

## THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : « Immunologie »

Par  
**Martin KLEIN**

### **Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'asthme.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le jeudi 7 Novembre 2019  
Unité de recherche : l'institut du thorax, Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291

#### **Rapporteurs avant soutenance :**

Cécile Chenivesse	Professeur des universités-Praticien hospitalier, CHRU de Lille, Université de Lille
Thomas Trian	Maître de conférences des universités, Université de Bordeaux

#### **Composition du Jury :**

Président :	Camille Taillé	Professeur des universités-Praticien hospitalier, Université de Paris
Examineurs :	Cécile Chenivesse	Professeur des universités-Praticien hospitalier, CHRU de Lille, Université de Lille
	Thomas Trian	Maître de conférences des universités, Université de Bordeaux
Dir. de thèse :	Antoine Magnan	Professeur des universités-Praticien hospitalier, CHU de Nantes, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Grégory Bouchaud	Chargé de Recherche, INRA Nantes

Remerciements .....	4
Liste des présentations et des publications .....	11
Liste des tableaux et des figures .....	13
Liste des abréviations .....	15
Partie I : Généralités.....	18
Chapitre 1 : L'asthme une pathologie complexe.....	18
I. Définition.....	18
1) Epidémiologie et prévalence .....	18
2) Impact socioéconomique .....	20
3) Les différents phénotypes d'asthme .....	21
II. Caractéristiques et mécanismes de l'asthme .....	24
1) L'hyperréactivité bronchique .....	24
2) L'inflammation bronchique .....	25
II.2.1. La réponse de type Th2 .....	26
II.2.2. Les lymphocytes T régulateurs .....	28
II.2.3. La réponse Th17 et les neutrophiles .....	30
3) Le remodelage bronchique.....	30
II.3.1. Altération de l'épithélium .....	31
II.3.2. Hypersécrétion de mucus.....	32
II.3.3. Le muscle lisse bronchique.....	33
4) Revue : Les nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'asthme.....	36
Chapitre 2 : Les approches thérapeutiques : vers une médecine personnalisée .....	44
I. Les traitements actuels et en cours.....	44
1) Les agonistes $\beta_2$ .....	45
2) Les glucocorticoïdes .....	47
3) Les anti-IgE .....	49
4) Les anti-IL-5 et anti-IL-5R.....	51
5) Les anti-IL-4/IL-13 .....	51
6) Les anti-IL-17A .....	53
7) Les anti-alarmines .....	53
8) L'immunothérapie spécifique de l'allergène .....	54
9) Les limites des biothérapies dans l'asthme .....	59
Chapitre 3 : Les modèles animaux dans l'asthme : du fondamental au préclinique.....	61
I. Les modèles murins d'asthme .....	61
1) Le modèle ovalbumine .....	62
2) Le modèle acariens.....	64
II. Les modèles de souris humanisées .....	65
III. Les modèles murins d'asthme sont-ils pertinents ? .....	68
Partie II : Résultats et discussion .....	71
I. Objectifs de la thèse .....	71
II. Matériels et méthodes .....	72
1) Modèle animal.....	72
II.1.1. Modèle d'asthme allergique aigu .....	72
II.1.2. Modèle d'asthme allergique chronique .....	72
II.1.3. Modèle de souris humanisées.....	73
1) Traitements .....	74
I.1.1. Dexaméthasone.....	74

I.1.2.	Le peptide Der p 2.1 .....	74
I.1.3.	Le complexe IL-2/anti-IL-2 .....	75
2)	Analyses fonctionnelles respiratoires.....	77
II.2.1.	Pléthysmographie.....	77
II.2.2.	FlexiVent.....	77
3)	Score Histologique.....	78
4)	Cytométrie en flux.....	78
II.4.1.	Récupération des échantillons .....	78
II.4.2.	Marquage et méthodes d'analyses .....	78
5)	Mixed Lymphocyte Reaction (MLR).....	80
6)	Transfert adoptif .....	80
7)	Dosage des IgE.....	81
8)	Multiplex .....	81
III.	Résultats.....	83
	Avant-propos (Revue) : Nouvelle approche thérapeutique dans l'asthme : l'immunothérapie peptidique .....	83
1)	Article 1 : Der p 2-Derived Peptide Abrogates HDM-Induced Severe Asthma in Mice.....	88
2)	Efficacité thérapeutique du complexe IL-2/anti-IL-2 (IL-2 Cx) dans l'asthme allergique aux acariens.....	117
III.2.1.	L'hyperréactivité bronchique est diminuée après traitement par IL-2 Cx 123	
III.2.2.	Réduction de l'infiltrat pulmonaire et du score histologique.....	125
III.2.3.	L'IL-2 Cx induit une augmentation de Treg et réduit l'inflammation locale périphérique et systémique .....	127
III.2.4.	L'IL-2 Cx possède une activité biologique supérieur à l'IL-2 seule et n'induit pas d'œdèmes pulmonaires.....	130
III.2.5.	Diminution l'hyperréactivité bronchique et du score histologique lié à l'asthme allergique aux acariens chez la souris humanisée .....	134
IV.	Discussion générale et perspectives.....	137
Annexes	.....	146
1)	Article 2 : The $\beta$ and $\alpha 2\delta$ auxiliary subunits of voltage-gated calcium channel ( $Ca_v$ 1) are required for Th2-lymphocyte function and acute allergic airway inflammation.....	146
2)	Article 3 : CD9 <sup>+</sup> Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients.....	166
	Références bibliographiques.....	178

## Remerciements

*Je dédicace cette thèse à mon grand-père (mon Pépé), tu as toujours cru en moi et montré un intérêt tout particulier pour mes travaux. L'aboutissement de ce travail est pour moi le meilleur hommage que je puisse te rendre. Je t'aimerais toujours et encore merci pour tout !*

Les remerciements... d'après mes prédécesseurs cela reste la partie la plus « facile » lors de la rédaction du manuscrit. Me voilà pourtant devant un réel défi, non pas par manque d'inspiration ou de reconnaissance envers vous, mais plutôt par la difficulté d'exprimer à travers des mots plus de 3 ans d'une aventure riche tant au niveau professionnel que personnel à vos côtés. Je vais donc faire de mon mieux pour vous faire part de toute ma gratitude à travers ces prochaines lignes.

Je remercie tout d'abord Hervé Le Marec et Richard Redon qui, en leur qualité de directeur de l'Institut du thorax, m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions au sein de leur unité de recherche.

Antoine, il y a un peu plus de 5 ans après avoir passé la porte de votre bureau je débutais mes premiers pas dans le monde de la recherche. J'ai découvert grâce vous une passion pour l'immunologie mais également pour une pathologie qui vous est chère : l'asthme. Au travers des stages de Master et de ma thèse j'ai pu constater toute l'énergie et la volonté dont vous faites preuve pour entretenir un esprit d'équipe fort et bienveillant. Encore aujourd'hui, après le morcèlement de l'équipe Poumon vous continuez d'être la « driving force » autour de laquelle l'axe Poumon perdure. Je tiens également à vous remercier pour votre implication dans le maintien d'un lien étroit entre les chercheurs et les cliniciens. Le fait de donner la possibilité à vos étudiants, chercheurs et médecins de découvrir, de s'impliquer et de partager ensemble reste pour moi l'une des expériences les plus enrichissantes de cette thèse et qui me conforte dans l'absolue nécessité d'entretenir ce lien. Donc continuez à défendre cette valeur (je n'ai aucun doute là-dessus) !!! Pour finir, je vous suis extrêmement reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre optimisme sans faille et votre bienveillance à mon égard. Votre départ de Nantes laissera un vide à n'en pas douter mais je sais que vous continuerez à prendre soin du petit Poumon nantais ! De mon côté, j'espère que

nous aurons toujours l'occasion de travailler ensemble sur de futurs projets !! Merci encore pour tout !!!

Grégory ou Greg (c'est mieux je trouve), c'est à toi qu'est revenu la lourde tâche de m'encadrer durant mon Master et ma thèse. Comme tu as pu le constater je suis fâché avec les deadlines et j'imagine bien tes réactions en recevant mes mails avec quelques jours de retard. Malgré cela je tiens tout d'abord à te remercier pour ta patience, je te remercie également pour ton implication et ton aide tout au long de ces 5 années. C'est grâce à toi « Oh Grand Maître des Cytokines » que j'ai vraiment développé une passion pour l'immunologie et sa complexité ! Tu m'as également donné le goût pour la recherche et motivé pour devenir à mon tour je l'espère un chercheur digne de ce nom. Ton esprit critique, tes idées qui te viennent à profusion dont ne sait où et ta pédagogie font de toi l'excellent chercheur que tu es aujourd'hui et l'obtention de ton HDR ne fait que conforter mes dires. Je pense honnêtement que je n'aurais pas trouvé meilleur mentor que toi, d'ailleurs comme me le font remarquer Clélia et Amandine je me transforme en « mini-Greg ». Merci à toi pour la confiance que tu m'as accordée, ton soutien et ton implication dans ma thèse et nos autres projets annexes. Merci pour cette amitié qui m'est chère et je sais que nous continuerons à travailler ensemble pour explorer le monde des allergies et du microbiote !!!

Marie-Aude, que serait l'ambiance au labo et à l'animalerie sans toi ? Laure m'avait prévenu, il y a plusieurs règles :

- Règle n°1 : si c'est ton anniversaire, tu ramènes un gâteau.
- Règle n°2 : si c'est réunion d'équipe, tu ramènes un gâteau.
- Règle n°3 : si le ménage n'est pas fait, tu ramènes un gâteau.
- Règle n°4 : si tu n'as pas de Bertrand, tu ne montes pas seul à l'animalerie (ouf plus de gâteau^^).

Ta bonne humeur permanente et la façon dont tu t'occupes de nous comme une maman me fait que je peux dire sans détour que j'ai vécu ma thèse comme une partie de plaisir. Merci de t'être occupée de mes petites souris, d'avoir pris la patience de me former (surtout au FlexiVent !) et merci pour les petits rappels à l'ordre à coup de règle ou de pichenettes ! Au moins je suis insensible à ces formes de tortures maintenant. Les petits potins et les

dégustations de viennoiseries/friandises vont me manquer. Merci encore pour ta gentillesse et ta bienveillance !!!

Damien (Damigros ou Grasmien), mon ami, tu as déjà eu le droit à un magnifique discours lors de ton mariage donc je propose de faire court et de laisser un peu de place pour les autres ! Ces années à te côtoyer au labo (mais en dehors aussi) m'ont permis de forger avec toi une vraie amitié comme il en existe peu. Je n'irai pas jusqu'à dire que je remplacerai la « bro-mance » entre Franck et toi mais je pense que l'on s'en rapproche. Merci encore pour cette amitié qui nous a permis de faire les savants fous ensemble pendant ces deux dernières années ! PCSK9 et l'asthme qui l'aurait cru ?! Continu d'être celui que tu es au quotidien et même si Tic et Tac ne seront plus là pour rendre chèvre leurs encadrants ils remettront ça prochainement outre atlantique !! A ton tour maintenant de rédiger et de montrer que l'on peut t'appeler Doc' !!

Laure (Graure, Castout, ...), je n'oublierai jamais cette doctorante encadrant un stagiaire plus vieux qu'elle (moi). Il est vrai que par ma faute tu as obtenu toute une déclinaison de petits surnoms et que j'ai parfois dû être un petit boulet. Je te remercie tout particulièrement pour m'avoir initié aux « joies » de la cytométrie nocturne et des dissections aux aurores, sans ça je pense que je me serai ennuyé sévère. Merci pour ton humour, ta naïveté (les souris DP), ces moments de fous rires surtout à ton insu, ta gentillesse, ta confiance et ton amitié !!! J'attends avec impatience ton futur titre de Miss microbiote (le caca c'est l'avenir) !

Maxim (papy Durand), au court de ces années j'ai enfin trouvé quelqu'un de mon âge avec qui échanger même si tu fais plus vieux que moi. Je n'oublierais jamais ces parties de fléchettes où je suis resté vaincu même avec un œil en moins. Il est vrai que Laure m'a initié à la cytométrie mais toi, tu étais le grand « sage » du FACS. Merci de toujours avoir été là pour mes questions d'ordre technique et tes moultes astuces à la façon Géo Trouve-tout ! Il un jour j'espère que l'on fera un papier sur une nomenclature B et Treg afin de concilier nos points de vue sur ces petites bêtes. Merci de m'avoir encouragé tout au long de cette thèse. Merci pour ton humour, ta gentillesse et également notre amitié !

Clélia, mon binôme de l'INRA. Je me souviens ces débuts de thèse où l'on s'appelait quotidiennement pour des questions techniques et administratives... les galères de doctorants quoi. On dit souvent que *l'in vitro* c'est has been, toi tu m'as prouvé le contraire, ton art de la co-culture de BMDC restera à jamais inscrite dans ma thèse ! Merci pour ton soutien, ces soirées FACS-burger-bières sans résultats probant et d'avoir rendu fun mes séjours à l'INRA. Bon je pense qu'après nos thèses respectives il va falloir se la faire cette carte du monde prévalence des allergies et de l'asthme ! Franchement meuf ne change rien et j'ai hâte d'assister à ta thèse que l'on fête ça ensemble comme il se doit ! Merci pour ton amitié et ta gentillesse.

Luke, ah mon petit Luke. Merci tout d'abord d'avoir mis au point ce magnifique modèle d'asthme murin sans lequel je n'aurais pas connu les joies de l'animalerie et du FlexiVent. C'est parfois un peu frustrant que tu aies réponse à tout mais c'est pour ça aussi que je t'apprécie, cela t'a d'ailleurs valu le surnom de Wikiluke. Merci pour tes petites questions très « challenging » après mes présentations en réunion d'équipe, j'aborde grâce à ça ma soutenance plus sereinement. Je tiens à m'excuser, car mon départ signifie une perte significative dans ta collecte de sang mensuelle, mais je ne m'inquiète pas car Draculito aura toujours de nouvelles proies à ponctionner pour la science ! Merci pour ton franc-parler, ta bonne humeur, tes histoires, ton soutien et ton amitié !

Eléonore (Grosnonore, Kirby) et Amandine (faut que je te trouve un surnom), votre arrivée a permis de ramener un peu de fraîcheur dans nos équipes et je pense qu'avec Clélia on est d'accord pour dire que la relève est assurée ! Même si le microbiote et les fèces vous ont corrompu je reste convaincu que vous rendrez justice à l'immuno pour montrer à BIA et au thorax qu'il n'y a pas que le patch-clamp et la génétique qui comptent ! Ne lâchez rien, vous allez tout déchirer pour ces dernières années de thèse ! Merci à toute les deux pour votre bonne humeur, vos moments de folie et pour la nourriture !!!

Audrey et Cédric, merci pour ces magnifiques moments de dissection de bon matin et les (bonnes) blagues de Cédric. Merci pour vos encouragements. Cédric je reste convaincu que casser des pintes de bières reste une méthode de mesure fiable pour ton alcoolémie ! Parlons de choses qui fâchent... certes Apple c'est génial pour un Mac, mais je maintiens que l'iPhone

ne surpassera jamais Samsung en termes de smartphone ! Les Galaxy eux explosent ! Merci pour votre amitié et votre gentillesse durant ces 3 années de thèse.

Florian et Simon, mes deux post doc atypiques par leur taille. J'ai vraiment apprécié nos échanges sur le devenir du jeune docteur et sur le choix du post doc. Florian, j'aimerais pouvoir un jour vivre comme toi avec mes rythmes circadiens inversés. Tu dois être l'une des rares personnes au monde à être insensible à la caféine. Sinon je te promets que tu me verras stresser ... un jour peut-être. Simon, ton côté épicurien, chasse et pêche, c'est ce qui manque dans cet institut, continu de porter ces valeurs qui sont celles de l'INRA (ta patrie de cœur). Je n'oublierais jamais ta fameuse patte d'ours qui m'a valu un vélo et des côtes fêlées, mais au final c'était la bière la coupable n'est-ce pas ?! Merci à tous les deux pour ces moments détentes autour d'un bon breuvage, votre amitié et je regrette de devoir vous abandonner si tôt.

Mon ancienne équipe Poumon, c'est avec tristesse que j'ai vécu notre scission au début de ma thèse, mais ces brefs moments à vos côtés m'ont montré ce que signifiait être une équipe ! Carole, Eugénie, Aurore, Jennifer, Damien et Kelly, merci à tous pour votre soutien et vos encouragements. Merci d'avoir fait de ma thèse un cadre idyllique et je continuerai à véhiculer cet état d'esprit du mieux que je peux au travers de mes futures expériences.

Ma nouvelle équipe, merci de nous avoir accueilli, nous les rescapés du poumon. Gervaise, Vincent, Morgane, Céline, Anne-Clémence, Marc, Angela et Florian, merci pour votre soutien tout au long de ces années de thèse et merci pour votre bienveillance. Sans oublier les nouveaux arrivant en thèse au sein de l'équipe Surya, Milène et Lindsay.

Mon équipe d'adoption, un grand merci également à l'équipe du gras (IV) pour m'avoir accueilli pour une collaboration qui sera riche en publication et en émotion j'en suis certain. Merci à Bertrand, Karim, Jocelyne, Xavier, Wieneke, Vimla et Matthieu pour votre aide et votre soutien pour ce projet collaboratif.

Mes collègues doctorants, merci à tous pour vos encouragements et votre soutien durant cette thèse. Claire, merci d'avoir immortalisé chacun de mes moments de faiblesse face aux

pâtisseries. Maxime et Méryl, merci pour avoir fait des débats sur des questions loufoques un rituel des pauses déjeuner ! Merci également à Stéphan, Alice, Manon et tous les nouveaux arrivant sur le long chemin qu'est la thèse !

Merci également à tous mes collègues de l'institut du thorax pour leur aide technique et le fantastique travail accompli en coulisse pour nous faciliter la vie au quotidien. Martine, Marie-France, Davy, Maude, Virginie, Corinne, Aurélie et Ophélie, merci pour votre soutien et votre bonne humeur quotidienne !

Les greffeurs de poumons (CRTI), je remercie également l'équipe IV codirigée par Sophie Brouard. Sophie, merci pour ces journées Lungstorming champêtres et ces moments conviviaux axés sur la science. Promis je parlerai des lymphocytes B durant ma thèse ! Merci également à Richard, Laureline, Hoa et Van-Ha pour votre soutien et votre bienveillance durant ces années de thèse.

Un grand merci également à tous mes stagiaires. Ce fut un réel plaisir de vous encadrer durant vos stages et même si vous avez beaucoup appris de moi (j'espère), sachez que j'ai également énormément appris de vous. Merci, car grâce à vous j'ai vraiment pris plaisir à partager mes connaissances, j'ai également appris à me remettre en question beaucoup plus souvent grâce à vous : « il n'y a pas de mauvaises questions ». Antoine (Mr.Moui), Corentin (Chat Noir), Marie (La Belge), Mélanie et Aurélie merci énormément de m'avoir aidé durant cette thèse et savoir que vous avez tous réussi est pour moi la plus belle des récompenses !

Ma Chloé, déjà 2 ans et demi que tu me supportes au quotidien durant ma thèse... Je peux affirmer que, si j'en suis là aujourd'hui, c'est en partie grâce à ton amour et ton soutien. Merci d'avoir supporté mes déplacements en congrès aux quatre coins du monde et promis cette fois les voyages se feront à deux ! Merci d'être venue à mon secours lors des nuits cytométrie avec de bons petits plats ! Je sais que tu es fière de moi pour ce que j'ai accompli durant ces 3 ans, mais sache que derrière chaque grand homme se cache une femme plus grande encore... et cette femme c'est toi ! Je sais que mes petites sessions geek en rentrant du boulot pour décompresser t'exaspèrent, mais ça y est le plus dur du travail est fait et je vais pouvoir

te faire à manger le soir ;) ! Merci encore pour tout ce que tu as fait pour moi et ce que tu continues de faire au quotidien ! Je t'aime énormément !!!

Papa, Maman, Philippe, Tatsu, merci à tous les quatre d'avoir toujours cru en moi malgré ces longues années d'études. Merci pour votre soutien, pour m'avoir écouté et supporté tout ce vocabulaire scientifique indigeste ! Je vous le redis encore, les petites souris n'ont pas souffert et je leur rendrai hommage. Je sais que vous êtes fier de moi, même si pour une partie d'entre vous il n'est pas facile de l'exprimer publiquement. Sachez néanmoins que c'est surtout moi qui suis extrêmement fier de vous avoir tous les quatre comme parents ! Encore merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et que vous continuez à faire, je vous aime !

Mes frangins, Pierre, Hugo et Iniaki, ma sœur, Clarisse, mais également mes cousins, cousines, neveux, nièce et oncles et tantes et grands-parents, merci à tous pour votre indéfectible soutien ! Merci de faire de cette famille la meilleure du monde ! Vous avez tous contribué à cette réussite et je sais que d'autres suivront ! Je vous aime tous énormément !

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement mes petites souris, sans lesquelles tout ce travail n'aurait jamais pu exister. Merci mes petites Balb/c et mes C57/B6, tous ces progrès et ceux à venir c'est à vous que le monde scientifique et moi le devons !

## Liste des présentations et des publications

Liste des posters et présentations orales :

J2R (Journées de Recherche en santé Respiratoires), Bruxelles, Belgique, Octobre 2019.

Poster : **Der p 2-Derived Peptide Abrogates HDM-Induced Asthma in Mouse and Humanized Model**

CFA (Congrès Francophone d'Allergologie), Paris, France, Avril 2019.

Poster : **Polypeptide derived from a mite allergen (Der p 2) for the treatment of allergic asthma**

DHU2020 (Département Hospitalo-Universitaire) Médecine personnalisée des maladies chroniques, Nantes, France, Octobre 2018. 1<sup>er</sup> prix communication orale.

Présentation orale : **Polypeptide derived from a mite allergen (Der p 2) for the treatment of allergic asthma**

J2R (Journées de Recherche en santé Respiratoires), Marseille, France, Octobre 2018. 1<sup>er</sup> prix présentation de poster.

Poster : **Polypeptide derived from a mite allergen (Der p 2) for the treatment of allergic asthma**

CFA (Congrès Francophone d'Allergologie), Paris, France, Avril 2018.

Poster : **Polypeptide derived from a mite allergen (Der p 2) for the treatment of allergic asthma**

WIRM (World Immune Regulation Meeting), Davos, Suisse, Mars 2018.

Poster : **Solution for allergic asthma using peptide therapy**

Les Folles Souris Nantaises, Nantes, France, Novembre 2017.

Présentation orale : **Intérêts du modèle animal dans les pathologies respiratoires : Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'asthme sévère**

J2R (Journées de Recherche en santé Respiratoires), Québec, Canada, Octobre 2017.

Présentation orale : **Solution for allergic asthma using peptide therapy**

Lungstorming, Marseille, France, Juin 2017.

Présentation orale : **Interleukin-2/Anti-Interleukine-2 Immune Complex Expands Regulatory T cells and Reduces HDM-induced asthma in mice**

J2R (Journées de Recherche en santé Respiratoires), Nice, France, Octobre 2016.

Présentation orale : **Interleukin-2/Anti-Interleukine-2 Immune Complex Expands Regulatory T cells and Reduces HDM-induced asthma in mice**

Liste des publications :

**Klein M**, Colas L, Cheminant M-A, Brosseau C, Magnan A, Bouchaud G. **Der p 2-derived peptide abrogates HDM-induced severe asthma in mice**. En preparation.

**Klein M**, Lebot C, Moui A, Cheminant M-A, Magnan A, Bouchaud G. **IL-2/anti-IL-2 complex reduces HDM-induced allergic asthma by specifically increasing Treg cells in mouse and humanised model**. En préparation.

**Klein M**, Dijoux E, Dilasser F, Hassoun D, Moui A, Loirand G, Colas L, Magnan A, Sauzeau V, Bouchaud G. **Nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'asthme**. Press Med 2019; 48: 255-261.

**Klein M**, Magnan A, Bouchaud G. **Nouvelle approche thérapeutique dans l'asthme : l'immunothérapie peptidique**. Revue des Maladies Respiratoires 2019; 36: 442-446.

Brosseau C, Durand M, Colas L, Durand E, Foureau A, Cheminant M-A, Bouchaud G, Castan L, **Klein M**, Magnan A, Brouard S. **CD9<sup>+</sup> Regulatory B cells induce apoptosis via IL-10 and are reduced in severe asthmatic patients.** Front Immunol 2018; 9: 3034.

Rosa N, Triffaux E, Robert V, Mars M, **Klein M**, Bouchaud G, Canivet A, Magnan A, Guéry J-C, Pelletier L, Savignac M. **The  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$  auxiliary subunits of voltage-gated calcium channel 1 (Ca<sub>v</sub>1) are required for Th2 lymphocyte function and acute allergic airway inflammation.** J Allergy Clin Immunol 2018; 142(3): 892-903.e8.

Dilasser F, **Klein M**, Magnan A, Loirand G, Sauzeau V. Essential role of smooth muscle Rac1 in airway hyperresponsiveness and airway remodeling associated to severe asthma. Rev Fr Allergol 2018; 58: 285-287.

#### Liste des tableaux et des figures

<b>Figure 1 : Prévalence de l'asthme dans le monde chez les enfants de 13 et 14 ans de 2000 à 2003. D'après Lai et al., 2009. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 2 : Prévalence de l'asthme dans le monde chez les adultes de 18 à 45 ans. D'après To et al., 2012. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 3 : Répartition des coûts de l'asthme en fonction de la sévérité. D'après Inoue et al., 2019. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 4 : Les différents phénotypes d'asthme. Adapté d'après Wenzel et al., 2012. ....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 5 : Agents directs et indirects responsables de l'hyperréactivité bronchique. D'après Busse et al., 2010. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 6 : Courbe dose-réponse après inhalation d'un agoniste (métacholine ou histamine) chez des sujets normaux et des asthmatiques légers à sévères. D'après Busse et al., 2010. ....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 7 : La synapse immunologique. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 8 : Réponse de type Th2 lors d'un asthme allergique. D'après Wenzel et al., 2012..</b>	<b>28</b>
<b>Figure 9 : Altération de la prolifération et des fonctions régulatrices des lymphocytes T régulateurs dans l'asthme. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 10 : Acteurs et mécanismes du remodelage bronchique dans l'asthme. ....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 11 : Recommandation des traitements dans l'asthme selon la sévérité. D'après GINA, 2018. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 12 : Voie de signalisation classique des <math>\beta_2</math>AR. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 13 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes et leurs effets associés. Adapté d'après Barnes, 2011. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 14 : Effets de l'omalizumab dans l'asthme. ....</b>	<b>50</b>

<b>Figure 15 : Modifications immunologiques au cours de l'ITA. D'après Akdis et al.,2010.....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 16 : Mécanismes d'action de l'immunothérapie spécifique de l'allergène. D'après Klein et al.,2019. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 17 : Diagnostic de l'asthme avec une composante allergique majeure et l'intégration de l'ITA comme traitement. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 18 : Modèle murin d'asthme allergique aigu aux acariens. ....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 19 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens. ....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 20 : Modèle murin humanisé d'asthme allergique sévère aux acariens.. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 21 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement par Dexaméthasone. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 22 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement peptidique de Der p 2.1.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 23 : Modèle murin humanisée d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement peptidique de Der p 2.1. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 24 : Modèle murin d'asthme allergique aigu aux acariens, associé à un traitement par complexe IL-2/anti-IL-2. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 25 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement par complexe IL-2/anti-IL-2. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 26 : Modèle murin humanisé d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement par complexe IL-2/anti-IL-2.. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 27 : Analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires issues de lavage broncho alvéolaire sous le logiciel FlowJo. ....</b>	<b>79</b>
<b>Figure 28 : Analyse par cytométrie en flux des cellules Ly5.1 issue du transfert adoptif sous le logiciel FlowJo. ....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 29 : Structure et association de l'IL-2 avec les différentes sous-unités de son récepteur. D'après Arenas-Ramirez et al., 2015. ....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 30 : Fixation de l'IL-2 et signalisation au travers de ses différents récepteurs.....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 31 : Différents mécanismes de trans-présentation de l'IL-2 par le CD25.....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 32 : Structure 3D des complexes IL-2/anti-IL-2. D'après Arenas-Ramirez et al., 2015... ..</b>	<b>123</b>
<b>Figure 33 : Mesure de l'hyperréactivité bronchique des voies aériennes supérieures et inférieures suite à un traitement de l'asthme par IL-2 Cx. ....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 34 : Evaluation des modifications histologiques des poumons et de leur infiltrat post traitement par IL-2 Cx.....</b>	<b>127</b>
<b>Figure 35 : Mesure du nombre total de Treg et de lymphocytes de type Th1, Th2 et Th17 au niveau local.....</b>	<b>128</b>
<b>Figure 36 : Mesure du nombre total de Treg et de lymphocytes de type Th1, Th2 et Th17 au niveau périphérique et dosage des IgE sanguins.....</b>	<b>129</b>
<b>Figure 37 : Mesure de l'activité biologique de l'IL-2 Cx.....</b>	<b>131</b>
<b>Figure 38 : Mécanisme d'expansion des Treg LY5.1 induit par l'IL-2 Cx.....</b>	<b>132</b>
<b>Figure 39 : Evaluation de la toxicité de l'IL-2 Cx dans les poumons.....</b>	<b>134</b>
<b>Figure 40 : Evaluation de l'efficacité de l'IL-2 Cx dans un modèle d'asthme allergique aux acariens chez la souris humanisée. ....</b>	<b>136</b>
<b>Tableau 1 : Propriétés protéolytiques des allergènes modulant les interactions cellules dendritiques-cellules épithéliales. D'après Hammad et Lambrecht, 2008. ....</b>	<b>32</b>

<b>Tableau 2 : Utilisation clinique des agonistes <math>\beta_2</math>. Les doses correspondent aux inhalations. D'après Billington et al., 2017. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 3 : Ensemble des thérapeutiques développées ou en cours de développement dans l'asthme. ....</b>	<b>59</b>
<b>Tableau 4 : Modèles murins aigus et sévères d'asthme à l'ovalbumine.. ....</b>	<b>63</b>
<b>Tableau 5 : Modèles murins aigus et sévères d'asthme aux acariens. ....</b>	<b>65</b>
<b>Tableau 6 : Composition, caractéristiques et utilisation des modèles de souris humanisées.. ....</b>	<b>67</b>

### Liste des abréviations

1C6 : anticorps anti-IL-2

$\beta_2$ AR : récepteur adrénergique bêta 2

AC : adénylate cyclase

ADN : acide désoxiribonucléique

ALI : air-liquid interface

AMP : adénosine monophosphate

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

AREG : amphiréguline

ATP : adénosine triphosphate

BCR : récepteur des cellules B

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

CMH II : complexe moléculaire d'histocompatibilité de type 2

CSI : corticostéroïdes inhalées

DC-IL-10+ : cellules dendritiques tolérogènes sécrétrices d'IL-10

Der f : *Dermatophagoides farinae*

Der p : *Dermatophagoides pteronyssinus*

Der p 2.1 : peptide déviré de *Dermatophagoides pteronyssinus de type 2*

DMSO : diméthylsulfoxyde

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ESC : embryonic stem cells

FCS : facteur de cellules souches

FeNO : fraction of exhaled nitric oxide

Foxp3 : forkhead box P3

GAN : Globale Asthma Network

GC : glucocorticoïdes  
GM : ganglions médiastinaux  
GM-CSF : granulocyte macrophage – colony stimulating factor  
GR : récepteur des glucocorticoïdes  
GRE : éléments de réponse aux glucocorticoïdes  
GR $\beta$  : sous-unité bêta du récepteur aux glucocorticoïdes  
GVHD : graft versus host disease  
HDM : house dust mites  
HRB : hyperréactivité bronchique  
HSC : cellules souches humaines  
ICOS : inducible T-cell costimulator  
IgE : immunoglobuline de type E  
IgG4 : quatrième sous-classe d'immunoglobuline de type G  
IL : interleukine  
IL-2 Cx : complexe IL-2/anti-IL-2  
IN : intranasale  
IP : intrapéritonéale  
iPSC : induced pluripotent stem cells  
ISAAC : International Study of Asthma and Allergies in Childhood  
ITA : immunothérapie allergénique  
IV : intraveineuse  
K<sub>d</sub> : constante de dissociation  
LABA : long acting beta agonist  
LBA : lavage broncho-alvéolaire  
LMC : lymphocyte-derived membrane conduit  
M : molaire  
MLB : muscle lisse bronchique  
NK : natural killer  
NKT : natural killer T  
NOD : non-obese diabetic  
nTreg : natural Treg

OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OVA : ovalbumine  
PAB : provocation allergique bronchique  
PBMC : peripheral blood mononuclear cell  
PBS : phosphate buffer saline  
PC : percutanée  
Penh : enhanced Pause  
PKA : protéine kinase A  
RCPG : récepteur couplé aux protéines G  
ROS : reactiv oxygen spieces  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium  
SABA : short acting beta agonist  
SC : sous cutanée  
SCID : severe combined immune deficiency  
SCIT : subcutaneous immonuthery  
SLIT : sublingual immunotherapy  
SVF : sérum de veau fœtal  
TCR : T cell receptor  
TGF- $\beta$  : tumor growth factor beta  
Th17 : T helper 17  
Th2 : T helper 2  
Treg : T regulatory cell  
TSLP : thymic stromal lympho-poietin  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
VEMS : volume expiré maximum en une seconde  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VLS : vascular leak syndrom

# Partie I : Généralités

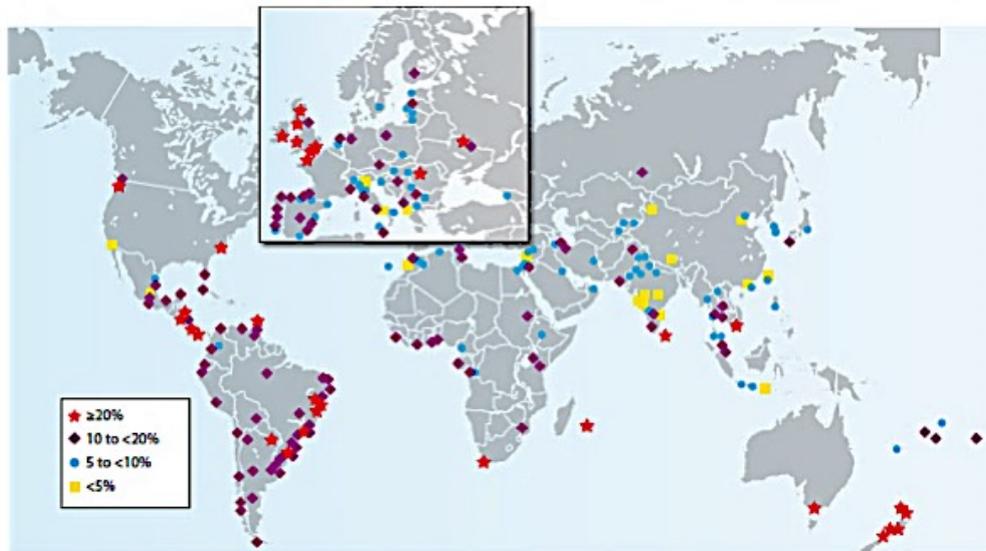
## Chapitre 1 : L'asthme une pathologie complexe

### I. Définition

#### 1) Epidémiologie et prévalence

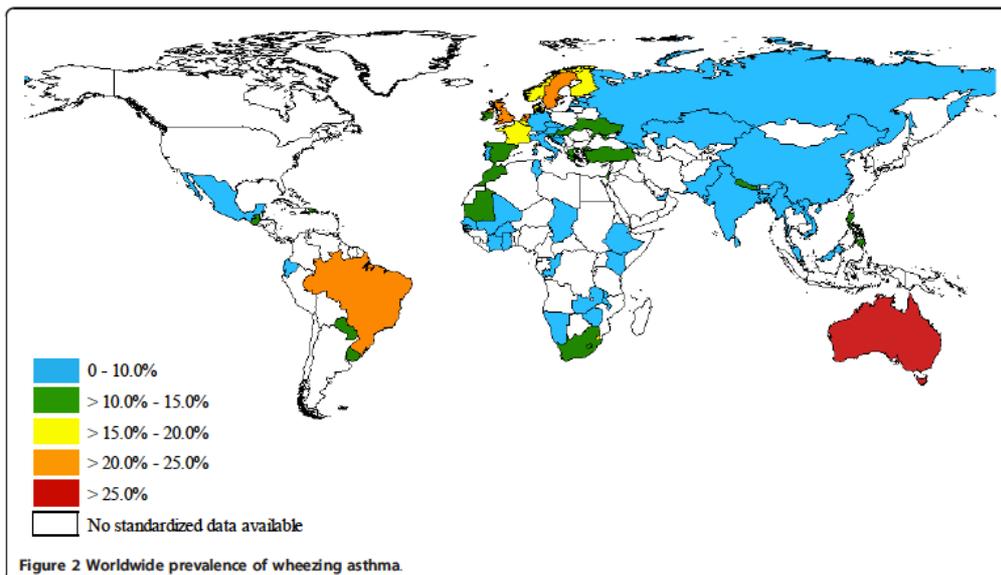
L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes inférieures. Cette pathologie est la plus répandue dans le monde avec plus de 300 millions d'individus atteints (Croisant, 2014). Cette inflammation, majoritairement Th2 (T helper 2), est accompagnée d'une hyperréactivité bronchique (HRB) favorisant la bronchoconstriction (Bousquet et al., 2000), induisant des sifflements dans la poitrine, une dyspnée, une oppression thoracique et de la toux. L'asthme est également caractérisé par une augmentation de la production de mucus par les cellules épithéliales et un épaississement de la paroi des voies aériennes (Bochner et al., 1994). Le spasme bronchique récidivant peut parfois constituer une urgence et parfois nécessiter une hospitalisation en réanimation. On dénombre environ 400 000 décès annuels par asthme dans le monde en 2015 (PMC, 2017) ; on estime d'ici 2025 100 millions de nouveaux asthmatiques en lien avec l'urbanisation croissante (Masoli et al., 2004).

Concernant la prévalence de l'asthme, enquêtes mondiales ont été réalisées ces dernières décennies. Le projet ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), démarré en 1991 fait référence et a pour but d'évaluer et de quantifier la prévalence de l'asthme chez les enfants dans deux populations : de 6 à 7 ans et de 13 à 14 ans dans 306 centres répartis dans 105 pays. Les résultats montrent une augmentation de la prévalence de l'asthme dans la majorité des pays de 1993 à 2003 (Asher et al., 2006). Chez les enfants de 6 à 7 ans en Europe occidentale elle est estimée au minimum à 7,4% en Autriche et jusqu'à un maximum de 20,9% au Royaume-Uni (Asher et al., 2006). Pour les enfants de 13 à 14 ans présentant un asthme, une prévalence supérieure à 20% est observée en Australie, Europe, Amérique du Nord et une partie de l'Amérique Latine. En revanche, une plus faible prévalence, inférieure à 5%, est observée dans le sous-continent Indien, l'Océanie, l'est méditerranéen, le nord et l'est de l'Europe (Lai et al., 2009). Cette étude a également montré une augmentation de la prévalence de l'asthme sévère chez les enfants âgés de 13 à 14 ans avec une moyenne mondiale autour de 7,5% (Lai et al., 2009) (**Figure 1**).



**Figure 1 : Prévalence de l’asthme dans le monde chez les enfants de 13 et 14 ans de 2000 à 2003. D’après Lai et al., 2009.**

Concernant les jeunes adultes de 18 à 45 ans, une vaste étude (World Health Survey) lancée par l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans les années 2000 et regroupant 70 pays fait état comme chez l’enfant d’une hétérogénéité de la prévalence de l’asthme, dont les plus fortes valeurs sont observées en Australie, dans le nord et l’ouest de l’Europe et au Brésil (To et al., 2012) (Figure 2).



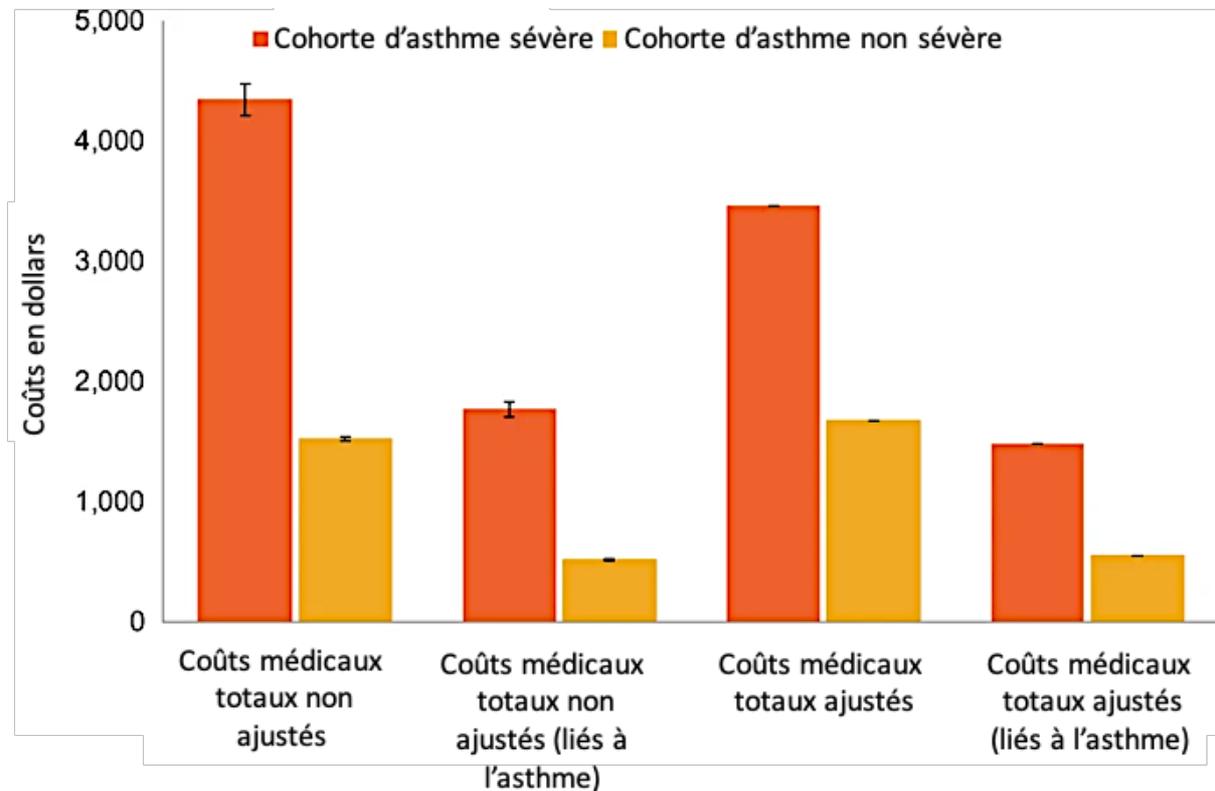
**Figure 2 : Prévalence de l’asthme dans le monde chez les adultes de 18 à 45 ans. D’après To et al., 2012.**

Alors que le projet ISAAC a été terminé en décembre 2012, un nouveau projet d'envergure mondiale lui succède : le GAN (Global Asthma Network). La première partie de ce projet (GAN phase I) se base sur la méthodologie d'ISAAC en collectant de nouvelles données épidémiologiques de l'asthme chez les enfants (6/7 ans), les adolescents (13/14 ans) et les adultes à travers le monde. Le premier rapport concernant ces nouvelles données est attendu courant 2020, nous donnant un nouvel aperçu de l'évolution de cette pathologie sur ces 10 dernières années. L'ensemble des études et projets mis en place renforcent le fait que l'asthme continue d'être un problème de santé publique majeur à travers le monde, surtout dans une époque de forte industrialisation, avec notamment d'importants enjeux socioéconomiques.

## 2) Impact socioéconomique

L'impact économique d'une pathologie est le résultat de sa prévalence ; les coûts directs dus aux services de santé (hôpitaux, médecins et traitements) et les coûts indirects sociétaux liés à une incapacité de travail partielle/totale et l'accumulation des jours de congés. D'autres coûts, qui malheureusement ne sont pas pris systématiquement en compte dans l'évaluation des coûts liés à l'asthme doivent également être pris en considération ; il s'agit des coûts immatériels. Ils sont liés à la qualité de vie des patients, aux douleurs générées (physique ou psychologiques), aux limitations de l'activité physique et à la réorientation professionnelle. D'après l'OMS, en 2004 le coût global de l'asthme dans le monde excédait ceux de la tuberculose et du VIH combinés. En 2003, il a été estimé que l'asthme génère en Europe et aux Etats-Unis un surcoût de 18 milliards de dollars par an (Global Atlas of Asthma, 2013). De nombreuses études évaluent les coûts de l'asthme au niveau individuel (le patient) ou au niveau sociétal (région ou pays). Le résultat est qu'en moyenne un patient asthmatique léger ou modéré coûte environ 5 000\$ par an, ce coût est encore plus élevé chez les asthmatiques sévères (Cisternas et al., 2003). Ces dernières années, l'apparition de nouvelles biothérapies a néanmoins permis de diminuer les coûts par patient. Une méta-analyse en 2009, montre pour la première fois que les coûts directs liés à l'asthme sont concentrés sur la médication et que les coûts indirects sont répartis sur l'absence à l'école et au travail. De plus, l'augmentation des coûts liés à l'asthme seraient corrélés avec les comorbidités, l'âge et la sévérité de la pathologie (Bahadori et al., 2009). En effet, la sévérité de l'asthme est une composante majeure liée au coût de la pathologie. Plus de la moitié des dépenses liées à

l'asthme sont générées par des patients asthmatiques sévères qui ne représentent que 5 à 10% des asthmatiques (Gibson et al., 2013; Inoue et al., 2019; Nunes et al., 2017; Sadatsafavi et al., 2010) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Répartition des coûts de l'asthme en fonction de la sévérité. D'après Inoue et al., 2019.**

### 3) Les différents phénotypes d'asthme

L'asthme comme toutes pathologies chroniques, nécessite un suivi et une médication tout au long de la vie du patient. Cependant les symptômes et les mécanismes sous-jacent de l'asthme varient d'un patient à un autre tout au long de leur vie ; on parle alors de phénotypes et d'endotypes d'asthme. D'après Sally E. Wenzel en 2012, le terme phénotype est défini comme « les propriétés observables d'un organisme qui sont produites par les interactions entre le génotype et l'environnement » (Wenzel, 2012). Les phénotypes d'asthme décrivent les particularités cliniques, morphologiques ainsi que la réponse aux traitements ; les endotypes quant à eux caractérisent les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués (Lötvall et al., 2011). C'est en 1947 que Rackemann catégorise l'asthme en deux grands phénotypes : l'asthme extrinsèque et l'asthme intrinsèque (Rackemann, 1947).

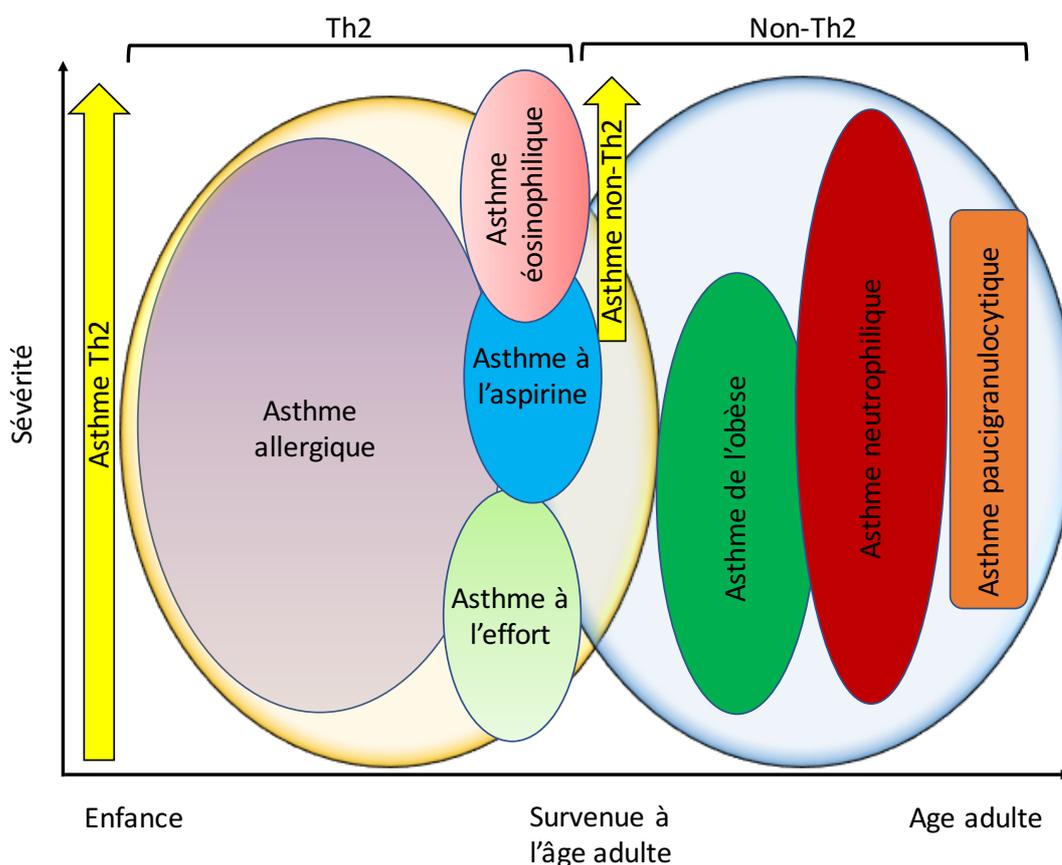
L'asthme extrinsèque est dit de type allergique et se développe de manière précoce au cours de la vie. Il est caractérisé d'une part, par une forte réponse inflammatoire de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) , une hyper éosinophilie bronchique, une production d'IgE spécifiques d'allergènes (Hamelmann et al., 1999) et d'autre part, par un remodelage des tissus bronchique avec une hyperplasie des cellules productrices de mucus et des cellules épithéliales et également par une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Agache et al., 2012). Cet asthme est généralement associé à d'autres pathologies atopiques (dermatite atopique ou rhinite allergique) ou des antécédents allergiques familiaux (Haldar et al., 2008).

