observed	Fernandez-Rodriguez et al., 2008
Male BALB/c	OVA	OVA + AIOH <sub>3</sub> (i.p.) on day 0 and OVA i.p. on day 10	OVA aerosol on days 17 and 24	Following OVA challenge: EAR and LAR. Increased inflammatory cells in BAL and lung tissue	Choi et al., 2005

Bla g 2, recombinant *Blattella germanica* 2 (cockroach allergen); Der f 1, *Dermatophagoides farinae* 1 (house dust mite allergen); BAL, bronchoalveolar lavage; EAR, early asthmatic response; LAR, late asthmatic response.

**Table 2. Mouse models of chronic allergic pulmonary inflammation**

Mouse gender/strain	Allergen	Sensitisation	Exposure/challenge	Responses post final allergen challenge	Reference
Female BALB/c	OVA	OVA + alum (i.p.) on days -7 and -21	OVA for 6/8 weeks (3 days/week)	Intraepithelial eosinophilia, infiltration of lamina propria by mononuclear cells, remodelling, Th2 cytokine induction and AHR	Temelkovski et al., 1998
Female BALB/c	OVA	OVA + alum (i.p.) on days 0 and 14	OVA (i.n.) on days 14, 27, 28, 47, 61 and 73-75	Eosinophilic and mononuclear cell inflammation; goblet cell hyperplasia and mucus occlusion of airways; widespread deposition of subepithelial collagen	Henderson et al., 2002
Female BALB/c	OVA	OVA + aluminium potassium sulphate (i.p.) on days 1 and 11	OVA (i.n.) on days 11, 19, 20, 33, 34, 47, 48, 61, 62, 75, 76, 89 and 90	Increased eosinophilia, remodelling, Th2 cytokine induction and AHR	Leigh et al., 2002a
Female BALB/c	OVA	OVA + alum (i.p.) on days 0 and 12	OVA aerosol on days 18-23 and then 3 days/week for 5/8 weeks starting on day 26	Inflammation, remodelling, Th2 cytokine induction and AHR; TGF- $\beta$ induction	McMillan et al., 2005
Female BALB/c	HDM extract	-	HDM (i.n.) 5 days/week for up to 7 weeks	Eosinophilic inflammation, remodelling, Th2 cytokine induction and AHR	Johnson et al., 2004
Female BALB/c	HDM extract	-	HDM (i.n.) 5 days/week for up to 5 weeks	Eosinophilic inflammation, lung tissue inflammatory gene expression	Ulrich et al., 2008
Male BALB/c	OVA	OVA + AIOH <sub>3</sub> on days 0 and 5	OVA aerosol, starting day 17, 3 days/week for 6 weeks	Eosinophilic inflammation, AHR, and early and late asthmatic responses	Fernandez-Rodriguez et al., 2008
Female BALB/c	OVA	OVA and alum (s.c.) on days 0, 7, 14 and 21	OVA (i.n.) on days 27, 29 and 31, and then twice a week for 3 months	Eosinophilic inflammation, remodelling and TGF- $\beta$ induction	Lee et al., 2008

Annexe 5 : avantages et désavantages des différents modèles animaux d'asthme, d'après Karol, 1994.