A contrario, l'asthme intrinsèque est dit de type non-allergique et se déclare bien plus tardivement chez l'adulte autour de 40 ans. Il est caractérisé par un remodelage plus marqué des tissus bronchiques (Carroll et al., 1993; Pepe et al., 2005). L'asthme intrinsèque est également caractérisé par une forte élévation de la réponse Th2 et une éosinophilie avec néanmoins une absence de positivité aux tests cutanés pour les pneumallergènes. Ces patients présentent généralement un asthme plus sévère. D'autres patients présentent un asthme non allergique et non éosinophilique avec une inflammation paucigranulocytaire. Ces patients sont souvent résistants aux corticoïdes et sont difficiles à traiter et non contrôlés (Ntontsi et al., 2017). On retrouve dans cette catégorie l'asthme de l'obèse. L'obésité étant une condition inflammatoire systémique, elle est souvent associée à de nombreuses comorbidités. Les patients obèses sont en général plus essoufflés avec un reflux gastro-oesophagien compliquant l'expression clinique de l'asthme ou même une inflammation bronchique neutrophilique médiée par le tissu adipeux (Scott et al., 2011). D'autres patients souffrant d'asthme après un effort physique possèdent un asthme sévère induit par l'effort ou EIA (exercice induced asthma) (Wenzel, 2012). Cet asthme peut être également associé à une réponse allergique de type Th2 avec une éosinophilie (Hallstrand et al., 2005).

L'asthme sévère est un asthme persistant et non contrôlé malgré l'utilisation de la thérapie la plus appropriée (GINA, 2018). Cet asthme est associé à un remodelage bronchique important lié à une forte concentration de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) conduisant à une angiogenèse et une néo vascularisation mucosale (Vrugt et al., 2000; Zou et al., 2014). Il est également caractérisé par la production de nombreuses cytokines inflammatoires non-Th2 : IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-8 et IFN- $\gamma$  retrouvées dans biopsies bronchiques de patients asthmatiques sévères (Al-Ramli et al., 2009; Shannon et al., 2008). Les patients asthmatiques sévères présentent également une résistance à la corticothérapie

(Irusen et al., 2002; Matthews et al., 2004). Les patients souffrant d'asthme sévère ont des exacerbations fréquentes pouvant être fatales et des effets secondaires importants liés à la médication, notamment par la prise de corticoïdes par voie orale.

En 1999, Wenzel catégorise l'asthme sévère en deux grands groupes : l'asthme sévère éosinophilique et l'asthme sévère non éosinophilique en se basant sur le statut inflammatoire des patients (Wenzel et al., 1999). Le groupe éosinophilique présente les caractéristiques classiques de l'asthme avec un fort taux d'éosinophiles persistant malgré une corticothérapie. Le groupe non éosinophilique possède une balance éosinophile/neutrophile en faveur de la neutrophilie favorisant d'autant plus sa résistance à la corticothérapie (Ray and Kolls, 2017). D'après Wenzel la prédominance des différentes populations cellulaires permet donc de distinguer trois phénotypes d'asthme : l'asthme éosinophilique, l'asthme neutrophilique et l'asthme paucigranulocytaire (Wenzel, 2006) (**Figure 4**).



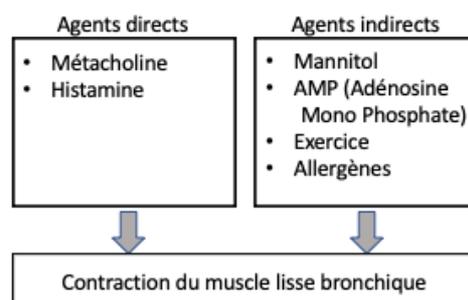
**Figure 4 : Les différents phénotypes d'asthme. Adapté d'après Wenzel et al., 2012.**

## II. Caractéristiques et mécanismes de l'asthme

Chez l'asthmatique les voies aériennes sont rendues hypersensibles à toutes sorte de stimuli aéroportés (tabac, virus, acariens, pollens, ...) et vont favoriser l'obstruction bronchique. Cette obstruction est liée à plusieurs mécanismes : l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation bronchique et le remodelage bronchique. Ces mécanismes sont connus comme étant les caractéristiques principales de la pathologie et interviennent à divers degrés en fonction de la sévérité.

### 1) L'hyperréactivité bronchique

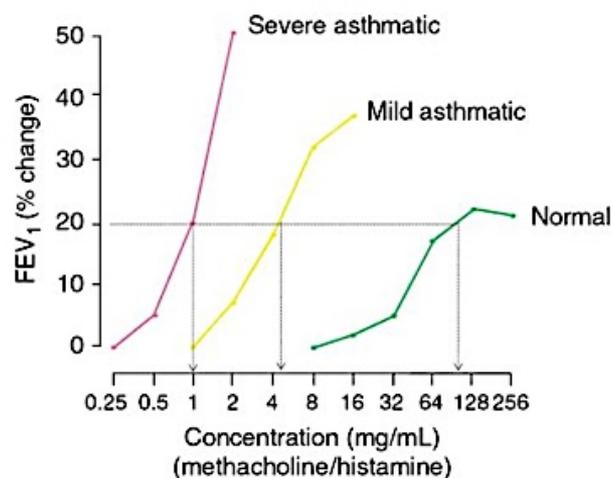
L'hyperréactivité bronchique (HRB) est une caractéristique principale de la manifestation clinique de l'asthme. Les stimuli permettant de mettre en évidence l'HRB peuvent être soit directs, soit indirects (Pauwels et al., 1988; Van Schoor et al., 2005). Les stimuli directs, l'histamine et la métacholine agissent directement sur les récepteurs H<sub>1</sub> et muscariniques des muscles lisses bronchiques respectivement (Fryer and Jacoby, 1998; Hill, 1990). Les stimuli indirects agissent sur une ou plusieurs voies intermédiaires, majoritairement via la libération de médiateurs provenant des cellules inflammatoires comme les mastocytes (Anderson, 2010). Ils peuvent aussi provenir de stimuli physiques (exercices, air froid, hyperventilation, ...) ou chimiques (AMP, mannitol) (Anderson and Brannan, 2003; Anderson et al., 1996; Van Schoor et al., 2000). L'ensemble de ces stimuli va agir sur différents récepteurs présents sur les cellules musculaires lisses bronchiques et induire une bronchoconstriction (**Figure 5**).



**Figure 5 : Agents directs et indirects responsables de l'hyperréactivité bronchique. D'après Busse et al., 2010.**

En clinique, les tests de provocation direct à la métacholine sont un bon outil de diagnostic de l'asthme (Cockcroft, 2010), ainsi que pour étudier les effets des thérapeutiques visant à prévenir ou réduire l'HRB dans l'asthme (O'Byrne et al., 2009) et pour adapter la dose

de corticostéroïdes inhalés en fonction d'un traitement au court ou long terme (Lipworth et al., 2012; Sont et al., 1999; Turton et al., 2012). Les tests de provocation bronchique indirect sont cliniquement matérialisés par une inhalation d'allergènes, d'agents osmotiques (mannitol) ou la pratique d'un exercice physique (Busse, 2010). La baisse du VEMS (volume expiré maximum en une seconde) en réponse à ces différents agents est le critère majeur de diagnostic d'une HRB. On estime qu'une baisse d'au moins 20% du VEMS est suffisant pour diagnostiquer une HRB (O'Byrne et al., 2009). Le taux de réponse aux différents tests de provocation peut varier selon l'appartenance ethnique (Sumino et al., 2012) et dépend aussi de l'existence ou non d'un terrain atopique (Liem et al., 2008). L'absence de détection de l'HRB peut se produire dans certains cas car elle restant dépendante de la présence d'une inflammation bronchique sous-jacente (Anderson et al., 2009; Haby et al., 1994; O'Hickey et al., 1988). Il existe également une corrélation entre une augmentation de l'HRB et la sévérité de l'asthme (Busse, 2010; Gibson et al., 2000; Porsbjerg et al., 2008) (**Figure 6**).



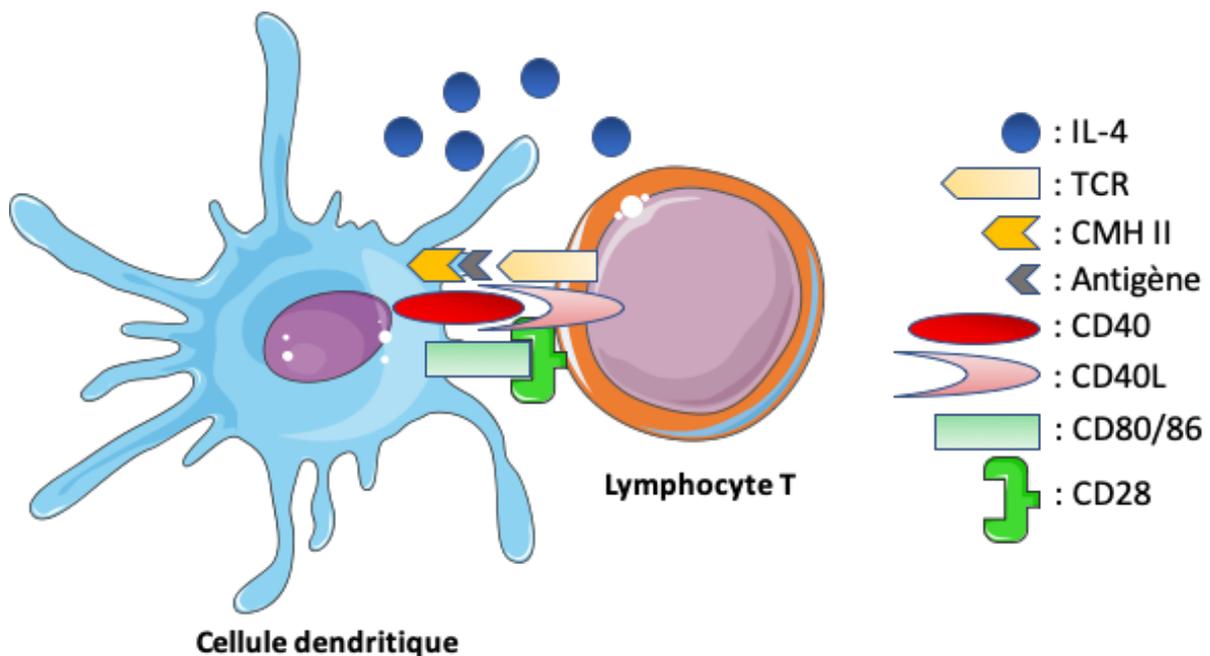
**Figure 6 : Courbe dose-réponse après inhalation d'un agoniste (méthacholine ou histamine) chez des sujets normaux et des asthmatiques légers à sévères. D'après Busse et al., 2010.**

## 2) L'inflammation bronchique

L'inflammation bronchique est une autre caractéristique principale de l'asthme et impacte de manière significative l'HRB. Cette inflammation résulte dans un premier temps, de la libération de médiateurs inflammatoires après exposition des voies aériennes à divers stimuli (allergènes, pollens, ...) et dans un second temps, de l'activation par ces médiateurs de réponses immunitaires innées et adaptatives.

### II.2.1. La réponse de type Th2

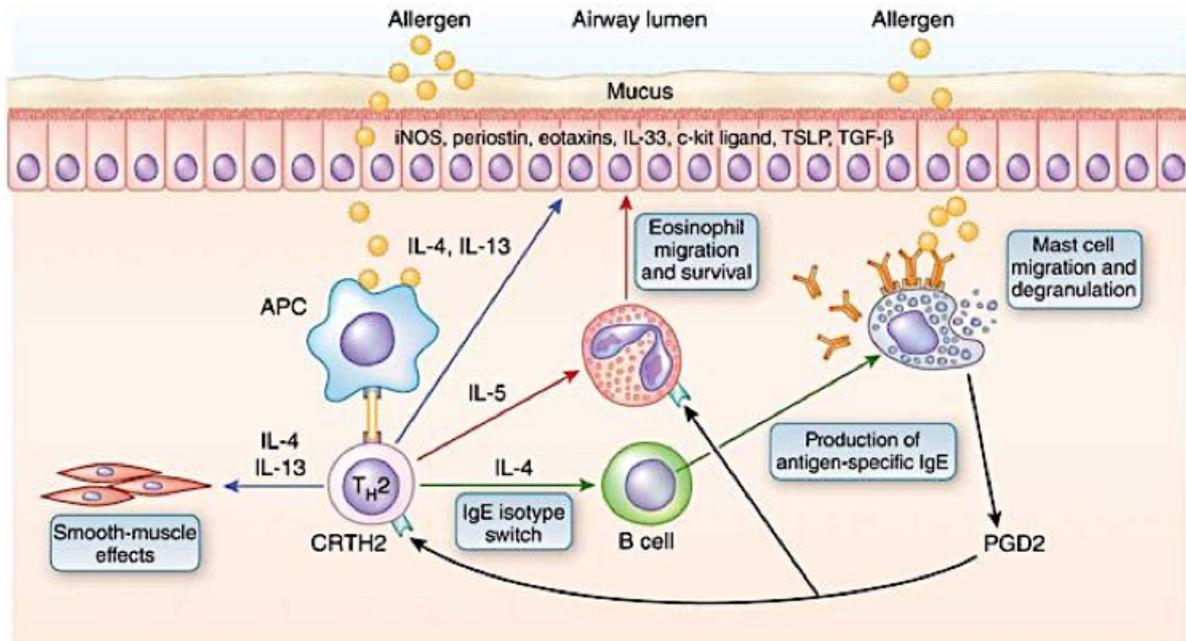
La majorité des asthmes sont associés à une réponse dite de type Th2 (Mosmann et al., 1986; Robinson et al., 1992). Pour les asthmes allergiques, la présence d'allergènes dans les voies respiratoires les cellules épithéliales bronchiques libèrent des agents chimio attractants suite à une agression de part ces allergènes (Hammad and Lambrecht, 2008). Ces agents vont se lier à leurs récepteurs sur les cellules dendritiques sous-jacentes de l'épithélium bronchique et entrainer leur migration vers l'épithélium (Hammad et al., 2010). Les cellules dendritiques étendent leurs dendrites au travers des jonctions serrées de l'épithélium pour capturer les allergènes, les digérer et les fragmenter en peptides courts (antigènes) qui seront ensuite présentés à la surface de complexe moléculaire d'histocompatibilité II (CMH II). Les cellules dendritiques migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques proximaux pour présenter l'antigène aux récepteurs TCR et BCR présents sur les lymphocytes T et B respectivement (Afshar et al., 2008; Holgate, 2012). Cette présentation, appelée synapse immunologique, permet l'activation des lymphocytes T naïfs. La présentation CMH II-TCR, est associé à l'expression de molécules de co-stimulation le CD80/86 et CD40, à la sécrétion d'IL-4 par la cellule dendritique et à l'expression des récepteurs respectifs CD28 et CD40L par le lymphocyte T (**Figure 7**). Une fois la synapse établie les lymphocytes T naïfs peuvent se différencier en lymphocytes Th2. Une absence des signaux de co-stimulation provoque une anergie et l'apoptose des cellules (Holgate, 2012).



**Figure 7 : La synapse immunologique.**

Les lymphocytes Th2 expriment le facteur de transcription Gata3 (Zheng and Flavell, 1997) et produisent diverses cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-4, IL-5 et IL-13 (Swain et al., 1988; de Waal Malefyt et al., 1993). Ces cytokines sont retrouvées en grande concentration dans les lavages broncho alvéolaires de patients asthmatiques (Robinson et al., 1992). L'IL-4 produite par les lymphocytes Th2 va agir sur les plasmocytes sécrétant d'IgM et entraîner une commutation isotypique permettant à la place une sécrétion d'IgE spécifiques de l'allergène (Hamelmann et al., 1999). Les IgE ainsi sécrétées vont ensuite se fixer via leur fragment constant Fc $\epsilon$  sur les cellules mastocytaires exprimant le récepteur Fc $\epsilon$ R1. Lorsque les IgE pontés captent les allergènes, ceux-ci vont entraîner la dégranulation des mastocytes libérant des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, les leucotriènes et la prostaglandine 2 responsables de la bronchoconstriction par l'activation des cellules musculaires lisses bronchiques (Bradding et al., 2006). À l'inverse, des inhibiteurs de dégranulation des mastocytes permettent de réduire l'HRB (Ramis et al., 2015). L'IL-5 permet quant à elle le recrutement d'éosinophiles sur le site inflammatoire entraînant un fort infiltrat bronchique (Adachi et al., 1995). Les éosinophiles produisent également les cytokines de type Th2 IL-4, IL-5, IL-13 et également l'IL-8 permettant un recrutement des neutrophiles (Corrigan et al., 1991; Douglass et al., 1994). L'IL-13 possède plusieurs rôles, dont un central dans l'hyperréactivité bronchique et le remodelage des tissus pulmonaires (Finkelman et al., 2010). L'IL-13 est également indispensable pour la différenciation des cellules caliciformes et la production de mucus (Wills-Karp et al., 1998). La réponse Th2 dans l'asthme se caractérise donc par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, le recrutement d'éosinophiles et la production d'IgE spécifiques de l'allergène (**Figure 8**). Ces différents acteurs se potentialisent

mutuellement entraînant un emballement de l'inflammation bronchique pouvant difficilement être contrôlée.



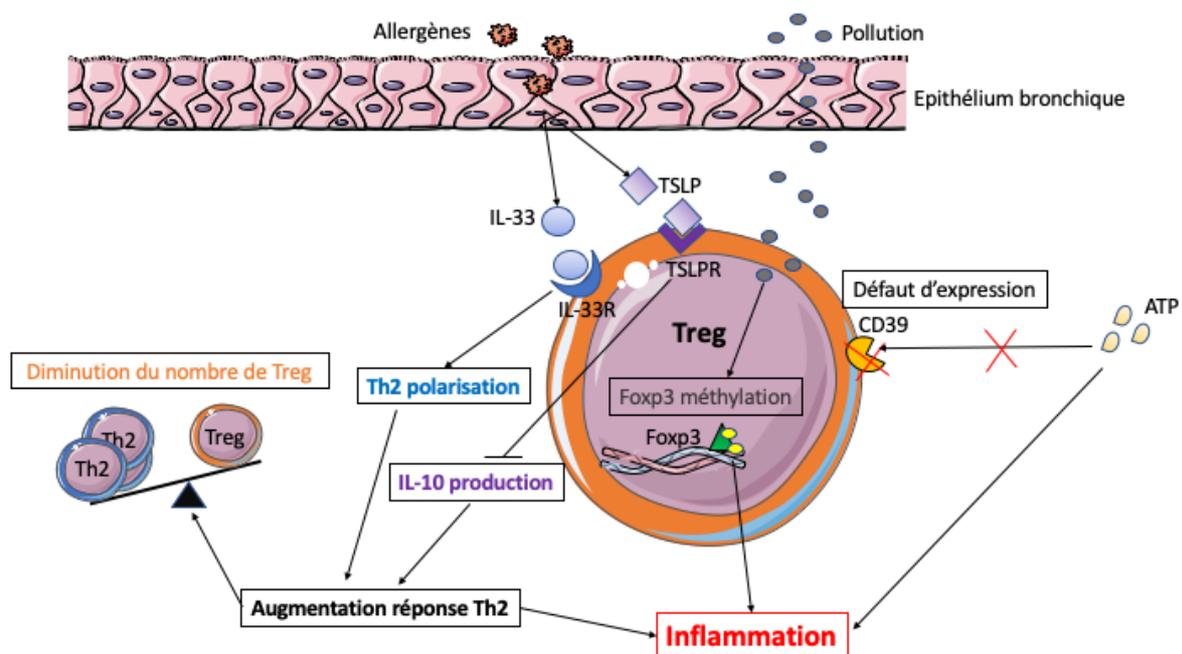
**Figure 8 : Réponse de type Th2 lors d'un asthme allergique. D'après Wenzel et al., 2012.**

### II.2.2. Les lymphocytes T régulateurs

Le concept de régulation de populations immunitaires par des lymphocytes date des années 70 avec les travaux de Gershon et Kondo, montrant que certains lymphocytes T pouvaient inhiber d'autres sous population de lymphocytes T (Gershon and Kondo, 1970; Gershon et al., 1972). Cependant, ce concept fut abandonné vers la fin des années 80 par l'absence caractérisation via des marqueurs spécifiques pour cette population. Ce n'est que dans les années 90 qu'une nouvelle sous population de T suppresseurs exprimant le CD4 fut proposée et nommée lymphocyte T régulateur (Treg) (Chen et al., 1994; Groux et al., 1997). Chez l'homme, les Treg se distinguent de façon générale par une très faible expression du CD127 et sont donc  $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low}Foxp3^+$  (Liu et al., 2006). La fonctionnalité des Treg et leurs capacités d'inhibition des réponses inflammatoires sont liés à l'expression de différents marqueurs : CD25, CD39, PD-1, CTLA-4 et ICOS ou à des produits de sécrétion : IL-10 et TGF- $\beta$  (Borsellino et al., 2007; Ito et al., 2008; Jonuleit et al., 2001; Polanczyk et al., 2007; Scheffold et al., 2007).

Dans l'asthme le maintien de l'inflammation est lié à un déséquilibre entre les réponses pro- et anti-inflammatoire où les Treg jouent un rôle primordial. Chez des patients

asthmatiques le nombre de Treg retrouvés dans les expectorations et le sang est inférieur à celui retrouvé chez des sujets sains, notamment dans les lavages broncho alvéolaires des enfants asthmatiques (Hartl et al., 2007). Chez l'adulte en revanche, certaines études montrent une augmentation (Smyth et al., 2010) ou une diminution des Treg dans l'asthme (Barczyk et al., 2014). Cette controverse laisse supposer que le nombre de Treg n'est pas la seule cause du maintien de l'inflammation dans l'asthme. Plusieurs études montrent que la fonctionnalité des Treg est réduite dans l'asthme (Mamessier et al., 2008). Les alarmines, IL-33 et TSLP (thymic stromal lymphopoietin) semblent participer à ce défaut de fonctionnalité. Chez la souris, les Treg pulmonaires traités par l'IL-33 sont capables de se polariser en lymphocytes Th2 (Chen et al., 2017). Chez l'homme, l'inhibition de la sécrétion d'IL-10 par les Treg est corrélée avec une augmentation de la TSLP dans les LBA chez des patients asthmatiques (Nguyen et al., 2010). L'environnement semble également participer à cette dysfonction. L'exposition de patients asthmatiques à un air pollué entraîne une perte de fonction des Treg par l'augmentation de la méthylation de Foxp3 (Nadeau et al., 2010). L'ensemble de ces données montre que l'asthme est lié à un défaut quantitatif et/ou qualitatif de lymphocytes T régulateurs (**Figure 9**).



**Figure 9 : Altération de la prolifération et des fonctions régulatrices des lymphocytes T régulateurs dans l'asthme.**

### II.2.3. La réponse Th17 et les neutrophiles

Même si l'asthme est généralement associé à une éosinophilie, les patients les plus sévères présentent un profil associant également la neutrophilie et une réponse de type mixte Th2/Th17 (Manni et al., 2014). Les Th17 sont un type particulier de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, induit par l'IL-6, IL-23 et le TGF- $\beta$ , ils expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et sécrètent l'IL-17 (Harrington et al., 2006; Iwakura and Ishigame, 2006). Chez les patients asthmatiques, une élévation des concentrations pulmonaires en IL-17 est corrélée avec un asthme de type neutrophilique et plus sévère (Molet et al., 2001). En effet, l'IL-17 est associée au recrutement des neutrophiles et à une augmentation de l'hyperréactivité bronchique (He et al., 2007). Les neutrophiles sont recrutés par l'IL-8 et l'IL-17 sécrétées par les éosinophiles, les cellules épithéliales et d'autres cellules inflammatoires (Douglass et al., 1994, 2013). Par ailleurs, une augmentation de l'IL-8 et l'IL-17 est retrouvée dans les expectorations induites et les biopsies bronchiques de patients asthmatiques (Bullens et al., 2006). Pour finir, l'IL-17 peut participer au remodelage bronchique en activant directement les cellules musculaires lisses bronchiques (Chesné et al., 2015; Chiba et al., 2017).

### 3) Le remodelage bronchique

Le remodelage bronchique est généralement défini comme un changement de composition, de distribution, d'épaisseur, de masse/volume et ou du nombre de composant structuraux observés dans les parois des voies aériennes des patients, comparées à des individus sains. Deux types de remodelages bronchiques existent. D'une part, le remodelage bronchique physiologique, qui concerne les changements structuraux apparaissant durant le développement normal du poumon vers des voies aériennes matures normales ou bien une réponse transitoire en réponse à des dommages ou une inflammation, qui résulte en une régénération complète des voies aériennes. D'autre part, le remodelage bronchique pathologique, comprenant cette fois les altérations structurales apparaissant lors d'un mauvais développement du poumon ou bien lors de lésions et/ou phénomènes inflammatoires chroniques conduisant à des altérations persistantes des voies aériennes et de leurs fonctions (Bai, 2010; Bergeron et al., 2009; Hirota and Martin, 2013).

Dans l'asthme, ces changements structuraux incluent une modification morphologique de l'épithélium bronchique, une hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus et une augmentation de la masse des cellules musculaires lisses bronchiques (Al-Muhsen et al., 2011; Beckett and Howarth, 2003; Jeffery, 2004; Udem et al., 1999). Cela se traduit par l'installation

d'une obstruction bronchique résiduelle, présentant très peu de sensibilité aux bronchodilatateurs ou aux corticoïdes inhalés. L'existence de ce remodelage est confirmé à l'aide plusieurs techniques (Bergeron et al., 2007). L'inflammation des voies aériennes participe activement au maintien de ce remodelage, de par la sécrétion de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance par les granulocytes, macrophages, lymphocytes mais également par les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales bronchiques (Fehrenbach et al., 2017). Des études montrent une corrélation entre l'intensité du remodelage bronchique et la sévérité de l'asthme (Benayoun et al., 2003; Chetta et al., 1997; Jeffery et al., 1989; Wenzel et al., 2003).

### II.3.1. Altération de l'épithélium

L'épithélium bronchique est en contact permanent avec l'air inhalé. C'est plus qu'une barrière physique passive nous protégeant du contenu de l'air extérieur (Tam et al., 2011). L'épithélium participe également au maintien d'un poumon sain et fonctionnel via la clairance des éléments inhalés et l'activation de réponses immunitaires innées (Munkholm and Mortensen, 2014; Weitnauer et al., 2016). Cependant, les dommages directs subits par l'épithélium bronchique sont considérés comme le premier élément déclencheur de l'asthme (Al-Muhsen et al., 2011; Hirota and Martin, 2013; Holt et al., 2014). Effectivement, certains allergènes possèdent des propriétés protéasiques endommageant les cellules épithéliales et/ou les jonctions serrées, entraînant ainsi une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale bronchique (Hammad and Lambrecht, 2008) (**Tableau 1**).

Allergène	Enzyme	Mode d'action	Effet
<i>Dermatophagoides pteronissynus</i>	Der p 1 Der p 9	Clivage des jonctions serrées (claudine, ocludine)	Augmentation de la perméabilité de l'épithélium
		Activation de PAR2	Activation cellules épithéliales et production de GM-CSF
		Clivage du complément (C3, C5)	Recrutement des cellules immunitaires innées
		Activation des cellules dendritiques	Polarisation des cellules T en Th2
		Clivage de DC-SIGN et DC-SIGN-R	Incapacité à produire de l'IL-10
		Clivage du CD40	Incapacité à produire de l'IL-12
		Production de CCL17 et CCL22 par les cellules dendritiques	Recrutement de cellules Th2
		Clivage de CD25	Activation des cellules T
		Clivage de CD23	Stimulation de la production d'IgE par les cellules B
<i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Aspergillus oryzae</i>	Asp f 5 Asp f 6 Asp f 11	Clivage des jonctions serrées	Augmentation de la perméabilité de l'épithélium
		Induction d'IL-25	Induction d'une réponse Th2
		Induction de chimiokines	Recrutement des cellules Th2 et éosinophiles
Pollen de bouleau Pollen d'ambrosie	Bet v 1 Amb a	Clivage des jonctions serrées	Augmentation de la perméabilité de l'épithélium
Allergènes de cafard	Bla g	Clivage des jonctions serrées	Augmentation de la perméabilité de l'épithélium
		Activation de PAR2	Activation des cellules épithéliales

**Tableau 1 : Propriétés protéolytiques des allergènes modulant les interactions cellules dendritiques-cellules épithéliales. D'après Hammad et Lambrecht, 2008.**

De plus, une perte de cellules épithéliales laissant la lame basale sous-jacente à nu est constatée sur des biopsies bronchiques de patients asthmatiques (Montefort et al., 1992). L'épithélium bronchique est également constitué d'une membrane basale le reliant à la matrice extracellulaire (Evans et al., 2010), un épaissement de cette membrane basale est suggéré comme étant caractéristique dans l'asthme mais est également présent dans la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Liesker et al., 2009).

### II.3.2. Hypersécrétion de mucus

Le mucus est un fluide sécrété par les cellules à mucus protégeant la surface externe de l'épithélium bronchique contre l'inhalation de particules ou agents indésirables (Knowles and Boucher, 2002). Il se compose d'une solution aqueuse contenant des électrolytes, des protéines exogènes et endogènes, des lipides et des carbohydrates. Le mucus forme une couche de gel protecteur dans laquelle les particules sont piégées et évacuées, grâce aux battements ciliaires, hors des voies respiratoires ; ce phénomène est qualifié de clairance

muco-ciliaire (Litt, 1970). Les mucines composent environ 2% du mucus, ce sont des glycoprotéines conférant la visco-élasticité nécessaire à la clairance muco-ciliaire (Davies et al., 2002). Les mucines sont sécrétées par les cellules caliciformes à la surface de l'épithélium (Rogers, 2003a) et par cellules à mucus des glandes sous-mucosales sous le contrôle du gène MUC (Finkbeiner, 1999). Les gènes MUC5AC et MUC5B produisent la majorité des mucines (Davies et al., 2002).

L'hypersécrétion de mucus est une des caractéristiques principales de l'asthme mais est également observée dans la BPCO et la mucoviscidose. Cependant, la composition du mucus entre ces pathologies varie (Rogers, 2004). La présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes est souvent retrouvée dans des cas d'asthme fatal chez l'enfant et chez l'adulte (Rogers, 2003b; Sidebotham and Roche, 2003). Cette hypersécrétion est liée à une hyperplasie des glandes sous-mucosales et des cellules à gobelets (Aikawa et al., 1992; Carroll et al., 2002). Une augmentation de la viscosité du mucus est observée chez les patients asthmatiques avec une surexpression des gènes MUC2, MUC5AC et MUC5B (Bai et al., 2007; Morcillo and Cortijo, 2006). Les conséquences de cette hypersécrétion et hyperviscosité du mucus sont une obstruction bronchique, une augmentation des exacerbations et un plus faible contrôle de l'asthme (Martínez-Rivera et al., 2018).

### II.3.3. Le muscle lisse bronchique

Le rôle physiologique du muscle lisse bronchique (MLB) reste controversé. Chez des sujets sains, il jouerait un rôle dans la distribution de l'air dans les voies aériennes, dans l'expulsion du mucus ou même pour faciliter l'expiration (Bullowa and Gottlieb, 1922; Cieri, 2019; Macklin, 1929; Otis, 1983). Cependant, tous ces rôles potentiels n'ont jamais été validés expérimentalement. En 2004, Mitzner W. suggère que le MLB est un vestige de l'évolution et n'a pas de rôle physiologique (Mitzner, 2004). Paradoxalement, le rôle physiopathologique du MLB dans l'asthme est bien connu. En effet, le MLB est l'acteur majeur de la contraction bronchique en réponse à divers stimuli comme des médiateurs inflammatoires. Il peut participer au recrutement, la survie et la prolifération des mastocytes, et produire des cytokines (Berger et al., 2003; El-Shazly et al., 2006; Hollins et al., 2008). La dégranulation, allergène-dépendante ou non, des mastocytes va favoriser la contraction du MLB et augmenter sa masse via la libération de médiateurs inflammatoires, entraînant un remodelage (Begueret et al., 2007; Berger et al., 1999).

Les lymphocytes T participent également au remodelage du MLB par contact direct avec les cellules musculaires lisses via des conduits membranaires dérivés de lymphocytes : les LMCs (Farahnak et al., 2017; Heialy et al., 2015; Lazaar et al., 1994; Ramos-Barbón et al., 2005). L'épithélium bronchique peut aussi induire une prolifération du MLB de manière allergène-dépendante chez des asthmatiques sévères (Trián et al., 2015). Cette prolifération est également associée à la production de facteurs de croissance, de l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et d'enzymes, de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et également au stress mécanique (Huang et al., 2004; Pandya et al., 2002; Panettieri et al., 1996; Smith et al., 1994). L'hypertrophie du MLB est constatée chez les patients asthmatiques sévères mais absente chez ceux présentant un asthme léger ou modéré (Woodruff et al., 2004) (**Figure 10**).

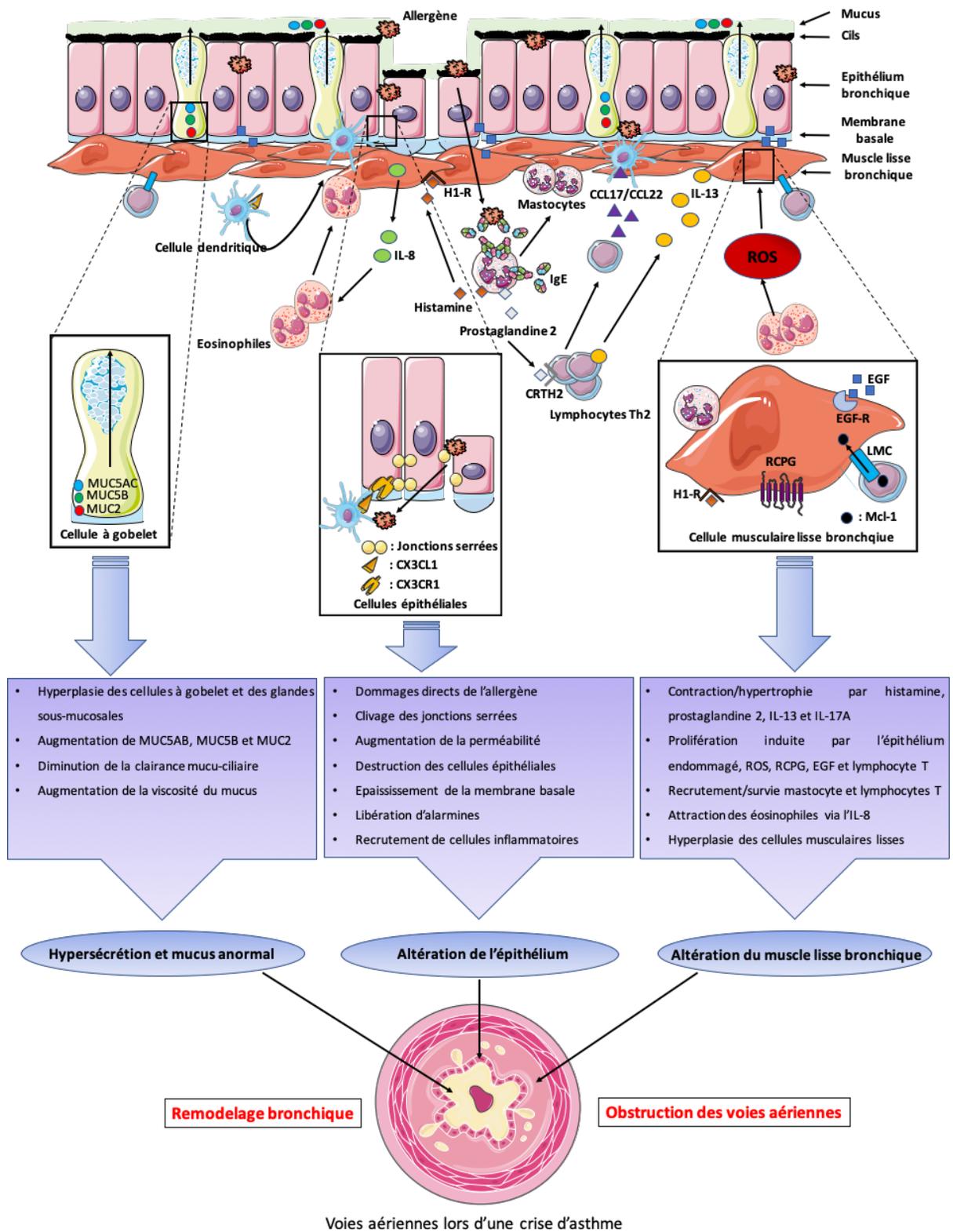


Figure 10 : Acteurs et mécanismes du remodelage bronchique dans l'asthme.

#### 4) Revue : *Les nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'asthme*

L'asthme tel qu'il est décrit depuis la fin des années 80 se caractérise par une inflammation de type Th2. Les principaux acteurs de cette inflammation sont les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les IgE, les éosinophiles et les mastocytes. Or depuis ces dernières années les données cliniques ont permis de différencier plusieurs phénotypes et endotypes évoluant avec la pathologie au cours du temps. Dès lors, une notion de complexité se voit associée à l'asthme. Les progrès de la génétique et l'apparition de nouveaux modèles animaux ont permis de mettre en évidence de nouveaux acteurs clés, renforçant dès lors cette complexité. La revue qui suit fait état de ces nouveaux acteurs, apportant une nouvelle vision sur la pathologie.



## Nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'asthme

Martin Klein<sup>1</sup>, Eléonore Dijoux<sup>1</sup>, Florian Dilasser<sup>1</sup>, Dorian Hassoun<sup>1,2</sup>, Antoine Moui<sup>1,2</sup>, Gervaise Loirand<sup>1</sup>, Luc Colas<sup>1,2</sup>, Antoine Magnan<sup>1,2</sup>, Vincent Sauzeau<sup>1</sup>, Grégory Bouchaud<sup>3</sup>

Reçu le 19 novembre 2018  
Accepté le 31 janvier 2019  
Disponible sur internet le :  
8 mars 2019

1. L'institut du thorax, Inserm, CNRS, université de Nantes, 44000 Nantes, France
2. L'institut du thorax, CHU de Nantes, service de pneumologie, 44000 Nantes, France
3. INRA, UR1268 BIA, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes, France

### Correspondance :

Grégory Bouchaud, INRA, UR1268 BIA, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes, France.  
gregory.bouchaud@inra.fr

### ■ Résumé

L'asthme est souvent associé à une réponse immunitaire de type Th2 avec des acteurs cellulaires et moléculaires bien connus comme les éosinophiles, les lymphocytes Th2 et les cytokines qui leurs sont associée comme l'interleukine-5 ou l'IL-4. Néanmoins une partie des patients asthmatiques montrent des manifestations cliniques et des caractéristiques qui ne correspondent pas au schéma actuel de la physiopathologie de l'asthme. Ainsi depuis quelques années de nouveaux acteurs cellulaires et moléculaires dans le développement de l'asthme sont mise en évidence dans des modèles animaux et chez l'homme. Parmi ceux-ci on retrouve des composants du système immunitaire innée comme les cellules lymphoïdes innées de type 2 ou du système adaptatif comme les lymphocytes de type Th9. Au niveau cellulaire, le rôle de petites protéines G dans l'asthme est également mis en évidence tout comme le rôle majeur cytokines comme l'IL-17 ou celles dérivées de l'épithélium. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'asthme et la prise en compte de ces nouveaux acteurs permet l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour les différents endotype de patients.

### ■ Summary

#### New protagonists in asthma pathophysiology

*Asthma is often associated with a Th2-type immune response with well-known cellular and molecular actors such as eosinophils, Th2 lymphocytes and associated cytokines such as interleukin-5 or IL-4. Nevertheless, some of the asthmatic patients show clinical manifestations and characteristics that do not correspond to the current pattern of the pathophysiology of asthma. Thus, recently new cellular and molecular actors in the development of asthma have been demonstrated in animal models and in humans. Among these are components of the innate immune system such as type 2 innate lymphoid cells or adaptive immune system such as Th9*



*lymphocytes. At the cellular level, the role of small G proteins in asthma is also highlighted as well as the role of major cytokines like IL-17 or those derived from the epithelium. A better knowledge of the physiopathology of asthma and the taking into account of these new actors allows the identification of new therapeutic targets for different endotypes of patients.*

## Introduction

Les 30 dernières années ont vu se transformer les connaissances concernant l'immunopathologie de l'asthme, à partir de la découverte en 1986 des lymphocytes Th2 [1] et de l'article princeps de Robinson en 1992 [2] mettant en évidence une activation Th2 dans les lavages alvéolaires des patients asthmatiques. Ces travaux ont donné lieu à de multiples développements ayant permis récemment l'avènement dans l'asthme sévère des anti-IL5 et anti-IL5R. Pourtant, si l'activation lymphocytaire Th2 concerne une très grande proportion des asthmatiques, le démantèlement de cette maladie en plusieurs phénotypes et la résistance relative d'un grand nombre de patients à ces thérapies ciblées a permis de montrer qu'une grande proportion des asthmatiques, notamment sévères, répondait à des mécanismes physiopathologiques différents, non Th2. Chez ces patients, une activation de type Th17 a pu être mise en évidence parfois [3] mais il semble que ce groupe soit à son tour suffisamment hétérogène pour qu'il soit difficile d'y mettre en évidence une cible thérapeutique unique pertinente. De plus, de nombreuses évidences démontrent que chez un même patient plusieurs mécanismes immunopathologiques peuvent être intriqués et que des profils mixtes Th2 et non Th2 existent. Le défi des années à venir va donc être de déterminer quels sont les acteurs physiopathologiques en amont de l'activation lymphocytaire, capables de rendre compte de cascades inflammatoires diverses notamment non Th2, et de nous offrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

## Cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) représentent ainsi de nouvelles populations cellulaires identifiées en amont de l'activation des lymphocytes T adaptatifs. Ces cellules sont issues des progéniteurs lymphoïdes communs de la moelle osseuse, appartenant de ce fait à la lignée lymphoïde mais n'exprimant pas de récepteur spécifique d'antigène [4]. De la même manière que les sous-populations de lymphocytes T auxiliaires, ces cellules sont catégorisées en 3 groupes principaux, selon l'expression de certains facteurs de transcription clés et selon leur production de cytokines [5]. On distingue ainsi les cellules lymphoïdes innées de type 1 (ILC1), de type 2 (ILC2) et de type 3 (ILC3). Ces 3 grands groupes d'ILC sont impliqués dans diverses pathologies inflammatoires telles que la maladie de Crohn, certaines maladies auto-immunes, le psoriasis et l'asthme. Le rôle des ILC1 et ILC2 dans l'asthme est devenu ces dernières

années un vaste sujet d'étude, à la fois dans les modèles murins d'asthme allergique et chez le patient asthmatique. Chez l'homme comme chez la souris, les ILC1 et plus particulièrement la population *natural killer* (NK) sont dépourvues de marqueurs des cellules B, T et dendritiques. Elles expriment les facteurs de transcription T-bet et EOMES et produisent de l'IFN- $\gamma$ . Les NK sont cependant très plastiques avec grande diversité dans l'expression de leurs marqueurs et leur implication dans la physiopathologie de l'asthme reste encore controversée. En effet, des études chez la souris et l'homme montrent que les cellules NK IL-4<sup>+</sup> et NK NKG2D<sup>+</sup> sont associées à production de cytokines Th2 et une éosinophilie aggravant l'asthme [6]. A contrario, d'autres cellules NK sont impliquées dans l'apoptose de polynucléaires éosinophiles [7]. Comme pour les ILC1, les ILC2 sont dépourvues des marqueurs des cellules T, B et dendritiques. Elles expriment en revanche à leur surface les récepteurs ST2, CD127 et IL-17BR, trois récepteurs des alarmines clés dérivées des cellules épithéliales activatrices des ILC2, respectivement l'IL-33, la lymphopoiétine stromale thymique (TSLP) et l'IL-25. Les ILC2 expriment également des facteurs de transcription tels que GATA3 et BCL11B et sécrètent les cytokines pro-Th2 IL-13 et IL-5. Les ILC2 murines et humaines se distinguent par l'expression du marqueur de surface CRTH2 et la production d'IL-4. Dans des modèles murins d'asthme éosinophilique, on observe une baisse de l'inflammation des voies aériennes chez les souris présentant une absence de cellules T, B, et ILC (*Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>*). Cependant, cette diminution de l'inflammation est moindre chez des souris n'ayant ni T ni B mais possédant des ILC (*Rag2<sup>-/-</sup>*), ce qui suggère une aggravation de la pathologie sous l'action des ILC. En effet un transfert passif d'ILC2 chez ces souris *Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>* entraîne la réapparition de l'inflammation des voies aériennes [8]. Les ILC2 semblent donc interagir avec d'autres cellules pour promouvoir l'inflammation. S'agissant des cellules T, ces interactions passent par l'expression à la surface des ILC2 d'ICOS et ICOSL connus pour leurs rôles dans la survie et la prolifération des sous-populations de lymphocytes T helper [9]. Dans le cas de l'asthme allergique, les médiateurs lipidiques tels que le leucotriène D<sub>4</sub> et la prostaglandine D<sub>2</sub> libérés par les mastocytes activés contribuent au recrutement et à l'activation des ILC2 au niveau des voies aériennes. Les ILC2 ainsi activées vont produire des cytokines de type IL-4 et IL-13, supposant un rôle dans l'initiation et la régulation de la réponse Th2. Effectivement, la co-culture in vitro d'ILC2 et de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> naïfs, conduit à une différenciation en lymphocyte de type Th2 avec une inhibition de la

réponse Th1 [10]. De même, on constate une absence de production de cytokines de type Th2 lors de co-cultures de cellules T helper avec des ILC2 incapable de sécréter de l'IL-4 [11]. L'IL-4 produite par les ILC2 est donc responsable de l'initiation et du maintien de la réponse Th2. La production d'IL-13 par les ILC2 va également permettre la mise en place d'une forte réponse Th2, celle-ci étant à l'inverse affaiblie dans les modèles murins d'asthme allergique présentant une déficience en ILC2 [12]. L'IL-13 issue des ILC2 permet également la migration des cellules dendritiques activées vers les ganglions lymphatiques afin de polariser les lymphocytes T naïfs en Th2. Les ILC2 pulmonaires semblent donc jouer un rôle crucial, à la fois direct et indirect dans l'initiation et l'orientation de la réponse Th2 dans des modèles murins d'asthme allergique. Chez l'homme, les ILC2 sont retrouvées en plus grande quantité dans le sang périphérique et les lavages bronchoalvéolaires (LBA) de patients asthmatiques comparés à des sujets sains. On note également une forte corrélation entre les ILC2 et l'IL-33 contenus dans les LBA et l'altération de la fonction respiratoire [13]. Certaines ILC2 persistent longtemps après la résolution d'une

phase allergique et sont même plus promptes à réagir en cas de réexposition à l'allergène que des ILC2 naïves. Ces ILC2 dites « allergène-expérience » possèdent un profil d'expression similaire aux cellules T mémoires, ce qui pourrait expliquer pourquoi des patients asthmatiques sont souvent sensibilisés à plusieurs allergènes. Des données plus récentes montrent que l'IL-13 issue des ILC2 pourrait cibler les jonctions serrées de l'épithélium bronchique et ainsi être impliquée dans la perte d'intégrité de la barrière épithéliale [14]. Les actions sur l'épithélium bronchique, les cellules dendritiques et la réponse de type Th2 des ILC2 demandent à être confirmées chez l'homme. En effet, les données relatives à cette population sont majoritairement issues de modèles murins et seules quelques études proviennent de patients *figure 1*.

### Lymphocytes Th9

L'IL-9 a longtemps été considérée comme une cytokine Th2 car elle favorise l'inflammation allergique et est associée à la réponse Th2 comme cela a été montré grâce à l'utilisation de souris transgéniques ou déficientes pour l'expression du gène

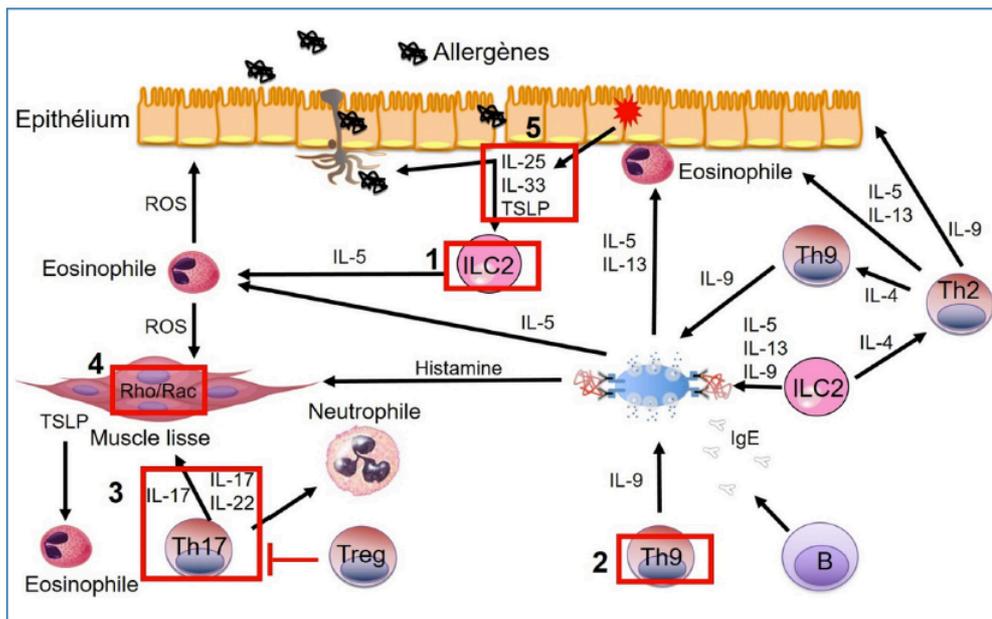


FIGURE 1 Les nouveaux acteurs cellulaires dans la physiopathologie de l'asthme allergique. La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'asthme se complexifie avec les connaissances de ces nouveaux acteurs qui sont impliqués dans toutes les étapes du développement de l'asthme allant de la réponse innée avec les ILC2 (1) et adaptatives avec les Th2 (2) jusqu'à la contraction musculaire avec les protéines G comme RAC ou Rho (3) en passant par l'action des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 (4) ou dérivées de l'épithélium comme l'IL-25, l'IL-33 ou la TSLP (5)



de l'IL-9. Récemment, il a été proposé qu'une sous-population lymphocytaire, les Th9, représentait la principale source d'IL-9 [15]. Les cellules Th9 peuvent être générées à partir de cellules T naïves en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4 ou via une plasticité des cellules Th2 par activation de la signalisation du TGF- $\beta$ , ce qui favorise la perte de l'expression de GATA-3, et de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, tout en induisant une régulation à la hausse de l'expression de l'IL-9. Bien qu'un facteur de transcription spécifique aux Th9 n'ait pas été clairement identifié, les facteurs de transcription BATF (facteur de transcription activant les cellules B), IRF4 et PU.1 sont essentiels au développement des cellules Th9. Dans certains modèles murins d'asthme, les cellules Th9 sont présentes dans les ganglions lymphatiques et les voies respiratoires, en particulier pendant les phases précoces de la maladie [16-18]. L'inhibition de la différenciation des cellules Th9 in vivo par des anticorps anti-TGF $\beta$  et de l'activine A inhibe le développement de l'allergie. Inversement, le transfert de cellules Th9 différenciées in vitro en présence d'activine A est suffisant pour induire une inflammation des voies aériennes caractérisée par un recrutement d'éosinophiles, une augmentation du nombre de mastocytes et des taux sériques d'IgE [16]. La surexpression d'IL-9 chez des souris transgéniques est également suffisante pour provoquer une hyperactivité bronchique (HRB) par ses effets sur l'épithélium respiratoire et la libération accrue de cytokines Th2 par les lymphocytes [19]. L'IL-9 contribue largement à l'inflammation allergique induite par la TSLP in vivo et exacerbe les maladies allergiques principalement en augmentant le nombre de mastocytes dans l'épithélium des voies respiratoires et en favorisant l'hyperplasie pulmonaire [20]. De plus, la délétion spécifique des lymphocytes Th9 par suppression du facteur de transcription IRF4 spécifique des lymphocytes Th9 entraîne une diminution de l'inflammation. De façon très intéressante, la neutralisation de l'IL-9 par un anticorps spécifique s'est montrée efficace dans un modèle d'asthme allergique à l'ovalbumine induit par le transfert de cellules Th9 spécifiques [21]. Récemment, il a été démontré dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire induite par la papaine qu'une autre source d'IL-9 in vivo est représentée par des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) et que l'expression transitoire d'IL-2 favorise leur survie et leur prolifération. Chez l'homme, les cellules Th9 sont des contributeurs majeurs aux maladies atopiques notamment la dermatite atopique, l'asthme et les allergies alimentaires. Les patients asthmatiques possèdent un nombre accru de cellules Th9 circulantes. De plus, dans l'asthme à éosinophiles comme dans l'asthme non éosinophilique, le ratio Th9/Th1 est élevé. Des polymorphismes mononucléotidiques (SNP) retrouvés dans les gènes codant pour l'IL-9 ont été associés à des effets bénéfiques sur la sensibilisation aux allergènes. Des études in vitro utilisant des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) isolées chez des nourrissons atopiques et non atopiques ont révélé une augmentation de la sécrétion d'IL-9 chez les atopiques, à la fois

en réponse à une stimulation non spécifique et à une stimulation spécifique par les allergènes [22]. Ensemble, ces données suggèrent que les cellules Th9 jouent un rôle important dans l'asthme allergique et font de ces cellules une cible pertinente dans cette maladie.

### Petites protéines G

Les protéines G monomériques de la famille Rho sont des enzymes à activité GTPasique dont les membres les mieux caractérisés sont RhoA et Rac1. Ces protéines agissent comme des commutateurs moléculaires qui cyclent entre un état inactif, lié au GDP et un état actif, lié au GTP. Les protéines Rho sont localisées dans le cytosol lorsqu'elles sont inactives et à la membrane plasmique lorsqu'elles sont actives. À l'échelle cellulaire, les protéines G monomériques de la famille Rho sont largement décrites pour réguler l'organisation du cytosquelette d'actine et ainsi réguler la morphologie, la polarité, la motilité et l'adhérence cellulaire. L'implication de cette famille de protéines dans la contraction des cellules musculaires lisses (CML) bronchiques a été suggérée par l'inhibition des géranylgéranyl-transférases (inhibition non spécifique des protéines G monomériques de la famille Rho) qui préviennent l'HRB dans un modèle murin d'asthme allergique sensibilisé à l'ovalbumine [23]. De plus, une augmentation de l'expression de RhoA dans les CML bronchiques a été observée dans des modèles d'asthme allergique chez le rat et la souris associée à une augmentation de l'activité de RhoA dans les CML bronchiques en culture stimulées par des bronchoconstricteurs tels que l'acétylcholine ou l'endothéline-1 [24]. L'effecteur principal de RhoA dans les CMLs est la sérine/thréonine kinase ROCK. L'administration d'inhibiteurs de ROCK, le fasudil par voie orale ou l'Y-27632 par voie intranasale, chez des souris sensibilisées à l'ovalbumine prévient l'HRB associée à l'asthme, confirmant le rôle de la voie RhoA/ROCK dans l'HRB. Ces études montrent également que l'utilisation de ces inhibiteurs de ROCK induit une diminution du recrutement des éosinophiles et de l'hyperplasie des cellules productrices de mucus dans les modèles murins asthmatiques. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation RhoA/ROCK ne serait pas impliquée uniquement dans l'HRB mais également dans la réponse inflammatoire associée à l'asthme allergique. Cette hypothèse est renforcée par une étude récente démontrant que l'administration du Y-27632 par voie intranasale potentialise l'effet sur l'HRB d'un anticorps neutralisant l'IL-17, une cytokine dont les niveaux sont augmentés chez les patients asthmatiques. Plus récemment, il a été mis en évidence qu'une autre protéine G monomérique, Rac1, est impliquée dans la contraction des CML bronchiques murines et humaines [25]. Ces travaux démontrent que les bronchoconstricteurs activent Rac1 qui interagit physiquement avec la phospholipase  $\beta$ 2 pour induire l'augmentation de calcium intracellulaire nécessaire à la contraction du muscle lisse bronchique. Les auteurs de ce travail ont observé une suractivation de Rac1 dans les voies aériennes

de souris asthmatiques sensibilisées aux extraits d'acariens et que la délétion du gène *Rac1* spécifiquement dans les CML prévient l'HRB chez ces animaux. De même, la nébulisation d'un inhibiteur de Rac1, le NSC23766, prévient l'HRB mais également l'inflammation pulmonaire en diminuant le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de Rac1 serait une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre l'HRB et l'inflammation pulmonaire associés à l'asthme allergique chez des patients asthmatiques de profil Th2 ou non Th2.

### Interleukines 17

Les interleukines 17 sont des cytokines pro-inflammatoires dont l'implication dans l'asthme a été mise en évidence. Les IL-17 sont produites en grande partie par les lymphocytes Th17 de même que l'IL-21 et l'IL-22. Les lymphocytes Th17 résultent de la différenciation des lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> naïfs stimulés par les cytokines telles que le TGF- $\beta$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 produites notamment par des cellules immunitaires (macrophage, lymphocytes T...) lors de la détection d'un pathogène. Les IL-17A et F ont un rôle similaire ; elles permettent le recrutement, l'activation et la migration des polynucléaires neutrophiles dans les tissus, notamment bronchique et pulmonaire. L'augmentation de la production d'IL-17A et F et l'accumulation de polynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire sont associées au phénotype asthmatique sévère [26]. Mais les lymphocytes Th17 n'ont pas l'exclusivité de la production d'IL-17. Il a été montré que la stimulation de neutrophiles, prélevés dans le sang de patients asthmatiques, par des cytokines régulant les lymphocytes Th17 (IL-23, IL-21 et IL-6) induisait une augmentation de la production d'IL-17A et F par ces polynucléaires neutrophiles eux-mêmes. Ces résultats suggèrent donc que les Th17 stimulent l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, dans les poumons d'asthmatiques, qui pourraient être à l'origine de l'augmentation importante des cytokines pro-inflammatoires IL-17A et F maintenant ainsi l'inflammation. De façon plus directe, les Th17 ont aussi un rôle dans la prolifération excessive des cellules musculaires lisses bronchiques caractéristique des patients asthmatiques via la sécrétion des IL-17A, IL-17F et IL-22 [27,28]. Ces interleukines activent les voies de signalisation de ERK1/2, p38 MAPK et/ou NF- $\kappa$ B qui induisent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses des voies respiratoires [28]. Les fibroblastes des patients asthmatiques présentent aussi une augmentation significative de la prolifération sous l'influence de l'IL-17A produite par les Th17 en association avec l'IL-13 et l'IL-4 produites par les lymphocytes Th2 [29]. Cette prolifération induit un remodelage bronchique suite à l'augmentation de la production des protéines de la matrice extracellulaire telle que l'acide hyaluronique et la ténascine C, par les fibroblastes [30]. L'IL-17A induit une hypersécrétion de mucine par augmentation de l'expression du gène (*MUC5AC*) suite à l'activation de la voie de

signalisation dépendante de NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales bronchiques. Cette hypersécrétion rend le mucus pulmonaire plus épais [31]. Les lymphocytes Th17 ont donc un rôle pro-inflammatoire via leur sécrétion d'IL-17 dans la pathogénèse et dans la sévérité de l'asthme [32]. Il existe aujourd'hui un anticorps monoclonal appelé Brodalumab utilisé dans la cas du psoriasis (maladie inflammatoire chronique) inhibant l'activité biologique des IL-17 A et F. Les essais cliniques de phase III sur le psoriasis ont atteint leur critère principal après 12 semaines de traitement, avec une amélioration de 75 % de l'atteinte et de la gravité du psoriasis. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'asthme, et notamment les IL-17, pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante.

### Cytokines dérivées de l'épithélium

L'épithélium bronchique activé est capable de sécréter de nombreuses cytokines dérivées de l'épithélium dont l'IL-25, l'IL-33 et la TSLP qui semblent particulièrement impliquées dans l'asthme et représentent des cibles thérapeutiques prometteuses. L'IL-25 (ou IL-17E) est une des seules cytokines faisant partie de la famille de l'IL-17 qui permette de stimuler la voie Th2. Elle est produite majoritairement par les lymphocytes Th2, les mastocytes mais également les cellules épithéliales bronchiques. Plusieurs données prouvent qu'une exposition prolongée à l'IL-25 suffit à induire une inflammation à éosinophiles, un remodelage et une HRB mimant une exposition à un allergène dans un modèle murin d'asthme [33,34]. Son blocage diminue l'inflammation bronchique et la production de cytokines Th2 dans des modèles murins d'asthme allergique [35]. Cette cytokine va activer via son récepteur IL-17RB qui lui est spécifique différentes cellules de l'immunité innée (éosinophiles, cellules dendritiques), adaptative (lymphocytes Th2) ainsi que les cellules épithéliales bronchiques elles-mêmes. Elle induit l'expression de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13. L'IL-25 a été montré dans comme impliqué dans l'inflammation Th17 [36] mais son rôle dans la réaction inflammatoire Th17 dans l'asthme reste à explorer. Elle interagirait également avec l'IL-33 et la TSLP. Chez l'homme, le dosage de l'IL-25 a été proposé pour distinguer les patients avec un phénotype Th2 [37] et ainsi prédire une meilleure réponse à la corticothérapie, comparativement au dosage de l'IL-33 et de la TSLP. L'IL-33 fait partie de la famille de l'IL-1, et joue un rôle central dans la réponse inflammatoire induite par un stimulus allergénique. Elle est exprimée par de nombreuses cellules dont les cellules épithéliales bronchiques, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les cellules dendritiques. Son récepteur ST2 est hautement exprimé par les mastocytes, les basophiles et est un marqueur des cellules Th2. La différenciation de cellules humaines CD4<sup>+</sup> in vitro en présence de l'IL-33 induit la production d'IL-5 et d'IL-13. C'est également un chemoattractant pour les cellules Th2 et un promoteur de



survie des éosinophiles. Son expression est augmentée dans les bronches de patients asthmatiques sévères et n'est pas modifiée par la corticothérapie par voie générale. Une corrélation entre cette cytokine et la sensibilisation aux acariens chez de patients asthmatiques non traités par une corticothérapie fut démontrée [38]. De plus il existe un lien entre les exacerbations induites par un rhinovirus et la production d'IL-33, ce qui fait de cette cytokine une cible thérapeutique intéressante [39]. La TSLP est également une cytokine dérivée des cellules épithéliales, produite en réponse à un stimulus pro inflammatoire qui mène à une réponse allergique via son activité sur de nombreuses cellules de l'immunité innée, dont les cellules dendritiques et les mastocytes. En 2017, un essai de phase 2 testant le Tezepelumab (anti-TSLP) chez des patients asthmatiques sévères a retrouvé une diminution du taux d'exacerbations, indépendamment du taux d'éosinophilie [40]. De plus différents marqueurs de l'inflammation Th2 diminuaient à 4 semaines tels que le taux d'éosinophiles, la FeNO et le taux sériques d'IgE. Des études de phase 3 sont actuellement en cours. En conclusion, les cytokines dérivées de l'épithélium bronchique et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques à l'étude qui ont comme intérêt principal de stimuler la voie Th2 mais d'agir également sur d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative, permettant d'en espérer un ciblage des asthmes non Th2.

### Points essentiels

- Cellules ILC2 : activées par les cytokines dérivées de l'épithélium : IL-33, IL-25 et TSLP. Produisent des cytokines pro-inflammatoires de type Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13. Activent les lymphocytes adaptatifs Th2.
- Lymphocytes Th9 : principale source d'IL-9, ils sont nécessaires et suffisants pour induire le développement d'une inflammation pulmonaire chez la souris.
- Protéines G monomériques de la famille Rho : les protéines RhoA et Rac1 sont décrites pour être impliquées dans la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisse. L'activité de ces protéines est augmentée au cours de l'asthme et leur inhibition prévient l'asthme allergique chez la souris.
- Lymphocytes Th17 : source d'IL-17, capables d'induire une migration cellulaire, un remodelage bronchique et une sécrétion de mucus, les lymphocytes Th17 sont une composante importante de l'inflammation au cours de l'asthme, en particulier dans ses formes sévères.
- Cytokine dérivées de l'épithélium : IL-25, IL-33 et TSLP participent à l'inflammation dans l'asthme et leur blocage serait efficace sur des phénotypes pour l'instant dénués de traitement efficace.

**Déclaration de liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

### Références

- [1] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
- [2] Benayoun BA, Caburet S, Dipietromaria A, Bailly-Bechet M, Batista F, Fellous M, et al. The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum Mol Genet* 2008;17(20):3118-27.
- [3] Chesne J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant MA, Loy J, et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *Allergy Clin Immunol* 2015;135(6) [1643-e3].
- [4] Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nature Rev Immunol* 2013;13(2):145-9.
- [5] Cherrier M, Sawa S, Eberl G. Notch, Id2, and RORgammat sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. *J Exp Med* 2012;209(4):729-40.
- [6] Matsubara S, Takeda K, Kodama T, Joetham A, Miyahara N, Koya T, et al. IL-2 and IL-18 attenuation of airway hyperresponsiveness requires STAT4, IFN-gamma, and natural killer cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36(3):324-32.
- [7] Barnig C, Purohit A, Casset A, Sohy C, Lieutier-Colas F, Sauleau E, et al. Nonallergic airway hyperresponsiveness and allergen-specific IgE levels are the main determinants of the early and late asthmatic response to allergen. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;23(4):267-74.
- [8] Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity* 2015;43(1):175-86.
- [9] Maazi H, Patel N, Sankaranarayanan I, Suzuki Y, Rigas D, Soroosh P, et al. ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity. *Immunity* 2015;42(3):538-51.
- [10] Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, Scott C, Bain CC, Cerovic V, et al. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4+ Th2 cell responses. *J Immunol* 2014;192(5):2442-8.
- [11] Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy* 2014;69(10):1300-7.
- [12] Halim TY, Steer CA, Mutha L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity* 2014;40(3):425-35.
- [13] Martinez-Gonzalez I, Mutha L, Steer CA, Ghaedi M, Poon GF, Takei F. Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity* 2016;45(1):198-208.
- [14] Sugita K, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, Altunbulakli C, Morita H, Castro-Giner F, et al. Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141(1) [300-10 e11].
- [15] Veldhoen M, Uytendhoeve C, van Snick J, Helmbj H, Westendorp A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta "reprograms" the differentiation of T helper 2 cells

- and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunol* 2008;9(12):1341-6.
- [16] Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM, Activin A, and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(4) [1000-10e3].
- [17] Kara EE, Comerford I, Bastow CR, Fenix KA, Litchfield W, Handel TM, et al. Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *J Immunol* 2013;191(3):1110-7.
- [18] Kerzeho J, Maazi H, Speak AO, Szely N, Lombardi V, Khoo B, et al. Programmed cell death ligand 2 regulates Th9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity. *J Allergy Clinical Immunol* 2013;131(4):1048-57 [57e1-2].
- [19] Temann UA, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest* 2002;109(1):29-39.
- [20] Hoppenot D, Malakauskas K, Lavinskiene S, Bajoruniene I, Kalinauskaitė V, Sakalauskas R. Peripheral blood Th9 cells and eosinophil apoptosis in asthma patients. *Medicina* 2015;51(1):10-7.
- [21] Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 2010;33(2):192-202.
- [22] Yao W, Tepper RS, Kaplan MH. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(6) [1357-60e5].
- [23] Chiba Y, Sato S, Hanazaki M, Sakai H, Misawa M. Inhibition of geranylgeranyltransferase inhibits bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(5):L984-91.
- [24] Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by alpha beta T cells drives airway hyperresponsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nature Med* 2012;18(4):547-54.
- [25] Andre-Gregoire G, Dilasser F, Chesne J, Braza F, Magnan A, Loirand G, et al. Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142(3) [824-33 e3].
- [26] Halwani R, Sultana A, Vazquez-Tello A, Jamhawi A, Al-Masri AA, Al-Muhsen S. Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma. *J Asthma* 2017;54(9):893-904.
- [27] Newcomb DC, Peebles Jr RS. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol* 2013;25(6):755-60.
- [28] Chang PJ, Bhavsar PK, Michaeloudes C, Khorasani N, Chung KF. Corticosteroid insensitivity of chemokine expression in airway smooth muscle of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(4) [877-85e5].
- [29] Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, Barczyk M, Schmidt M, Mattoli S. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. *Mucosal Immunol* 2012;5(2):140-9.
- [30] Benayoun L, Pretolani M. Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutic perspectives. *Med Sci* 2003;19(3):319-26.
- [31] Linden A, Dahlen B. Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma. *Eur Respir J* 2014;44(5):1319-31.
- [32] Zou XL, Chen ZG, Zhang TT, Feng DY, Li HT, Yang HL. Th17/Treg homeostasis, but not Th1/Th2 homeostasis, is implicated in exacerbation of human bronchial asthma. *Ther Clin Risk Manage* 2018;14:1627-36.
- [33] Yao XJ, Huang KW, Li Y, Zhang Q, Wang JJ, Wang W, et al. Direct comparison of the dynamics of IL-25- and "allergen" induced airways inflammation, remodeling and hypersensitivity in a murine asthma model. *Clin Exp Allergy* 2014;44(5):765-77.
- [34] Yao X, Wang W, Li Y, Lv Z, Guo R, Corrigan CJ, et al. Characteristics of IL-25 and allergen-induced airway fibrosis in a murine model of asthma. *Respirology* 2015;20(5):730-8.
- [35] Petersen BC, Budelsky AL, Baptist AP, Schaller MA, Lukacs NW. Interleukin-25 induces type 2 cytokine production in a steroid-resistant interleukin-17RB+ myeloid population that exacerbates asthmatic pathology. *Nature Med* 2012;18(5):751-8.
- [36] Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007;204(1):161-70.
- [37] Yao X, Sun Y, Wang W, Sun Y. Interleukin (IL)-25: Pleiotropic roles in asthma. *Respirology* 2016;21(4):638-47.
- [38] Porsbjerg C, Baines K, Gibson P, Bergqvist A, Erjefalt JS, Sverrild A, et al. IL-33 is related to innate immune activation and sensitization to HDM in mild steroid-free asthma. *Clin Exp Allergy* 2016;46(4):564-74.
- [39] Jackson DJ, Makrinioti H, Rana BM, Shamji BW, Trujillo-Torralbo MB, Footitt J, et al. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190(12):1373-82.
- [40] Corren J, Parnes JR, Wang L, Mo M, Roseti SL, Griffiths JM, et al. Tezepelumab in adults with uncontrolled asthma. *N Engl J Med* 2017;377(10):936-46.

## Chapitre 1 : L'asthme une pathologie complexe

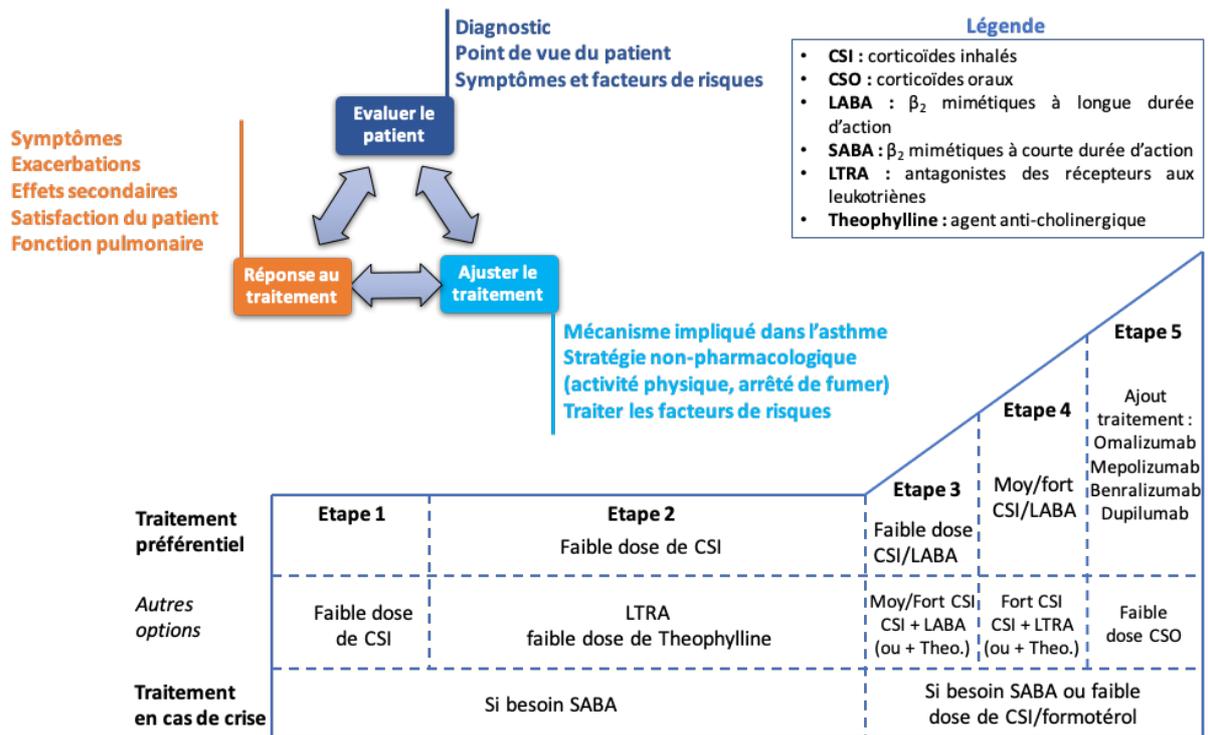
### Points Clés

- L'asthme est une maladie fréquente apparaissant à tout âge. Cette maladie évolue au cours de la vie à travers divers phénotypes plus ou moins sévères.
- L'asthme reste un problème de société majeur avec des coûts importants et une qualité de vie altérée.
- Les aéroallergènes en sont la cause principale. Ils déclenchent une réponse inflammatoire innée et adaptative, faisant intervenir de nombreux acteurs dont la liste ne cesse d'être étoffée.
- L'inflammation et le remodelage bronchique sont deux composantes physiopathologiques responsables de l'hyperréactivité bronchique.
- Les lymphocytes T régulateurs voient leur nombre et leurs fonctions régulatrices altérées dans l'asthme, permettant le maintien d'une inflammation.

## Chapitre 2 : Les approches thérapeutiques : vers une médecine personnalisée

### I. Les traitements actuels et en cours

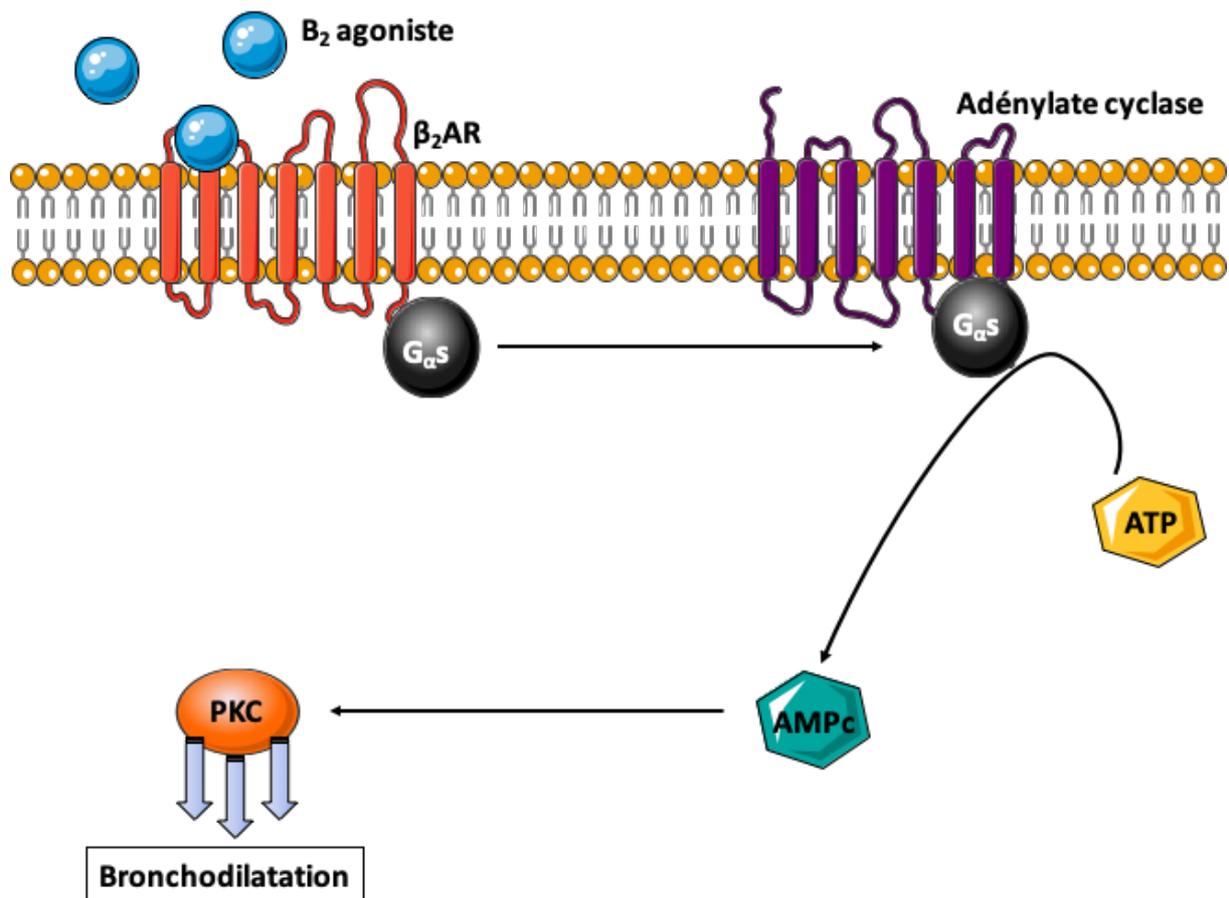
L'asthme est actuellement une maladie dont il n'existe aucun traitement curatif, seuls les symptômes peuvent être contrôlés mais avec une efficacité variable. En effet, suite aux diverses études sur des cohortes de patients, il est apparu que l'asthme possède de nombreux phénotypes et endotypes. Les symptômes sont également variables d'un patient à un autre et évoluent au cours de sa vie. Une telle hétérogénéité, à la fois clinique et biologique, oriente les professionnels de santé vers une médecine de précision ou personnalisée. Cette médecine a pour ambition de concevoir de nouvelles thérapeutiques adaptées au phénotype du patient et ayant pour but d'améliorer l'observance, la prévention et le contrôle de l'asthme. Cette médecine personnalisée s'inscrit dans une démarche prédictive, préventive et participative (Magnan and Blanc, 2013) (**Figure 11**).



**Figure 11 : Recommandation des traitements dans l'asthme selon la sévérité. D'après GINA, 2018.**

### 1) Les agonistes $\beta_2$

Les agonistes  $\beta_2$  constituent la première ligne de traitement dans l'asthme mais également dans la BPCO. Ils exercent leurs effets bronchodilatateurs via les récepteurs adrénergiques  $\beta_2$  ( $\beta_2$ AR) situés sur les cellules musculaires lisses bronchiques. L'activation de ces récepteurs induit un changement de conformation de la sous-unité alpha sous-jacentes des protéines G ( $G_{\alpha s}$ ) (Penn et al., 2000). La sous-unité se dissocie et va se lier à l'adénylate cyclase membranaire (AC). L'AC catalyse la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). L'AMPc se lie à la phospho-kinase A (PKA) dont la sous-unité catalytique, à son tour va phosphoryler diverses cibles et induire la relaxation du muscle lisse bronchique et par extension induire une broncho dilatation (Penn, 2008) (**Figure 12**). Les  $\beta_2$ AR sont également exprimés sur d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales, l'endothélium vasculaire, les mastocytes, les macrophages et les éosinophiles (Barnes, 2004).



**Figure 12 : Voie de signalisation classique des  $\beta_2$ AR.**

Les effets relaxants des agonistes  $\beta$  sont connus depuis des siècles via une plante médicinale contenant de l'éphédrine, mais ce n'est qu'en 1910 que les premiers effets broncho dilatateurs de l'éphédrine sont décrits (Chu and Drazen, 2005). Par la suite, le développement de nouveaux agonistes  $\beta$  ont permis l'apparition de l'isoprenaline en 1940. Cet agoniste non sélectif pour les récepteurs  $\beta$  adrénergiques ( $\beta_1$ AR et  $\beta_2$ AR) fut utilisé pendant une vingtaine d'années dans l'asthme. Cependant, l'utilisation abusive et à forte dose fut responsable de nombreux décès jusqu'à la conception d'agonistes plus spécifiques (Jackson, 2009).

Le premier agoniste spécifique des  $\beta_2$ AR, le salbutamol, fut synthétisé en 1968 par Brittain à Glaxo Smith Kline (GSK), ayant des effets secondaires bien moindres que l'isoprénaline et possédant une durée d'action bien supérieure (Brittain et al., 1968; Cullum et al., 1969). La courte durée d'action du salbutamol sur les  $\beta_2$ AR lui vaut la qualification de SABA (agoniste  $\beta$  de courte action), sa formule est ensuite modifiée pour donner le salmétérol (Brittain, 1990). A la différence du salbutamol, le salmétérol possède une durée d'action sur les  $\beta_2$ AR relativement longue (12 heures) ; il est qualifié quant à lui de LABA (agoniste  $\beta$  de

longue action). Bien qu'étant considérés comme la pierre angulaire pour le traitement de l'asthme et la BPCO, les instances de santé comme la Food and Drug Administration (FDA) mettent l'accent sur la manière d'utiliser les LABA. En effet les études SNS (Nationwide Surveillance Study) et SMART (Salmeterol Multicentre Asthma Research Trial), indiquent que dans l'asthme les LABA doivent obligatoirement être associés aux corticostéroïdes inhalés afin d'éviter des problèmes cardiovasculaires, des exacerbations et des décès (Castle et al., 1993; Nelson et al., 2006; Ortega and Peters, 2010; Salpeter et al., 2006). A l'inverse, ils peuvent être utilisés en monothérapie dans la BPCO (**Tableau 2**).

	Apparition des effets	Durée des effets	Indication thérapeutique	Spécificité pour $\beta_2$ AR ( $\beta_2/\beta_1$ )
<b>SABA</b>				
Salbutamol	< 5 min	3-6h	100-200 $\mu$ g (jusqu'à 4 fois par jour)	27
Terbutaline	< 5 min	4-6h	500 $\mu$ g (jusqu'à 4 fois par jour)	63
<b>LABA</b>				
Salmétérol	15 min	12h	50-100 $\mu$ g deux fois par jour + CSI	3000
Formotérol	7 min	12h	12-24 $\mu$ g deux fois par jour + CSI	150
Olodatérol	5 min	12h	5 $\mu$ g une fois par jour + CSI	65
Vilantérol	5 min	12h	55 $\mu$ g une fois par jour + CSI	2400
<b>Ultra-LABA</b>				
Indacatérol	5 min	24h	150-300 $\mu$ g une fois par jour + CSI	16

**Tableau 2 : Utilisation clinique des agonistes  $\beta_2$ . Les doses correspondent aux inhalations. D'après Billington et al., 2017.**

## 2) Les glucocorticoïdes

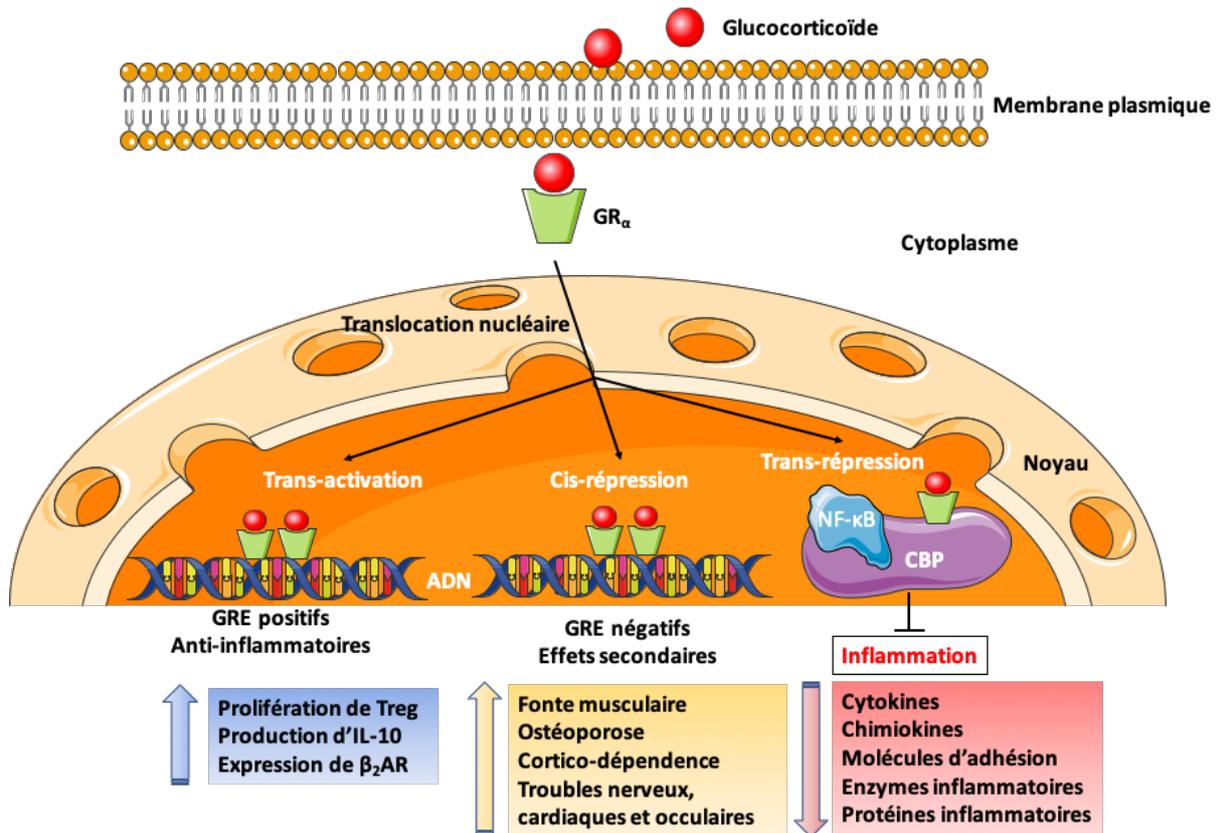
Appelés également corticoïdes ou stéroïdes, les glucocorticoïdes sont les médicaments les plus efficace disponibles actuellement pour le traitement de nombreuses maladies inflammatoires chroniques et immunes, y compris l'asthme. L'utilisation précoce des corticostéroïdes inhalés (CSI) a révolutionné la prise en charge de l'asthme en réduisant la morbidité et la mortalité. Les CSI sont maintenant recommandés comme la première ligne de traitement chez les patients avec un asthme persistant, y compris chez l'enfant (Bateman et al., 2008). Ils permettent à de nombreux patients de vivre normalement, améliorant leur fonction pulmonaire, réduisant la fréquence d'exacerbation et prévenant des altérations des voies aériennes (Barnes et al., 1998; O'Byrne et al., 2006).

Les glucocorticoïdes (GC) possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Ils activent de nombreux gènes anti-inflammatoires et répriment également plusieurs gènes pro-inflammatoires (Barnes, 2006a, 2011; Rhen and Cidlowski, 2005). Les GC diffusent à travers la membrane plasmique et se lient à leur récepteur cytoplasmique : le récepteur aux

glucocorticoïdes (GR) (Rhen and Cidlowski, 2005). Le GR se translocalise ensuite dans le noyau cellulaire pour former des homodimères et se fixer aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) sur la région promotrice des gènes de réponse aux GC (Goldfarb et al., 2004; Tao et al., 2006), s'en suit une activation de la transcription desdits gènes. (Barnes, 2006b; Clark, 2003; Dostert and Heinzl, 2004; Ito et al., 2000). Dans l'asthme les GC réduisent le nombre d'éosinophiles, lymphocytes T, mastocytes et cellules dendritiques dans les voies aériennes (Barnes et al., 1998). Les CSI permettent de restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale, suppriment l'inflammation mucosale et diminuent l'hyperréactivité bronchique seulement 3h après inhalation (Barnes et al., 1998; Erin et al., 2008; Gibson et al., 2001; Ketchell et al., 2002). Cependant, une réversibilité complète de l'hyperréactivité bronchique prend plusieurs mois suite aux changements structuraux des voies aériennes (Juniper et al., 1990). Comme mentionné précédemment, les GC sont fréquemment associés aux agonistes  $\beta_2$  pour le contrôle de l'asthme. Cette association résulte du fait qu'ils interagissent entre eux et améliorent leurs effets respectifs (Giembycz et al., 2008). En effet, les GC vont inhiber la régulation négative des  $\beta_2$ AR et augmenter leur couplage avec les protéines G, augmentant ainsi l'effet des agonistes  $\beta_2$  (Mak et al., 1995, 2002). De leur côté, les agonistes  $\beta_2$  augmentent la translocation des récepteurs aux GC vers le noyau après activation par les GC (Usmani et al., 2005).

Malgré de nombreux effets bénéfiques sur le contrôle de l'asthme, les GC sont aussi sujet à débat concernant leurs effets secondaires. Les CSI utilisés aux doses recommandées ne présentent que peu de risques pour les patients asthmatiques légers ou modérés. En revanche les asthmatiques sévères nécessitent de fortes doses de GC par inhalation ou bien des doses variables par voie orale sur le long terme pour un contrôle souvent insuffisant de leur asthme. Cette assimilation sur le long terme est responsable de nombreuses comorbidités telles que l'ostéoporose, une fonte musculaire, des troubles métaboliques, cardiaques, oculaires et nerveux (Schäcke et al., 2002). S'ajoute à cela un phénomène de résistance aux GC dit de cortico-résistance. Cette résistance est souvent présente chez les asthmatiques sévères expliquant l'absence ou la faible réponse aux GC. La résistance aux GC est liée à divers facteurs extrinsèques comme le tabagisme (Thomson and Spears, 2005) ou bien intrinsèques avec une résistance génétique (Carmichael et al., 1981; Donn et al., 2007), un défaut de liaison des GC sur leur récepteur et sa translocation (Irusen et al., 2002), une diminution des Treg et un défaut de sécrétion d'IL-10 (Hawrylowicz, 2005; Xystrakis et al., 2006) ou l'inhibition de la

fixation du GR sur les régions GRE de l'ADN via une augmentation de AP-1 (Adcock et al., 1995) (**Figure 13**). L'ensemble de ces données montre un effet significatif des glucocorticoïdes dans le contrôle de l'asthme chez les patients légers et modérés. Néanmoins, les patients asthmatiques sévères souffrent d'une résistance et d'effets secondaires importants impactant une qualité de vie déjà médiocre.



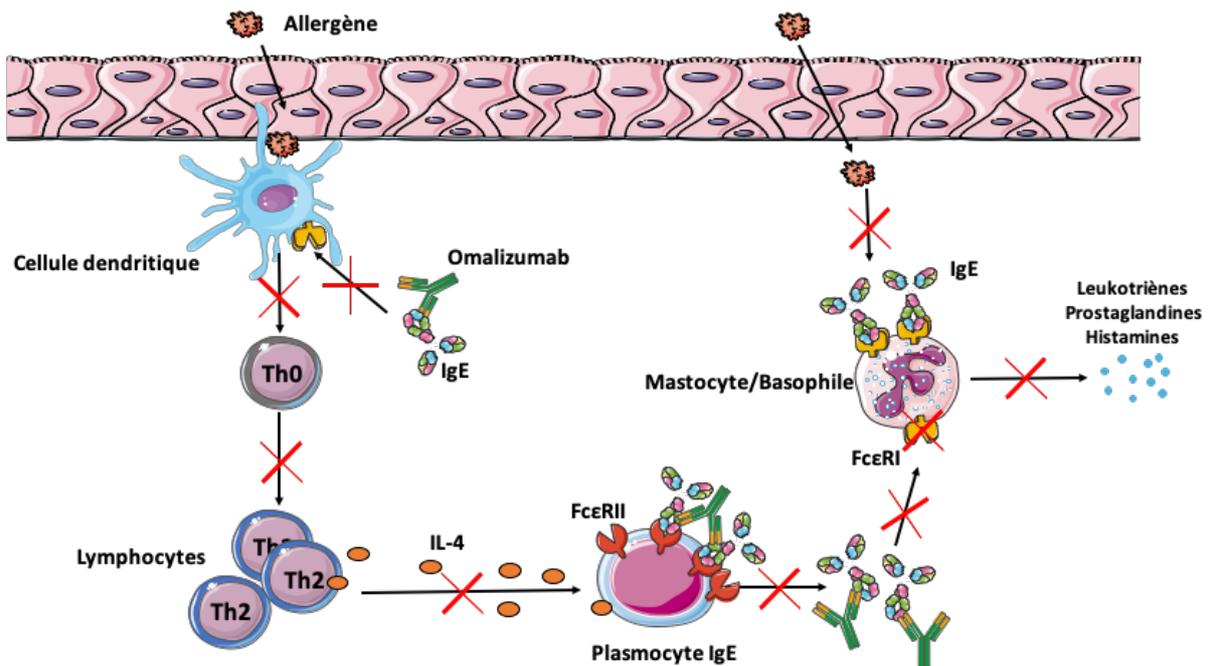
**Figure 13 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes et leurs effets associés. Adapté d'après Barnes, 2011.**

### 3) Les anti-IgE

Les immunoglobulines de type E (IgE) sont des anticorps spécialisés dans la réponse antiparasitaire, notamment contre les helminthes, produits par les lymphocytes B sécréteurs d'immunoglobulines : les plasmocytes (Anthony et al., 2007). Les IgE possèdent des récepteurs de faible et haute affinité. Le récepteur de faible affinité FcεRII ou CD23 est exprimé par les lymphocytes T, B, macrophages, éosinophiles, cellules musculaires lisses bronchiques et permet la production par ces différents types cellulaires de médiateurs pro-inflammatoires (Rosenwasser and Meng, 2005). Le récepteur de haute affinité FcεRI est quant à lui majoritairement exprimé à la surface des mastocytes et des basophiles, permettant leur dégranulation (MacGlashan, 2008). Les IgE sont également impliquées dans diverses

pathologies impliquant une réaction allergique et notamment dans l'asthme. En effet, comme décrit précédemment, elles possèdent un rôle primordial dans la phase de sensibilisation de l'asthme allergique de par leur fixation sur les mastocytes ou les basophiles. Les IgE sont par conséquent devenues l'une des premières cibles des nouvelles biothérapies à base d'anticorps bloquant monoclonaux.

Développé à l'origine dans les années 90, le premier anticorps anti-IgE est capable de se lier aux IgE et d'empêcher la fixation des IgE libres sur leur récepteur en se liant au même épitope reconnu par le FcεRI : l'Omalizumab (Chang, 2000; Presta et al., 1993). Approuvé en 2003 par la FDA, puis en 2005 par l'Agence de Médecine Européenne. Il est recommandé pour le traitement de l'asthme allergique sévère chez des patients positifs aux tests cutanés pour des aéroallergènes et ayant des exacerbations multiples même sous corticoïdes inhalés à forte dose. L'Omalizumab possède également la capacité de réduire l'expression du FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles chez les patients asthmatiques sévères (Chanez et al., 2010; MacGlashan et al., 1997). Il peut aussi se lier aux IgE membranaire présent sur les plasmocytes, empêchant ainsi leur production (Chan et al., 2013). L'Omalizumab permet également de réduire la présentation antigénique des cellules dendritiques et l'induction d'une réponse Th2 (Oliver et al., 2010; Schroeder et al., 2010) (**Figure 14**). Cependant, certains asthmatiques allergiques sévères ne répondent pas aux anti-IgE.



**Figure 14 : Effets de l'omalizumab dans l'asthme.**

#### 4) Les anti-IL-5 et anti-IL-5R

Face à l'échec des anti-IgE dans l'asthme sévère hyperéosinophilique de nouvelles biothérapies furent développées : l'anti-IL-5 et l'anti-IL-5R. L'interleukine 5 (IL-5) et son récepteur (IL-5R) sont des acteurs majeurs dans l'asthme allergique participant à la survie, la prolifération, l'activation et au recrutement des éosinophiles (Clutterbuck et al., 1989; Kouro and Takatsu, 2009). Ils participent aussi à l'augmentation du relargage d'histamine et de leucotriènes par les basophiles et les mastocytes (Bischoff et al., 1990). Le Mépolizumab est un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre l'IL-5 approuvé aux Etats-Unis depuis 2015 (Keating, 2015) et 2016 pour la France. Il empêche la fixation de l'IL-5 sur son récepteur et par conséquent diminue la prolifération et la survie des éosinophiles et les exacerbations chez les asthmatiques sévères (Bel et al., 2014; Ortega et al., 2014; Pavord et al., 2012).