Table 3. – Advantages and disadvantages of various animal models of asthma

Advantages	Disadvantages
<p><b>Mouse</b>                      Small, inexpensive animal                      Numerous inbred strains                      Availability of species-specific reagents                      IgE is major class of anaphylactic antibody                      Demonstrates AHR to carbachol</p>	<p>Vasculature is anaphylactic target                      Poorly developed airway smooth muscle                      Responds poorly to histamine</p>
<p><b>Rat</b>                      Small, inexpensive animal                      IgE is major class of anaphylactic antibody                      Demonstrates EAR and LAR                      Demonstrates AHR lasting for days                      Responds to methacholine                      Responds to cromolyn</p>	<p>Injection of antigen required for sensitization                      Adjuvants (alum, <i>Bordetella pertussis</i>) required for sensitization                      Responds poorly to histamine                      Tracheal smooth muscle responds poorly to peptide-leukotrienes</p>
<p><b>Guinea-pig</b>                      Small, docile animal                      Relatively inexpensive                      Sensitization possible <i>via</i> inhalation route                      Lung is major shock organ                      Airways respond to histamine                      Demonstrates EAR and LAR                      Neutrophil influx to lung following LAR                      Eosinophilic inflammation during LAR                      AHR following airway hypersensitivity response                      Tracheal smooth muscle responds to histamine</p>	<p>Few inbred strains exist                      Few species-specific reagents                      IgG<sub>1</sub> is the major class of anaphylactic antibody                      Not sensitive to cromolyn</p>
<p><b>Rabbit</b>                      Lung is anaphylactic target organ                      IgE is major class of anaphylactic antibody                      Demonstrates EAR, LAR</p>	<p>Neonatal immunization required for LAR</p>
<p><b>Dog</b>                      IgE is major class of anaphylactic antibody                      Natively sensitized to <i>Ascaris</i>                      Demonstrates AHR</p>	<p>Individual variability in responsiveness to <i>A. suum</i>                      LAR not demonstrated</p>
<p><b>Basenji greyhound dog</b>                      Persistent AHR                      Very responsive to methacholine</p>	<p>AHR not associated with clinical disease</p>
<p><b>Pony</b>                      Native sensitization to "barn" environment                      Develops AHR (only during clinical disease)                      Recurrent exacerbations of clinical disease</p>	<p>Large animal, costly</p>
<p><b>Sheep</b>                      Natively sensitive to <i>A. suum</i>                      Demonstrates EAR and LAR                      Demonstrates AHR to carbachol</p>	<p>Large animal, costly</p>
<p><b>Nonhuman primate</b>                      Consistent response to antigen                      Natively sensitized (<i>A. suum</i>)                      Allergic responsiveness persists for years                      IgE is major class of anaphylactic antibody</p>	<p>Costly species</p>

AHR: airway hyperresponsiveness; EAR: early airway response; LAR: late airway response; IgE: immunoglobulin E.

# Résumé

De nombreuses avancées majeures de la médecine moderne sont nées de l'expérimentation sur des modèles animaux de maladies humaines. Pourtant, cette pratique scientifique est régulièrement remise en question alors que des pathologies fréquentes, comme l'asthme, sont encore méconnues et insuffisamment maîtrisées.

Les modèles animaux d'asthme sont induits artificiellement. Ils reposent le plus souvent sur l'exposition de l'animal à un allergène éventuellement associé à un adjuvant. Ils présentent à des degrés variables une hyperréactivité bronchique et des lésions inflammatoires pulmonaires formant un syndrome asthmatique approchant la maladie humaine. La réactivité bronchique peut être évaluée précisément, y compris chez de petits animaux, grâce aux développements technologiques récents reposant notamment sur l'utilisation de la pléthysmographie et des oscillations forcées. Les lésions tissulaires peuvent aussi être caractérisées par des techniques biologiques et histologiques comparables à celles utilisées chez l'homme. L'expérimentation sur des modèles animaux a ainsi permis d'acquérir des certitudes sur la physiopathologie de l'asthme comme l'implication de l'immunité innée ou l'importance des lymphocytes T et des cytokines de type 2. Dans le domaine thérapeutique, elle a aussi servi à l'évaluation préclinique de nouveaux traitements contre l'asthme et, plus récemment, au ciblage de nouvelles voies thérapeutiques grâce aux puces.

Cependant, certaines caractéristiques essentielles, comme le remodelage bronchique, sont difficiles à reproduire et les modèles sont souvent caricaturaux. De plus, la variabilité des résultats issus de la modélisation peut rendre délicate l'extrapolation des données à l'homme. La validité des modèles actuels doit donc être questionnée. Elle pourrait être améliorée grâce au développement de modèles plus physiologiques mais aussi grâce à la complexification des modèles existants.

Mots clés : modèles animaux, asthme, hyperréactivité bronchique