Un autre anti-IL-5, le Reslizumab, est utilisé pour les asthmes hautement éosinophiliques. Les patients traités par Reslizumab présentent une baisse significative du nombre d'éosinophiles dans leur expectoration et une amélioration de leur fonction respiratoire (Castro et al., 2011). Le Benralizumab est quant à lui un anticorps bloquant dirigé contre la chaîne alpha du récepteur de l'IL-5 (Koike et al., 2009). Le premier essai clinique montre une réduction des éosinophiles dans le sang, les expectorations et la moelle osseuse des patients (Lavolette et al., 2013). Un essai clinique de phase IIb montre quant à lui une diminution des fréquences d'exacerbations chez les patients traités (Castro et al., 2014). Les premières études de phase III SIROCCO et CALIMA montrent également une réduction du nombre d'éosinophiles et d'exacerbations chez les patients (Bleecker et al., 2016; FitzGerald et al., 2016). Les anti-IL-5 sont sans effets secondaires majeurs, ne comprenant que des céphalées ou des réactions d'hypersensibilité au niveau du site d'injection. Le Benralizumab, lui, peut induire dans de rares cas (0,3% des patients) un choc anaphylactique. Néanmoins, ces trois anticorps ne présenteraient que peu d'efficacité chez des patients non sélectionnés pour un profil hyperéosinophilique (Giannetti and Cardet, 2016).

#### 5) Les anti-IL-4/IL-13

Les cytokines IL-4 et IL-13 sont des cibles d'intérêt majeur car elles possèdent un rôle clé dans la réponse Th2 et leur signalisation est induite par une partie commune des récepteurs IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$  (Gour and Wills-Karp, 2015). Plusieurs tentatives de blocage de l'IL-4 se sont soldées par des résultats décevants en phase d'essai clinique avec le Pascolizumab et le Pitracinra (Slager et al., 2012; Walker and Leigh, 2008; Wenzel et al., 2007). En revanche, la

neutralisation de l'IL-13 semble plus prometteuse. Le Tralokinumab, un anticorps monoclonal bloquant l'IL-13, permet d'améliorer la qualité de vie des patients atteints d'asthme sévère non contrôlé ou de fibrose idiopathique pulmonaire en essai clinique de phase II (Piper et al., 2013). Un autre essai clinique de phase IIb montre que le Tralokinumab ne permet pas de réduire significativement la fréquence des exacerbations (Brightling et al., 2015). Cependant, dans ce même essai certains patients se sont montrés d'excellents répondants au traitement. Ce sous-groupe de patients possédait une forte expression de périostine, cette protéine est impliquée dans la régénération tissulaire et la migration des cellules épithéliales (Conway et al., 2014). Elle est également surexprimée dans l'asthme et est depuis peu considérée comme un biomarqueur pour l'activation de la voie de l'IL-13 (Izuhara et al., 2016; Jia et al., 2012). Malheureusement, un essai de phase III conduit en 2018 avec deux cohortes STRATOS 1 et STRATOS 2 comprenant respectivement des patients asthmatiques sévères et des asthmatiques sévères possédant un biomarqueur de réponse positive au Tralokinumab provenant de STRATOS 1, ne permit pas de montrer une efficacité clinique suffisante pour réduire la fréquence des exacerbations (Panettieri et al., 2018).

Un autre anti-IL-13, le Lebrikizumab, se lie à l'IL-13 et empêche sa signalisation par l'intermédiaire de l'IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$  (Ultsch et al., 2013). Un essai clinique sur des patients asthmatiques sévères a montré un gain de VEMS avec une amélioration encore plus importante chez des patients avec un fort taux de périostine (Corren et al., 2011). Chez cette même sous-population avec de forts taux de périostine, d'autres études ont montré une réduction des exacerbations de 60% avec le Lebrikizumab (Hanania et al., 2015). En revanche, une étude ne montre aucune réduction de VEMS chez des certains patients avec un taux élevé de périostine (Noonan et al., 2013). Des travaux plus approfondis concernant les taux élevés de périostine chez des patients asthmatiques comme un biomarqueur associé à une bonne réponse aux anti-IL-13 sont nécessaires. Comme décrit précédemment, le ciblage unique de l'IL-4 ou de l'IL-13 a montré certaines limites lors d'essais cliniques, conduisant au développement d'une autre biothérapie supprimant à la fois l'activité de l'IL-4 et de l'IL-13. Le développement des anti-IL-13 a cependant été interrompu en raison d'un nombre insuffisant de patients répondants.

Le Dupilumab, est un anticorps dirigé contre le récepteur IL-4R $\alpha$  inhibant à la fois l'IL-4 et l'IL-13. Son efficacité a été démontrée en préclinique en réduisant la production d'IgE, l'hyperréactivité bronchique et l'expression des gènes des mucines dans un modèle murin

d'inflammation pulmonaire par ovalbumine (Kasaian et al., 2013). Les premiers essais de phase II sur des asthmatiques sévères hyperéosinophiliques non contrôlés malgré une corticothérapie montrent une amélioration du VEMS, une réduction d'exacerbations, de la fraction d'oxyde nitrique (FeNO), des IgE sériques et des éosinophiles sanguins (Wenzel et al., 2013, 2016). Après des essais cliniques de phase III très concluants (QUEST, VENTURE et VOYAGE), le Dupilumab est pour la première fois commercialisé aux Etats-Unis en Mars 2017 et sa commercialisation en Europe est attendue dans les mois qui viennent (Shirley, 2017). Il est déjà disponible dans la dermatite atopique sévère.

#### 6) Les anti-IL-17A

Les nouvelles biothérapies décrites précédemment sont relativement efficace contre les asthmes sévères de type Th2. En revanche, elles ne sont d'aucune utilité contre les asthmes sévères non-Th2, qui restent les plus réfractaires aux thérapies actuelles (Chanez et al., 2007). En effet plusieurs études montrent l'existence d'une autre voie inflammatoire dans l'asthme sévère : la réponse de type Th17 (Chesné et al., 2014). Cette réponse Th17 est liée à une forte neutrophilie, une production d'IL-17A et une hyperréactivité bronchique (Chesné et al., 2015; Lajoie et al., 2010; Linden et al., 2000). La majorité des essais cliniques utilisant des anticorps bloquant l'IL-17 sont réalisés dans le traitement du psoriasis, spondylarthrite ankylosante et d'autre arthrites inflammatoires. Cependant, un faible nombre se focalise sur les maladies atopiques. Le Secukinumab, un anticorps dirigé contre l'IL-17A, dont l'essai en clinique dans l'asthme a été arrêté prématurément par manque d'efficacité (identifiant NCT01478360). Un anticorps cette fois dirigé contre le récepteur de l'IL-17A : le Brodalumab (anti-IL-17AR), fut développé et testé dans l'asthme sévère non-Th2. Ce traitement c'est également soldé par un échec chez les patients traités. Cependant les patients sélectionnés pour cette étude ne présentaient pas d'inflammation neutrophilique (Busse et al., 2013). Malgré les échecs thérapeutiques dans l'asthme, s'il s'avère que le Secukinumab et le Brodalumab restent très efficaces dans le traitement du psoriasis et la spondylarthrite ankylosante et sont actuellement commercialisés (Langley et al., 2014; Papp et al., 2016). D'autres anti-IL-17 sont actuellement testés dans l'asthme sévère.

#### 7) Les anti-alarmines

Désignées comme de nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'asthme, les alarmines sont des cytokines produites en majorité par l'épithélium des voies aériennes suite à une agression de la barrière épithéliale. Ces cytokines majoritairement constituées de l'IL-

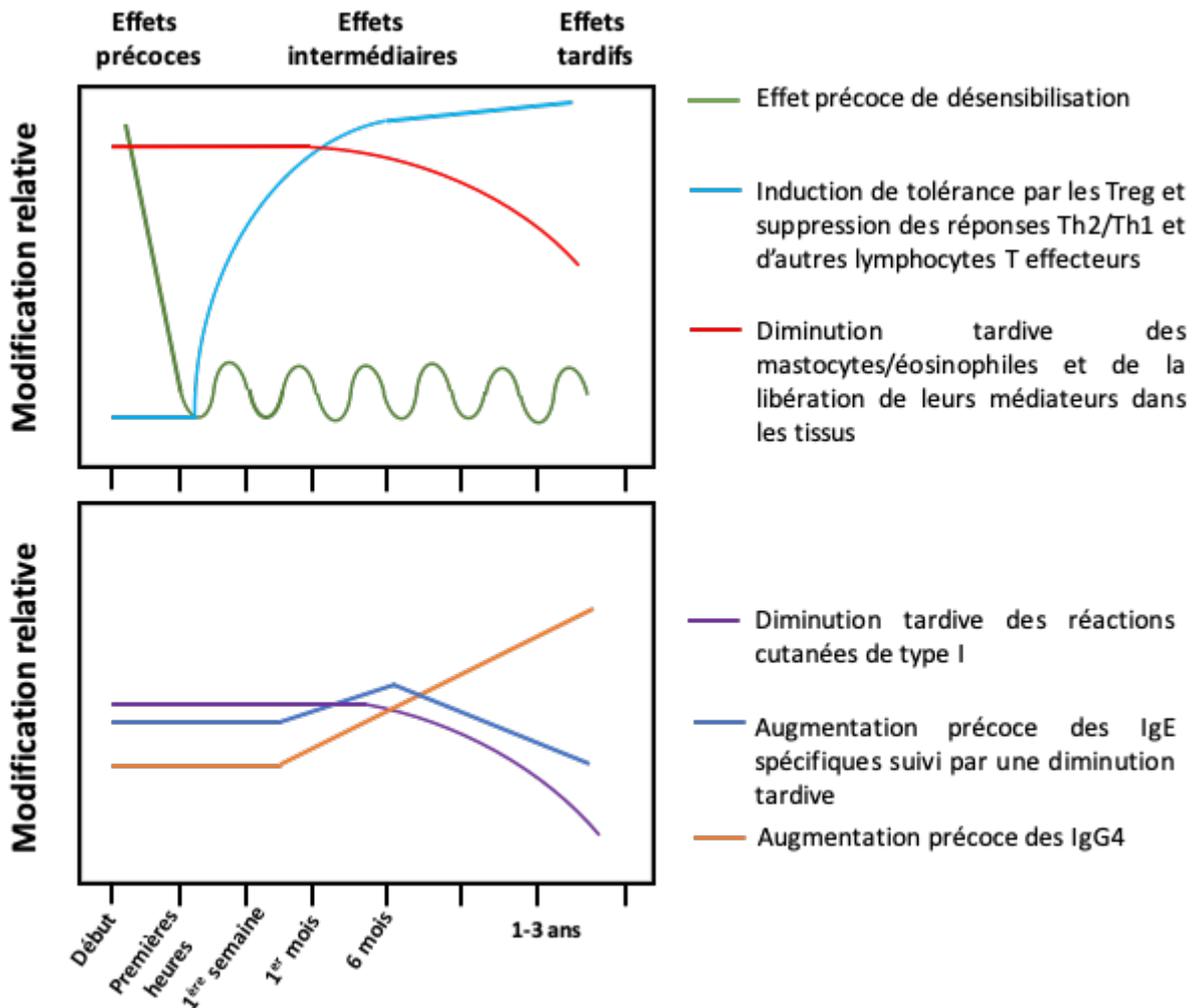
33, la TSLP et l'IL-25 (IL-17F) sont des cibles d'intérêt thérapeutique majeur dans l'asthme car elles sont en amont de toutes les cascades inflammatoires (Klein et al., 2019). Le Tezepelumab, un anticorps dirigé contre la TSLP (anti-TSLP) c'est montré efficace chez des patients présentant un asthme allergique, en réduisant la bronchoconstriction et l'inflammation avant et après un test de provocation par des allergènes (Gauvreau et al., 2014). Suivant ces premiers résultats, une seconde étude montre une réduction du nombre d'exacerbations et une amélioration du VEMS chez des adultes asthmatiques non contrôlés (Corren et al., 2017). Le Tezepelumab semble très prometteur dans les asthmes de types Th2 et est toujours en phase d'essai clinique.

Concernant l'IL-33, trois nouvelles biothérapies anti-IL-33 sont actuellement en phase d'essai clinique : l'ANB020, le MEDI 3506 et l'AMG 282. L'ANB020 est testé pour le traitement de l'asthme, la dermatite atopique et l'allergie à l'arachide. Les sujets sont actuellement recrutés pour la phase II, évaluant la sureté et en second lieu les changements du score clinique. Le MEDI 3506 est en cours d'essai sur des sujets en phase I contre la BPCO. Pour finir, les études avec l'AMG 282 contre l'asthme et rhinosinusite chronique avec polypes sont terminés mais aucun résultat n'a encore été publié. Un anti-IL-33R a également été développé. Le CNTO 716 cible le récepteur de l'IL-33 (ST2), les essais sont également en cours pour le traitement de l'asthme et de la dermatite atopique. Des nouvelles biothérapies sont en cours de développement, notamment contre l'IL-25. Des études préliminaires montrent un intérêt de cibler cette cytokine dans l'asthme (Knolle et al., 2015). Un brevet concernant l'utilisation d'un anti-IL-25 dans l'asthme, la dermatite atopique et la polyangéite éosinophilique granulomateuse a été déposé par Regeneron Pharmaceuticals mais aucun essai clinique n'a encore débuté.

#### 8) L'immunothérapie spécifique de l'allergène

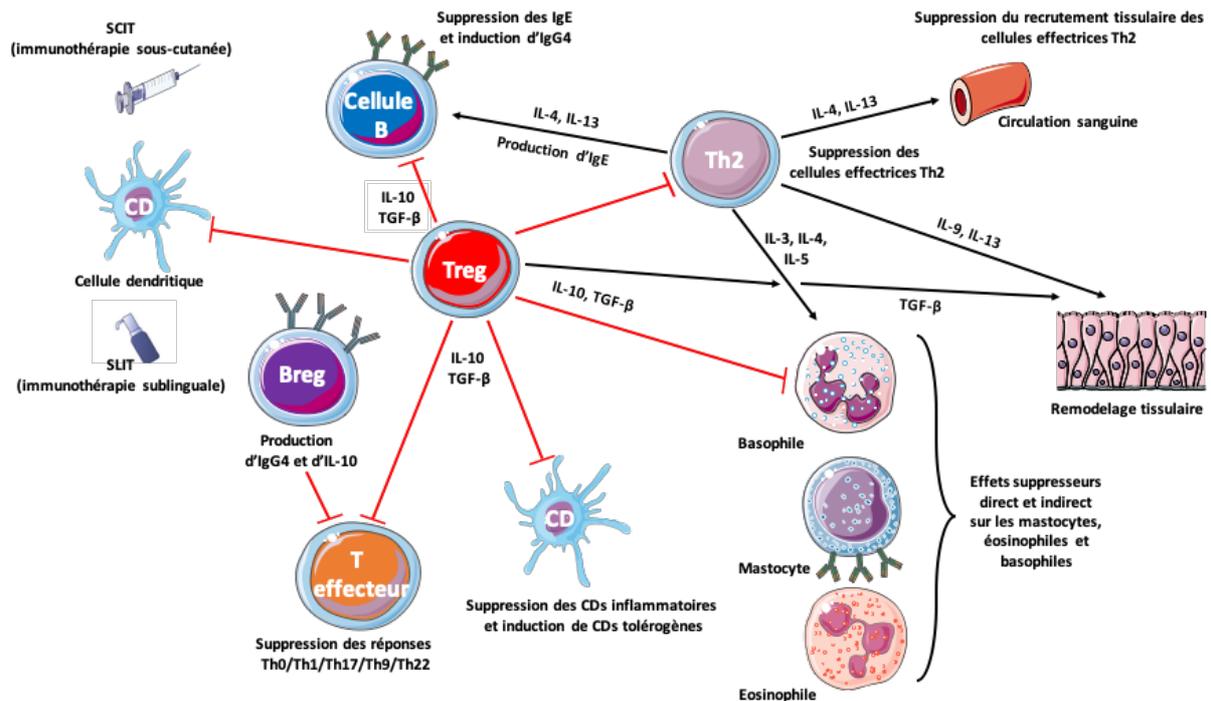
Bien que la majorité des stratégies thérapeutiques dans l'asthme reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, il existe néanmoins une autre approche pour les asthmes où l'allergie joue un rôle majeur : l'immunothérapie spécifique de l'allergène (ITA). Les proportions de patients asthmatiques avec une sensibilisation allergique sont de 30 à 79% chez les enfants (Ballardini et al., 2016; Tran et al., 2016) et de 30 à 60% chez les adultes (Gibson, 2009; Knudsen et al., 2009; Pearce et al., 1999). Depuis les premières observations de Léonard Noon en 1911 et jusqu'à aujourd'hui, l'ITA reste la seule thérapie pouvant prévenir l'apparition des symptômes et modifier l'évolution de la pathologie sur le

long terme (Noon, 1911). Elle a pour but de rétablir une tolérance du système immunitaire via l'exposition répétée d'un allergène (acariens, pollen...) sur le long terme chez les patients sensibilisés. L'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) recommande un minimum de 3 ans de traitement pour une efficacité optimale (Halken et al., 2017) (**Figure 15**).



**Figure 15 : Modifications immunologiques au cours de l'ITA. D'après Akdis et al., 2010.**

Deux voies d'administration existent pour cette approche, l'immunothérapie sublinguale (SLIT) et l'immunothérapie sous-cutanée (SCIT) en voie de disparition (Akdis and Akdis, 2011). Les mécanismes d'action et les effets sur l'immunité des deux voies restent similaires, avec comme pilier central les Treg spécifiques de l'allergène (Akdis et al., 2005; Jutel et al., 2003; Ling et al., 2004; Radulovic et al., 2008) (**Figure 16**).

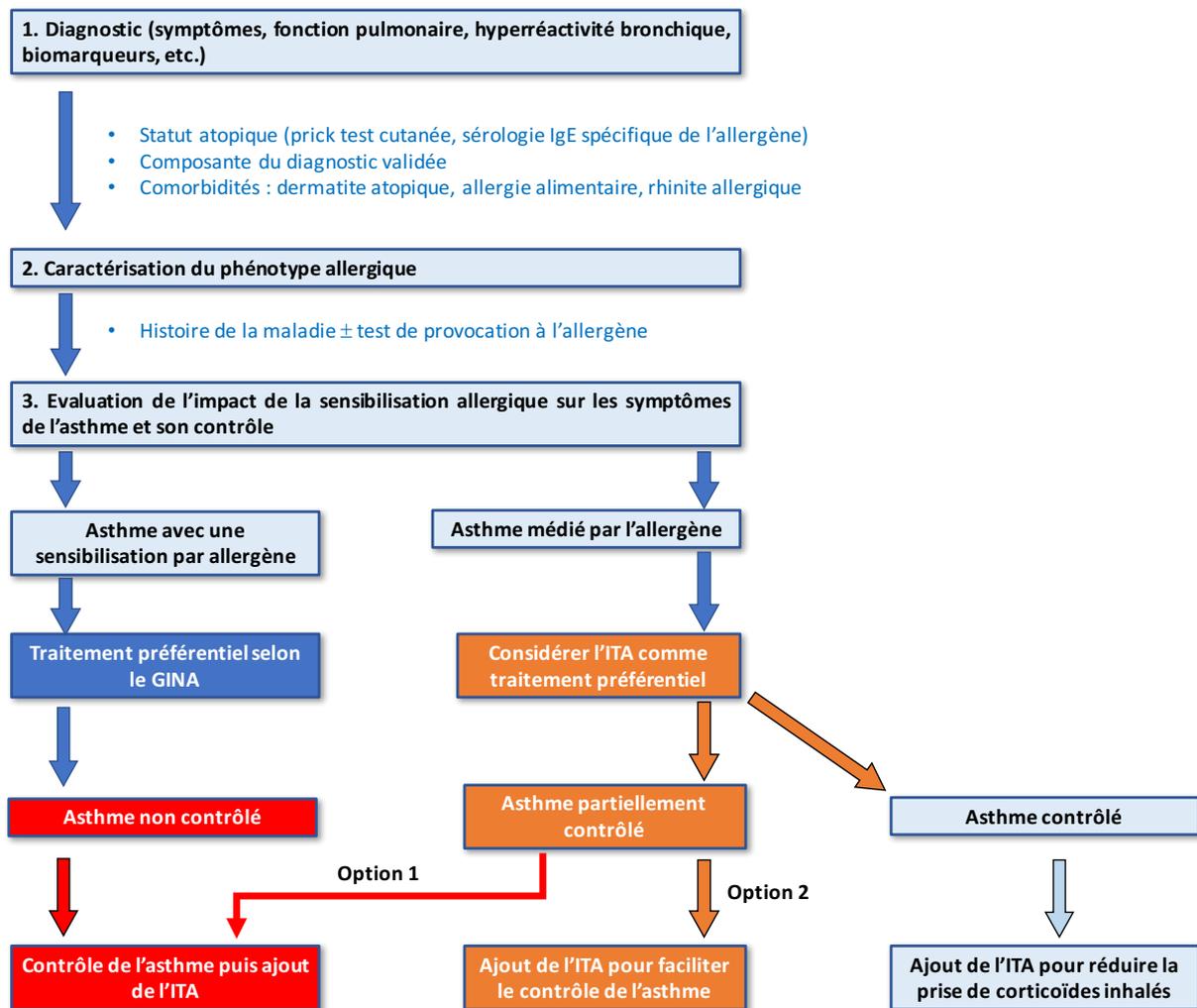


**Figure 16 : Mécanismes d'action de l'immunothérapie spécifique de l'allergène. D'après Klein et al., 2019.** L'ITA permet de générer à la fois une polarisation des lymphocytes T spécifiques de l'allergène de Th2 en Th0/Th1 et la génération de Treg sécrétant d'IL-10 et de TGF-β. Les Treg vont interagir directement ou indirectement avec les lymphocytes B, engendrant une production d'IgG4 et d'IgA et bloquant la production d'IgE. Les Treg vont également empêcher la domiciliation tissulaire des cellules Th2 ; ils inhibent les mastocytes, basophiles et éosinophiles par des mécanismes directs ou indirects ; inhibent l'action des cellules dendritiques pro-inflammatoires et induisent à la place des cellules dendritiques dites tolérantes. De plus, les Treg vont être stimulés par l'action des lymphocytes B régulateurs qui inhibent les cellules T effectrices via la production d'IL-10 et d'IgG4.

A l'origine, un nombre limité d'études furent conduites afin d'évaluer l'efficacité et la dangerosité de l'ITA dans l'asthme allergique. La majorité des données provenaient d'analyses rétrospectives d'essais cliniques contre la rhinite allergique et dont certains sous-groupes de patients présentaient également un asthme allergique associé. Concernant la SCIT, des études chez l'adulte présentant un asthme allergique montrent une amélioration du VEMS et des symptômes après un test de provocation allergique bronchique (PAB) (Ameal et al., 2005; Basomba et al., 2002). Le PAB permet de différencier les répondeurs des non-répondeurs à la SCIT, car seuls les répondeurs voient leur prise de corticoïdes diminuée après traitement (Alvarez et al., 2002; Rosewich et al., 2013). Un essai clinique réalisé en 2006 chez des enfants asthmatiques allergiques aux acariens montre que l'ITA par voie sous-cutanée (SCIT) permet de réduire la fréquence des exacerbations (Wang et al., 2006). Un autre essai utilisant la SCIT,

montre un maintien du contrôle des symptômes même si les corticoïdes inhalés sont diminués (Zielen et al., 2010). Chez l'adulte, elle permet de réduire la prise de corticoïdes inhalés mais uniquement avec de forte doses (Jutel et al., 2018). L'efficacité de la SCIT reste néanmoins dépendante de la dose d'allergènes inoculés avec des effets secondaires dose-dépendant allant de l'urticaire localisé au choc anaphylactique (Bousquet et al., 2008).

La SLIT, plus récente que la SCIT, se décline sous deux formes : la SLIT en solution et la SLIT en comprimés. La SLIT en solution permet également de réduire les symptômes et de diminuer la prise de corticoïdes inhalés. Néanmoins les premiers résultats présentaient une forte hétérogénéité inter-étude due au faible nombre de patients inclus (Compalati et al., 2009). Une étude comprenant un plus grand nombre de patients montre une amélioration du contrôle des symptômes de l'asthme en association avec une diminution de prise de corticoïdes inhalés. Ces améliorations ne sont cependant observable que pour les patients asthmatiques modérés persistants (Wang et al., 2014). Néanmoins, un autre essai de grande envergure mené par Stallergenes Greer ne montre pas de réduction des exacerbations, ni d'amélioration de la fonction respiratoire chez les patients asthmatiques ayant reçu la SLIT en solution (Devillier et al., 2016). La SLIT en comprimés permet également de réduire les exacerbations, de diminuer la prise de corticoïdes inhalés et d'améliorer le contrôle des symptômes (Mosbech et al., 2014; Nolte et al., 2015; Virchow et al., 2016). Suite à ces 3 études, l'utilisation de la SLIT en comprimés peut être recommandée pour des patients ayant des exacerbations malgré un traitement d'étape 2 du GINA (Agache et al., 2019) (**Figure 17**).



**Figure 17 : Diagnostic de l'asthme avec une composante allergique majeure et l'intégration de l'ITA comme traitement.**

L'ITA sous forme sublinguale reste néanmoins restreinte à une population particulière d'asthmatiques et peut engendrer des effets secondaires tels que des irritations, démangeaisons au niveau des oreilles ou de la langue, œdèmes bucaux, gonflement des lèvres, etc (Bernstein et al., 2017). Elle est fortement contraindiquée pour des asthmes sévères non contrôlés car présentant des risques d'exacerbations fatales (Bernstein et al., 2004; Calderón et al., 2017; Epstein et al., 2016; Pitsios et al., 2015) et doit être considérée avec précaution pour des asthmes partiellement contrôlés (Mosbech et al., 2014; Virchow et al., 2016). L'ITA ne doit pas être initiée chez les femmes enceintes, chez les patients ayant des maladies auto-immunes (Pitsios et al., 2015) et ceux présentant une immunodéficience, une infection active ou des pathologies non contrôlées (diabète, ulcères gastriques, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin,...) (Rodríguez Del Río et al., 2017).

## 9) Les limites des biothérapies dans l'asthme

L'ensemble des biothérapies actuelles et en développement sont principalement dirigées contre des asthmes de type Th2, avec des utilisations restreintes selon le phénotype et l'endotype (**Tableau 3**).

Mécanisme d'action	Nom	Effets	Développement	Cibles
Anti-IgE	Omalizumab	Réduit les exacerbations, les IgE et les symptômes et améliore la qualité de vie	Approuvé en clinique, commercialisé 2005	Asthme Th2 modéré persistant/sévère
Anti-IL-5	Mépolizumab	Réduit les exacerbations et l'éosinophilie et améliore la fonction respiratoire	Approuvé en clinique, commercialisé depuis 2016	Asthme Th2 sévère éosinophilique
	Reslizumab	Réduit les exacerbations et l'éosinophilie et améliore la fonction respiratoire	Approuvé en clinique, commercialisé depuis 2017	Asthme allergique sévère très éosinophilique
Anti-IL-5R	Benralizumab	Réduit les exacerbations et l'éosinophilie et améliore la fonction respiratoire	Approuvé en clinique, commercialisé depuis 2018	Asthme allergique Th2 sévère éosinophilique
Anti-IL-4	Pascolizumab	<i>Absence d'efficacité significative</i>	Arrêt en phase II	Asthme Th2 modéré/sévère
Anti-IL-4R	Pitrakinra	<i>Absence d'efficacité significative</i>	Arrêt en phase II	Asthme Th2 modéré/sévère
Anti-IL-13	Lebrikizumab	Améliore le VEMS et réduit les exacerbations	Phase III	Asthme Th2 modéré/sévère avec un fort taux de péristoine
	Tralokinumab	<i>Absence d'efficacité significative</i>	Arrêt en phase III	Asthme Th2 modéré/sévère avec un fort taux de périsotine
Anti-IL-4R/IL-13R	Dupilumab	Améliore le VEMS, réduit les IgE, les éosinophiles et les exacerbations	Approuvé en clinique, commercialisation proche	Asthme Th2 sévère éosinophilique non contrôlé
Anti-IL17A	Secukinumab	<i>Absence d'efficacité significative</i>	Arrêt en phase II	Asthme sévère non-Th2
Anti-IL-17AR	Brodalumab	Améliore le score ACQ	Phase II terminée. Phase III ?	Asthme sévère non-Th2 avec forte réversibilité sous bronchodilatateurs
Anti-TSLP	Tezepelumab	Améliore le VEMS et réduit les exacerbations	Phase II en cours	Asthme Th2 modéré/sévère
Anti-IL-33	ANB020	Aucune données	Phase II en cours	Asthme Th2 modéré
	AMG 282	Aucune données	Phase I/II en cours	Asthme Th2 modéré
Anti-IL-33R	CNTO 716	Aucune données	Phase I/II en cours	Asthme Th2 modéré
Tolérance immune	SCIT	Réduit les exacerbations et la prise de corticoïdes inhalés	Approuvé en clinique, commercialisé depuis 2009	Asthme Th2 allergique modéré
	SLIT	Réduit les exacerbations et la prise de corticoïdes inhalés	Approuvé en clinique, commercialisé depuis 2017	Asthme Th2 allergique léger/modéré

**Tableau 3 : Ensemble des thérapeutiques développées ou en cours de développement dans l'asthme.**

Ces avancés ont certes pu améliorer la qualité de vie de nombreux patients et réduire les coûts directs et indirects associés. Cependant, les patients présentant un asthme sévère de type non-Th2 restent inéligibles pour ces biothérapies et dépendent d'une forte corticothérapie avec un contrôle de l'asthme médiocre ou inexistant. Il est donc d'une absolue nécessité d'explorer et de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour ces 5 à 10% de patients non-Th2 parmi les asthmatiques sévères (Chung et al., 2014).

**Points Clés**

- Le degré de sévérité de l'asthme est défini par la charge thérapeutique utilisée pour contrôler les symptômes.
- Pour les asthmes légers et modérés une association d'agonistes  $\beta_2$  et de corticoïdes inhalés suffit généralement pour un bon contrôle des symptômes.
- L'utilisation de cohortes de patients a permis de discriminer les phénotypes/endotypes les plus répondeurs à certaines biothérapies.
- De nombreuses biothérapies sont aujourd'hui disponibles pour contrôler les asthmes sévères de type Th2 selon leurs phénotypes :
  - Anti-IgE : Omalizumab
  - Anti-IL-5 et -IL-5R : Mépolizumab, Benralizumab, Reslizumab
  - Anti-IL4/IL-13R : Dupilumab
- L'immunothérapie spécifique de l'allergène permet un contrôle efficace et la réduction de la prise de corticoïdes pour des asthmes Th2 légers et modérés à composante allergique majeure.
- De nouvelles biothérapies anti-alarmines sont en développement pour les asthmes Th2.
- Les patients asthmatiques sévères non-Th2 restent très mal contrôlés du fait de leur résistance aux corticoïdes et de l'absence de biothérapies efficaces.

## Chapitre 3 : Les modèles animaux dans l'asthme : du fondamental au préclinique

### I. Les modèles murins d'asthme

Même si l'asthme reste une pathologie essentiellement humaine, d'autres animaux (singe, chat, cheval et mouton) manifestent également des symptômes cliniques proches de la crise d'asthme humaine (Epstein, 2006). Ces animaux ne sont cependant pas ceux chez qui la majorité des études sont menées. En effet, depuis la première modélisation d'asthme allergique chez la souris en 1994 (Lukacs et al., 1994), celle-ci est devenue le modèle d'asthme le plus utilisé à travers le monde. Bien que la souris développe des caractéristiques cliniques de l'asthme semblables à l'homme, il existe néanmoins des différences majeures entre les deux espèces. Ces différences incluent : (1) une hyperréactivité bronchique transitoire plutôt que persistante ; (2) le rôle et la fonction des IgE et des mastocytes peu définis ; (3) l'absence de modèle d'inflammation chronique durable ; (4) des différences anatomiques du poumon et de fonctionnement des éosinophiles (Epstein, 2004).

Les souris ne développent pas spontanément de l'asthme mais il peut en revanche être induit. Cette induction se réalise via l'exposition répétée de l'animal à un ou plusieurs allergènes sur des durées variables ; allant de quelques semaines (modèle aigu) à quelques mois (modèle chronique/sévère) et comportant deux phases principales (Gelfand et al., 2004). Le modèle dit aigu est le plus utilisé pour mimer l'asthme chez la souris, or c'est pourtant le modèle chronique qui se rapproche le plus de l'asthme développé par l'homme (Kumar et al., 2016).

La première phase, appelée sensibilisation consiste à administrer l'allergène par voie générale ou locale (intranasale) pour constituer une mémoire immunitaire envers l'allergène mais asymptomatique. Il existe plusieurs voies permettant l'administration de l'allergène ; la voie intrapéritonéale en combinaison avec un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium (Takeda et al., 1997); la voie intranasale par inhalation ou dépôt de microgouttelettes sur le museau (O'Brien et al., 1996); la voie percutanée associée à une abrasion de l'épithélium cutané par diméthylsulfoxyde (DMSO) (Bihouée et al., 2014). La

seconde phase, appelé provocation allergénique, est basée sur l'administration par voie intranasale du même allergène afin de déclencher la maladie (Shin et al., 2009). Les allergènes les plus couramment utilisés sont l'ovalbumine (OVA) et les acariens (HDM pour House Dust Mites), le choix de l'allergène dépend des paramètres que l'on souhaite observer mais ils peuvent également être utilisés simultanément (Zosky and Sly, 2007).

#### 1) Le modèle ovalbumine

L'ovalbumine (OVA) est l'allergène le plus utilisé dans les modèles animaux d'asthme, provenant de l'œuf de poule il peut être produit en grande quantité à des coûts moindres. Chez la souris, le modèle d'asthme à l'OVA permet l'induction d'une forte inflammation exclusivement de type Th2 des voies aériennes avec présence d'éosinophiles (Daubeuf and Frossard, 2013). Il n'existe cependant pas de modèle murin standard ou de référence pour l'asthme à l'OVA. En effet, les variations dans la souche murine utilisée mais aussi les voies,

les fréquences et durées des sensibilisations/provocations vont moduler de manière différente la fonction respiratoire et l'inflammation (**Tableau 4**).

Modèle murin	Sévérité	Administration de l'allergène		T hleper et amplitude de réponse	Caractéristiques	Auteurs, année
		Sensibilisation	Provocation			
OVA/alun (BALB/c femelle)	aigu	I.P. : jours 0 et 7	I.N. : jours 17, 18, 19 et 20	Th2 élevée	HRB, éosinophiles et remodelage	Daubeuf et al., 2013
OVA/alun (C57BL/6 femelle)	aigu	I.P. : jours 0, 7 et 14	I.N. : jours 20, 21 et 22	Th2 élevée	HRB, éosinophiles et remodelage	
OVA/alun (BALB/c femelle)	aigu	I.P. : jours 0 et 14	Aérosol : jours 28 à 30	Th2 élevée	HRB, éosinophiles, remodelage et cytokines Th2	Nials et al., 2008
OVA (BALB/c mâle)	aigu	I.P. : sur 7 jours	Aérosol : 8 jours consécutifs à partir du jour 27	Th2 élevée	HRB, éosinophiles et cytokines Th2	
OVA/alun (BALB/c mâle ou femelle)	aigu	I.P. : jours 0, 14 et 21	Aérosol : jours 26 et 27	Th2 élevée	HRB, éosinophiles, cytokines Th2 et IgE sériques	
OVA/alun (C57BL/6)	aigu	I.P. : jours 0 et 14	I.T. : jour 24	Th2 élevée	Éosinophiles, cytokines Th2 et IgE sériques	
OVA/alun (C57BL/6)	aigu	I.P. : jours 0 et 7	Aérosol: jours 14 à 16	Th2 élevée	HRB, éosinophiles, remodelage et cytokines Th2	Debeuf et al., 2016
OVA (BALB/c SCID)	aigu	I.T.: jour -1 puis I.V. cellules Th17 à jours 0	I.T. : jours 1, 2 et 3	Th17 élevée	HRB, IL-17 et neutrophiles	McKinley et al., 2008
OVA/alun (BALB/c femelle)	sévère	I.P. : jours 7 et 21	I.N. : 3 fois par semaine sur 6/8 semaines	Th2 élevée	HRB, cytokines Th2, éosinophiles et infiltrat cellulaire de la lamina propria	Nials et Uddin, 2008
OVA/alun (BALB/c femelle)	sévère	I.P. : jours 0 et 14	I.N. : jours 14, 27, 28, 47,61 et de 73 à 75	Th2 élevée	HRB, éosinophiles, hyperplasie des cellules à gobelet, hyperproduction de mucus	
OVA/alun (BALB/c femelle)	sévère	I.P. : jours 1 et 11	I.N. : jours 19, 20, 33, 34, 47, 48, 61, 62, 75, 76, 89, 90	Th2 élevée	HRB, cytokines Th2, remodelage et éosinophiles	
OVA/alun (BALB/c femelle)	sévère	I.P. : jours 0 et 12	Aérosol : 3 fois/jours sur 8 semaines	Th2 élevée	HRB, remodelage, éosinophiles, cytokines Th2 et TGF-β	
						McMillan et Lloyd, 2012

**Tableau 4 : Modèles murins aigus et sévères d'asthme à l'ovalbumine. I.P. : intrapéritonéale, I.N. : intranasale, I.T. : intratrachéale, I.V. : intraveineuse.**

Même si le modèle murin d'asthme à l'OVA présente des caractéristiques inflammatoires comparable à la clinique humaine, l'ovalbumine n'en reste pas moins un

allergène peu pertinent chez l'homme. Effectivement, l'OVA est une protéine inerte avec une absence d'immunogénicité et nécessite une association avec un adjuvant (hydroxyde d'aluminium) pour déclencher une réponse de type Th2 (Kumar et al., 2008). L'hydroxyde d'aluminium ou alun, est considéré comme « le vilain petit secret » des immunologistes, dont les mécanismes d'action restent encore mal connus, mais peu déjà à lui seul induire l'activation de l'inflammasome (Kool et al., 2008), la production de cytokines pro-inflammatoires, une activation Th2 et la production d'IgE (Kuroda et al., 2011). De plus, la voie de sensibilisation intrapéritonéale est requise pour le modèle d'asthme à l'OVA, et cette voie n'est pas représentative chez l'homme contrairement à la voie orale, nasale ou percutanée. C'est pourquoi les scientifiques se sont tournés vers des allergènes avec une plus grande pertinence clinique pour concevoir de nouveaux modèles : les acariens.

## 2) Le modèle acariens

Les allergènes issus d'acariens ou HDM, sont responsables de la majorité des asthmes et de plus de 50% des asthmes allergiques (Bousquet et al., 2007). Ils se déclinent en plusieurs espèces dont *Dermatophagoides farinae* et *Dermatophagoides pteronyssinus* sont les plus communément retrouvés chez les patients asthmatiques (Meyer et al., 1994; van der Zee et al., 1988). Les allergènes d'acariens ne sont pas des protéines dites inertes comme l'ovalbumine, elles possèdent différentes propriétés allant de l'activité protéasique (Hammad and Lambrecht, 2008) à l'activation d'une réponse immune de type Th2. Ces protéines agissent sur l'épithélium, induisant la production d'alarmines types IL-33, IL-25 et TSLP ; activent l'immunité innée dont les basophiles, les mastocytes et les cellules lymphoïdes innées ; favorisent également la présentation antigénique par les cellules dendritiques (Hammad et al., 2010; Lambrecht and Hammad, 2015; Schuijs et al., 2015; Willart et al., 2012). Il n'existe pas de modèle murin de référence pour l'asthme aux acariens et ce pour les mêmes raisons que celles citées précédemment pour le modèle ovalbumine. Néanmoins certaines différences existent entre ces deux modèles. Premièrement, la sensibilisation aux acariens n'est pas exclusivement intrapéritonéale, elle peut être à la fois intratrachéale, cutanée, orale ou nasale. Deuxièmement, il n'est pas nécessaire d'associer un adjuvant lors de la sensibilisation car les allergènes d'acariens possèdent une forte immunogénicité. Troisièmement, l'inflammation obtenue peut être de type Th2, Th17 ou mixte (Th2/Th17) associée à une cortico-résistance et une composante neutrophile, se rapprochant bien plus des caractéristiques cliniques humaines des asthmes sévères (**Tableau 5**).

Modèle murin	Sévérité	Administration de l'allergène		T hleper et amplitude de réponse	Caractéristiques	Auteurs, année
		Sensibilisation	Provocation			
HDM (C57BL/6 femelle)	aigu	I.T. : jour 0	I.N. : jours 6, 7, 8, 9 et 10	Th2/Th17	HRB, éosinophiles, cytokines Th2 et Th17, hypersécrétion de mucus et hyperplasie des cellules à gobelet	Debeuf et al., 2016
HDM (BALB/c femelle)	aigu	P.C. (oreilles) : HDM+DMSO jours 0,7, 14 et 21	I.N. : jours 27 et 34	Th2/Th17	HRB, éosinophiles, neutrophiles, cytokines Th2 et Th17, IgE sériques	Chesné et al., 2015
HDM (BALB/c femelle)	sévère	I.N. : 5 fois/semaines sur 7 semaines	/	Th2 élevée	HRB, éosinophiles, remodelage et cytokines Th2	Johnson et al., 2004
HDM (BALB/c femelle)	sévère	P.C. (oreilles) : HDM+DMSO jours 0,7, 14 et 21	I.N. : jours 27,28, 29, 36, 37 et 38	Th2/Th17 élevée	HRB, remodelage, éosinophiles, neutrophiles, cytokines Th2 et Th17, IgE sériques et cortico-résistance	Klein et al., 2019

**Tableau 5 : Modèles murins aigus et sévères d'asthme aux acariens. I.T. : intratrachéale, I.N. : intranasale, P.C. : percutanée.**

## II. Les modèles de souris humanisées

L'étude des fonctions cellulaires et tissulaires humaines est habituellement limitée par des analyses *in-vitro*, des procédures non-invasives ou des essais cliniques très coûteux et très limités à cause des contraintes éthiques. L'utilisation de modèles animaux comportant des fonctions humaines cellulaires et tissulaires permet de s'affranchir en partie de ces contraintes. L'étude de ces fonctions fut entreprise dès la première description des souris dépourvues de fonctions thymiques : les souris nude (Flanagan, 1966). Depuis lors, de grandes avancées en termes d'humanisation de souris virent le jour. Notamment avec la découverte de souris possédant des déficiences immunes combinées sévères (SCID), favorisant la greffe de cellules et/ou tissus humains (Bosma et al., 1983). La génération de ces déficiences immunitaires dans des souris diabétique non-obèse (NOD), présentant une inactivation du gène C5 du complément, a conduit à l'obtention du premier modèle murin comportant une humanisation et dépourvu de cellules T et B : NOD-SCID (van der Loo et al., 1998).

La manipulation du génome de la souris par des technologies transgéniques ou de suppression de gènes a permis d'améliorer les greffes humaines, notamment le modèle présentant une mutation de perte de fonction de la chaîne gamma du récepteur à l'IL-2 ( $IL2r^{null}$ ) : NOD-SCID  $IL2r^{null}$  (NSG) (Ito et al., 2002; Manz and Di Santo, 2009; Shultz et al., 2005). De même que pour les modèles murins, les modèles humanisés sont variés et leur utilisation dépend de l'objectif expérimental et de la pathologie étudiée.

Malgré une amélioration considérable des modèles humanisés ces dernières années, les études continuent de se heurter à certaines limites. La première concerne la standardisation des protocoles d'humanisation. Pour répondre à ce problème Pearson et Legrand ont défini un protocole standard pour chaque type d'humanisation (Legrand et al., 2008; Pearson et al., 2008). La seconde question concerne la souche de souris utilisée pour l'humanisation. Une comparaison entre les souris BALB/c et NOD montre que ces deux souches génèrent de manière équivalente des cellules dendritiques, plaquettes et cellules B humaines. Cependant, les souris NOD supportent mieux le développement des cellules T humaines (Lepus et al., 2009). Cette même étude compare également la méthode d'humanisation via des cellules mononucléées de sang périphériques humains (PBMC) ou via des cellules souches hématopoïétiques humaines dérivées de sang de cordon (HSC). Les souris humanisées par HSC présentent une meilleure réussite du taux de greffe comparée aux souris humanisées par PBMC. La troisième limite est liée à la greffe elle-même : la destruction du greffon par l'hôte (GVHD). Ce phénomène est observé à partir de 30 jours post greffe chez les souris humanisées par PBMC, limitant la durée de l'étude (King et al., 2008). Pour les souris humanisées à partir de HSC la GVHD survient à partir de 100 jours post greffe, permettant d'étudier des pathologies chroniques (Lockridge et al., 2013). La dernière limite concerne la spécificité d'espèce. Effectivement l'absence de reconnaissance entre certaines cytokines murines et certains récepteurs cellulaires humains limitent ou empêchent le développement, la survie ou le fonctionnement de certains types cellulaires, nécessitant des injections ou une induction par transgène (Schmidt et al., 2008).

L'utilisation de modèle humanisé dans l'asthme est de plus en plus fréquente mais reste limitée par la difficulté de mimer complètement un système immunitaire humain. Cependant depuis 2010, l'apparition d'un nouveau modèle de souris humanisé exprimant les cytokines humaines à la base déficientes, permet une étude plus approfondie des mécanismes cellulaires et tissulaires humain dans l'asthme (Wunderlich et al., 2010). Ce modèle nommé NOD-SCIG IL2 $\gamma^{\text{null}}$ /IL3 $^{-/-}$  (NSG-SGM3), permet l'expression par transgène de GM-CSF, d'IL-3 et du facteur de cellules souches humaines (FCS). L'expression de ces différentes protéines permet d'obtenir un système immunitaire humain complet arborant des cellules dendritiques, des cellules B fonctionnels, des lymphocytes T helper, T cytotoxiques et T régulateurs, des mastocytes et progéniteurs myéloïdes (Billerbeck et al., 2011; Bryce et al., 2016; Coughlan et al., 2016). Ce nouveau modèle est depuis lors utilisé pour l'étude de l'asthme car il est capable

de mimer à la fois l'HRB et le remodelage mais il permet également d'obtenir tous les acteurs de l'immunité innée et adaptative liés à la pathologie (Ito et al., 2013, 2018). D'autres modèles de souris humanisées continuent d'être développés et améliorés afin de se rapprocher au mieux de la clinique humaine (**Tableau 6**).

Modèle	Gène(s) déplété(s)	Transgène inséré	Méthode d'humanisation	Avantages	Inconvénients	Pathologie(s)	Auteurs, année
NOD-SCID	/	/	Cellules cancéreuses, PBMC	Déplétion en lymphocytes T et B	Présence de l'immunité innée et déplétion lymphocytaire partielle	VIH, leucémie cancers, diabète de type 1	Bosma et al., 1983, Carreno et al., 2009
NSG ou NOG (NOD-SCID IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> )	IL2 $\gamma$	/	Cellules cancéreuses humaines, PBMC ou HSC	Déplétion en lymphocytes T et B, NK, défaut fonctionnel des macrophages et DC murines et meilleure prise de la greffe	Faible différenciation de cellules myéloïdes et NK, dysfonctionnement de l'immunité adaptative	VIH, leucémie, cancers, dermatite atopique et allergies alimentaires	Shultz et al., 2005, Watanabe et al., 2007
NOG IL-3/GM-CSF/IL-5 Tg	IL2 $\gamma$	IL-3, IL-5 et GM-CSF humains	Cellules cancéreuses humaines, PBMC ou HSC	Déplétion du répertoire lymphocytaire, de l'immunité innée et des DC murines. Développement de lymphocytes T et B, de cellules myéloïdes et dendritiques humaines fonctionnelles	Absence d'érythrocytes	VIH, asthme, allergies	Ito et al., 2002 et 2013
NSG-SGM3 (NOD-SCID IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> /SCF/GM-CSF/IL-3 Tg)	IL2 $\gamma$	IL-3, GM-CSF et SCF humains	Cellules cancéreuses humaines, PBMC ou HSC	Déplétion du répertoire lymphocytaire, de l'immunité innée et des DC murines. Développement de lymphocytes T et B, de cellules myéloïdes et dendritiques humaines fonctionnelles	Absence d'érythrocytes et diminution des plaquettes	VIH, leucémie, allergies, asthme	Wunderlich et al., 2010, Lockridge et al., 2013, Bryce et al., 2016
MISTRG (BALB/c RAG2 <sup>null</sup> /IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> /M-CSF/IL-3/Sirpa/thrombopoïétine/GM-CSF Tg)	IL2 $\gamma$ et RAG2	IL-3, thrombopoïétine, Sirp $\alpha$ , M-CSF et GM-CSF humains	Cellules cancéreuses humaines, PBMC ou HSC	Déplétion du répertoire lymphocytaire, de l'immunité innée et des DC murines. Développement de lymphocytes T et B, de cellules myéloïdes et dendritiques humaines fonctionnelles	Absence de mastocytes et d'érythrocytes	Leucémie, grippe, listéria	Rongvaux et al., 2014, Saito et al., 2016

**Tableau 6 : Composition, caractéristiques et utilisation des modèles de souris humanisées.** DC : cellules dendritiques, NK : cellules natural killer, GM-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages, M-CSF : facteur stimulant les colonies de monocytes, VIH : virus de l'immunodéficience humaine, RAG2 : protéine activant la recombinaison du gène 2, Sirp $\alpha$  : signal régulateur de la protéine alpha.

### III. Les modèles murins d'asthme sont-ils pertinents ?

A l'heure actuelle, la réponse à cette question reste sujet à débat. Il est vrai que la souris reste le modèle le plus attractif pour l'étude de l'asthme et ce pour de nombreuses raisons. Depuis des années, les progrès concernant la découverte et la compréhension des voies de signalisation et leurs médiateurs dans l'immunologie murine et le développement de technologies ont considérablement évolués. Les anticorps bloquants monoclonaux sont d'excellents outils pour moduler les voies de signalisation et les médiateurs inflammatoires chez la souris. De plus, de nouvelles technologies basées sur la manipulation du génome murin à l'aide d'insertions et déléptions de gènes spécifiques ont permis l'obtention de nouvelles lignées. Ces progrès ont permis de comprendre et de décortiquer le fonctionnement d'un grand nombre de voies de signalisation inflammatoires et la ou les fonctions des différents médiateurs et cellules impliqués dans la pathologie de l'asthme dont Clare M. Lloyd dresse la liste exhaustive (Lloyd et al., 2001).

Comme illustré précédemment, les différents modèles murins d'asthmes présentent tous plus ou moins des caractéristiques cliniques se rapprochant de la pathologie humaine mais il est néanmoins indispensable de connaître leurs limites. Malheureusement, certains chercheurs surinterprètent le ou les rôles de certains médiateurs, les définissant comme obligatoires, critiques ou cruciaux, devenant au final de faible importance lors d'essais cliniques. L'asthme est une pathologie hétérogène et complexe et ce serait une erreur de penser qu'elle puisse être entièrement modélisée par un unique modèle animal. Seulement une fraction de gènes responsable du statut inflammatoire Th2 sont en commun entre un patient et une souris asthmatique, soulignant l'écart de reproductibilité de la pathologie (Walker et al., 2013). Les divers phénotypes d'asthmes humains nécessitent une modélisation chez la souris pour une meilleure compréhension de leur physiopathologie, or les modèles d'asthme actuels sont basés principalement sur l'inoculation d'allergènes, excluant de ce fait les phénotypes non-allergiques. La création et la validation de modèles exprimant certaines caractéristiques d'un phénotype d'asthme et leur association, pourrait aider à définir une meilleure cible pour de potentielles molécules à visée thérapeutique (May et al., 2012). Ces associations pourraient également permettre en évidence les relations entre les voies de sensibilisation, l'exposition systémique et pulmonaire d'allergènes et leur durée, afin d'obtenir des données fiables pour concevoir de futurs essais cliniques.

Une question persiste toujours, peut-on trouver des alternatives aux modèles animaux dans l'asthme ? La majorité des tissus humains utilisable pour l'étude de l'asthme proviennent de cultures cellulaires d'extraits bronchiques, de lavage broncho alvéolaires, d'expectorations et plus récemment d'explants de tissus (Wright et al., 2013). Ces échantillons permettent la réalisation d'études *in vitro* mais possèdent également leurs limites avec une faible durée de vie et une disponibilité restreinte. De nouvelles techniques prometteuses sont cependant à l'étude, telle que la dérivation de cellules souches pluripotentes de patients en épithélium, cellules musculaires lisses ou fibroblastes (Yamanaka, 2012). Les techniques *in silico* générant des modèles de fonctions cellulaires ou d'organes par ordinateur sont également explorées dans l'asthme. La pertinence de ces modèles est néanmoins dépendante de la pertinence et de la qualité des données physiopathologiques obtenues en amont (Buckland, 2011).

Les modèles animaux dans l'asthme ne peuvent être pertinents et cliniquement pertinents utilisés seuls. En revanche, s'ils sont associés aux modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in silico* comprenant un ou plusieurs aspects de la pathologie (voie de signalisation, génétique, fonctions cellulaires, phénotypes), ils permettent une compréhension plus globale de la maladie et des mécanismes la régissant (Holmes et al., 2011).

**Points Clés**

- Les modèles murins d'asthme présentent des différences au niveau anatomique et immunitaire par rapport à l'homme.
- Il est nécessaire de connaître les limites du ou des modèles utilisés.
- Il n'y a pas de modèle de référence pour l'asthme, chacun permet d'observer et d'étudier une ou plusieurs composantes de la pathologie. Ces composantes vont dépendre :
  - De la souche murine
  - Du nombre de sensibilisations et provocations
  - De la durée du modèle
- Aucun modèle ne peut mimer seul toutes les composantes physiopathologiques d'un phénotype d'asthme.
- La combinaison de différents modèles d'asthme et l'association des données *ex vivo*, *in vitro* et *in silico* permettrait une meilleure compréhension de ces phénotypes et l'élaboration de thérapies plus adéquates.

## Partie II : Résultats et discussion

### I. Objectifs de la thèse

L'asthme touche aujourd'hui plus de 300 millions de personnes à travers le monde. D'après plusieurs études épidémiologiques, 100 millions d'asthmatiques supplémentaires seraient attendus d'ici 2025. Cette pathologie chronique inflammatoire s'exprime à travers divers phénotypes et endotypes évoluant au cours de la vie du patient. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif et seuls les symptômes peuvent être contrôlés avec plus ou moins d'efficacité. Ces dernières années, de nouvelles biothérapies ont permis un meilleur contrôle des symptômes de l'asthme, notamment chez des patients asthmatiques sévères avec le Mépolizumab, le Benralizumab et le Dupilumab. Malgré un arsenal thérapeutique conséquent et efficace dans le contrôle des symptômes de l'asthme, 5 à 10% des patients asthmatiques sévères restent réfractaires aux traitements et génèrent à eux seuls plus de 50% des coûts liés à l'asthme. L'objectif de ma thèse a donc été, en utilisant des modèles murins et humanisés d'asthme, de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans l'asthme et d'en comprendre les mécanismes immunologiques.

En 2010, Letourneau a démontré que l'association de l'IL-2 et d'un anticorps monoclonal bloquant l'IL-2 forment un complexe (IL-2/anti-IL-2) augmentant l'activité biologique et la demi-vie de cette cytokine (Letourneau et al., 2010). Egalement en 2010, Krieg montra que le complexe IL-2/anti-IL-2 permet d'activer spécifiquement les Treg (Krieg et al., 2010). Ces données suggèrent que le complexe IL-2/anti-IL-2 pourrait être utilisé pour contrer des mécanismes inflammatoires à l'aide de Treg.

Plus récemment, Chen a montré en 2012 que certains fragments issus d'allergènes provenant d'acariens présentent des propriétés hypoallergéniques avec une faible stimulation lymphocytaire T et IgE (Chen et al., 2012). Se basant sur ces observations, Bouchaud en 2015 a démontré qu'un des fragments issus de l'allergène *Dermatophagoides pteronyssinus* : Der p 2.1, permet de prévenir l'apparition des symptômes de l'asthme allergique aux acariens chez la souris (Bouchaud et al., 2015), suggérant que ce peptide pourrait rétablir la tolérance du système immunitaire vis à vis des allergènes d'acariens.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces deux approches pourraient déboucher sur l'élaboration de nouveaux traitements dans l'asthme. Ces approches sont d'autant plus novatrices qu'elles pourraient s'affranchir des barrières liées aux différents phénotypes et

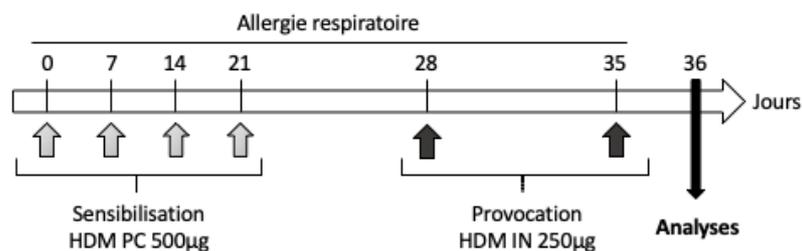
endotypes d'asthme, en modulant de façon plus générale l'inflammation. Pour cela, nous avons établi plusieurs modèles murins d'asthmes allergiques aux acariens, à la fois aigu et chronique mais également un modèle d'asthme allergique aux acariens chez des souris humanisées. La partie « résultats » de ce manuscrit sera divisée en deux parties, la première portant sur l'utilisation du peptide Der p 2.1 dans une approche thérapeutique dans l'asthme allergique aux acariens et la deuxième sur les effets du complexe IL-2/anti-IL-2 dans l'asthme allergique.

## II. Matériels et méthodes

### 1) Modèle animal

#### II.1.1. Modèle d'asthme allergique aigu

Le modèle murin d'asthme allergique aux acariens sur souris BALB/c ByJ (souche JAX Mice, Charles River) est composé de deux grandes étapes : la sensibilisation et le déclenchement de la réponse allergique. L'étape dite de sensibilisation se réalise par voie percutanée avec le dépôt de 500µg d'extrait total d'acariens dilué dans du DMSO sur chaque face des oreilles. Les sensibilisations se font à J0, J7, J14 et J21. Le déclenchement de la réponse allergique est induit par 2 provocations intra-nasales (IN), à J28 et J35 contenant 250µg d'extrait total d'acariens (**Figure 18**). Les analyses sont ensuite réalisées le lendemain de la dernière provocation. Cette modélisation permet d'obtenir un asthme allergique de type Th2, présentant une augmentation de l'hyperréactivité bronchique et une production d'IgE spécifiques de l'allergène.

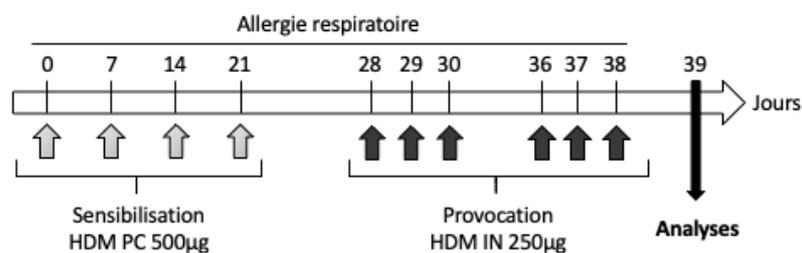


**Figure 18 : Modèle murin d'asthme allergique aigu aux acariens.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale.

#### II.1.2. Modèle d'asthme allergique chronique

Le modèle d'asthme allergique chronique possède la même étape de sensibilisation que le modèle d'asthme allergique aigu. La différence réside dans le nombre et la fréquence

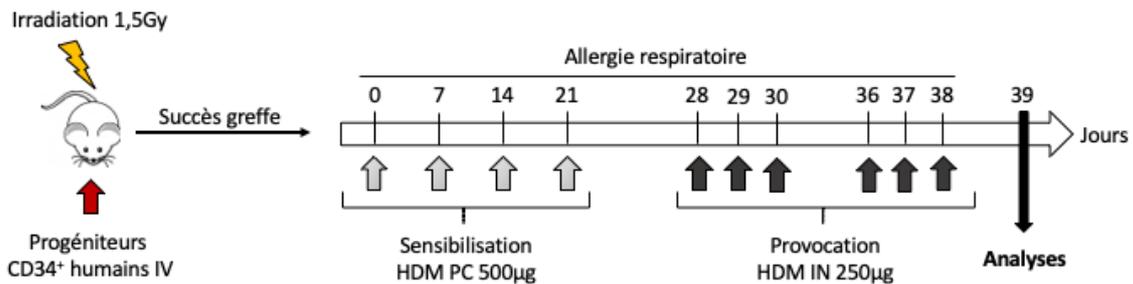
des provocations. Le déclenchement de la réponse allergique est ici induit par 3 provocations IN successives à J28, J29 et J30, puis 3 autres provocations IN successives à J36, J37 et J38. Ces provocations IN contiennent la même quantité d'extrait total d'acariens que pour le modèle précédent. Les analyses sont réalisées le lendemain de la dernière provocation. Ce protocole permet de modéliser un asthme présentant une hyperréactivité bronchique, une production d'IgE spécifiques de l'allergène et présente à la fois une composante Th2 et Th17, se rapprochant cliniquement parlant d'un asthme sévère (**Figure 19**).



**Figure 19 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale.

### II.1.3. Modèle de souris humanisées

Des souris NSG-GM3 (NOD/SCID/hIL-2R $\gamma^{-/-}$ /hIL-3 $^{-/-}$ ) âgées de 4 semaines sont irradiées avec une dose de 1,5Gy puis anesthésiées 6h plus tard pour recevoir par voie intraveineuse de 50000 à 100000 cellules souches hématopoïétiques humaines CD34 $^{+}$  dérivées de sang de cordon. Au bout de 3 mois, un prélèvement de sang est réalisé à l'extrémité de la queue. Ce sang est ensuite marqué avec des anticorps humains puis analysé par cytométrie en flux. L'humanisation des souris est considérée comme un succès si au moins 10% de lymphocytes T humains sont présent dans le sang périphérique. Une fois l'humanisation faite, les souris subissent le protocole d'asthme allergique chronique décrit précédemment (**Figure 20**).

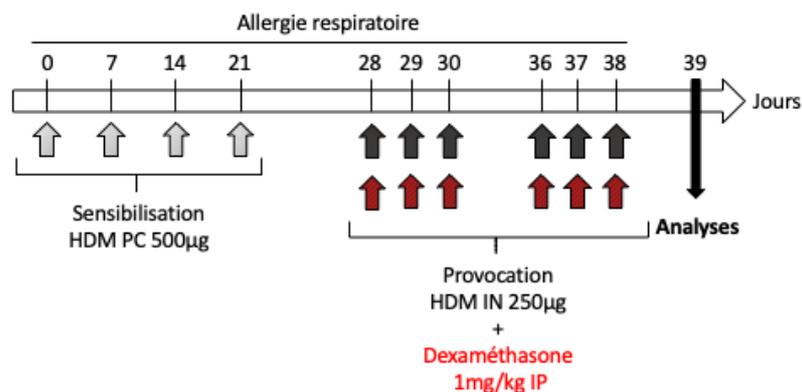


**Figure 20 : Modèle murin humanisé d'asthme allergique sévère aux acariens.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, IV : intraveineuse.

## 1) Traitements

### 1.1.1. Dexaméthasone

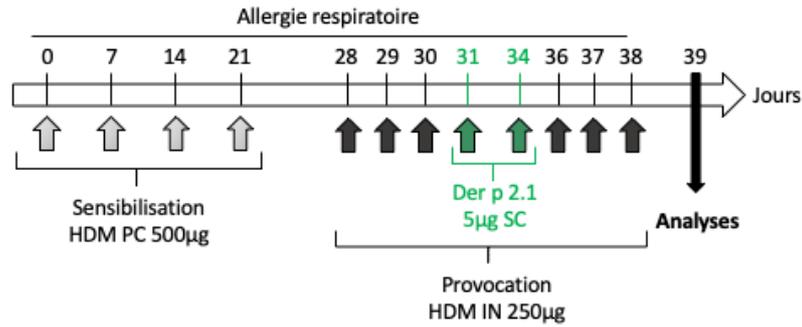
La dexaméthasone est administrée aux souris du modèle d'asthme allergique chronique par voie intrapéritonéale (IP) à une concentration de 1mg/kg. Les injections sont réalisées 2 heures après chaque provocation (**Figure 21**).



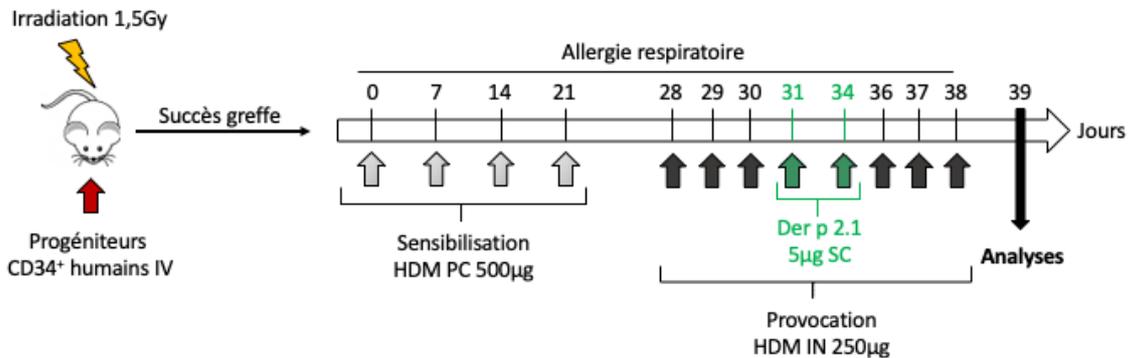
**Figure 21 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement par Dexaméthasone.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, IP : intrapéritonéale.

### 1.1.2. Le peptide Der p 2.1

Le peptide dérivé de Der p 2 (Der p 2.1) contenant les acides aminés de 1 à 53 est administré aux souris du modèle d'asthme allergique chronique et humanisé par voie sous-cutanée dorsale (SC) avec une concentration de 5µg de peptide par injection. Les injections sont réalisées à J31 et J35 (**Figure 22 et 23**).



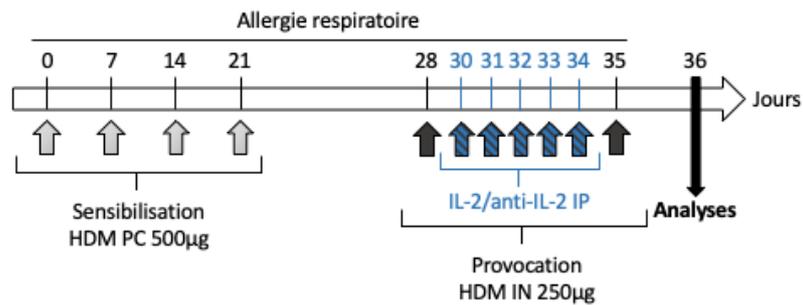
**Figure 22 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement peptidique de Der p 2.1.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, SC: sous-cutanée.



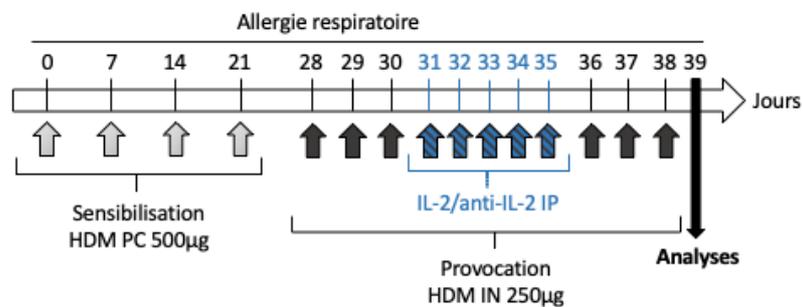
**Figure 23 : Modèle murin humanisée d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement peptidique de Der p 2.1.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, SC: sous-cutanée.

### 1.1.3. Le complexe IL-2/anti-IL-2

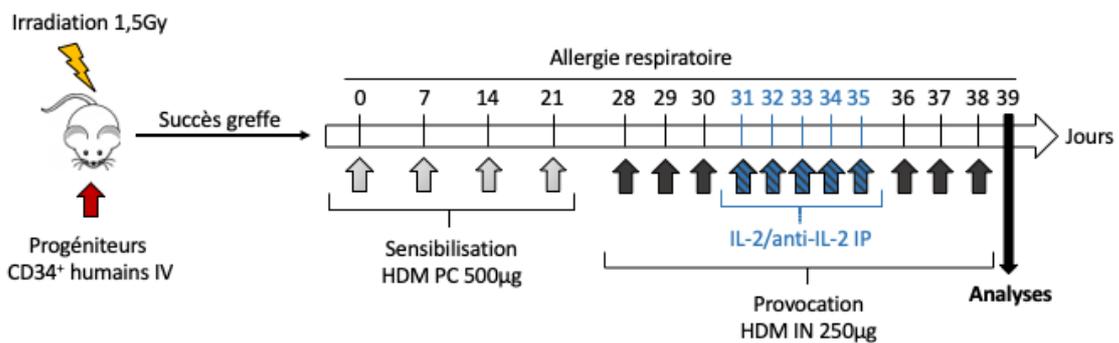
Le complexe IL-2/anti-IL-2 est composée d'IL-2 humaine (Proleukin) et d'un anticorps anti-IL-2 humaine (1C6). L'IL-2 humaine et l'anti-IL-2 humaine sont mélangés à des concentrations respectives de 15µg et de 150µg. Le mélange est réalisé 15 minutes avant injection pour permettre l'association de l'IL-2 et de son anticorps. Le complexe IL-2/anti-IL-2 est ensuite injecté aux souris du modèle d'asthme allergique aigu par voie IP à J30, J31, J32, J33 et J34. Pour le modèle d'asthme allergique chronique et humanisé, le complexe est injecté par voie IP à J31, J32, J33, J34 et J35 (Figures 24, 25 et 26).



**Figure 24 : Modèle murin d'asthme allergique aigu aux acariens, associé à un traitement par complexe IL-2/anti-IL-2.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, IP : intrapéritonéale.



**Figure 25 : Modèle murin d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement par complexe IL-2/anti-IL-2.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, IP : intrapéritonéale.



**Figure 26 : Modèle murin humanisé d'asthme allergique sévère aux acariens, associé à un traitement par complexe IL-2/anti-IL-2.** HDM : house dust mite, PC : percutanée, IN : intranasale, IP : intrapéritonéale.

## 2) Analyses fonctionnelles respiratoires

### II.2.1. Pléthysmographie

La pléthysmographie est une technique de mesure de la fonction respiratoire réalisée sur souris vigiles placées dans une chambre de pléthysmographie. De la métacholine à dose croissante (0, 5, 10, 20 et 40 mg/ml) est alors nébulisée régulièrement dans les chambres et le pléthysmographe analyse les variations de pression liées aux mouvements respiratoires à l'aide de capteurs. L'augmentation du volume à l'inspiration est estimée à partir de la surpression provoquée dans la chambre. L'inverse se produit à l'expiration. La valeur mesurée est la Penh (enhanced pause) qui correspond à l'allongement du temps de la pause expiratoire. La Penh n'est pas une mesure des résistances pulmonaires mais sa variation évolue en parallèle de celle-ci. La Penh n'est pas assez précise ; elle est en effet mesurée sur la base d'un signal de pression qui peut être influencé par des facteurs extérieurs comme l'humidité ou la température ou des facteurs intrinsèques à l'animal comme le stress. Il est donc indispensable de valider sa mesure par d'autres techniques plus précises comme le FlexiVent.

### II.2.2. FlexiVent

Le FlexiVent est l'appareil permettant de mesurer différents paramètres de la fonction respiratoire à l'aide de la technique des oscillations forcées. La souris est anesthésiée avec un mélange xylazine/kétamine puis trachéotomisée afin de placer une sonde trachéale reliée à l'appareil. La souris est ensuite curarisée afin d'empêcher toute respiration volontaire. En effet, c'est l'appareil qui ventile la souris de manière automatique tout le long de la procédure. La souris reçoit des doses croissantes de métacholine (0, 5, 10, 15 et 20mg/ml) permettant de mesurer la résistance, la compliance et l'élastance pulmonaire. La résistance pulmonaire est la résistance due à l'écoulement de l'air dans les voies aériennes plus la résistance due au tissu pulmonaire ; elle illustre le niveau de constriction des poumons. La compliance pulmonaire est la capacité du poumon à modifier son volume en réponse à une variation de pression. Elle traduit donc la facilité avec laquelle le poumon peut être distendu. L'inverse de la compliance est l'élastance. L'élastance illustre l'élasticité du poumon. Elle reflète la résistance à l'augmentation du volume du poumon. Lorsque de l'air est insufflé dans un poumon, son volume augmente mais l'élastance diminue. Cette technique se différencie de la pléthysmographie car elle permet d'analyser le rôle du poumon périphérique (bronchioles

terminales) dans l'hyperréactivité bronchique, là où le pléthysmographe ne prend en compte que les voies aériennes proximales.

### 3) Score Histologique

Les poumons sont prélevés puis fixés en formaldéhyde 4%. Les coupes histologiques réalisées par la plateforme d'anatomopathologie de la faculté de Médecine (MicroPicell) sont colorées à l'hématoxyline-éosine (HE).

Le score histologique est établi sur deux paramètres essentiels : l'altération des bronches sur 4 points et l'inflammation sur 8 points. Afin d'apprécier l'état des bronches, chaque paramètre présent est évalué par 1 point : l'hyperplasie des cellules épithéliales, les cellules à mucus placées de manière circonférentielle, la dystrophie (clarification) des cellules et enfin le remodelage du chorion bronchique. L'inflammation est quantifiée par rapport au contrôle avec une augmentation péri-vasculaire et bronchique du nombre de cellules de 50% par rapport au contrôle évaluée sur 1 point, l'augmentation du nombre de lymphocytes de 50% par rapport au contrôle évaluée sur 1 point, l'augmentation du nombre de granulocytes de 50% par rapport au contrôle évaluée sur 1 point et enfin la présence d'un nodule lymphocytaire est évaluée sur 4 points.

### 4) Cytométrie en flux

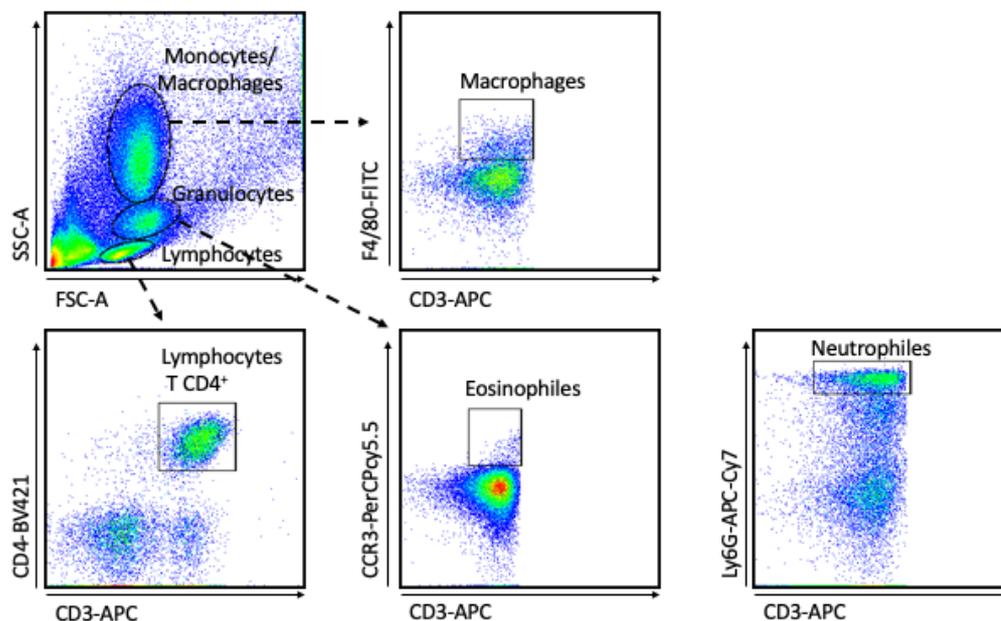
#### II.4.1. Récupération des échantillons

Après anesthésie par du doléthal, la souris est sacrifiée par ponction intracardiaque et le sang est récupéré pour des analyses sur le sérum. Les lavages broncho alvéolaires sont récupérés par l'ajout de 1ml de PBS dans un cathéter placé par voie intra-trachéale. Après centrifugation à 1500rpm pendant 5min, le surnageant est mis de côté et les cellules sont resuspendues dans 100µl de PBS SVF 5% EDTA 1% pour être marquées. Les différents organes (poumons, ganglions médiastinaux et rate) sont prélevés, broyés à l'aide d'un grinder, puis la suspension cellulaire obtenue est filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire de 40µm. Un tampon de lyse des globules rouges est alors ajouté aux suspensions cellulaires provenant des poumons et de la rate pendant 7 à 8 minutes. Après lavage, les cellules sont centrifugées à 1500rpm pendant 5 min puis resuspendues dans du PBS SVF 5% EDTA 1% afin d'être marquées.

#### II.4.2. Marquage et méthodes d'analyses

Le marquage extracellulaire, effectué en présence de CD16/32 afin d'éviter tout marquage non spécifique, se fait avec les anticorps suivant pendant 20min à 4°C dans le noir :

CD3-APC (lymphocytes), CCR3-PerCPcy5.5 (éosinophiles), Ly6G-APC-Cy7 (neutrophiles), F4/80-FITC (macrophages) et CD4-BV421. Pour le marquage intracellulaire, 1 million de cellules sont placées dans les puits d'une plaque de culture 96 puits en présence d'un milieu complet (RPMI 1640, glutamine 1%, SVF 10%, et pénicilline/streptomycine 1%) enrichi d'une solution de stimulation : extrait total d'acariens (20µg), ionomycine (1µg/ml), GolgiPlug et GolgiStop au 1/1000 (BD Biosciences) et incubées 5h à 37°C. A la fin de la stimulation, les cellules sont centrifugées puis lavées afin d'être marquées. Après le marquage extracellulaire avec les anticorps suivant : CD3-APC/BUV395, CD4-FITC, CD8-PerCPcy5.5, CD25-BV510, MHCII-PE, CD11c-BV421 et CD11b-PerPcy5.5 les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide du Fix/Perm kit (BD Biosciences) pendant 20min à 4°C puis le marquage intracellulaire est effectué dans une solution perméabilisante PERM Wash (BD Biosciences) à l'aide des anticorps suivant : Foxp3-APC, IL-13-PE-Cy7, IL-17A-PE, IL-10-APC, Gata3-PE et RORyt-BV421 pendant 40 min à 4°C. Après lavage avec PERM Wash, les cellules sont analysées sur un Fortessa X20 (BD Biosciences). L'analyse des données est réalisée sur le logiciel FlowJo (Treestar) comme ci-dessous (**Figure 27**).



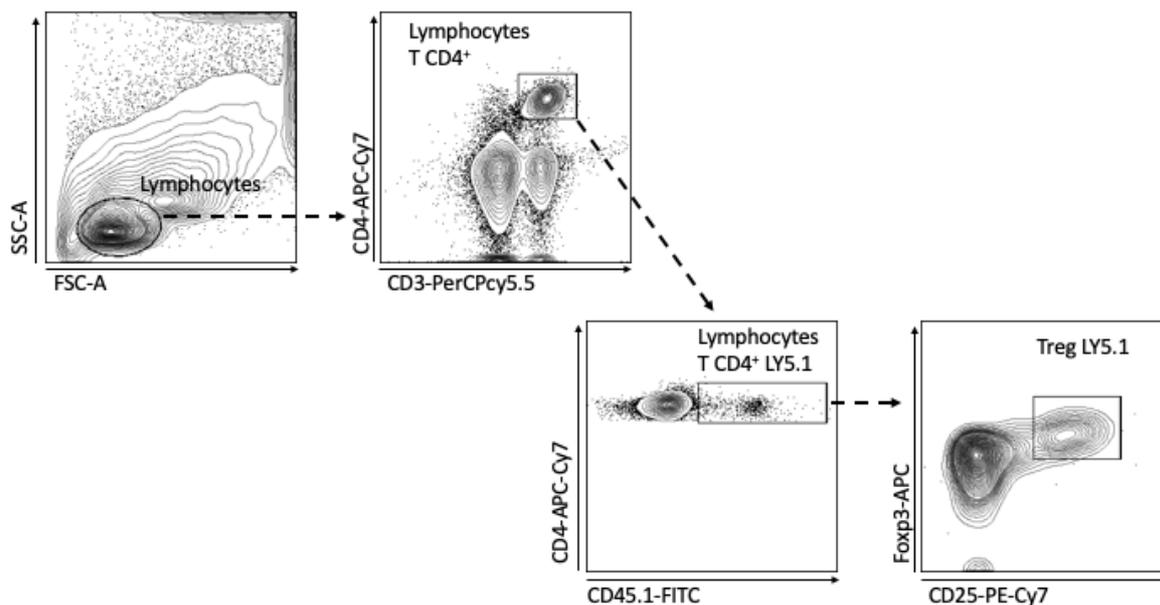
**Figure 27 : Analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires issues de lavage broncho alvéolaire sous le logiciel FlowJo.**

## 5) Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Des souris BALB/c naïves sont sacrifiées. Les fémurs et tibias sont récupérés, les cellules dendritiques de la moelle osseuse (BMDC) en sont extraites par lavage à l'aide d'une seringue avec une solution de PBS SVF 10% EDTA 0,7mM. Les BMDC sont ensuite filtrées sur tamis cellulaire 40µm puis centrifugées 10 min à 1200rpm. Les cellules sont resuspendues dans du tampon de lyse des globules rouges pendant 7 à 8 min. Après lavage, les cellules sont resuspendues avec du milieu complet contenant du RPMI 1640, pénicilline/streptomycine 1%, sodium/pyruvate 1%, HEPES 1%, SVF 10%, L-glutamine 1% et β-mercapto-ethanol 100µl/l. Les cellules sont ensuite comptées et mise en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu complet préchauffé à 37°C. Un mélange de GM-CSF (50ng/ml) et d'IL-4 (50ng/ml) est ajouté dans les boîtes de pétri ; elles sont ensuite incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Au troisième jour d'incubation les BMDC reçoivent à nouveau du GM-CSF (50ng/ml) et de l'IL-4 (50ng/ml), ainsi que 10ml de milieu complet. Au sixième jour, une partie des BMDC est récoltée puis marquée avec un anti-CMHII et passées au cytomètre de flux. Les BMDC sont différenciées en cellules dendritiques si elles expriment plus de 80% de CMHII. L'autre partie des BMDC reçoit à nouveau du GM-CSF (50ng/ml) et de l'IL-4 (50ng/ml), ainsi que 10ml de milieu complet. A partir du huitième jour, les cellules dendritiques sont mises en présence de l'extrait total d'acariens et/ou de Der p 2.1 pendant 48h. A l'issue des 48h, les cellules dendritiques sont mises en co-culture 48h avec des lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïfs triés par enrichissement négatif. Les cellules sont ensuite récoltées et marquées pour passage en cytométrie de flux.

## 6) Transfert adoptif

Les souris BALB/c congéniques (LY5.1) sauvages non soumises au protocole d'asthme allergique sont sacrifiées. La rate est alors récupérée puis broyée et un tri par enrichissement négatif de CD4<sup>+</sup> puis sélection positive de CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> est réalisé sur la totalité des cellules récupérées (EasySep Mouse CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit II, STEMCELL). Après comptage des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> triés, 3 millions de cellules sont injectées par voie rétro orbitale avant la première provocation dans des souris sauvage (LY5.2) ayant subi le protocole d'asthme allergique sous traitement IL-2/anti-IL-2. Les souris sont sacrifiées à la fin du protocole, l'inflammation est alors analysée dans les lavages broncho alvéolaires, les poumons, les ganglions médiastinaux et la rate. Une fois la suspension cellulaire obtenue, les cellules sont marquées avec les anticorps suivant : CD3-PerCPcy5.5, CD4-APC-Cy7, CD25-PE-Cy7, CD44-BV421, Foxp3-APC et CD45.1-FITC (LY5.1) (**Figure 28**).



**Figure 28 : Analyse par cytométrie en flux des cellules Ly5.1 issue du transfert adoptif sous le logiciel FlowJo.**

#### 7) Dosage des IgE

Les IgE sont dosées par un ELISA sandwich et révélées par immunofluorescence à l'aide de la réaction de l'alkaline phosphatase. Brièvement, l'extrait total d'acariens est coaté à 5µg/ml dans du tampon carbonate sur des plaques 96 puits à fond noir durant toute une nuit à 4°C. Après lavage au PBS-Tween 0,05%, la plaque est saturée à l'aide de PBS-Tween 0,05%-BSA 1% pendant 2h à 37°C, puis les sérums sont dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween 0,05%-BSA 1% et incubés 2h à 37°C. L'anticorps secondaire Mouse anti-IgE-Alcaline phosphatase (Southern Biotech) est ajouté au 1/250<sup>ème</sup> dans les PBS-Tween 0,05%-BSA 1% et la plaque est incubée 2h à 37°C. Enfin, le substrat MUP (Methylumbellifery phosphate) est dilué dans les TRIS (trishydroxyméthylaminométhane) au 1/5<sup>ème</sup> et est ajouté 90 minutes à température ambiante dans le noir. La plaque est ensuite lue par fluorescence avec une excitation à 360nm et une émission à 440nm à l'aide d'un Varioscan Lux<sup>®</sup> (Thermofisher Scientific).

#### 8) Multiplex

Le dosage des cytokines dans les surnageants des lavages broncho-alvéolaires est réalisée à l'aide d'un kit de multiplex (Bio-Plex Pro Mouse Cytokines Standard 23-Plex, Group 1, BIO-RAD) en suivant les instructions du kit. Brièvement, des billes magnétiques sont ajoutées sur une plaque 96 puits prévue à cet effet, ainsi que chaque échantillon et la gamme étalon. La plaque est ensuite incubée 2h à température ambiante. Après lavage, un anticorps

de détection est ajouté et la plaque incubée 1h à température ambiante. Enfin, de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (PE) est ajoutée et la plaque est incubée 30min à température ambiante. Après suspension du contenu des puits la plaque est lue sur un Bio-Plex<sup>®</sup> 200 et analysée avec le logiciel Bio-Plex MAGPIX<sup>®</sup> System (BIO-RAD).

### III. Résultats

## Avant-propos (Revue) : Nouvelle approche thérapeutique dans l'asthme : l'immunothérapie peptidique

Revue des Maladies Respiratoires (2019) 36, 442–446



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



JOURNÉES DE RECHERCHE EN PNEUMOLOGIE

## Nouvelle approche thérapeutique dans l'asthme : l'immunothérapie peptidique



*Allergen-derived peptide: A promising approach in asthma*

M. Klein<sup>a</sup>, A. Magnan<sup>a,b</sup>, G. Bouchaud<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm UMR 1087 / CNRS UMR6291, IRS, institut du thorax, université de Nantes, 8, quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1, France

<sup>b</sup> Service de pneumologie, institut du thorax, CHU de Nantes, 44000 Nantes, France

<sup>c</sup> Inra, UR 1268 BIA, 44316 Nantes, France

Reçu le 28 février 2019 ; accepté le 1<sup>er</sup> mars 2019

Disponible sur Internet le 18 avril 2019

#### MOTS CLÉS

Asthme ;  
Allergie ;  
Immunothérapie ;  
Peptides

**Résumé** Le contrôle des symptômes de l'asthme se complexifie avec sa sévérité et nécessite des associations thérapeutiques à base de fortes doses de corticostéroïdes et de biothérapies dégradant la qualité de vie des patients sur le long terme. De récentes études montrent que l'immunothérapie à base de peptides hypoallergéniques dérivés de l'allergène prévient l'hyperréactivité bronchique, diminue la réponse lymphocytaire Th2 et les IgE spécifiques de l'allergène dans des modèles murins d'asthme allergique. Même si les mécanismes d'actions des peptides restent mal connus, leur efficacité d'action rapide avec de faibles quantités d'allergènes font de l'immunothérapie peptidique une approche thérapeutique prometteuse dans l'asthme allergique.

© 2019 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### KEYWORDS

Asthma;  
Allergy;  
Immunotherapy;  
Peptides

**Summary** Severe asthma required high dose of corticosteroids combined with biotherapies to control more or less asthma symptoms and lead to the decrease of patients' quality of life on long term. Recent studies show that hypoallergenic peptides derived from allergen can prevent airway hyperresponsiveness, decrease Th2 response and also allergen-specific IgE in mouse models of allergic asthma. Even if some peptides mechanisms remain unknown, their

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : martin.klein@etu.univ-nantes.fr (G. Bouchaud).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2019.03.005>

0761-8425/© 2019 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

fast efficacy with low doses of allergens make peptide immunotherapy a new promising approach in allergic asthma.

© 2019 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

La prévalence de l'asthme est en constante augmentation ces dernières décennies, devenant de ce fait un problème de santé publique majeur. On estime à plus de 300 millions le nombre de personnes vivant avec de l'asthme [1] et on enregistre en France environ 800 décès par an. Cette pathologie inflammatoire chronique des bronches se traduit par des modifications immunologiques avec des réponses lymphocytaires T helper 2 (Th2) [2], T helper 17 (Th17) [3] et une production d'immunoglobuline de type E (IgE) [4] spécifiques de l'allergène. De récentes études montrent une implication de la réponse T helper 9 (Th9) [5], des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) [6] et des petites protéines G [7] comme nouveaux acteurs de la physiopathologie de l'asthme. L'ensemble de ces acteurs conduisent à un épaississement de la paroi des voies aériennes, une hypersécrétion de mucus et une bronchoconstriction. Les symptômes et les mécanismes sous-jacent de l'asthme peuvent être variables d'un patient à un autre et évoluer au cours de leur vie, on parle alors de phénotypes et d'endotypes d'asthme (Fig. 1) [8].

Les phénotypes d'asthme décrivent les particularités cliniques, morphologiques ainsi que la réponse aux traitements ; les endotypes quant à eux caractérisent les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. C'est la charge thérapeutique permettant d'obtenir le contrôle de l'asthme qui va permettre de définir son degré de sévérité. L'inhalation de faibles doses de corticostéroïdes en association avec des bêta agonistes permet un bon contrôle des asthmes légers et modérés [9]. Cependant, les asthmes dit sévères nécessitent de fortes doses de corticostéroïdes inhalés ou parfois oraux, notamment lors des exacerbations. Cela entraîne sur le long terme une perte de masse osseuse et musculaire, et augmente le risque cardiovasculaire notamment. Une association avec une biothérapie (anti-IgE, anti-IL-5...) est parfois nécessaire dans les cas les plus sévères pour contrôler au mieux les symptômes en fonction du phénotype. Même avec cet arsenal thérapeutique conséquent, 5 % à 10 % des asthmatiques sévères restent mal contrôlés. Ces patients voient leur qualité de vie fortement dégradée et sont responsables à eux seuls de 50 % des coûts thérapeutiques dans l'asthme [10]. C'est pourquoi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques doit être considéré avec grand intérêt.

### Immunothérapie spécifique de l'allergène

Depuis les premières observations de Leonard Noon en 1911 [11] jusqu'à aujourd'hui, le concept d'immunothérapie spécifique de l'allergène reste la seule thérapie pouvant prévenir l'apparition des symptômes de l'asthme allergique.

Cette immunothérapie est basée sur l'exposition répétée d'un allergène (pollen, acarien...) sur le long terme chez des patients sensibilisés et l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) recommande un minimum de 3 ans de traitement pour une bonne efficacité. Deux voies d'administration sont possibles pour cette immunothérapie : l'immunothérapie sublinguale (SLIT), largement utilisée, et l'immunothérapie sous-cutanée (SCIT), (Fig. 2) [12], en voie de disparition.

Depuis 2014, la Food and Drug Administration (FDA) autorise la SLIT avec l'utilisation de tablettes sublinguales, contenant des extraits d'allergènes [13]. Depuis lors, l'Agence de médecine européenne et les autorités japonaises ont aussi approuvé l'utilisation de la SLIT avec des formulations contenant des pollens ou des extraits d'acariens. L'efficacité de la SLIT à base de pollens permet d'obtenir une réduction de 30 % des symptômes durant les 12 premiers mois puis 45 % après 3 ans [14]. Pour la SLIT contenant des extraits d'acariens, on constate une réduction des symptômes de 42 % après les 12 premiers mois [15]. Sur le long terme, après arrêt de l'immunothérapie, la SLIT à base de pollens et d'extraits d'acariens montre respectivement une diminution des symptômes de 25 % à 36 % (2 ans post traitement) et de 18 % à 20 % (1 an post traitement) [15]. Ces résultats encourageants montrent un effet à long terme protecteur même après arrêt du traitement. Néanmoins, cette immunothérapie possède certaines limites dont la première est la durée du traitement. En effet, la génération d'une réponse lymphocytaire T régulatrice sur le long terme nécessite en moyenne 2 ans chez la majorité des patients et n'est pas obtenue dans 100 % des cas. Deuxièmement, les doses d'allergènes contenus dans la SLIT ne sont pas standardisées et des variations de dose de 7 à 200 fois celle présente dans la SCIT sont nécessaires pour une protection efficace [16]. Troisièmement, l'immunothérapie spécifique de l'allergène nécessite de grandes quantités d'allergènes totaux pour être efficace. Ce dernier point peut expliquer en partie l'observation d'effets secondaires : irritations de la gorge (17–43 %), démangeaisons au niveau des oreilles (7–29 %) ou de la langue (5–9 %), œdèmes buccaux (4–11 %), gonflement des lèvres (3–11 %), etc. [17]. La SLIT reste cependant un moyen le plus efficace de prévenir la survenue des symptômes de l'asthme mais reste dépendante d'une forte dose d'allergène et de plusieurs années de traitement journalier pour obtenir une efficacité optimale.

### Immunothérapie peptidique

Depuis quelques années, grâce aux progrès de l'ingénierie génétique, une nouvelle approche de l'immunothérapie

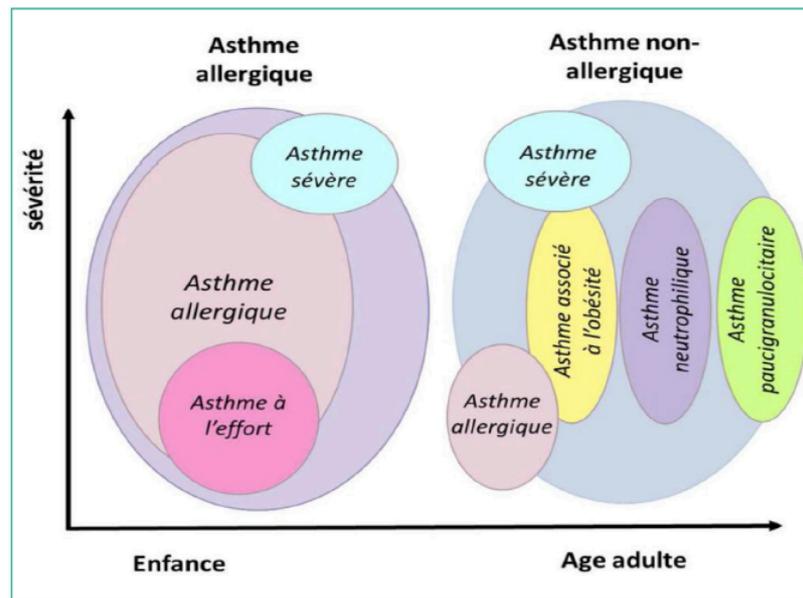


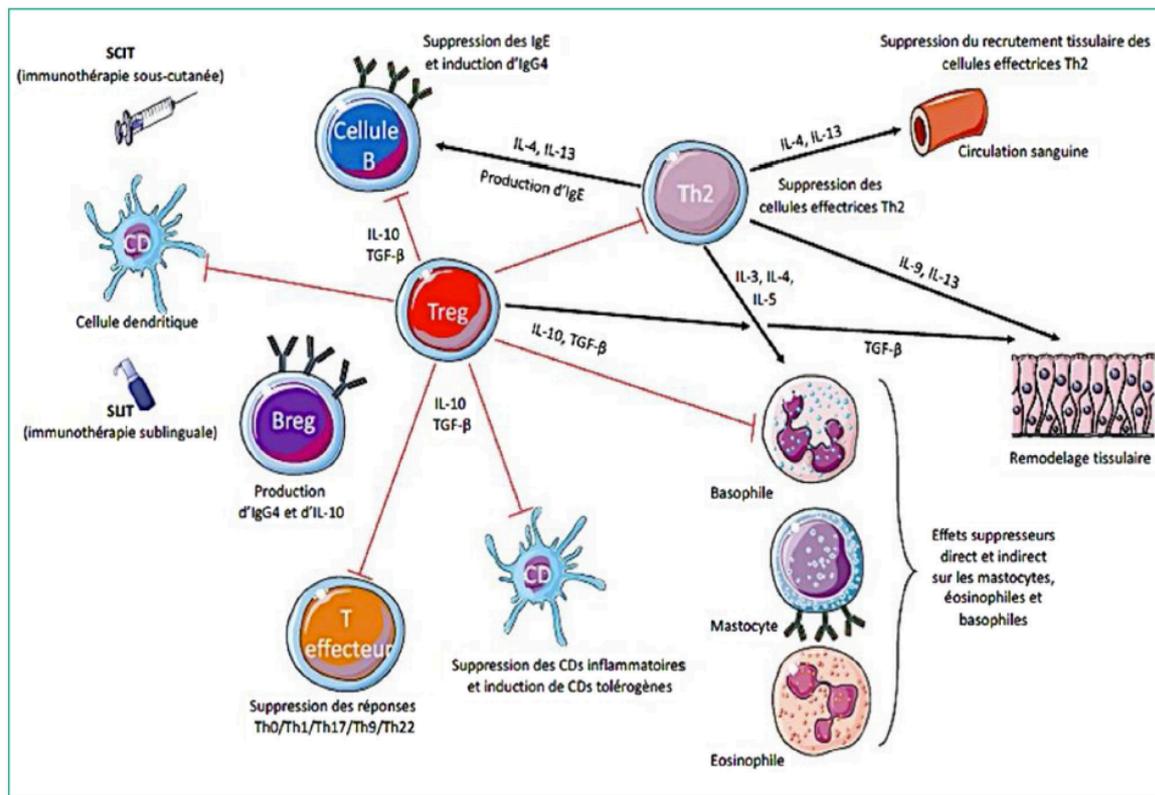
Figure 1. Les différents phénotypes d'asthmes. Adapté d'après Wenzel, *Nature Medicine* 2012 et Wenzel, *Lancet* 2001.

spécifique de l'allergène se développe, celle-ci se base sur l'utilisation de peptides dérivés de l'allergène. Ces peptides possèdent des propriétés hypoallergéniques remarquables, ils possèdent une très faible réactivité vis-à-vis des cellules T et n'induisent pas ou peu la production d'IgE spécifiques. Une étude de Bouchaud et al. publiée en 2015 montre qu'une administration sous cutanée d'un peptide dérivé de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 2) avant une sensibilisation à un extrait total d'acarien, permet de prévenir l'hyperréactivité bronchique dans un modèle murin d'asthme allergique aux acariens [18]. Dans cette même étude, les souris traitées avec le peptide montrent une baisse des populations éosinophiles et neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires, une baisse des réponses Th2 et Th17 pulmonaires et une diminution des IgE spécifiques [18]. Montrant de ce fait qu'une approche vaccinale peptidique est efficace avec une faible quantité d'allergène et est suffisante pour induire une tolérance vis-à-vis d'un allergène sur une courte période. Plus récemment, une étude clinique se basant sur la vaccination d'individus non asthmatiques à l'aide de dérivés peptidiques de pollen de bouleau (Bet v 1) montre également des résultats prometteurs. Les sujets vaccinés sur deux ans avec les fragments peptidiques de Bet v 1 et naturellement exposés aux allergènes de bouleau voient leurs immunoglobulines de type G (IgG) spécifiques de Bet v 1 augmenter [19]. Ces IgG vont ensuite bloquer la reconnaissance entre l'allergène Bet v 1 et ses IgE spécifiques, expliquant l'absence de symptômes cutanés et de positivité aux prick tests. Le point le plus remarquable de cette étude reste cependant la fréquence de prise du traitement : sur deux ans, seulement 4 injections peptidiques sous-cutanées sont nécessaires pour protéger les sujets. L'immunothérapie peptidique semble ainsi palier les défauts de la SLIT. Une fréquence de traitement modérée associée à de faibles doses

de fragments d'allergènes est suffisante pour induire une protection, effective dès les premières semaines.

## Perspectives

L'immunothérapie peptidique montre une efficacité remarquable lors d'approches vaccinales que ce soit chez la souris ou bien chez l'homme. Cependant, prédire l'apparition de l'asthme reste encore impossible de nos jours et vacciner la population de façon empirique implique un coût inacceptable. C'est pourquoi une approche thérapeutique de l'immunothérapie peptidique serait plus pertinente. L'immunothérapie peptidique serait ainsi instituée après les premières exacerbations dans le but de prévenir l'aggravation et la survenue des symptômes de l'asthme au cours du temps. La protection croisée vis-à-vis d'autres allergènes par effet « by-stander » est aussi une perspective digne d'intérêt. Il est bien connu que l'asthme n'est pas uniquement dû à un seul allergène et qu'une grande proportion des patients sont sensibilisés à plusieurs allergènes. Une immunothérapie peptidique basée sur des homologues de séquences entre allergènes et pouvant potentiellement protéger un individu ayant plusieurs sensibilisations à des allergènes différents est envisageable. Pour finir, une dernière approche serait de développer des associations de peptides hypoallergéniques afin de prévenir l'apparition des symptômes de l'asthme dans le cas de sensibilisation à divers allergènes. Cette approche semble difficilement réalisable avec la SLIT au vu de la quantité d'allergènes administrés et de leurs formes totales contenant des épitopes majeurs activant les réponses T et IgE spécifiques, mais pourrait être intéressante avec l'immunothérapie peptidique.



**Figure 2.** Mécanismes d'action de l'immunothérapie spécifique des allergènes. Adapté d'après Akdis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011. L'immunothérapie à base d'allergène permet de générer à la fois une polarisation des lymphocytes T spécifiques de l'allergène de Th2 en Th0/Th1 et à la génération de cellules T régulatrices (Treg) sécrétrices d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Les cellules T régulatrices vont interagir directement ou indirectement avec les cellules B, engendrant une production d'IgG4 et d'IgA et bloquant la production d'IgE. Les Treg vont également empêcher la domiciliation tissulaire des cellules Th2 ; ils inhibent les mastocytes, basophiles et éosinophiles par des mécanismes direct ou indirect ; inhibent l'action des cellules dendritiques (DCs) pro-inflammatoires et induisent à la place des DCs dites tolérogènes. De plus, les Treg vont être supportés par l'action des cellules B régulatrices (Breg) qui inhibent les cellules T effectrices via l'IL-10 et produisent également des IgG4.

## Conclusion

Même si l'immunothérapie peptidique semble prometteuse, plusieurs études restent nécessaires pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Pourquoi ces peptides à faible dose agissent aussi rapidement et ne nécessitent que peu d'injections ? Comment sont-ils pris en charge par les cellules immunitaires ? Comment modulent-ils la réponse inflammatoire ? Sont-ils efficaces lors d'une approche thérapeutique ? Les réponses à ces questions sont nécessaires avant de pouvoir envisager l'immunothérapie peptidique comme nouvelle approche thérapeutique dans l'asthme. En attendant, l'immunothérapie spécifique de l'allergène reste actuellement le meilleur moyen spécifique de prévenir l'apparition des symptômes de l'asthme sur le long terme tout en minimisant la prise de corticostéroïdes.

## Déclaration de liens d'intérêts

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

## Références

- [1] Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol* 2013;4:263.
- [2] Cappella A, Durham S. Allergen immunotherapy for allergic respiratory diseases. *Hum Vaccin Immunother* 2012;8:1499–512.
- [3] Chesné J, et al. IL-17 in severe asthma. Where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1094–101.
- [4] Hamelmann E, Tateda K, et al. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness  $\pm$  a murine model. *Allergy* 1999;54:297–305.
- [5] Kerzerho J, et al. Programmed cell death ligand 2 regulates TH9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131 [1048–57.e2].
- [6] Martinez-Gonzalez I, et al. Allergen-experienced group 2 innate lymphoid cells acquire memory-like properties and enhance allergic lung inflammation. *Immunity* 2016;45:198–208.
- [7] André-Grégoire G, et al. Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:824–33.
- [8] Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18:716–25.

- [9] Chung KF, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *ERJ* 2014;43:343–73.
- [10] Al-Hajjaj MS. Difficult-to-treat asthma, is it really difficult? *Ann Thorac Med* 2011;6:1–2.
- [11] Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;177:1572–3.
- [12] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2011;127:18–27.
- [13] ALK announces FDA approval for Merck's grass sublingual allergy immunotherapy tablet GRASTEK<sup>®</sup> (GRAZAX<sup>®</sup>) <https://ir.alk.net/news-releases/news-release-details/alk-announces-fda-approval-mercks-grass-sublingual-allergy>.
- [14] Durham SR, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: Confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:717–25.
- [15] Blanco C, Bazire R, Argiz L, et al. Sublingual allergen immunotherapy for respiratory allergy: a systematic review. *Drugs Context* 2018;7:1–19.
- [16] Larenas-Linnemann DE, Mösges R. Dosing of European sublingual immunotherapy maintenance solutions relative to monthly recommended dosing of subcutaneous immunotherapy. *Allergy Asthma Proc* 2016;37:50–6.
- [17] Bernstein DI, et al. A practical guide to the sublingual immunotherapy tablet adverse event profile: implications for clinical practice. *Postgrad Med* 2017;129:590–7.
- [18] Bouchaud G, et al. Prevention of allergic asthma through Der p 2 peptide vaccination. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:197–200.
- [19] Campana R, et al. Vaccination of non-allergic individuals with recombinant hypoallergenic fragments of birch pollen allergen Bet v 1: safety, effects and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2018;22 [S0091-6749(18)31643-9].

1) Article 1 : *Der p 2-Derived Peptide Abrogates HDM-Induced Severe Asthma in Mice*

Article soumis à l'American Journal of Respiratory  
and Critical Care Medicine (2019)

Page 1 of 31

1 **Der p 2-Derived Peptide Abrogates HDM-Induced Severe Asthma in Mice**

2 Martin Klein<sup>1,2</sup>, Luc Colas<sup>1,2</sup>, Marie-Aude Cheminant<sup>1</sup>, Carole Brosseau<sup>3</sup>, Antoine

3 Magnan<sup>1,4</sup> and Grégory Bouchaud<sup>3\*</sup>

4

5 <sup>1</sup> Institut du thorax, UMR INSERM 1087/CNRS 6291, Nantes, France

6 <sup>2</sup> Université de Nantes, Nantes, France

7 <sup>3</sup>INRA, UR1268, BIA, Nantes, France

8 <sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service de Pneumologie, Nantes, France

9 \* Corresponding author: Grégory Bouchaud PhD, INRA, BIA, Rue de la Géraudière,  
10 44000 Nantes, France, gregory.bouchaud@inra.fr

11 **Running title:** Allergen-derived peptide immunotherapy in asthma.

12 **Author's contributions:**

13 M. Klein performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

14 M.A.C. provided support for the experiments with mice. C.B. participated in the  
15 analysis of cell populations, and L.C. gave scientific inputs. A.M. and G.B. designed  
16 and elaborated the study and supervised manuscript writing.

17 **Funding:**

18 This work was supported by a grant from the Fondation du Souffle and the Fond de

19 Dotation de Recherche en Santé Respiratoire.

20

21

22

23 **Abstract**

24 **Rationale:** Asthma is a chronic airway disease that is frequently due to sensitization  
25 to aero-allergens, among which house dust mites (HDMs) are the most frequently  
26 involved. We previously showed that a *Dermatophagoides pteronyssinus* 2-derived  
27 peptide (Der p 2.1) could prevent airway inflammation and hyperresponsiveness.  
28 However, it is unknown whether this compound is able to treat asthma, especially in  
29 the context of severity and low steroid sensitivity, and whether it has the potential to  
30 treat human asthma.

31 **Objective:** To evaluate the effect of Der p 2.1 immunotherapy in a mouse and  
32 humanized mouse model of HDM-induced asthma.

33 **Methods:** We used a mouse model of HDM allergic asthma combining Th2/Th17  
34 responses. Asthmatic mice were treated with subcutaneous injection of Der p 2.1.  
35 Airway hyperresponsiveness (AHR), lung inflammation and Der p 2.1 *in vitro*  
36 mechanisms were assessed in mice and humanized mice.

37 **Main Measurements and Results:** Der p 2.1 peptide reduced AHR, BAL eosinophilia,  
38 the lung Th2 response and HDM-specific IgE production. Additionally, compared to  
39 dexamethasone, Der p 2.1 reduced BAL neutrophilia and the lung Th17 response, with  
40 an increase in Treg and tolerogenic dendritic cell numbers. Der p 2.1 peptide also  
41 decreased AHR, the Th2 and Th17 responses and HDM-specific IgE levels in  
42 humanized mice.

43 **Conclusion:** Allergen-derived peptide immunotherapy abrogates asthma features in  
44 a model of steroid-resistant asthma and in allergic asthmatic-derived humanized mice  
45 by modulating T cell and dendritic cell activation.

46 **Keywords:** Asthma, Allergy, Immunotherapy, T lymphocytes, Dendritic cells

#### 47 **Introduction**

48 Asthma prevalence has constantly increased over the last decades, becoming  
49 one of the most prevalent airway diseases that affects more than 300 million people  
50 worldwide. Despite the efficacy of controller treatments, asthma still results in altered  
51 quality of life, morbidity and economic burden(1). Severe asthma represents 5 to 10%  
52 of the asthmatic population and results in permanent respiratory limitation, frequent  
53 exacerbations and sometimes death(2). Due to the importance of allergy and  
54 eosinophilic inflammation in patients displaying the so-called type 2 immunity (T2)  
55 phenotype(3), biologics such as anti-IgE and anti-IL-5 have been proposed, which are  
56 efficacious in 70% of T2 patients(4)-(5) without acting on its main causes, notably  
57 allergy. Indeed, allergy affects 70% of asthmatic patients(6), where house dust mites  
58 are the most implied allergen(7). Allergen immunotherapy (AIT) represents the only  
59 asthma therapy that can alter the natural course of allergy(8, 9) and has prolonged  
60 protection, lasting several years after treatment is stopped(10, 11). AIT is based on  
61 daily exposure to a high dose of allergen, and according to the European Academy of  
62 Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 3 to 4 years of AIT are required for optimal

63 efficacy. Induction and activation of regulatory T cells (Treg) are considered the main  
64 mechanism of action of AIT(12). However, the induction of allergen tolerance following  
65 AIT requires approximately 1 to 2 years to reach full efficacy; adverse effects due to  
66 the use of crude allergen extracts, such as throat irritation (17-43%), ear pruritus (7-  
67 29%), mouth edema (4-11%) and swollen tongue (3-10%)(11), are frequent. The risk  
68 of asthma exacerbations in severe asthmatic patients still precludes AIT use in such  
69 patients despite the importance of allergy(13).

70         Based on these observations, AIT efficacy and safety must be improved to make  
71 this treatment a full treatment of asthma, including severe asthma, which is frequently  
72 associated with difficult-to-treat neutrophilic infiltration. Genetic engineering led to the  
73 development of new therapeutic recombinant hypoallergenic peptides derived from  
74 whole allergens. These peptides display interesting properties, such as low IgE  
75 induction and T cell reactivity(14). Recombinant hypoallergenic peptides derived from  
76 *Dermatophagoides pteronyssinus protein 2* (Der p 2) were described to exhibit less *in*  
77 *vivo* allergenicity than Der p 2 whole allergen, while preserving  
78 immunogenicity(15)-(16). We previously demonstrated in a mouse model of HDM-  
79 induced asthma that the use of Der p 2-derived peptides as a vaccine prevents airway  
80 hyperresponsiveness (AHR) and inflammation(17), the two main characteristics of  
81 asthma. Recently, non-allergic individuals vaccinated with recombinant hypoallergenic  
82 peptide derived from birch pollen allergen Bet v 1 were protected over 2 years with

83 only 4 subcutaneous injections of the peptide against Bet v 1 allergen allergy(18).  
84 However, the prediction of asthma is still too uncertain to propose AIT as a preventive  
85 strategy, and this treatment is used mainly once the disease is established. In this  
86 paper, we investigated whether Der p 2-derived peptide after HDM sensitization and  
87 challenge would decrease HDM-induced asthma features in mice and humanized  
88 mice.

## 89 **Methods**

### 90 ***HDM-induced asthma model***

91 Female BALB/c mice were purchased from Charles River Breeding  
92 Laboratories and used for all experiments. Mice were housed in a ventilated cage  
93 system. The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal  
94 Experimentation of the Pays de la Loire (accreditation number: 9456). Mice were  
95 sensitized on days 0, 7, 14 and 21 by percutaneous application of 500 µg of crude  
96 extract of *Dermatophagoides farinae* (Der f) (Stallergenes®, Antony, France) diluted  
97 in 20 µL of DMSO (Sigma-Aldrich®, St Louis, Mo) on the ears, without any synthetic  
98 adjuvant. They were then challenged intranasally with 250 µg of Der f in 40 µL of sterile  
99 PBS on day 28 to induce AHR and again on days 29, 30, 35, 36 and 37 to enhance  
100 AHR. Mice were sacrificed on day 38 (**Figure 1A**).

### 101 ***Humanized mice***

102 Four-week-old NSG-SGM3 mice (NOD/SCID/hIL-2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>/hSCF/hGM-CSF/hIL-3)  
103 were irradiated with a dose of 1.5 Gy and anesthetized 6 hours later to receive  
104 intravenously 50.000 to 100.000 cord blood-derived flow-sorted human CD34<sup>+</sup>  
105 hematopoietic stem cells. After three months, mice were considered humanized when  
106 their peripheral blood contained more than 10% human T cells. After that, humanized  
107 mice were sensitized and challenged with HDM extract as described above.

#### 108 ***Dexamethasone and peptide treatment***

109 Dexamethasone was diluted in PBS and given intraperitoneally (i.p.) at 1 mg/kg  
110 2 hours after each HDM challenge. Derivative peptide (Der p 2.1, amino acids 1-53)  
111 was purified as previously described(15). Der p 2.1 was solubilized with a 10 mM  
112 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7) solution to a final concentration of 450 µg/mL. Approximately 200 µL  
113 of a solution of PBS containing 5 µg of the peptide without adjuvant was injected  
114 subcutaneously into the neck of the mice on days 31 and 34 (**Figure 1A**).

#### 115 ***Cell culture***

116 Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were collected from mice  
117 shinbones and femurs in a PBS/10% FBS /1% EDTA solution. Cells were counted and  
118 cultured for 8 days in nontreated petri dishes with 10 mL of complete growth medium  
119 (RPMI, 1% penicillin/streptomycin, 1% NaPy, 1% HEPES, 10% FBS, 100 µL/L β-  
120 mercapto ethanol, and 1% L-glutamine) supplemented with 50 µg/mL both the purified  
121 mouse cytokines IL-4 and GM-CSF (Miltenyi Biotech) and then incubated at 37°C with  
122 5% CO<sub>2</sub>. The cells were harvested on day 8 and cultured for 24 hours with HDM  
123 extract, Der p 2.1 or both. Then, BMDCs were cocultured for 2 days with mouse T

124 CD4<sup>+</sup> cells sorted from the mouse spleen with a EasySep CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit  
125 (Stemcell, Grenoble, France) according to the manufacturer's specifications, and cells  
126 were harvested for flow cytometry.

### 127 ***Cytokine quantification***

128 Cytokine concentrations in broncho-alveolar lavages (BAL) supernatants were  
129 quantified by Luminex technology (BioPlex 200 system, Bio-Rad Laboratories, Munich,  
130 Germany) using a Pro Mouse Group I Cytokine 23-plex kit (Bio-Rad Laboratories).  
131 Assays were performed according to the manufacturer's specifications.

### 132 ***Flow cytometry***

133 Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed with 1 ml of PBS administered  
134 intratracheally through a flexible catheter. The lungs were removed and crushed to  
135 obtain a single-cell suspension; they were then suspended in a PBS/5% FBS/1%  
136 EDTA buffer solution. Cells were stained with a lineage cocktail for the following  
137 surface markers: CD45 (eBioscience), F4/80, CD11c, CD11b (Miltenyi Biotec), CD3,  
138 CD4, CCR3, Ly6G, MHCII, CD103, CD25, ST2, and CD127, and in the presence of  
139 CD16/32 mAbs (Biolegend). Cells were stimulated for 5 hours with 100 µg/ml crude  
140 HDM preparation and 1 µg/mL ionomycin with brefeldin A (Golgi plug, BD Biosciences,  
141 1:1000). Cells were fixed and permeabilized using a Cytofix/Cytoperm Kit (BD  
142 Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and stained with anti-IL-13, anti-Gata3, anti-  
143 Foxp3 (eBioscience), anti-IL-17A, anti-IL-10, anti-IL-4 (Biolegend), and anti-RORγt

144 (BD Biosciences) antibodies. The cells were analyzed on a Fortessa X20 cytometer  
145 (BD Biosciences). Data were acquired using DIVA software (BD Biosciences) and  
146 analyzed with FlowJo 10.4 (TreeStar), as previously described(19).

#### 147 ***Airway hyperresponsiveness measurements***

148 AHR was measured on age-matched (11 weeks) BALB/c female mice using the  
149 forced oscillation technique with a FlexiVent (SCIREQ Inc.) in response to increasing  
150 concentrations of methacholine (0, 5, 10, 15 and 20 mg/mL), as previously  
151 described(17). FlexiWare software was used for data analysis.

#### 152 ***Histology***

153 Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde for at least 48 hours, embedded in  
154 paraffin, cut and stained with hematoxylin and eosin for inflammatory scoring. The  
155 histological score was calculated blindly as previously described(20).

#### 156 ***Immunoglobulin assay***

157 Blood was collected via cardiac puncture 24 hours after the last HDM challenge  
158 and then centrifuged, and supernatants were frozen at -20°C. The assay for the  
159 quantification of HDM-specific IgE was performed in serum samples via indirect ELISA,  
160 as previously described(21).

#### 161 ***Statistical analysis***

162 Statistical analysis was performed with Prism 7 software (GraphPad, La Jolla,  
163 CA). Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance, defined as  $p$

164 less than 0.05, was analyzed by Student's *t* tests and Bonferroni test as indicated in  
165 the figure legends.

## 166 **Results**

### 167 ***Der p 2.1 decreases asthma features in HDM-induced asthma.***

168 To investigate the therapeutic potential of Der p 2.1 peptide, we measured its  
169 effects on AHR, cell inflammation and histology in the HDM-induced asthma model  
170 (**Figure 1A**). We first investigated the ability of Der p 2.1 peptide to decrease AHR in  
171 a therapeutic setting (**Figure 1B**). As expected, asthmatic mice displayed an increase  
172 in lung resistance in response to methacholine compared with that of control mice (8,68  
173 versus 3,23,  $p < 0,001$ ). On the contrary, in mice receiving a Der p 2.1 injection, we  
174 observed a decrease in lung resistance compared with that of asthmatic mice (3,63  
175 versus 8,63,  $p < 0,001$ ) to a level comparable to that of the control mice. Interestingly,  
176 injection of dexamethasone in asthmatic mice did not decrease lung resistance  
177 compared to that of asthmatic mice (**Figure 1B**). Then, pulmonary lesions were  
178 investigated by histology (**Figure 1C and D**). Concordant with lung function results,  
179 asthmatic mice displayed perivascular and peribronchial cell infiltration, epithelial cell  
180 hyperplasia and smooth muscle thickening compared to those of control mice (**Figure**  
181 **1C and D**). Similarly, Der p 2.1 injection drastically reduced pulmonary lesions but to  
182 a similar extent as that by dexamethasone (**Figure 1C and D**). Finally, we explored  
183 the effect of Der p 2.1 peptide on lung inflammation (**Figure 1E**). A dramatic increase  
184 in BAL total cells was observed in asthmatic mice compared to that in controls, which  
185 was distributed among lymphocytes, macrophages, eosinophils and neutrophils  
186 (**Figure 1E**). Mice receiving a Der p 2.1 injection displayed a decrease in BAL total  
187 cells as well as in inflammatory cells. By contrast, dexamethasone induced a decrease  
188 in BAL total cells, lymphocytes and eosinophils and, to a lesser extent, in macrophages

189 but not neutrophils (**Figure 1E**). Altogether, our results demonstrate that, in  
190 neutrophilic component and thus in AHR in a mouse model of HDM-induced steroid-  
191 insensitive asthma, Der p 2.1 HDM-derived peptide considerably reduced globally the  
192 features of asthma, treating the whole inflammation response, including neutrophilia  
193 and thus AHR, two cardinal characteristics shared by all asthma phenotypes.  
194 Therefore, Der p 2.1 displays highly interesting anti-inflammatory properties that are  
195 relevant for severe asthma.

196 ***BAL proinflammatory cytokines, lung T helper responses and HDM-specific IgE***  
197 ***are decreased under Der p 2.1 treatment.***

198 To decipher the antiinflammatory properties of Der p 2.1 peptide, we  
199 investigated its effects on the humoral and adaptive responses (**Figure 2**). To do so,  
200 we quantified BAL cytokines and observed significantly decreased concentrations of  
201 IL-4 (6.634 pg/ml, P=0.038 vs 30.13 pg/ml), IL-5 (25.42 pg/ml, P=0.0021 vs 151.3  
202 pg/ml), and IL-17A (0.611 pg/ml, adjusted P=0.0001 vs 3.056 pg/ml) in Der p 2.1-  
203 treated mice compared to those in asthmatic mice (**Figure 2A and C**). Dexamethasone  
204 reduced BAL IL-4 and IL-5 levels. It also reduced IL-17A content, but half as much as  
205 Der P 2.1 (**Figure 2C**). In addition, IL-13 levels were not statistically reduced by either  
206 Der p 2.1 or dexamethasone (**Figure 2A**). To assess how T cells were involved in this  
207 cytokine modulation, we analyzed Treg, Th2 and Th17 cells in the lungs of mice by  
208 flow cytometry by both specific transcription factor expression and cytokine production  
209 (**Figure 2B and D**). According to assays of BAL, the Der p 2.1 peptide decreased the  
210 Th2 response, with a decrease in both CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> cells  
211 compared to those in asthmatic mice (**Figure 2B**). We also observed a decrease in  
212 CD4<sup>+</sup>RORyt<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells, representative of Th17 cells (**Figure 2D**). Both  
213 Th2 and Th17 cells in mice treated with Der p 2.1 peptide were similar to those in

214 control mice (**Figure 2B and D**). By contrast, Der p 2.1 induced an increase in Treg  
215 frequency (**Figure 2E**). At the T cell level, dexamethasone had no effect: the absolute  
216 number of Th2 and Th17 cells and Treg frequency remained at the same level in  
217 dexamethasone-treated mice as those in asthmatic mice (**Figure 2B 2D and 2E**).  
218 Finally, HDM-specific IgE was measured in the serum of mice (**Figure 2F**) as a  
219 reflection of the Th2 humoral response. A decrease in specific IgE levels in Der p 2.1-  
220 treated mice compared with those in asthmatic mice (**Figure 2F**) was observed.  
221 Moreover, dexamethasone-treated mice also displayed a decrease in specific IgE  
222 levels. These results show a global effect of Der p 2.1 on the whole inflammation  
223 response by decreasing not only the Th2 response but also the Th17 response and  
224 increasing Treg frequency.

225 ***Der p 2.1 peptide inhibits Th2 and Th17 polarization and cytokine production in***  
226 ***vitro.***

227 To further elucidate how Der p 2.1 inhibits Th2 and Th17 responses in asthma,  
228 we analyzed its effect on T cell differentiation *in vitro* (**Figure 3**). To do so, we  
229 cocultured BMDC and T cells from naïve BALB/c mice in the presence of HDM extract  
230 and/or Der p 2.1. We observed that when DCs were incubated in the presence of HDM  
231 extract, the number of Th2 CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> IL-13-producing cells  
232 increased compared with those of T cells cultured with control DCs (**Figure 3A and**  
233 **B**). In contrast, no increase in Th2 cells was observed when DCs were incubated with  
234 both HDM extract and Der p 2.1 peptide (**Figure 3A and B**). Similar results were  
235 observed in Th17 cells: CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cells increased in the presence  
236 of DCs loaded with HDM preparation compared to those in control conditions, whereas  
237 this increase was completely abrogated in the presence of Der p 2.1 (**Figure 3C and**  
238 **D**). As a control, DCs incubated with Der p 2.1 alone did not induce T cell differentiation

239 into Th2 or Th17 cells (**Figure 3A-D**). Treg frequency did not vary when DCs were  
240 loaded with HDM extract/or Der p 2.1 or both (**Figure 3E**). These results suggest that  
241 Der p 2.1 is able to counteract the HDM ability to induce Th2 and Th17 differentiation  
242 of T cells by acting on DC activation. In the presence of HDM extract and Der p 2.1,  
243 an increased frequency of CD11c<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> cells was observed (**Figure 3F**). By contrast,  
244 DCs loaded with HDM extract alone did not induce an increase in IL-10-producing cells  
245 (**Figure 3F**), but DCs incubated with Der p 2.1 alone induced IL-10 secretion in CD11c<sup>+</sup>  
246 DCs only at a lower level than DCs incubated with both HDM extract and Der p 2.1. In  
247 conclusion, our results suggest that Der p 2.1 induces IL-10-producing antigen-  
248 presenting cells, which could in turn inhibit HDM-induced T cell differentiation.

249 ***Der p 2.1 decreases asthma features in asthmatic humanized mice.***

250 To confirm our results in a human immune environment and therefore the  
251 potential of using Der p 2.1 in a therapeutic setting in humans, we reproduced our  
252 experiments using a humanized mouse model of allergic asthma (**Figure 4A**).  
253 Irradiated mice reconstituted with human CD34<sup>+</sup> cells and treated with Der p 2.1  
254 peptide displayed a dramatic decrease in airway resistance in response to  
255 methacholine compared to that in HDM-exposed mice (9.9 cmH<sub>2</sub>O//ml vs 18,2  
256 cmH<sub>2</sub>O//ml; p=0.0186) (**Figure 4B**). In Der p 2.1-treated humanized mice, the airway  
257 resistance in response to methacholine was indeed comparable to that observed in  
258 nonasthmatic mice (**Figure 4B**). These results were confirmed by anatomical analyses  
259 of the lungs (**Figure 4C and D**). Likewise, our previous observations showed that  
260 humanized mice treated with Der p 2.1 peptide displayed reduced cell infiltrate and  
261 epithelial thickening (**Figure 4C**). The results blindly quantified indicated that the  
262 histological score of Der p 2.1-treated humanized mice was lower than that of  
263 asthmatic humanized mice (**Figure 4D**). Collectively, our analyses demonstrate that

264 Der p 2.1 peptide efficiently reduces asthma features *in vivo* in a human immune  
265 system.

266 ***Der p 2.1 modulates T cell responses and HDM-specific IgE production in***  
267 ***asthmatic humanized mice.***

268 Having shown an effect of Der p 2.1 peptide on lung function and inflammation  
269 using humanized mice, we then explored the human immune response in this model  
270 (**Figure 5**). As expected, both Th2 (CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> IL-4-producing T cells)  
271 and Th17 (CD4<sup>+</sup> RORγt<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> IL-17A-producing T cells) cell numbers were  
272 decreased in the lungs of asthmatic mice treated with Der p 2.1 compared with those  
273 in the lungs of untreated asthmatic mice. Moreover, Der p 2.1-treated mice displayed  
274 Th2 and Th17 cell numbers comparable to those of control mice (**Figure 5A-B**). The  
275 frequency of lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs was not different between control and  
276 asthmatic humanized mice, although Treg frequency was increased in the lungs after  
277 Der p 2.1 treatment (**Figure 5C**). Finally, we measured HDM-specific IgE and observed  
278 a decrease in treated mice compared with that in asthmatic mice, with a level  
279 comparable to that of the control (**Figure 5D**). Taken together, these results  
280 demonstrate a decrease in both Th2 and Th17 cells in response to Der p 2.1 and an  
281 increase in Der p 2.1-induced Treg cells in humanized asthmatic mice.

## 282 **Discussion.**

283 In the present study, we first confirmed that our mouse model of HDM-induced  
284 asthma not only exhibited the allergic asthma features of eosinophilia, Th2 response  
285 and allergen-specific IgE production(22) but also key features of severe asthma, such  
286 as neutrophilia, Th17 response, and steroid resistance(23).

287 In our model, steroid resistance was illustrated by the persistent AHR in  
288 asthmatic mice after dexamethasone treatment. As dexamethasone reduced

289 eosinophilia and Th2 cytokines but could not diminish neutrophilia and IL-17A  
290 secretion, it is possible that steroid resistance of AHR is related to the IL-17-induced  
291 neutrophilic and Th17 contingents(24). Indeed, IL-17A is well known to be associated  
292 with elevated levels of neutrophils in the airways and can directly activate smooth  
293 muscle cell contraction(19). By contrast, Der p 2 allergen-derived peptide  
294 immunotherapy abrogated both Th2- and Th17-related asthma features and  
295 established AHR. In addition, lung Treg cell frequency increased under Der p 2.1  
296 treatment. As Treg cells are key players in inflammation resolution, they are candidates  
297 to be responsible for the Th2/Th17 modulation induced by the peptide. Accordingly,  
298 their increase is associated with success of AIT(25, 26). Moreover, Der p 2.1 seems  
299 to act on lung tissue alteration. It is well known that bronchial remodeling is a severe  
300 asthma feature (27). Interestingly, our peptide reduced lung infiltrate and decreased  
301 epithelium thickening (data not shown). Based on these observations, we can expect  
302 that Der p 2.1 may also decrease smooth muscle cell hyperplasia.

303 To further decipher the mechanisms of action of Der p 2.1, we analyzed the  
304 effects on T and dendritic cells cocultured *in vitro*. As expected, HDM extract increased  
305 Th2 and Th17 cell polarization *in vitro* without affecting Treg or IL-10-secreting  
306 dendritic cells, which could be associated with a defect in regulatory function(28). By  
307 contrast, Der p 2.1 alone or in combination with HDM extract did not induce Th2 or  
308 Th17 cells but increased the frequency of IL-10-secreting dendritic cells. This result  
309 demonstrates a direct capacity of Der p 2.1 to induce an antiinflammatory phenotype  
310 of DCs (29). This direct effect independent of the presence of allergens suggests the  
311 capacity of Der p 2.1 to exert an anti-inflammatory bystander effect that could prevent  
312 inflammation from other allergens.

313           Preclinical assessment of new therapies requires animal models reflecting  
314 human pathogenesis, but existing differences in the immune physiology of mice and  
315 humans limit their interpretation. Previous NSG mouse strains were not fully relevant  
316 and failed to fully mimic the human immune system(30, 31). A new model of  
317 humanized mice called NSG-SGM3 was able to express functional human Treg, T and  
318 B cells, myeloid progenitor and dendritic cells and mast cells(32–36). For the first time,  
319 we developed a model of HDM-induced allergic asthma in NSG-SGM3 humanized  
320 mice. This model exhibits elevated AHR, a bronchial infiltrate and alteration associated  
321 with a mixed Th2/Th17 response and HDM-specific IgE production relevant to allergic  
322 severe asthma. All these features were decreased under Der p 2.1 treatment and  
323 associated with an increase in Treg frequency in the lungs, consistent with results in  
324 nonhumanized mice and with an anti-inflammatory effect of Treg cells induced by  
325 peptide therapy.

326           The use of whole allergen could present the inconvenience of being recognized  
327 by specific IgE and then induce asthma rather than treating it (37, 38). Several studies  
328 have already shown the clinical efficacy and safety of allergen-modified extract  
329 (allergoids) in asthma (39, 40). In the present study, we show that allergoids but not  
330 allergen-derived peptides equally safe and efficient for treating asthma. Moreover,  
331 whereas allergoids require an adjuvant association for increased immunogenicity (41,  
332 42), Der p 2.1 alone is sufficient to induce an immune response. Both allergoids and  
333 allergen-derived peptides induce Treg and IL-10-secreting DCs to reestablish a  
334 tolerance defect (43–45). However, whereas allergoids modulate only the Th2 and IgE  
335 allergic responses (40, 46), Der p 2.1 can also modulate the Th17 axis, which  
336 predominates in the severe form of asthma. Despite their efficacy in decreasing  
337 asthma features, allergen-derived peptides may also be improved. Indeed, Martínez

338 and colleagues showed that the combination of several Der p allergen-derived  
339 peptides exhibits antiinflammatory properties (47). Moreover, the use of nanoparticles  
340 as adjuvants (48) in allergen-derived peptide immunotherapy could potentially improve  
341 their ability to polarize innate and adaptive cells into a tolerogenic phenotype.

#### 342 **Conclusion**

343 We demonstrated that Der p 2.1 immunotherapy abrogates HDM severe allergic  
344 asthma features in both mice and humanized mice through the induction of Treg cells  
345 and tolerogenic DCs. Thus, allergen-derived immunotherapy could be considered a  
346 promising therapeutic approach to treat allergic asthma, including severe steroid-  
347 resistant forms.

#### 348 **Acknowledgment:**

349 First, the author would like to thank Fabienne Haspot and Véronique Daguin from the  
350 humanized rodents' platform who provided the NSG-SGM3 mice. The authors would  
351 also like to thank the Cytocell platform for assistance with the flow cytometry analysis,  
352 and we would like to thank the Therassay platform for the use of respiratory equipment  
353 (Flexivent system). We are grateful to the members of the UTE IRS-UN animal facility  
354 for the support they provided with the mice. We would also like to thank the MicroPicell  
355 platform for performing the histological analysis. Finally, we would like to thank  
356 Stallergenes Greer for kindly providing the HDM total extract.

#### 357 **Disclosure of potential conflict of interest:**

358 The authors have declared that no conflict of interest exists.

#### 359 **References**

- 360 1. Siroux V, Boudier A, Bousquet J, Bresson J-L, Cracowski J-L, Ferran J,  
361 Gormand F, Just J, Le Moual N, Morange S, Nadif R, Oryszczyn M-P, Pison C,  
362 Scheinmann P, Varraso R, Vervloet D, Pin I, Kauffmann F. Phenotypic determinants

- 363 of uncontrolled asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;124:681-  
364 687.e3.
- 365 2. Lang DM. Severe asthma: Epidemiology, burden of illness, and heterogeneity.  
366 2015;doi:info:doi/10.2500/aap.2015.36.3908.
- 367 3. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular  
368 approaches. *Nature Medicine* 2012;18:716–725.
- 369 4. G N, R F, F P, A L, D F, S P, I C, J P, N W, C M. Omalizumab for the treatment  
370 of severe persistent allergic asthma: a systematic review and economic evaluation.  
371 *Health Technology Assessment* 2013;17:.
- 372 5. Roufousse FE, Kahn J-E, Gleich GJ, Schwartz LB, Singh AD, Rosenwasser LJ,  
373 Denburg JA, Ring J, Rothenberg ME, Sheikh J, Haig AE, Mallett SA, Templeton DN,  
374 Ortega HG, Klion AD. Long-term safety of mepolizumab for the treatment of  
375 hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:461-467.e5.
- 376 6. Knudsen TB, Thomsen SF, Nolte H, Backer V. A Population-based Clinical  
377 Study of Allergic and Non-allergic Asthma. *Journal of Asthma* 2009;46:91–94.
- 378 7. Bousquet P-J, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D, European  
379 Community Respiratory Health Survey I. Geographical variation in the prevalence of  
380 positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community  
381 Respiratory Health Survey I. *Allergy* 2007;62:301–309.
- 382 8. Noon L. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. *The Lancet*  
383 1911;177:1572–1573.
- 384 9. Larsen JN, Broge L, Jacobi H. Allergy immunotherapy: the future of allergy  
385 treatment. *Drug Discovery Today* 2016;21:26–37.
- 386 10. Durham SR, Emminger W, Kapp A, de Monchy JGR, Rak S, Scadding GK,  
387 Wurtzen PA, Andersen JS, Tholstrup B, Riis B, Dahl R. SQ-standardized sublingual

- 388 grass immunotherapy: Confirmation of disease modification 2 years after 3 years of  
389 treatment in a randomized trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*  
390 2012;129:717-725.e5.
- 391 11. Blanco C, Bazire R, Argiz L, Hernández-Peña J. Sublingual allergen  
392 immunotherapy for respiratory allergy: a systematic review. *Drugs in Context*  
393 2018;7:1–19.
- 394 12. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big  
395 picture of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;123:735–  
396 746.
- 397 13. Passalacqua G, Canonica GW. Specific immunotherapy in asthma: efficacy and  
398 safety. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1247–1255.
- 399 14. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I,  
400 Vrtala S. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010;28:211–  
401 241.
- 402 15. Chen K-W, Blatt K, Thomas WR, Swoboda I, Valent P, Valenta R, Vrtala S.  
403 Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust  
404 mite allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012;130:435-443.e4.
- 405 16. Chen K-W, Focke-Tejkl M, Blatt K, Kneidinger M, Gieras A, Dall'Antonia F, Faé  
406 I, Fischer G, Keller W, Valent P, Valenta R, Vrtala S. Carrier-bound nonallergenic Der  
407 p 2 peptides induce IgG antibodies blocking allergen-induced basophil activation in  
408 allergic patients. *Allergy* 2012;67:609–621.
- 409 17. Bouchaud G, Braza F, Chesné J, Lair D, Chen K-W, Rolland-Debord C,  
410 Hassoun D, Roussey-Bihouée T, Cheminant M-A, Brouard S, Bodinier M, Vrtala S,  
411 Magnan A. Prevention of allergic asthma through Der p 2 peptide vaccination. *Journal*  
412 *of Allergy and Clinical Immunology* 2015;136:197-200.e1.

- 413 18. Campana R, Marth K, Zieglmayer P, Weber M, Lupinek C, Zhernov Y, Elisyutina  
414 O, Khaitov M, Rigler E, Westritschnig K, Berger U, Wolkersdorfer M, Horak F, Horak  
415 F, Valenta R. Vaccination of non-allergic individuals with recombinant hypoallergenic  
416 fragments of birch pollen allergen Bet v 1: Safety, effects and mechanisms. *Journal of*  
417 *Allergy and Clinical Immunology* 2018;doi:10.1016/j.jaci.2018.11.011.
- 418 19. Chesné J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant M-A, Loy J, Brouard S,  
419 Sauzeau V, Loirand G, Magnan A. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway  
420 smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model.  
421 *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2015;135:1643-1645.e5.
- 422 20. Castan L, Cheminant M-A, Colas L, Brouard S, Magnan A, Bouchaud G. Food  
423 allergen-sensitized CCR9 + lymphocytes enhance airways allergic inflammation in  
424 mice. *Allergy* 2018;73:1505–1514.
- 425 21. Bihouée T, Bouchaud G, Chesné J, Lair D, Rolland-Debord C, Braza F,  
426 Cheminant M-A, Aubert P, Mahay G, Sagan C, Neunlist M, Brouard S, Bodinier M,  
427 Magnan A. Food allergy enhances allergic asthma in mice. *Respir Res* 2014;15:142.
- 428 22. Foster PS, Maltby S, Rosenberg HF, Tay HL, Hogan SP, Collison AM, Yang M,  
429 Kaiko GE, Hansbro PM, Kumar RK, Mattes J. Modeling TH2 responses and airway  
430 inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of  
431 asthma. *Immunol Rev* 2017;278:20–40.
- 432 23. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A, Henry A,  
433 Irvin CG, Piganelli JD, Ray A, Kolls JK. TH17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway  
434 Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J Immunol* 2008;181:4089–  
435 4097.
- 436 24. Chesné J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in Severe  
437 Asthma. Where Do We Stand? *American Journal of Respiratory and Critical Care*

- 438 *Medicine* 2014;190:1094–1101.
- 439 25. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by  
440 grass pollen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*  
441 2003;111:1255–1261.
- 442 26. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen  
443 immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa.  
444 *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008;121:1467-1472.e1.
- 445 27. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest* 2013;144:1026–  
446 1032.
- 447 28. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1314–  
448 1323.
- 449 29. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10  
450 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*  
451 2001;2:725–731.
- 452 30. Legrand N, Ploss A, Balling R, Becker PD, Borsotti C, Brezillon N, Debarry J,  
453 de Jong Y, Deng H, Di Santo JP, Eisenbarth S, Eynon E, Flavell RA, Guzman CA,  
454 Huntington ND, Kremsdorf D, Manns MP, Manz MG, Mention J-J, Ott M, Rathinam C,  
455 Rice CM, Rongvaux A, Stevens S, Spits H, Strick-Marchand H, Takizawa H, van Lent  
456 AU, Wang C, *et al.* Humanized mice for modeling human infectious disease:  
457 challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* 2009;6:5–9.
- 458 31. Manz MG. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and  
459 challenges. *Immunity* 2007;26:537–541.
- 460 32. Billerbeck E, Barry WT, Mu K, Dorner M, Rice CM, Ploss A. Development of  
461 human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-  
462 macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID

- 463 IL2Ry(null) humanized mice. *Blood* 2011;117:3076–3086.
- 464 33. Bryce PJ, Falahati R, Kenney L, Leung J, Bebbington C, Tomasevic N, Krier  
465 RA, Hsu C-L, Shultz LD, Greiner DL, Brehm MA. Humanized Mouse Model of Mast  
466 Cell-Mediated Passive Cutaneous Anaphylaxis and Passive Systemic Anaphylaxis. *J*  
467 *Allergy Clin Immunol* 2016;138:769–779.
- 468 34. Coughlan AM, Harmon C, Whelan S, O'Brien EC, O'Reilly VP, Crotty P, Kelly  
469 P, Ryan M, Hickey FB, O'Farrelly C, Little MA. Myeloid Engraftment in Humanized  
470 Mice: Impact of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment and Transgenic  
471 Mouse Strain. *Stem Cells Dev* 2016;25:530–541.
- 472 35. Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, Ida-Tanaka M,  
473 Suemizu H, Nunomura S, Ra C, Mori A, Aiso S, Ito M. Establishment of a Human  
474 Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF–Transgenic NOG Mice. *The Journal of*  
475 *Immunology* 2013;191:2890–2899.
- 476 36. Wunderlich M, Chou F-S, Link KA, Mizukawa B, Perry RL, Carroll M, Mulloy JC.  
477 AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice  
478 constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia* 2010;24:1785–  
479 1788.
- 480 37. Bernstein DI, Jr JAB, Fogh BS, Kaur A, Li Z, Nolte H. A practical guide to the  
481 sublingual immunotherapy tablet adverse event profile: implications for clinical  
482 practice. *Postgraduate Medicine* 2017;129:590–597.
- 483 38. Calderón MA, Vidal C, Rodríguez Del Río P, Just J, Pfaar O, Tabar AI, Sánchez-  
484 Machín I, Bubel P, Borja J, Eberle P, Reiber R, Bouvier M, Lepelliez A, Klimek L,  
485 Demoly P, EASSI Doctors' Group. European Survey on Adverse Systemic Reactions  
486 in Allergen Immunotherapy (EASSI): a real-life clinical assessment. *Allergy*  
487 2017;72:462–472.

- 488 39. Jutel M, Rudert M, Kreimendahl F, Kuna P. Efficacy and tolerability of a house  
489 dust mite allergoid in allergic bronchial asthma: a randomized dose-ranging trial.  
490 *Immunotherapy* 2018;10:1149–1161.
- 491 40. Roger A, Depreux N, Jurgens Y, Serra AT, Heath MD, Garcia G, Skinner MA.  
492 A novel microcrystalline tyrosine-adsorbed, mite-allergoid subcutaneous  
493 immunotherapy: 1-year follow-up report. *Immunotherapy* 2016;8:1169–1174.
- 494 41. Carnes J, Gallego MT, Moya R, Iraola V. Allergoids for Allergy Treatment.  
495 *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2018;12:110–119.
- 496 42. Worm M, Ernst D, Kraller M, Babina M. The Impact on Allergy-Related Cells of  
497 a Birch Pollen Allergoid, with and without Monophosphoryl Lipid A, in Comparison with  
498 the Native Equivalent. *Int Arch Allergy Immunol* 2017;172:20–26.
- 499 43. Sirvent S, Soria I, Cirauqui C, Cases B, Manzano AI, Diez-Rivero CM, Reche  
500 PA, López-Relaño J, Martínez-Naves E, Cañada FJ, Jiménez-Barbero J, Subiza J,  
501 Casanovas M, Fernández-Caldas E, Subiza JL, Palomares O. Novel vaccines  
502 targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance  
503 allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death  
504 ligand 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;138:558-567.e11.
- 505 44. Benito-Villalvilla C, Soria I, Subiza JL, Palomares O. Novel vaccines targeting  
506 dendritic cells by coupling allergoids to mannan. *Allergo J Int* 2018;27:256–262.
- 507 45. Simons FE, Imada M, Li Y, Watson WT, HayGlass KT. Fel d 1 peptides: effect  
508 on skin tests and cytokine synthesis in cat-allergic human subjects. *Int Immunol*  
509 1996;8:1937–1945.
- 510 46. Klimek L, Fox G-C, Thum-Oltmer S. SCIT with a high-dose house dust mite  
511 allergoid is well tolerated: safety data from pooled clinical trials and more than 10 years  
512 of daily practice analyzed in different subgroups. *Allergo J Int* 2018;27:131–139.

513 47. Martínez D, Munera M, Cantillo JF, Wortmann J, Zakzuk J, Keller W, Caraballo  
514 L, Puerta L. An Engineered Hybrid Protein from *Dermatophagoides pteronyssinus*  
515 Allergens Shows Hypoallergenicity. *Int J Mol Sci* 2019;20:.

516 48. Felice GD, Colombo P. Nanoparticle&ndash;allergen complexes for allergen  
517 immunotherapy. *International Journal of Nanomedicine*  
518 2017;doi:10.2147/IJN.S134630.

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535 **Figures Legend**

536 **Figure 1.** (A) A mouse model of HDM-induced allergic asthma. (B) Lung  
537 resistances of control (white circles), asthmatic (black circles), and dexamethasone-

538 (white triangles) and Der p 2.1-treated (black squares) mice were obtained by Flexivent  
539 with increasing doses of methacholine challenges (n = 7-8 mice per group). (C) BAL  
540 cells were collected by washing the lung with 1 ml of PBS after tracheotomy. BAL fluids  
541 were centrifuged and stained for flow cytometry analysis of lymphocytes,  
542 macrophages, eosinophils and neutrophils (control n= 4, asthmatic n = 6,  
543 dexamethasone n = 6 and Der p 2.1 n = 8). (D) Lungs were perfused with 4%  
544 paraformaldehyde, embedded in paraffin and then stained with hematoxylin eosin  
545 coloration: CTL (control), HDM (asthmatic), Dexa (dexamethasone) and Der p 2.1 (Der  
546 p 2.1 peptide) (n = 6-8 mice per group). (E) Histological slices were scored on 12  
547 points; 4 points were dedicated to morphologic alteration and 8 points to inflammation  
548 (n = 6-8 mice per group). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01,  
549 \*\*\* $P$ <0.001 and \*\*\*\* $P$ <0.0001 using Bonferroni tests. NS = not significant and PBS =  
550 phosphate-buffered saline.

551 **Figure 2.** (A and B) BAL was collected by washing lungs with 1 ml of PBS and  
552 centrifuged. The supernatant was collected, and the BAL cytokines IL-4, IL-5, IL-13  
553 and IL-17 were quantified by Luminex technology according to the manufacturer's  
554 instructions (n = 5-6 mice per group). (B, D and E) Lungs were mechanically disrupted  
555 and filtered, and red blood cells were lysed with red blood cell lysis buffer. Cells were  
556 stimulated for 6 hours with HDM extract, followed by extracellular and intracellular  
557 staining, and then Treg cells expressing CD3, CD4, CD25 and Foxp3, Th2 cells  
558 expressing Gata3 and IL-13, and Th17 cells expressing ROR $\gamma$ t and IL-17 were  
559 assessed by flow cytometry (control n = 4, asthmatic, dexamethasone and Der p 2.1 n  
560 = 6 mice per group). (F) Blood was collected from the heart and centrifuged. Serum  
561 was extracted from the supernatant and added to 96-well dark plates coated with HDM  
562 total extract, and HDM-specific IgE was detected by indirect ELISA. IgE values are

563 expressed in arbitrary units obtained by the ratio of sample fluorescence/basal  
564 fluorescence. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001  
565 and \*\*\*\* $P$ <0.0001 using Bonferroni tests. NS = not significant.

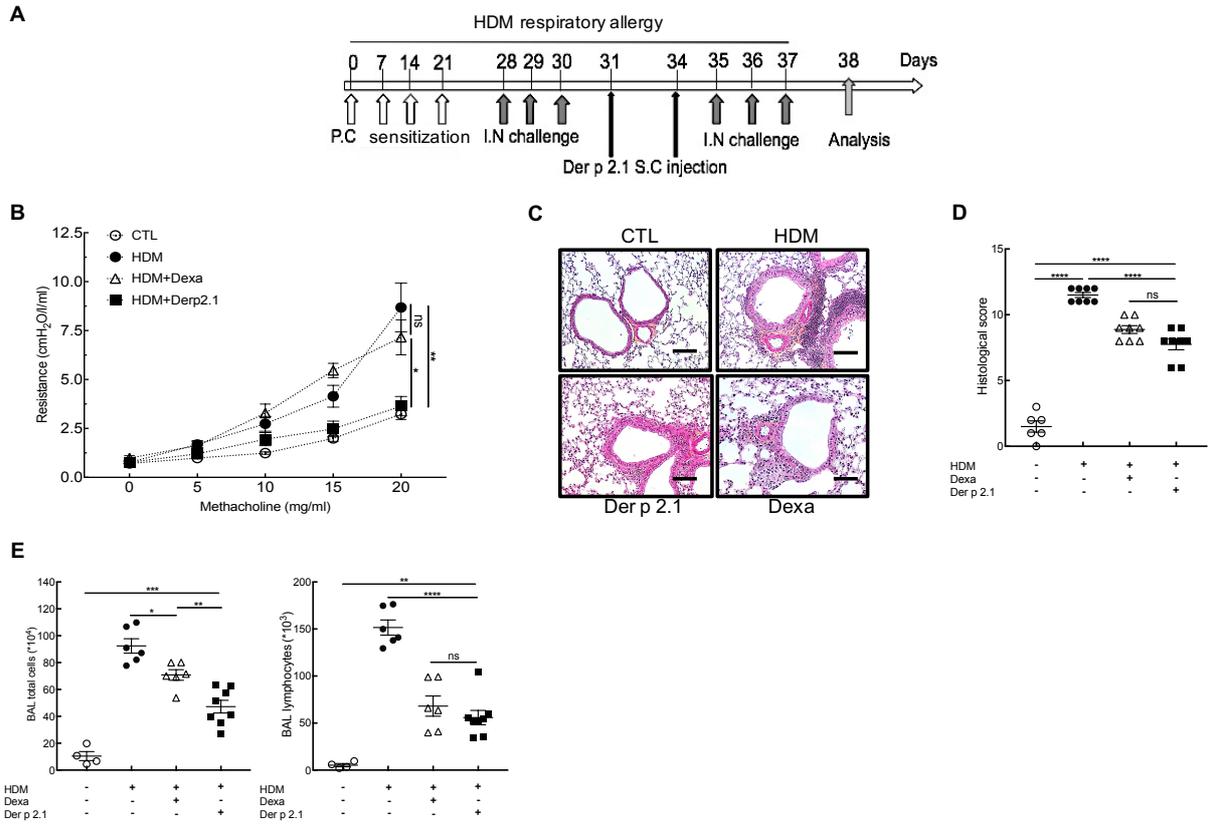
566 **Figure 3.** (A, B, C, D, E and F) Bone marrow derived cells (BMDCs) from naïve  
567 mice were cultured in complete growth medium supplemented with IL-4 and GM-CSF  
568 for 8 days to obtain dendritic cells (DCs). DCs were harvested and stimulated for 24  
569 hours with HDM extract or Der p 2.1 or both. After stimulation, dendritic cells were  
570 cocultured for 2 days with sorted CD4<sup>+</sup> naïve T cells from the spleen by a negative  
571 enrichment kit and were harvested and stained for flow cytometry analysis. Treg, Th2,  
572 Th17 and IL-10<sup>+</sup> DC subsets were quantified in response to no stimulation (white  
573 circles), HDM stimulation (black circles), Der p 2.1 stimulation (white squares) and  
574 HDM plus Der p 2.1 stimulation (black squares) (n = 6 mice per group). Data are  
575 presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001 using Bonferroni  
576 tests. NS = not significant.

577 **Figure 4.** (A) A humanized mouse model of HDM-induced asthma. (B) Lung  
578 resistances of control (white circles), asthmatic (black circles) and Der p 2.1--treated  
579 (black squares) mice were obtained by Flexivent with increasing doses of  
580 methacholine challenges (n = 4 mice per group). (C) Lungs were perfused with 4%  
581 paraformaldehyde, embedded in paraffin and then stained with hematoxylin eosin  
582 staining: CTL (control), HDM (asthmatic) and Der p 2.1 (Der p 2.1 peptide) (n = 4 mice  
583 per group). (D) Histological slices were scored on 12 points; 4 points were dedicated  
584 to morphologic alteration and 8 points to inflammation (n = 4 mice per group). Data are  
585 presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 and \*\*\*\* $P$ <0.0001 using  
586 Bonferroni tests.

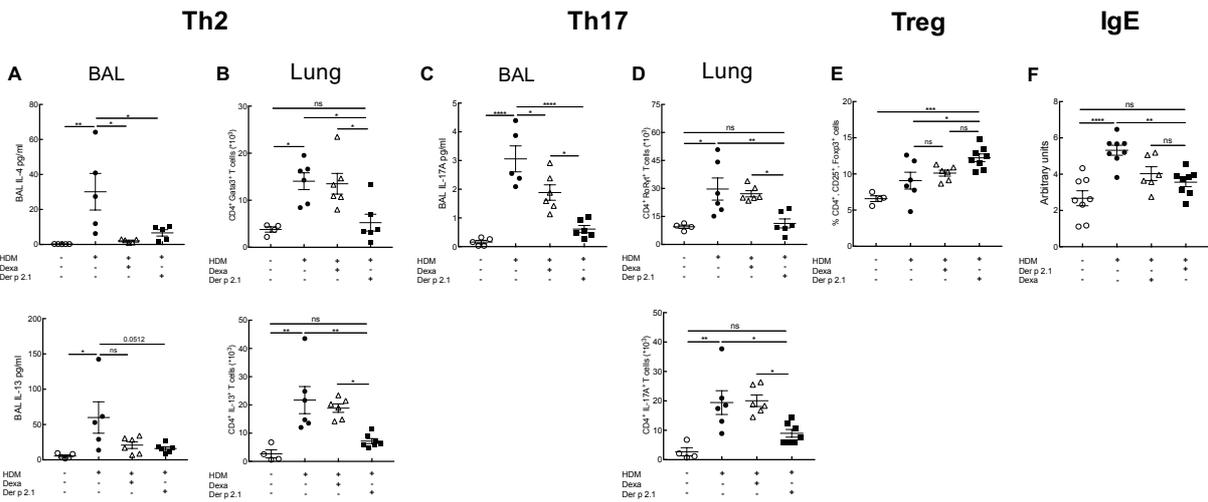
587 **Figure 5.** (A, B and C) Lungs were mechanically disrupted and filtered, and red  
588 blood cells were lysed with red blood cell lysis buffer. Cells were stimulated for 6 hours  
589 with HDM extract and stained. Treg, Th2 and Th17 cells were assessed by flow  
590 cytometry (n = 4 mice per group). (D) Serum was extracted, the supernatant was added  
591 to 96-well dark plates coated with HDM total extract, and HDM-specific IgE was  
592 detected by indirect ELISA. IgE values are expressed in arbitrary units obtained by the  
593 ratio of sample fluorescence/basal fluorescence. Data are presented as the mean  $\pm$   
594 SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001 using Bonferroni tests. NS = not significant.

For Review Only

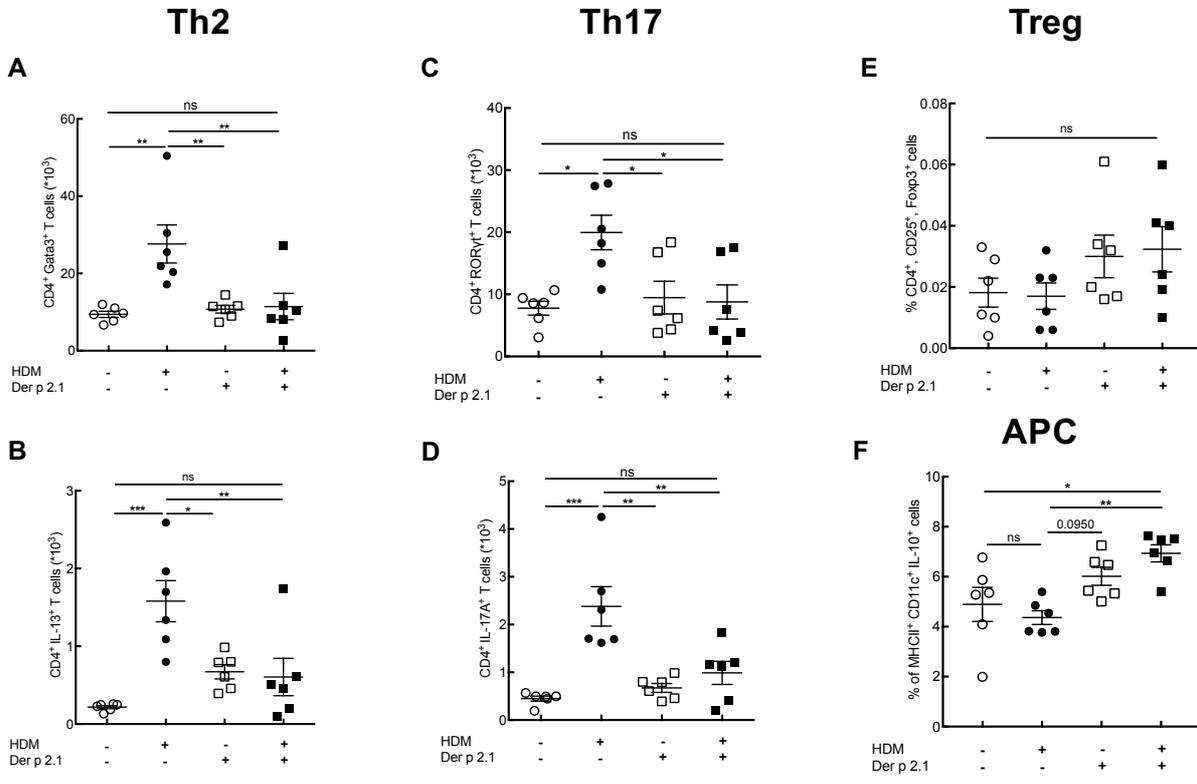
**Figure 1**



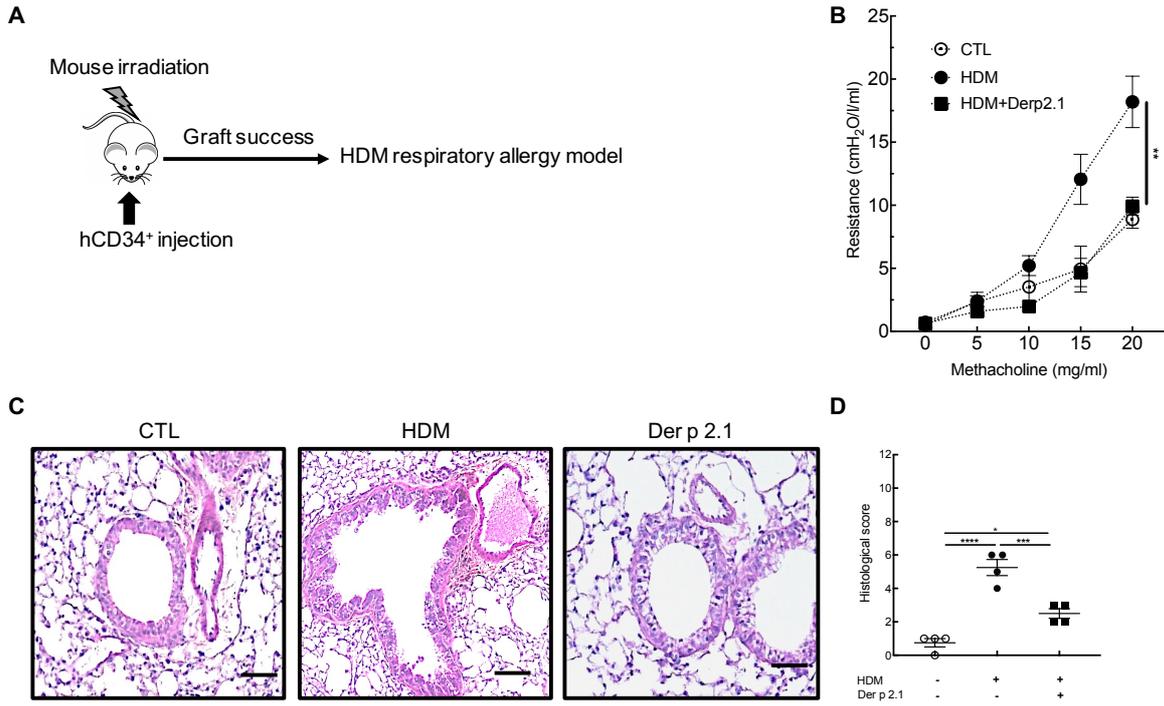
**Figure 2**



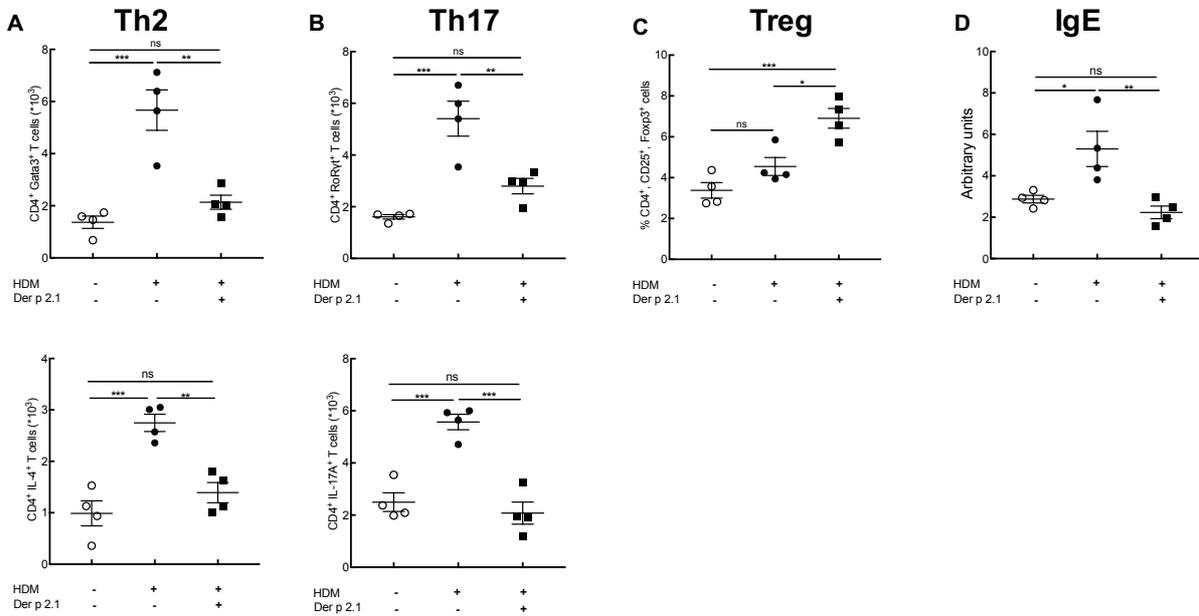
**Figure 3**



**Figure 4**

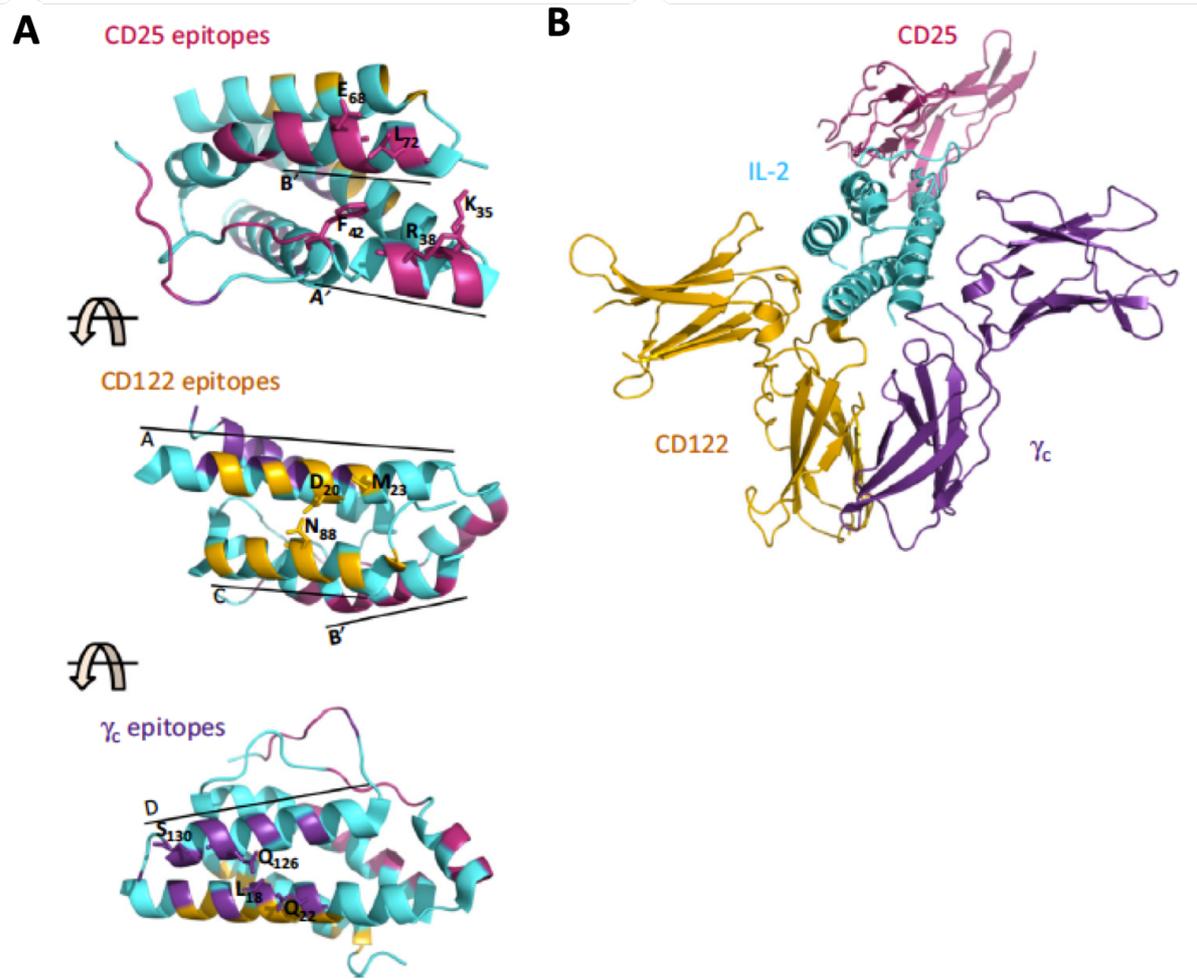


**Figure 5**



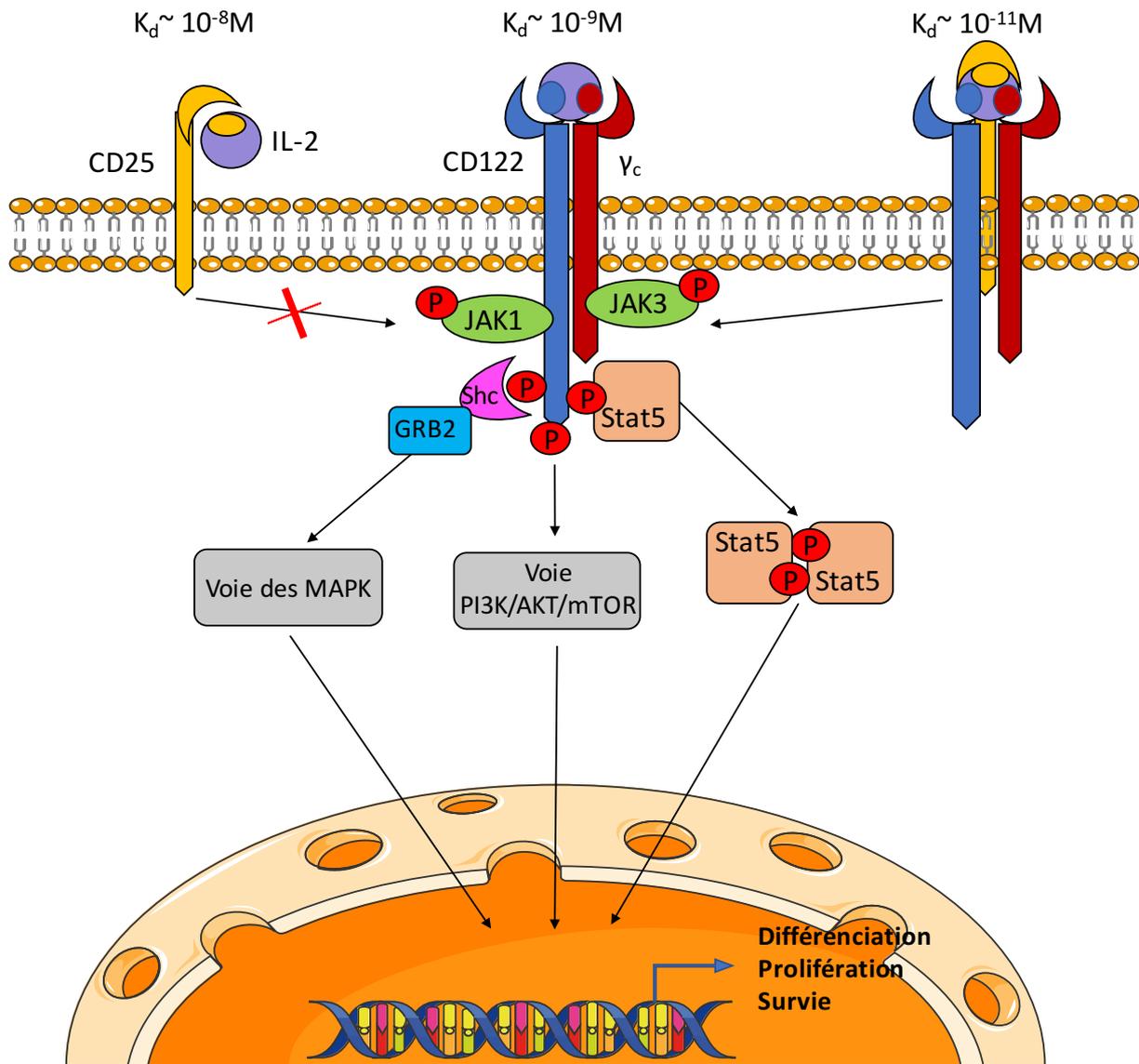
## 2) Efficacité thérapeutique du complexe IL-2/anti-IL-2 (IL-2 Cx) dans l'asthme allergique aux acariens

L'interleukine 2 (IL-2) appartient à la famille des cytokines à chaîne gamma ( $\gamma_c$ ) parmi lesquelles on retrouve l'IL-4, -7, -9, -15 et -21, utilisant le récepteur  $\gamma_c$  pour réguler la survie, la génération et l'homéostasie lymphocytaire (Rochman et al., 2009). L'IL-2 est principalement produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, elle est également produite en plus faible quantité par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les cellules dendritiques, les cellules natural killer (NK) et T natural killer (NKT) (Boyman and Sprent, 2012). L'action de l'IL-2 s'exerce via sa fixation sur les différentes formes de son récepteur : monomérique, dimérique et trimérique (Malek and Castro, 2010). Le récepteur monomérique de l'IL-2 correspond à la sous-unité alpha du dit récepteur (IL-2R $\alpha$  ou CD25), le récepteur dimérique est composé des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma_c$  (respectivement CD122 et CD132) et pour finir, le récepteur trimérique est quant à lui composé des 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_c$  (**Figure 29**). Les parties  $\beta$  et  $\gamma_c$  du récepteur à l'IL-2 sont majoritairement co-exprimées par les lymphocytes T effecteurs, mémoires et les cellules NK (Kalia et al., 2010; Krieg et al., 2010; Obar et al., 2010). Le récepteur trimérique composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_c$  est quant à lui exprimé majoritairement et de façon constitutive sur les Treg (Setoguchi et al., 2005), de façon plus transitoire sur les T effecteurs (Obar et al., 2010) et est également présent sur les cellules endothéliales (Downie et al., 1992).



**Figure 29 : Structure et association de l'IL-2 avec les différentes sous-unités de son récepteur. D'après Arenas-Ramirez et al., 2015. IL-2 humaine (bleu) et ses épitopes pour le CD25 (rose), CD122 (jaune) et  $\gamma_c$  (violet) (A). Structure du complexe IL-2/IL-2 récepteurs avec l'IL-2 (bleu), CD25 (rose), CD122 (jaune) et  $\gamma_c$  (violet) (B).**

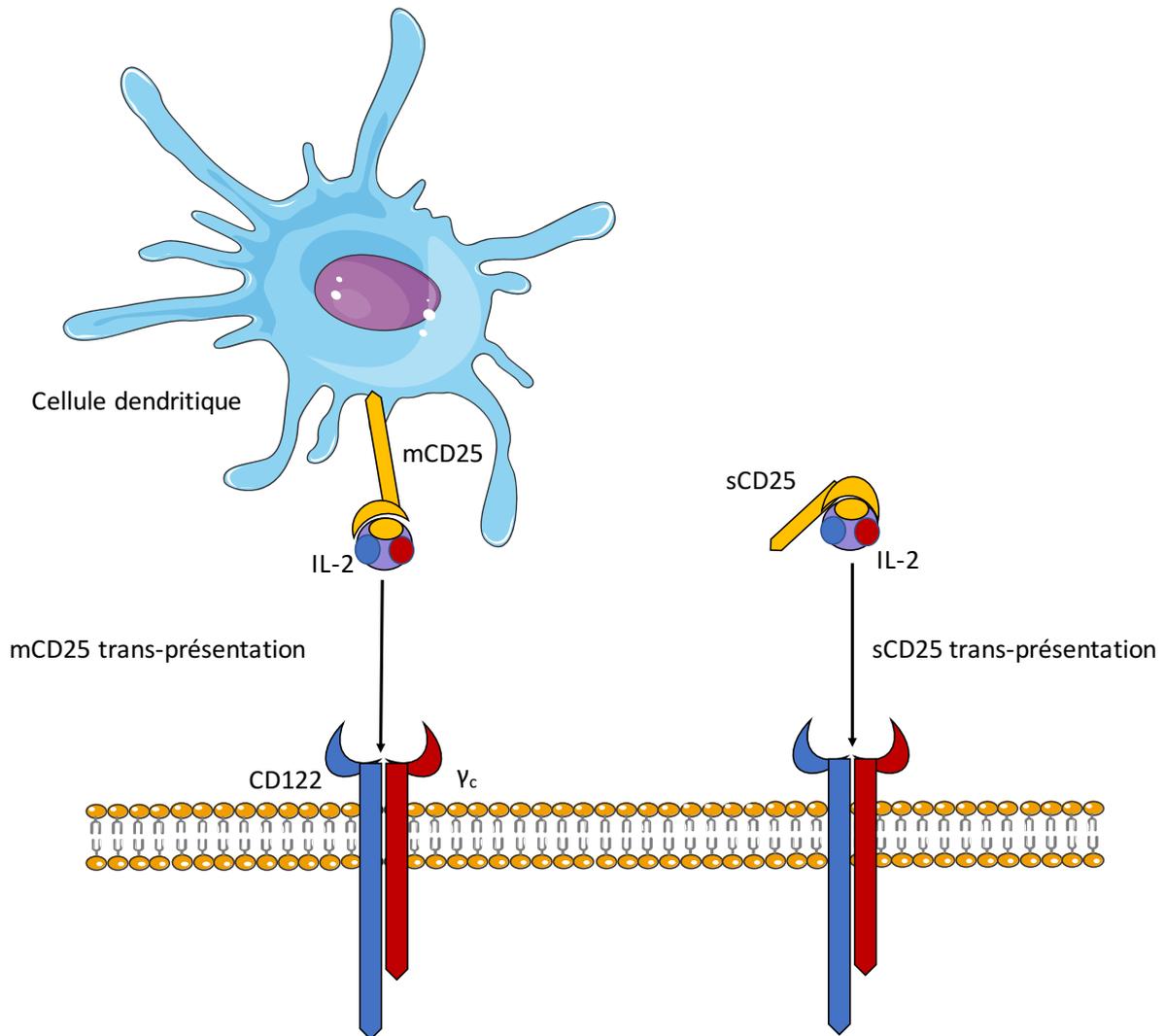
L'IL-2 possède des affinités différentes pour chacun de ses récepteurs, représentée par une constante de dissociation ( $K_d$ ). La fixation de l'IL-2 sur son récepteur  $\alpha$  est de faible affinité ( $K_d \sim 10^{-8}M$ ), cette liaison peut avoir lieu dans le cytoplasme ou au niveau membranaire, mais il ne peut en aucun cas induire une transduction de signal dans la cellule (Taniguchi and Minami, 1993). Le récepteur dimérique possède une affinité dite moyenne pour l'IL-2 ( $K_d \sim 10^{-9}M$ ), le récepteur trimérique possède quant à lui une affinité 100 fois plus forte que le récepteur monomérique pour l'IL-2 ( $K_d \sim 10^{-11}M$ ). Les récepteurs dimérique et trimérique peuvent en revanche induire une transduction de signal dans la cellule après fixation de l'IL-2 (Taniguchi and Minami, 1993) (**Figure 30**).



**Figure 30 : Fixation de l'IL-2 et signalisation au travers de ses différents récepteurs.** La liaison de l'IL-2 sur le CD25 seul n'induit pas de signalisation dans la cellule. En revanche, les liaisons de l'IL-2 aux récepteurs dimérique et trimérique induit une hétérodimérisation de leur queue cytoplasmique, conduisant à l'activation de JAK1 et JAK3 (associés au CD122 et à  $\gamma_c$  respectivement). L'activation de JAK1 et JAK3 permet le recrutement de la protéine adaptatrice Shc, ainsi que de STAT5. La phosphorylation de STAT5 permet la formation de dimères et de tétramères pouvant se transloquer dans le noyau, où ils se lient sur des gènes cibles responsable de l'activation, la différenciation et de la prolifération cellulaire. Ces mêmes gènes sont également activés par la phosphorylation de Shc et PI3K, induisant respectivement l'activation de la voie des MAP kinase et PI3K-AKT-mTOR. JAK1 : Janus kinase 1, JAK3 : Janus kinase 3, Shc : Src homology et collagen, STAT : Signal transducer and activator of transcription, GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2, MAPK : Mitogen-associated protein kinase, PI3K : Phosphoinositide 3-kinase, AKT : Protein kinase B, mTOR : Mammalian target of rapamycin.

L'IL-2 peut également se fixer sur ces récepteurs via un phénomène dit de trans-présentation. Le CD25 peut être exprimé sous deux formes : membranaire (mCD25) et soluble

(sCD25) (Rubin and Nelson, 1990). L'expression du mCD25 seul n'induit pas de transduction de signal pour la cellule l'exprimant, il en va de même pour le sCD25. En revanche, certaines cellules telles que les cellules dendritiques exprimant le mCD25 peuvent trans-présenter l'IL-2 captée par celui-ci, aux cellules T exprimant les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma_c$  du récepteur à l'IL-2 induisant leur activation (Wuest et al., 2011). Le sCD25 est également capable après sa liaison à l'IL-2 de la trans-présenter aux cellules (Yang et al., 2011) (**Figure 31**).



**Figure 31 : Différents mécanismes de trans-présentation de l'IL-2 par le CD25.**

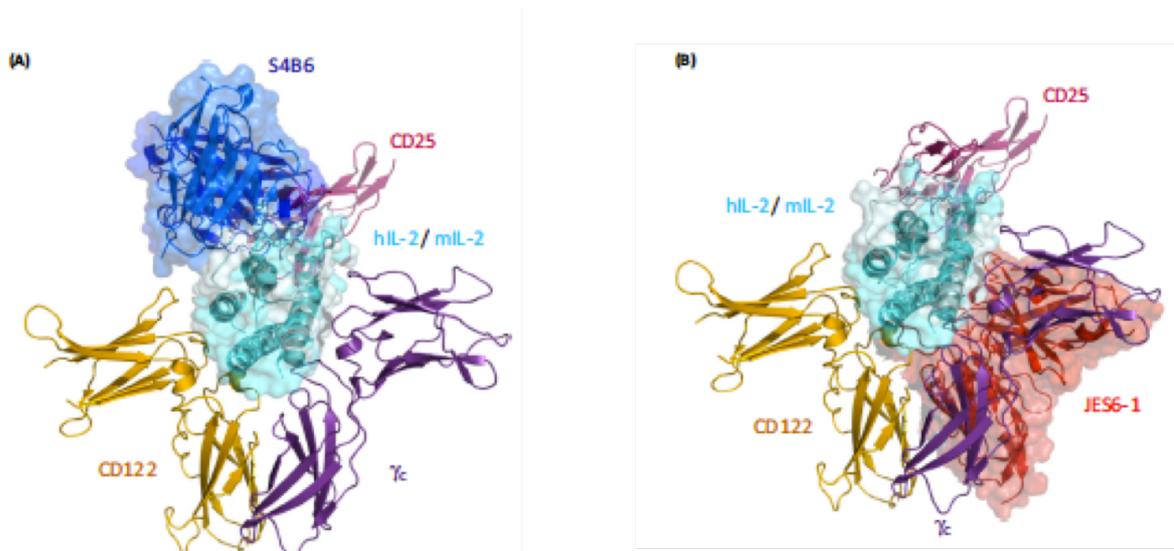
L'homéostasie de l'IL-2 s'exerce au travers de deux acteurs majoritaires : les T effecteurs et les Treg. L'équilibre entre le taux de production de l'IL-2 par les T effecteurs et son taux de consommation par les Treg permet le maintien de cette homéostasie (Malek and Castro, 2010). En revanche, dans un système pathologique inflammatoire chronique suite à une stimulation antigénique via leur TCR, les T effecteurs vont produire de forte quantité d'IL-2 dans les organes lymphoïdes secondaires (Kalia et al., 2010). Ces grandes quantités d'IL-2

vont agir de manière autocrine sur les T effecteurs l'ayant secrété en augmentant leur prolifération et leur sécrétion d'IL-2 (Setoguchi et al., 2005). Le taux d'IL-2 produite va alors dépasser le taux d'IL-2 pouvant être consommé par les Treg, le déséquilibre de la balance T effecteurs/Treg en faveur des T effecteurs entraîne de ce fait un emballement de la réponse inflammatoire. Dans l'asthme, le défaut qualitatif et quantitatif de Treg semble aggraver cet emballement inflammatoire.

Plusieurs études se sont concentrées sur l'utilisation d'IL-2 pour favoriser l'immunosuppression ou rétablir une tolérance de par l'induction de Treg. Néanmoins, les chercheurs se sont heurtés à plusieurs problèmes de taille. Le premier étant la demi-vie de l'IL-2. En effet, l'IL-2 ne perdure que quelques minutes avant d'être entièrement éliminée par la clairance rénale (Donohue and Rosenberg, 1983). Cette demi-vie peut cependant être augmenter en associant l'IL-2 à une protéine de transport de type IgG ou bien par administration répétée d'IL-2, mais conduit au second problème lié à cette cytokine. L'IL-2 possède une toxicité dose dépendante appelée syndrome de fuites vasculaires (VLS). Ce syndrome, médié par la fixation de l'IL-2 sur les cellules endothéliales, est associé à une augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'hypotension, des œdèmes pulmonaires et des dysfonctions rénales (Boyman et al., 2006a; McDermott and Atkins, 2004). L'homéostasie de l'IL-2 peut également intervenir via l'action du CD25. L'expression de la forme membranaire et soluble du CD25 est augmentée lors de pathologies inflammatoires et dans les cancers (Rubin and Nelson, 1990). Dans l'asthme de hauts taux de mCD25 et sCD25 ont été retrouvés chez des enfants asthmatiques lors d'exacerbations (Shi et al., 1999). Le rôle du sCD25 reste néanmoins controversé de l'homéostasie de l'IL-2. Certaines études *in vitro* montrent que sCD25 entrerait en compétition avec les lymphocytes T activés pour la liaison de l'IL-2, entraînant l'inhibition de la prolifération des cellules T (Lindqvist et al., 2010). Le sCD25 peut également faire une trans-présentation d'IL-2 aux cellules T, induisant leur différenciation en Treg (Yang et al., 2011). Rubin, Lindqvist et Yang suggèrent également que le sCD25 participerait à la fois à la privation des cellules T effectrices en IL-2 et à l'induction de Treg *in vivo*. D'un autre côté, les rôles du CD25 et des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma_c$  exprimées par des cellules non-immunitaires telles que les cellules endothéliales mais aussi sur les cellules lymphoïdes innées de type 2 restent méconnues (Krieg et al., 2010; Spits et al., 2013). Krieg suggère que l'expression du CD25 sur les cellules endothéliales pulmonaire et sa liaison à l'IL-2 serait responsable du syndrome de fuites vasculaires (Krieg et al., 2010). Ces différents

problèmes peuvent être contournés avec l'utilisation de complexes associant de faibles doses d'IL-2 et un anticorps bloquant anti-IL-2.

En effet, plusieurs travaux montrent que l'association de l'IL-2 et d'anticorps monoclonal bloquant l'IL-2 ne permet pas de bloquer son activité, mais au contraire augmente sa demi-vie, son activité biologique et augmente sa spécificité pour certains types cellulaires. L'utilisation de l'IL-2 associée à un anti-IL-2 murin (le S4B6) permet de stimuler spécifiquement les cellules NK et T CD8<sup>+</sup> mémoires (CD25<sup>-</sup>) sans pour autant activer les Treg (CD25<sup>+</sup>) ou induire de VLS (Boyman et al., 2006a; Courtney et al., 1994; Sato et al., 1993). Une sélectivité et des effets similaires ont été observés en associant de l'IL-2 humaine et un anti-IL-2 humain (le MAB602) (Krieg et al., 2010). Un autre complexe formé de l'IL-2 et d'un autre anticorps murin (le JES6-1) a été étudié dans le cadre de la transplantation. Le complexe IL-2-JES6-1 permet quant à lui d'élargir spécifiquement les Treg (CD25<sup>+</sup>) favorisant une tolérance et sans affecter les NK ou les T CD8<sup>+</sup> (CD25<sup>-</sup>) responsables du rejet du greffon (Boyman et al., 2006b; Webster et al., 2009). L'association de l'IL-2 humaine et de son anticorps bloquant humain (le 5344) permet également d'obtenir les mêmes effets chez la souris (Letourneau et al., 2010). La sélectivité des complexes IL-2/anti-IL-2 pour certains types cellulaires proviendrait de la liaison de l'anticorps à l'IL-2. La liaison IL-2-S4B6/IL-2-MAB602 masquerait les sites de fixation pour le CD25 favorisant la fixation sur le récepteur dimérique, de son côté la liaison IL-2-JES6-1/IL-2-5344 masquerait partiellement les sites de fixations sur les récepteurs  $\beta$  et  $\gamma_c$  favorisant la fixation sur le récepteur trimérique (Arenas-Ramirez et al., 2015) (**Figure 31**). La question d'une activation des cellules T par trans-présentation des complexes IL-2/anti-IL-2 reste sujette à débat. Les différents complexes présentés précédemment sont composés d'anticorps de type IgG (Boyman et al., 2006b; Letourneau et al., 2010). Les cellules dendritiques expriment à leur surface le récepteur de la partie constante des IgG (Fc $\gamma$ R), qui permet une trans-présentation via les IgG (Amigorena, 2002). Ce mécanisme est pour l'instant peu étudié mais reste néanmoins non négligeable dans l'étude du fonctionnement des complexes cytokines/anti-cytokines.



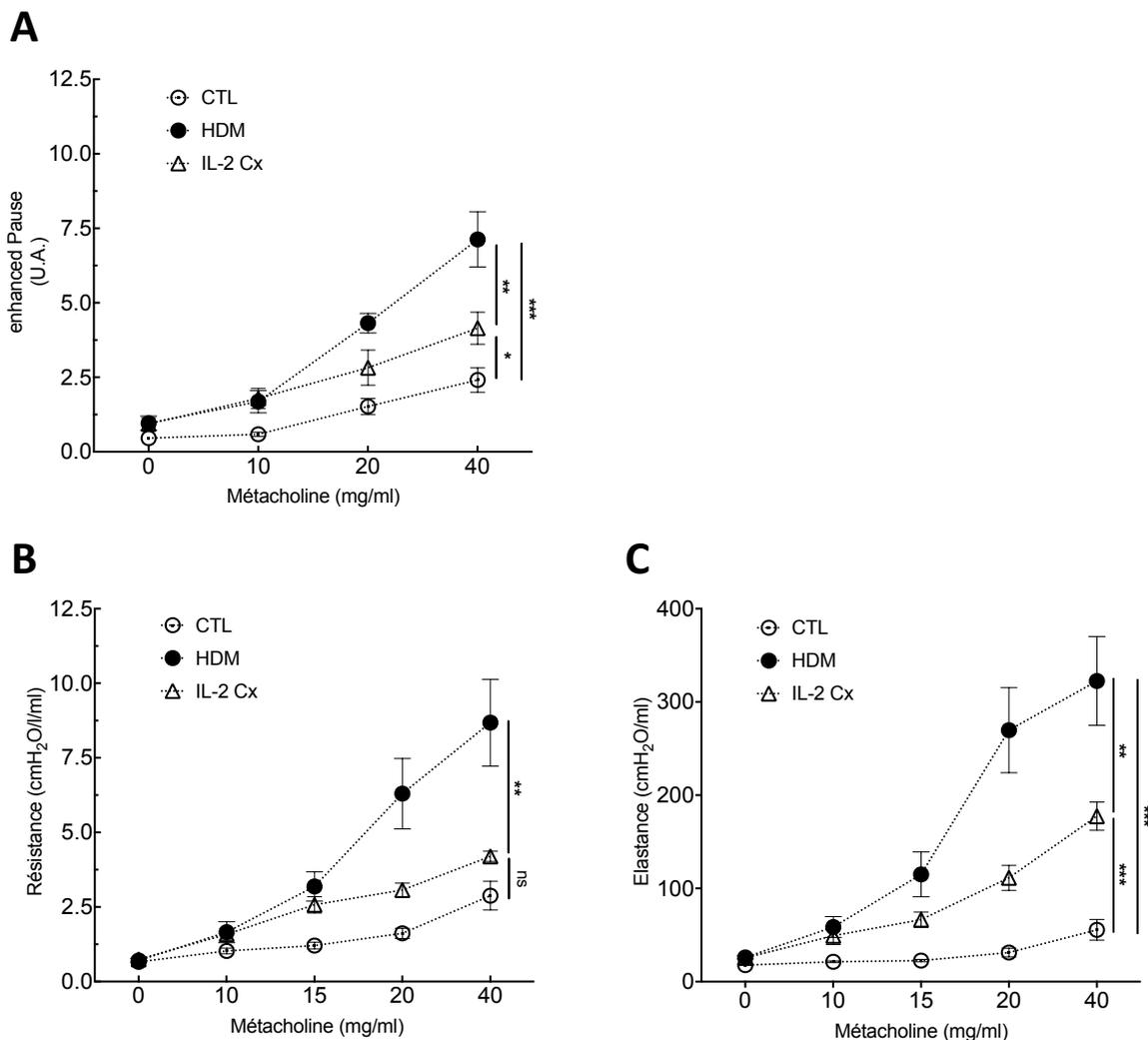
**Figure 32 : Structure 3D des complexes IL-2/anti-IL-2. D'après Arenas-Ramirez et al., 2015.**  
 (A) S4B6 recouvrant une portion du CD25 et (B) JES6-1 recouvrant la majorité du  $\gamma_c$ .

En se basant sur l'ensemble de ces travaux, nous avons développé par hybridome plusieurs clones d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-2. Les différents tests de compétitivité et de sélectivité nous ont permis de sélectionner un candidat liant l'IL-2 avec une sélectivité pour les Treg : le 1C6. Nous sommes donc venus à émettre l'hypothèse selon laquelle, l'administration d'un complexe IL-2-1C6 (IL-2 Cx) pourrait restaurer la déficience en Treg liée à l'asthme et par extension moduler la réponse inflammatoire. Pour ce faire, nous avons généré un modèle murin d'asthme allergique aux acariens et administré l'IL-2 Cx selon une approche thérapeutique. L'efficacité de l'IL-2 Cx a été évaluée au travers de la fonction respiratoire, de l'histologie et du statut inflammatoire des souris.

### III.2.1. L'hyperréactivité bronchique est diminuée après traitement par IL-2 Cx

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'IL-2 Cx, nous avons mesuré ses effets sur l'hyperréactivité bronchique dans un modèle murin d'asthme chronique allergique aux acariens (Figure 25). Les premières mesures du temps de pause expiratoire (Penh ou enhanced Pause) montrent que les souris asthmatiques (HDM) ont une Penh significativement plus élevée que les souris non asthmatiques (CTL) en réponse à la métacholine (6,07 vs 2,085,  $p < 0,002$ ). Par contraste, les souris asthmatiques traitées par l'IL-2 Cx (IL-2 Cx) montrent une diminution de leur Penh par rapport aux souris asthmatiques (3,57 vs 6,07 U.A,  $p = 0,0078$ ), mais conservent néanmoins une Penh plus élevée que les souris non asthmatiques (3,57 vs

2,085 U.A,  $p = 0,0159$ ) (Figure 33A). Ce premier résultat semble indiquer une diminution de l'hyperréactivité bronchique avec un traitement par IL-2 Cx. Néanmoins, la Penh ne permet d'étudier que les voies aériennes supérieures, or les paramètres tels que la résistance et l'élastance des poumons et par extension, des bronches sont plus révélateurs d'une hyperréactivité bronchique. A l'aide de la technique des oscillations forcées (FlexiVent®), nous observons en réponse à la métacholine une augmentation de la résistance et de l'élastance chez souris asthmatiques par rapport aux souris non asthmatiques (8,199 vs 2,337  $\text{cmH}_2\text{O/l/ml}$ ,  $p = 0,013$  et 292,8 vs 40,51  $\text{cmH}_2\text{O/ml}$ ,  $p = 0,007$  respectivement), en revanche les souris traitées avec l'IL-2 Cx voient ces deux paramètres diminuer significativement par rapport aux souris asthmatiques (4,234 vs 8,199  $\text{cmH}_2\text{O/l/ml}$ ,  $p = 0,0023$  et 192,3 vs 292,8  $\text{cmH}_2\text{O/ml}$ ,  $p = 0,0023$  respectivement). Il est intéressant de noter que les souris traitées par l'IL-2 Cx ne possèdent pas de résistance plus élevée que les souris non asthmatiques (non significatif), en revanche leur élastance reste supérieure (192,3 vs 40,51  $\text{cmH}_2\text{O/ml}$ ,  $p = 0,0003$ ) (Figure 33B et C). Ces premiers résultats montrent un effet de l'IL-2 Cx sur l'hyperréactivité bronchique mais certains paramètres comme la Penh et l'élastance restent élevés. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que des lésions tissulaires au niveau bronchique semblent en partie perdurer malgré le traitement. Il serait également intéressant de regarder les populations immunitaires locales aux niveaux des lavages broncho-alvéolaires et des poumons.

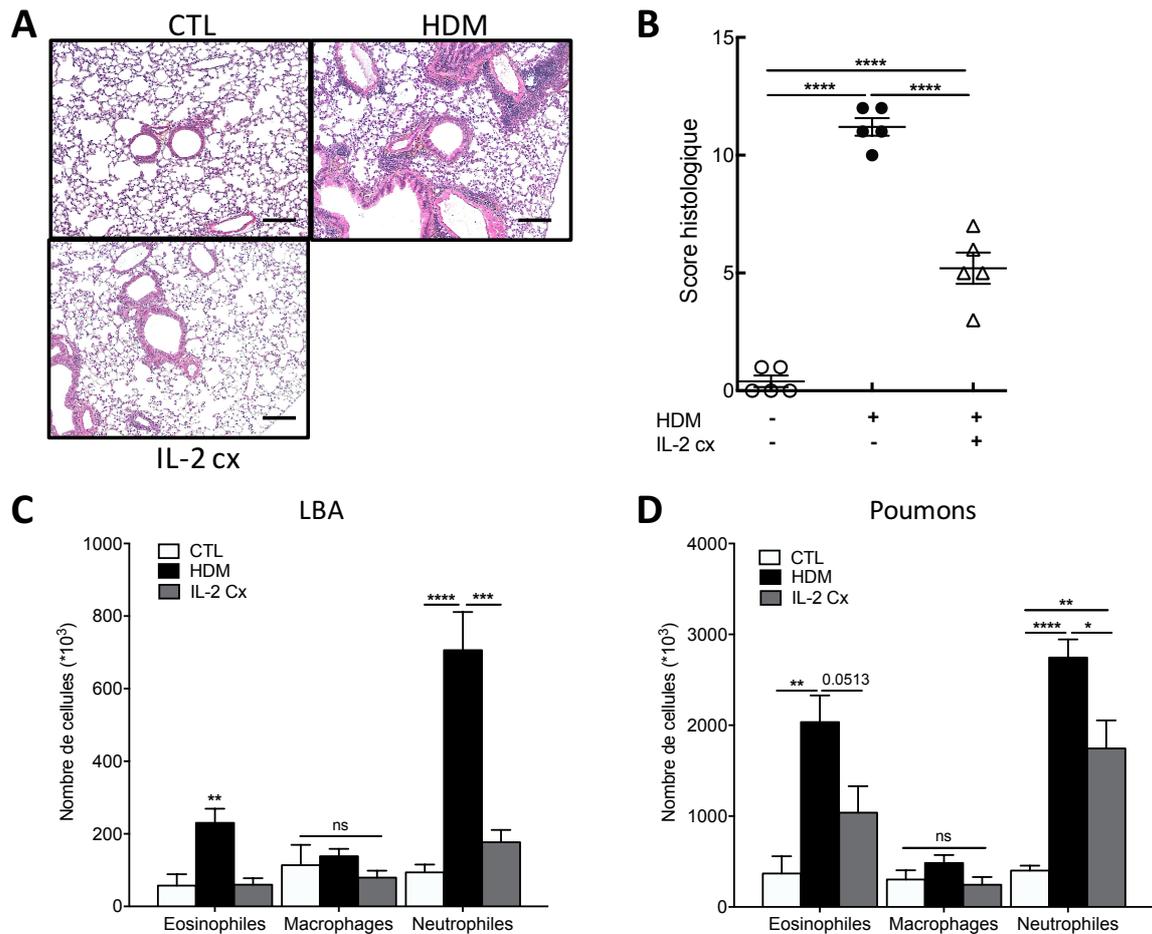


**Figure 33 : Mesure de l'hyperréactivité bronchique des voies aériennes supérieures et inférieures suite à un traitement de l'asthme par IL-2 Cx.** L'hyperréactivité bronchique a été évaluée en mesurant le temps de pause expiratoire (Penh) par pléthysmographie (A), ainsi que les paramètres de résistance (B) et d'élastance (C) par FlexiVent® en réponse à des doses croissantes de métacholine. N = 8 souris par groupe, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; ns = non significatif.

### III.2.2. Réduction de l'infiltrat pulmonaire et du score histologique

Afin d'évaluer l'impact de l'IL-2 Cx sur le tissu pulmonaire, nous avons analysé des coupes histologiques correspondant aux souris non-asthmatiques, asthmatiques et traitées. Les premières observations montrent que les souris asthmatiques présentent une hyperplasie de leurs cellules épithéliales et présentent un fort infiltrat péri vasculaire et péri bronchique. En revanche les souris traitées avec l'IL-2 Cx voient leur infiltrat disparaître, avec néanmoins une hyperplasie des cellules épithéliales persistante (Figure 34A). La quantification des atteintes tissulaires du poumon se fait à l'aide d'un score histologique, plus ce score est élevé,

plus les altérations sont importantes. Celui-ci se base à la fois sur des critères morphologiques et inflammatoires. Les souris asthmatiques possèdent un score nettement plus élevé que les souris non-asthmatiques (11,2 vs 0,4,  $p < 0,0001$ ). Les souris traitées, quant à elles, voient leur score diminuer comparativement aux souris asthmatiques (5,2 vs 11,2,  $p < 0,0001$ ), en revanche ce score reste plus élevé que les souris non-asthmatiques (5,2 vs 0,4,  $p < 0,0001$ ) probablement dû à la persistance de l'hyperplasie des cellules épithéliales (Figure 34B). Concernant l'inflammation présente dans les lavages broncho-alvéolaires, les souris asthmatiques présentent une augmentation du nombre d'éosinophiles et de neutrophiles par rapport aux souris non-asthmatiques ( $230,5 \cdot 10^3$  vs  $57,6 \cdot 10^3$ ,  $p = 0,0045$  et  $706 \cdot 10^3$  vs  $93,67 \cdot 10^3$ ,  $p < 0,0001$  respectivement). En revanche, il est intéressant de constater une nette diminution des éosinophiles et des neutrophiles lorsque les souris sont traitées avec l'IL-2 Cx par rapport aux souris asthmatiques ( $60 \cdot 10^3$  vs  $230,5 \cdot 10^3$ ,  $p = 0,0035$  et  $177 \cdot 10^3$  vs  $706 \cdot 10^3$ ,  $p = 0,0001$  respectivement) et avec des taux similaires par rapport aux souris non-asthmatiques (non significatifs). En revanche, aucune variation n'est observée pour les macrophages quel que soit les conditions (Figure 34C). Au niveau pulmonaire, nous constatons que l'IL-2 Cx permet également de réduire le nombre d'éosinophiles et de neutrophiles par rapport aux souris asthmatiques ( $1038 \cdot 10^3$  vs  $2035 \cdot 10^3$ ,  $p = 0,0513$  et  $1744 \cdot 10^3$  vs  $2745 \cdot 10^3$ ,  $p = 0,015$  respectivement). Même si le taux d'éosinophiles entre les souris traitées et non-asthmatiques ne varie pas (non significatif), le taux de neutrophiles quant à lui reste plus élevé chez les souris traitées ( $1744 \cdot 10^3$  vs  $401,5 \cdot 10^3$ ,  $p = 0,0015$ ). Nous ne constatons toujours aucune variation du nombre de macrophages pulmonaires entre les différentes conditions (non significatif) (Figure 34D). Notre modèle murin d'asthme présente une inflammation mixte éosinophiles/neutrophiles avec une composante neutrophile majeure. Il semblerait, à la vue de ces résultats, que l'IL-2 Cx puisse moduler l'immunité innée au niveau local. Il serait donc intéressant, du point de vue de la pathologie, de regarder l'évolution de l'immunité adaptative pas seulement au niveau local mais également au niveau systémique.

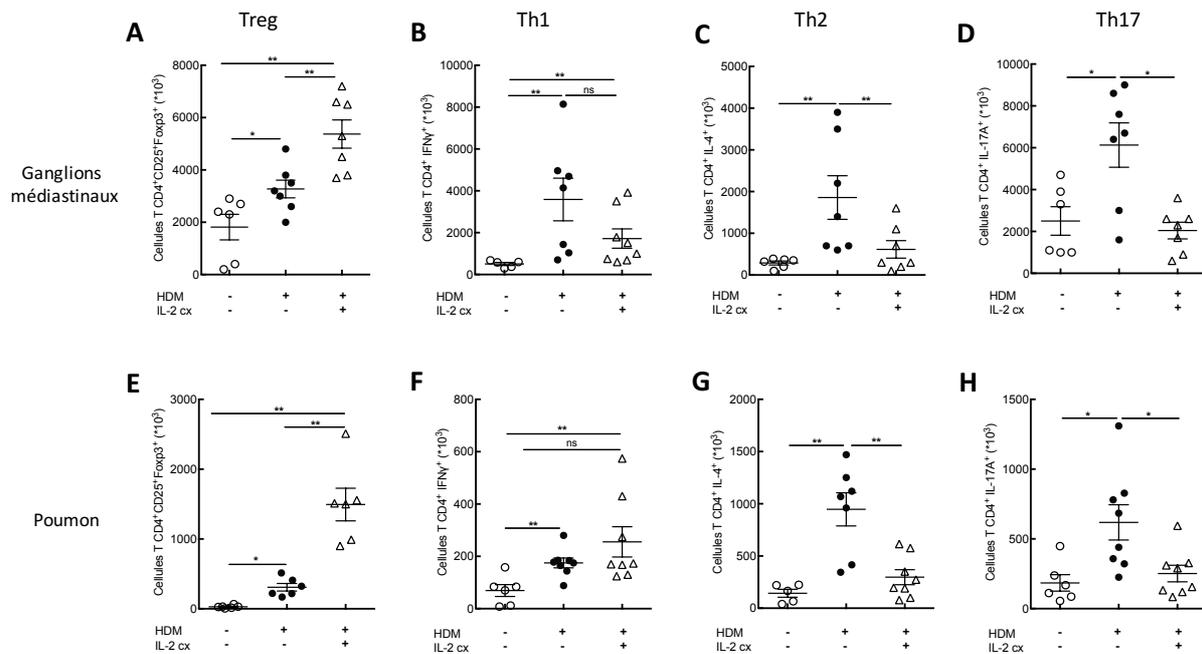


**Figure 34 : Evaluation des modifications histologiques des poumons et de leur infiltrat post traitement par IL-2 Cx.** L'effet de l'asthme et de l'IL-2 Cx sur les tissus pulmonaires a été évalué par la réalisation de coupes histologiques (A) et le calcul d'un score histologique (B).  $N = 5$  souris par groupe. L'infiltrat a été étudié en dénombrant par cytométrie en flux le nombre de cellules immunitaires innées (macrophages, éosinophiles et neutrophiles) présentes dans les lavages broncho alvéolaires (C) et les poumons (D).  $N = 6$  souris non-asthmatiques (CTL), 7 souris asthmatiques (HDM) et 7 souris asthmatiques traitées (IL-2 Cx), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  et ns = non significatif.

### III.2.3. L'IL-2 Cx induit une augmentation de Treg et réduit l'inflammation locale périphérique et systémique

Dans l'objectif d'analyser l'immunité adaptative locale, périphérique et systémique en réponse à un traitement par IL-2 Cx dans l'asthme, nous avons mesuré le nombre de Treg et de  $CD4^+$  effecteurs sécrétant de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-4 et de l'IL-17A dans les ganglions mésentériques (GM), les poumons et la rate. Au niveau local, les souris traitées par IL-2 Cx voient leur nombre de Treg augmenter significativement par rapport aux souris asthmatiques et non asthmatiques à la fois dans leurs GM et leurs poumons (Figure 35A et E). De plus, ces

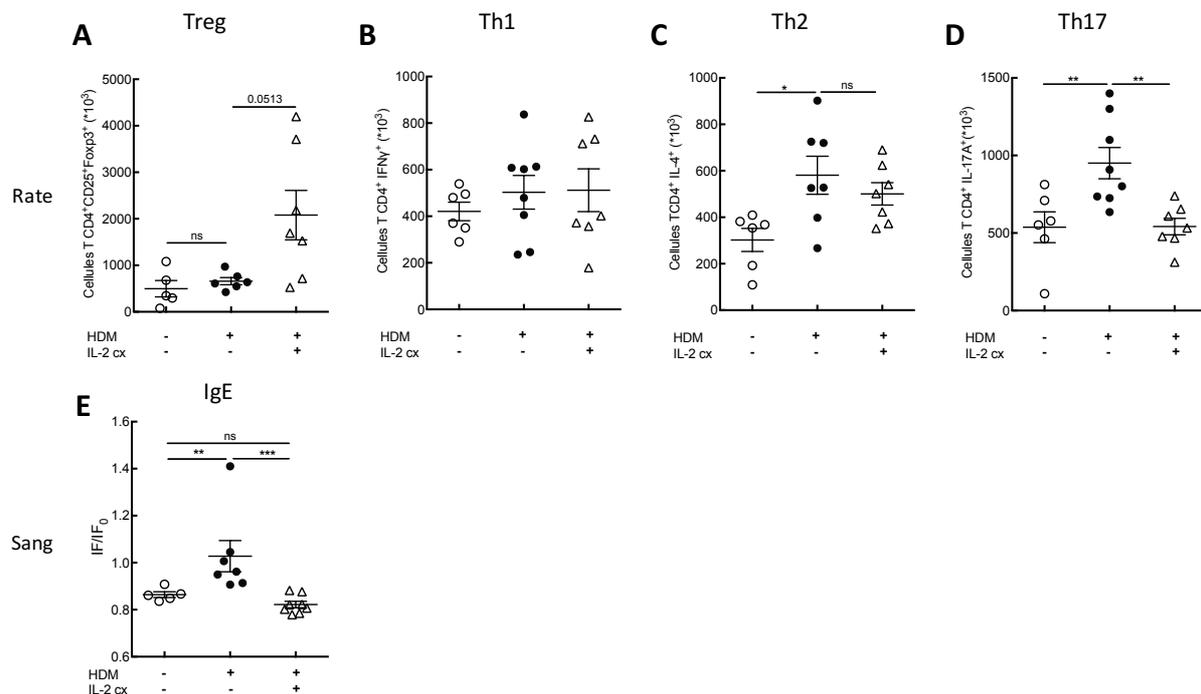
souris présentent une diminution du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-4 et de l'IL-17A par rapport aux souris asthmatiques et avec des niveaux similaires par rapport aux souris non-asthmatiques (Figure 35C, D, G et H). En revanche, les souris traitées ne présentent pas de modification concernant les lymphocytes sécrétant de l'IFN- $\gamma$  par rapport aux souris asthmatiques et avec un niveau cependant plus élevé que chez les souris non-asthmatiques (Figure 35B et F).



**Figure 35 : Mesure du nombre total de Treg et de lymphocytes de type Th1, Th2 et Th17 au niveau local.** Le nombre total de lymphocytes Treg (Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), Th1 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), Th2 (IL-4<sup>+</sup>) et Th17 (IL-17A<sup>+</sup>) a été mesuré dans les ganglions médiastinaux (A-D) et les poumons (E-H) par cytométrie en flux. N= 6 souris non-asthmatiques (rond blanc), 7 souris asthmatiques (rond noir) et 7 souris asthmatiques traitées (triangle blanc), \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 et ns = non significatif.

En ce qui concerne l'immunité adaptative périphérique, les souris traitées présentent également une augmentation du nombre de leurs Treg par rapport aux souris asthmatiques et non-asthmatiques (Figure 36A). De la même manière que pour les GM et les poumons, les souris traitées par IL-2 Cx présentent une diminution de leurs lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17A par rapport aux souris asthmatiques et proche du niveau des souris non asthmatiques (Figure 36B et D). En revanche, les niveaux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-4 restent les mêmes entre les souris asthmatiques et traitées, avec des niveaux supérieurs par rapport aux souris non-asthmatiques (Figure 36C). Au niveau systémique, nous avons également dosé par ELISA fluorimétrique le taux d'IgE spécifiques de l'allergène circulant dans le sang. Le dosage

des IgE spécifiques montre des taux élevés chez les souris asthmatiques. En revanche, lorsque les souris sont traitées avec l'IL-2 Cx le taux d'IgE diminue de manière significative en comparaison aux souris asthmatiques, avec un taux proche de celui des souris non-asthmatiques (Figure 36E). Ces résultats montrent que l'IL-2 Cx peut effectivement augmenter les Treg aussi bien au niveau local que périphérique. Cette augmentation de Treg peut expliquer la diminution des lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-4 et de l'IL-17A correspondant aux réponses Th2 et Th17 respectivement. L'IL-4 permet d'induire la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B dans l'asthme, la diminution de lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-4 pourrait également expliquer la diminution d'IgE observée au niveau sanguin. IL-17A est quant à elle associée au phénomène d'hyperréactivité bronchique en activant directement la contraction du muscle lisse bronchique et participe au recrutement des neutrophiles. Sa diminution expliquerait donc la baisse de l'hyperréactivité bronchique et de l'infiltrat neutrophilique observé précédemment. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'administration de l'IL-2 Cx aurait une activité biologique supérieure à l'IL-2 seule expliquant la forte augmentation de Treg.

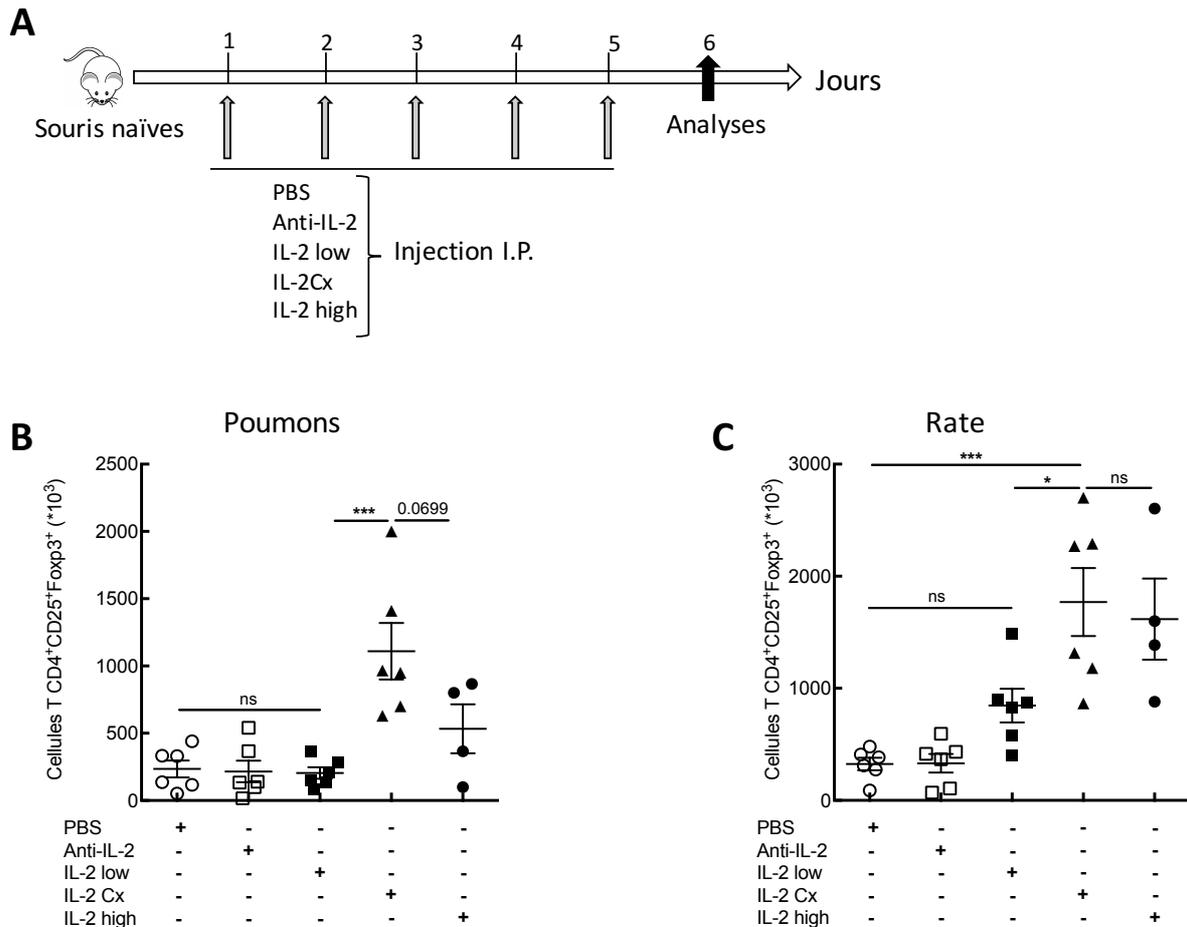


**Figure 36 : Mesure du nombre total de Treg et de lymphocytes de type Th1, Th2 et Th17 au niveau périphérique et dosage des IgE sanguins.** Le nombre total de lymphocytes Treg (Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), Th1 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), Th2 (IL-4<sup>+</sup>) et Th17 (IL-17A<sup>+</sup>) a été mesuré dans la rate (A-D) par cytométrie en flux. Les IgE sanguins ont été dosés dans le sang par ELISA fluorimétrique (E) en réalisant un ratio d'intensité de fluorescence obtenue/ la fluorescence basale (IF/IF<sub>0</sub>). N= 6 souris non-asthmatiques (rond blanc), 7 souris asthmatiques (rond noir) et 7 souris

*asthmatiques traitées (triangle blanc), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  et ns = non significatif.*

#### III.2.4. L'IL-2 Cx possède une activité biologique supérieure à l'IL-2 seule et n'induit pas d'œdèmes pulmonaires

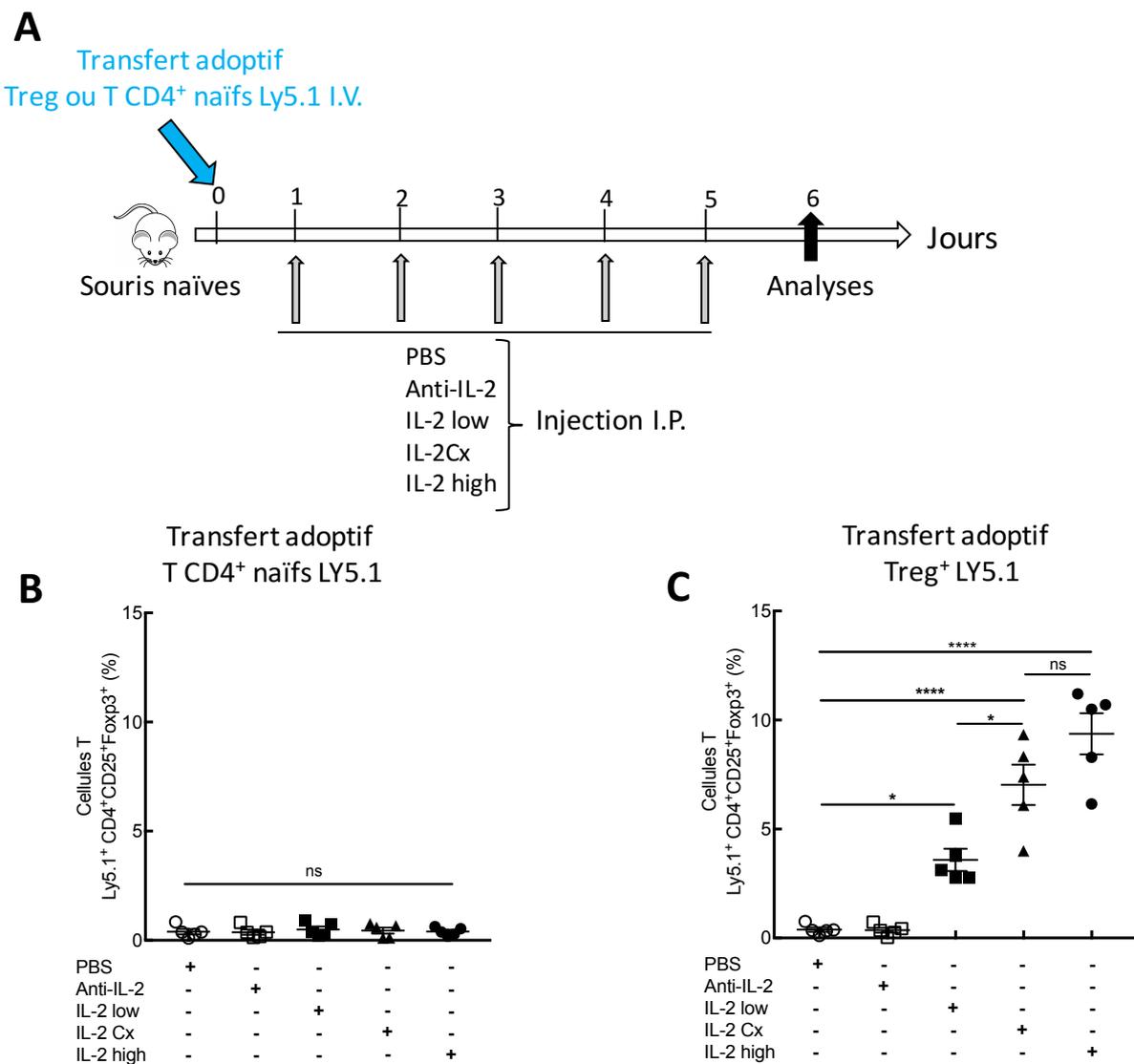
Afin d'étudier d'envisager une future utilisation de l'IL-2 Cx pour des essais cliniques, nous nous penchons sur l'évaluation de paramètres pharmacologiques tels que la dose maximale d'activité biologique, la dose tolérée et la toxicité. Pour ce faire, nous avons injecté à des souris naïves du PBS comme contrôle négatif, de l'IL-2 seule à faible dose à 15 $\mu$ g (IL-2 low), l'anti-IL-2, l'IL-2 Cx composé d'IL-2 low + anti-IL-2 et de l'IL-2 à forte dose 150 $\mu$ g (IL-2 high) comme contrôle positif. Nous avons ensuite mesuré dans les poumons et la rate le nombre de Treg présents suite aux injections (Figure 37A). Nous n'observons aucune différence dans le nombre de Treg suite aux injections de PBS, d'anti-IL-2 ou d'IL-2 low. De façon assez surprenante l'injection d'IL-2 high n'induit pas une augmentation de Treg dans le poumon. Il est néanmoins intéressant de noter que l'injection d'IL-2 Cx permet d'augmenter significativement le nombre de Treg pulmonaires par rapport aux conditions précédentes (Figure 37B). Dans la rate, nous n'observons également aucune différence dans la variation de Treg suite aux injections de PBS et d'anti-IL-2, il semble néanmoins y avoir une tendance à l'augmentation du nombre de Treg avec l'IL-2 low (non significatif). En revanche, l'injection d'IL-2 high permet d'obtenir cette fois une augmentation significative du nombre de Treg. L'injection d'IL-2 Cx augmente également le nombre de Treg dans la rate par rapport aux conditions PBS, anti-IL-2 et IL-2 low et à un niveau équivalent à celui des souris injectées avec l'IL-2 high (Figure 37C). Ces résultats montrent que l'IL-2 Cx possède une activité biologique supérieure à l'IL-2 seule en faible dose et équivalente celle de l'IL-2 à forte dose. L'absence d'induction de Treg dans les poumons après injection d'IL-2 à faible et forte dose peut être due à la faible demi-vie de la cytokine et son élimination, l'empêchant d'être délivrée efficacement au niveau pulmonaire. Cette demi-vie semble augmenter avec l'IL-2 Cx permettant l'augmentation des Treg de façon distale par rapport au site d'injection. De par l'augmentation du nombre de Treg via l'IL-2 Cx, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'IL-2 Cx permettrait d'expandre directement les Treg et non pas via la différenciation de lymphocytes T naïfs en Treg.



**Figure 37 : Mesure de l'activité biologique de l'IL-2 Cx.** Suite aux injections de PBS, d'anti-IL-2, d'IL-2 faible dose (IL-2 low) d'IL-2 Cx et d'IL-2 forte dose (IL-2 high) en intrapéritonéale chez des souris naïves, le nombre total de Treg (Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) a été mesuré dans les poumons (B) et la rate (C). N = 6 souris PBS (rond blanc), anti-IL-2 (carré blanc), IL-2 low (carré noir), IL-2 Cx (triangle noir) et N = 4 souris IL-2 high (rond noir), \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 et ns = non significatif.

Dans l'objectif d'analyser l'effet de l'IL-2 Cx sur l'expansion direct des Treg, nous avons au préalable isolé des Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) et des T CD4<sup>+</sup> naïfs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>) issus de splénocytes provenant de souris naïves congéniques LY5.1. L'injection des Treg et T CD4<sup>+</sup> naïfs LY5.1 dans des souris receveuses est réalisée en amont des injections des différents composés (Figure 38A). Les rates des souris receveuses sont ensuite collectées à 6 jours post injection et la fréquence des Treg LY5.1 est alors mesurée. Nous observons de manière intéressante, que l'administration des différents composés n'a aucun impact sur la fréquence des Treg LY5.1 après un transfert adoptif de T CD4<sup>+</sup> naïfs LY5.1 (Figure 38B). A contrario, après un transfert adoptif de Treg LY5.1, l'injection de faibles doses d'IL-2 permet d'augmenter la fréquence de

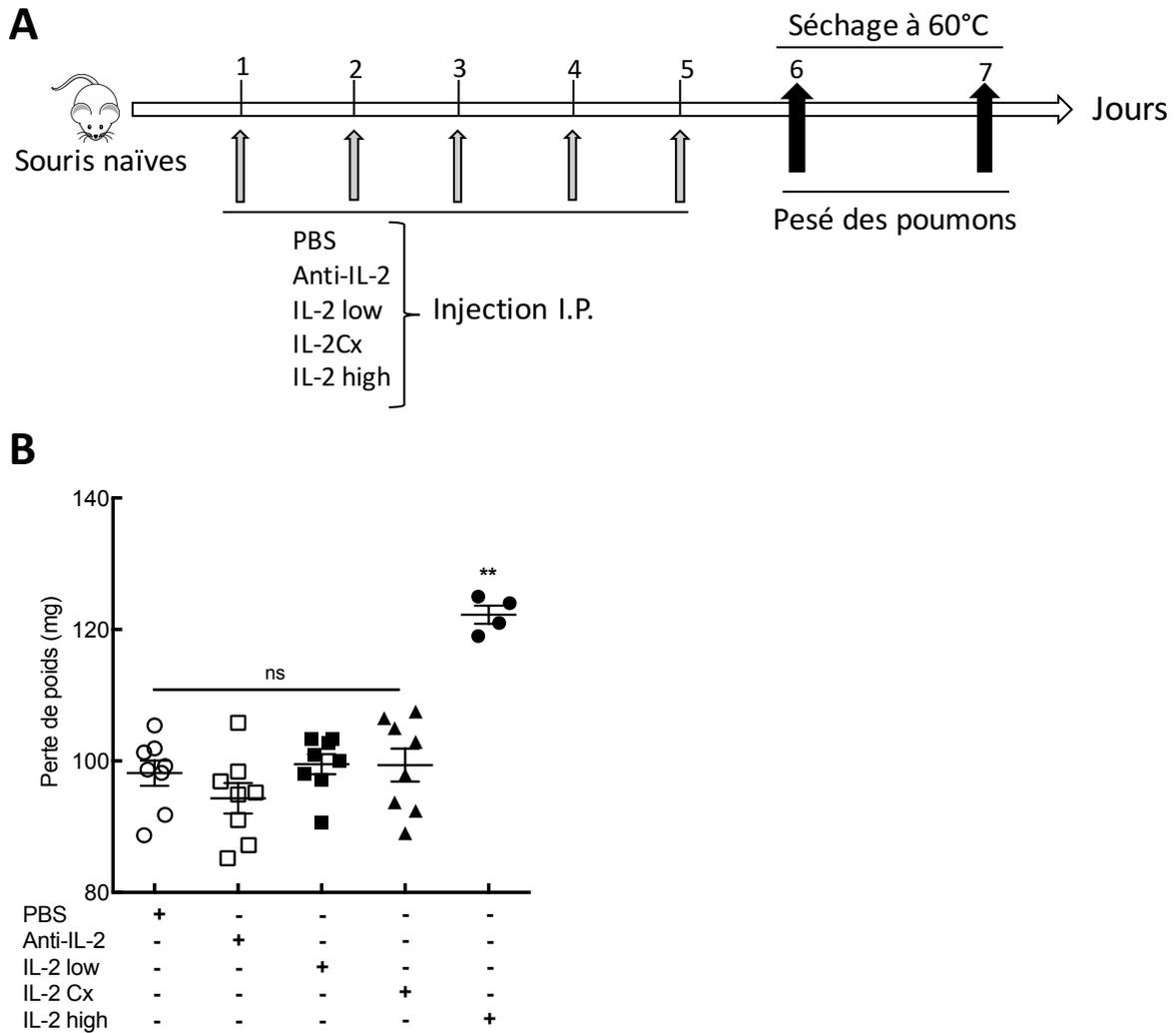
Treg LY5.1 de manière significative par rapport aux conditions PBS et anti-IL-2. L'IL-2 Cx et l'IL-2 à forte dose permettent quant à elles d'augmenter de manière équivalente la fréquence des Treg LY5.1 par rapport aux 3 autres conditions (Figure 38B). Ces résultats renforcent ceux obtenus précédemment concernant l'activité biologique de l'IL-2 Cx avec une induction de Treg équivalente à l'administration de fortes doses d'IL-2 seule. De plus, nous avons la confirmation que l'IL-2 Cx permet l'expansion directe des Treg et non pas via la différenciation de T CD4<sup>+</sup> naïfs en Treg. Les précédents résultats montrent que l'IL-2 Cx possède une activité biologique équivalente à l'IL-2 à forte dose, or de fortes doses d'IL-2 peuvent induire un syndrome de fuites vasculaires conduisant à des œdèmes pulmonaires. Il apparaît donc nécessaire d'analyser si l'IL-2 Cx peut elle aussi induire ce syndrome.



**Figure 38 : Mécanisme d'expansion des Treg LY5.1 induit par l'IL-2 Cx.** L'effet de l'IL-2 Cx sur l'expansion de Treg a été mesuré après transferts adoptifs de Treg et de T CD4<sup>+</sup> naïfs issus de souris congéniques dans des souris naïves receveuses (A). La fréquence des Treg LY5.1 après

*transfert adoptif de T CD4<sup>+</sup> naïfs LY5.1 (B) et de Treg LY5.1 (C) dans la rate a été mesurée par cytométrie en flux. N= 5 souris par groupe, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001 et ns= non significatif.*

Concernant l'effet dose lié à l'IL-2, notamment à la formation d'œdèmes pulmonaires suite au syndrome de fuites vasculaires, nous avons mesuré la différence de poids des poumons des souris après injections des différents composés. Les poumons ont été pesés après prélèvement puis 24h après séchage à l'étuve. La variation de poids permettra de définir la présence d'infiltrat pulmonaire correspondant à la présence d'œdèmes (Figure 39A). Les souris ayant reçu des injections de PBS, d'anti-IL-2, d'IL-2 low et d'IL-2 Cx présente des pertes de poids au niveau des poumons équivalentes, tandis que les souris ayant été injectées avec l'IL-2 high présentent une augmentation significative de cette perte de poids par rapport aux autres conditions (Figure 39B). Ces résultats montrent que pour une activité biologique équivalente, l'IL-2 Cx reste relativement sans danger car elle n'induit pas de syndrome de fuites vasculaires et donc d'œdèmes pulmonaires. Notre IL-2 Cx étant composé d'IL-2 humaine et d'un anticorps chimérique murin composé de paratopes humains pour l'IL-2, nous pouvons supposer qu'il pourrait s'avérer efficace dans l'induction de Treg chez l'homme avec peu de risque de toxicité.

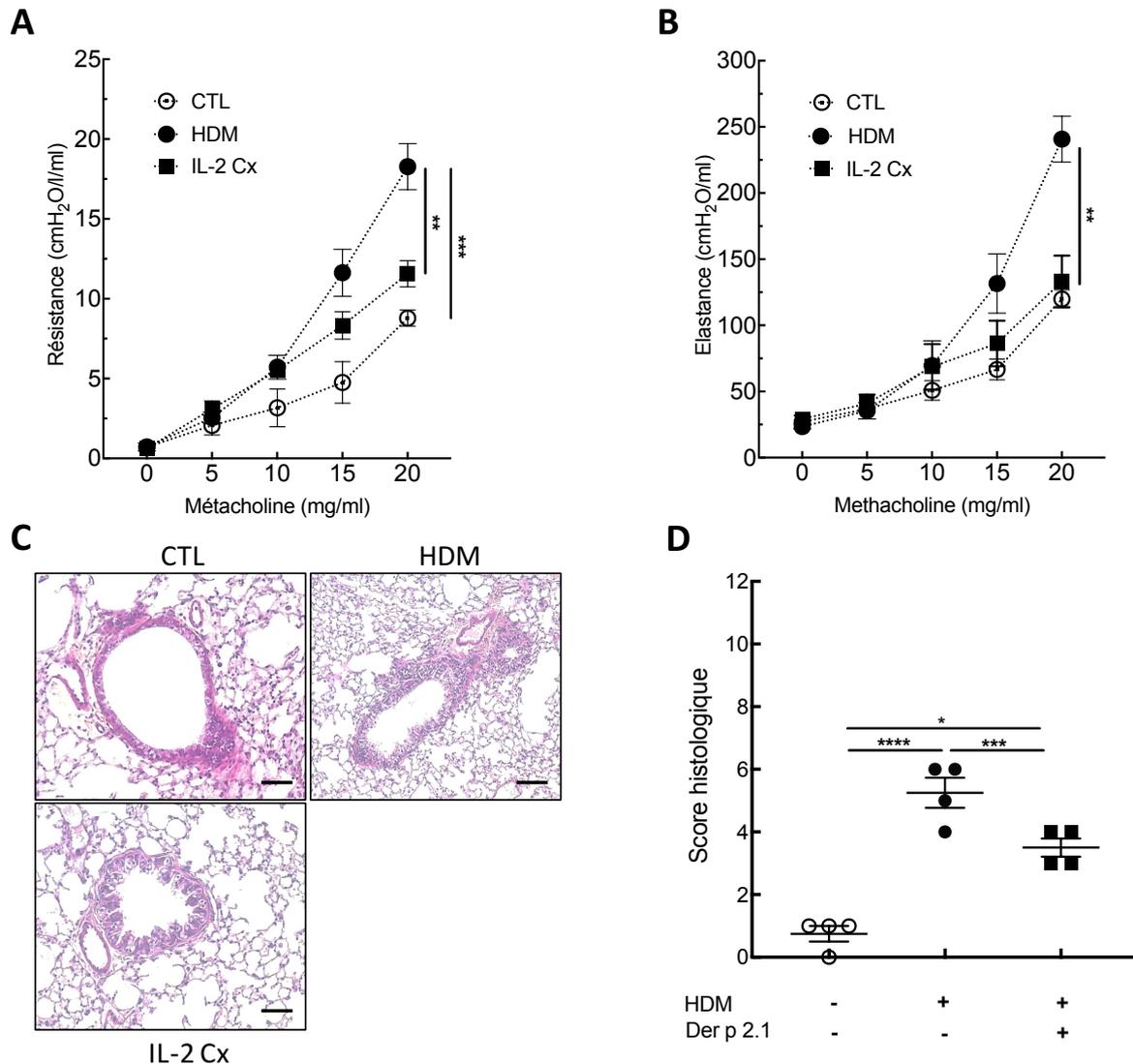


**Figure 39 : Evaluation de la toxicité de l'IL-2 Cx dans les poumons.** La toxicité pulmonaire liée au syndrome de fuites vasculaires a été mesurée par pesée des poumons 6 jours après administration des différents composés puis 24h après séchage des mêmes poumons à l'étuve (A). Le poids perdu après séchage correspond à la masse de liquide présente dans les poumons (B). N = 6 souris PBS (rond blanc), anti-IL-2 (carré blanc), IL-2 low (carré noir), IL-2 Cx (triangle noir) et N = 4 souris IL-2 high (rond noir), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  et ns = non significatif.

### III.2.5. Diminution l'hyperréactivité bronchique et du score histologique lié à l'asthme allergique aux acariens chez la souris humanisée

Dans l'optique d'évaluer les effets de l'IL-2 Cx sur un système immunitaire humain. Nous avons humanisé des souris de souche NSG-SGM3 avec des progéniteurs CD34<sup>+</sup> issus de sang de cordon ombilical humain. Une fois l'humanisation réussie, nous avons modélisé chez ces souris un asthme allergique aux acariens, suivi d'un traitement par IL-2 Cx (Figure 26). L'évaluation de l'hyperréactivité bronchique montre une diminution de la résistance et de

l'élastance chez les souris asthmatiques traitées par l'IL-2 Cx par rapport aux souris asthmatiques (11,56 vs 18,27 cmH<sub>2</sub>O/l/ml, p = 0,0031 et 133,29 vs 240,08 cmH<sub>2</sub>O/ml, p = 0,0026 respectivement). De plus nous n'observons pas de différences entre la résistance et l'élastance des souris traitées et celles des souris non-asthmatiques (Figure 40A et B). L'analyse histologique des poumons révèle une hyperplasie des cellules épithéliales bronchiques, ainsi que d'un infiltrat péri bronchique et péri vasculaire chez les souris asthmatiques par rapport aux souris non-asthmatiques. En revanche, il est intéressant de noter une absence d'infiltrat chez les souris traitées par IL-2 Cx malgré une hyperplasie des cellules épithéliales persistante (Figure 40C). Le score histologique pulmonaire établi selon les mêmes paramètres décrit précédemment chez les souris non-humanisées montre une augmentation de ce score chez les souris asthmatiques par rapport aux souris non-asthmatiques (5,25 vs 0,75, p<0,0001). Les souris traitées par IL-2 Cx montrent quant à elles une baisse de ce score histologique vis à vis des souris asthmatiques (3,5 vs 5,25, p = 0,0151), mais ce score reste néanmoins plus élevé que chez les souris non-asthmatiques (3,5 vs 0,75, p = 0,0005) (Figure 39D).



**Figure 40 : Evaluation de l'efficacité de l'IL-2 Cx dans un modèle d'asthme allergique aux acariens chez la souris humanisée.** L'hyperréactivité bronchique a été mesurée par FlexiVent® en analysant les paramètres de résistance (A) et d'élastance pulmonaires (B). Les modifications histologiques ont été évaluées par la réalisation de coupes histologiques (C) et le calcul d'un score histologique (D). N = 4 souris par groupe, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001 et ns = non significatif.

Ces résultats montrent que l'administration d'IL-2 Cx dans un modèle d'asthme allergique aux acariens chez des souris humanisées permet de réduire l'hyperréactivité bronchique. Il permet de diminuer également l'infiltrat pulmonaire mais ne semble pas avoir d'impact sur les altérations tissulaires telle que l'hyperplasie des cellules épithéliales, expliquant un score histologique supérieur aux souris non-asthmatiques. A la vue de ces résultats chez la souris humanisée, il serait pertinent de regarder à la fois l'évolution des populations immunitaires innées et adaptatives et si cette évolution est associée à une

augmentation des Treg. Le dosage des IgE spécifiques de l'allergène est aussi nécessaire pour évaluer le statut inflammatoire lié à l'asthme allergique. Enfin, l'utilisation de l'IL-2 Cx chez l'homme semble être une approche thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'asthme.

#### IV. Discussion générale et perspectives

L'asthme est une pathologie complexe qui reste aujourd'hui un problème de santé majeur à travers le monde. Le développement de nouveaux modèles murins d'asthme, ainsi que l'étude de nombreuses cohortes de patients issues d'essais cliniques nous montrent que l'asthme n'est plus uniquement caractérisé par une inflammation purement Th2, mais par une inflammation hétérogène impliquant de nombreuses populations cellulaires. Cette hétérogénéité se traduit par l'expression de nouveaux phénotypes inflammatoires Th2 et non-Th2 évoluant de l'enfance à l'âge adulte (Wenzel, 2012). Ces nouveaux phénotypes et endotypes d'asthme poussent la recherche vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le modèle d'asthme allergique aigu aux acariens développé par notre équipe se caractérise par une inflammation mixte Th2/Th17 (Chesné et al., 2015) qui se rapproche au plus près de l'asthme allergique sévère des patients. En effet, l'originalité de ce modèle repose sur la sensibilisation percutanée au niveau des oreilles de la souris avec une solution contenant de l'HDM solubilisé dans du DMSO. Des travaux datant de 2007 montrent qu'une sensibilisation cutanée oriente l'inflammation pulmonaire après provocation vers une réponse de type Th17 (He et al., 2007), expliquant l'obtention d'une réponse mixte Th2/Th17 dans notre modèle. Nous avons depuis lors modifié ce modèle aigu en modèle chronique par l'ajout de 4 provocations intranasales avec de l'HDM post sensibilisation. L'objectif étant de se rapprocher au plus près du phénomène d'exacerbations récurrentes retrouvé chez les patients asthmatiques sévères (Franzese, 2015).

L'augmentation du nombre de provocations a permis d'obtenir une réponse inflammatoire mixte Th2/Th17<sup>prédominante</sup>, se rapprochant des asthmes allergiques sévères à infiltrat neutrophilique important (Irvin et al., 2014; Wenzel et al., 1999). Ces asthmes sont très peu sensibles à la corticothérapie de par leur composante Th17 et neutrophilique. Dans notre modèle, l'inflammation éosino-neutrophilique persiste sous l'ajout d'une corticothérapie, soulignant une potentielle résistance aux corticoïdes. En effet, l'IL-17 a la

capacité d'inhiber l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes par l'activation de la sous-unité  $\beta$  inhibitrice du récepteur aux glucocorticoïdes (GR $\beta$ ) (Vazquez-Tello et al., 2010, 2013). La corticorésistance n'est pas dépendante d'une inflammation essentiellement neutrophilique, certains modèles comportant une inflammation éosino-neutrophilique présentent également une résistance aux corticoïdes (Manni et al., 2016). L'ensemble des caractéristiques présentes dans notre modèle suggèrent que celui-ci se rapproche au plus des asthmes allergiques sévères observés en clinique. Néanmoins, l'asthme sévère est surtout défini par un remodelage bronchique. Comme décrit précédemment dans l'introduction, ce remodelage est caractérisé par une hypersécrétion de mucus, une altération des cellules épithéliales et une hyperplasie des cellules musculaires lisses bronchiques. Notre modèle présente des altérations du tissu pulmonaire après analyse histologique, notamment une augmentation de la taille des cellules épithéliales bronchiques. A la vue de réponse Th17 prédominante dans notre modèle et du rôle de l'IL-17A dans l'hyperplasie et la contraction des cellules musculaires lisses bronchiques (Chesné et al., 2015; Chiba et al., 2017), il serait pertinent de mesurer la taille de ces cellules. Il serait également intéressant de mesurer l'expression des gènes MUC2, MUC5AC et MUC5B. En effet, ces gènes permettant la sécrétion de mucus dans les poumons sont fortement exprimés chez les patients asthmatiques (Bai et al., 2007; Morcillo and Cortijo, 2006).

L'utilisation d'un modèle murin implique néanmoins des limites difficilement évitables. Comme décrit dans l'introduction, les différences anatomiques et fonctionnelles des voies aériennes liées à l'espèce sont un des inconvénients majeurs avec l'utilisation de modèles animaux. De nombreuses études se sont focalisées sur ces différences anatomiques et la manière dont celles-ci pouvaient être palliées. Une des premières alternatives étant d'utiliser une culture *in vitro* de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de biopsies de patients (Wu et al., 1986). Ces cellules perdent cependant leur phénotype épithélial par dédifférenciation après plusieurs cycles de culture (Prytherch et al., 2011). Ce phénomène a conduit au développement d'un nouveau système impliquant une interface air-liquide (ALI), permettant le maintien du phénotype épithélial et une étude plus précise des mécanismes biologiques et fonctionnels de cet épithélium dans l'asthme (Gras et al., 2012, 2017; Pezzulo et al., 2011). Cette modélisation ALI reste cependant limitée au microenvironnement épithélial et ne prend pas en compte les systèmes immunitaire, musculaire et vasculaire

impliqués dans la physiopathologie du poumon. La prise en compte de l'ensemble de ces variables physiologiques et leurs relations s'exprime au travers d'une notion de biologie des systèmes (Ma'ayan, 2017). Cette notion est de nos jours indispensable pour appréhender l'ensemble des mécanismes et acteurs d'une pathologie, ainsi que pour la conception de nouveaux traitements. De nouvelles approches tentent de répondre à cette notion, notamment via la conception d'organoïdes. Permettant d'obtenir des portions d'organes à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ou embryonnaires (ECS) (Huch and Koo, 2015; Jung et al., 2011). Ces iPSC peuvent être directement issues de patients afin de modéliser et étudier les altérations génétiques, cellulaires et physiologiques induites par la pathologie (Lancaster and Knoblich, 2014; Takebe et al., 2013). De nombreuses approches sur la conception d'organoïdes de poumon semblent prometteuses pour l'étude de pathologies pulmonaires complexes (Barkauskas et al., 2017).

En résumé, nous avons développé à partir de notre précédent modèle d'asthme allergique aigu, un modèle d'asthme allergique chronique capable de mimer une inflammation mixte et une corticorésistance présentes chez les patients asthmatiques les plus sévères. Ce modèle pourrait contribuer à la création de nouveaux traitements dans l'asthme sévère et d'en comprendre les mécanismes d'action.

Nos travaux mettent en avant le développement de nouvelles approches novatrices dans le traitement de l'asthme allergique aux acariens et posent la question de la compréhension des mécanismes de l'asthme à travers ces différentes approches ainsi que de sa prise en charge.

La majorité des traitements actuels de l'asthme sont conçus pour des patients présentant un phénotype de type Th2. A l'exception de l'immunothérapie spécifique de l'allergène, ces traitements cherchent à inhiber la voie de l'inflammation Th2 en bloquant l'action d'un des acteurs de cette voie. Or, cette restriction de cible revient à considérer l'asthme comme une pathologie « simple » dont le court-circuit d'un seul acteur est suffisant pour inhiber le système inflammatoire. En effet, comme décrit dans l'introduction, les biothérapies existantes ou en essai clinique, fonctionnent, mais leur efficacité est souvent limitée par l'endotype du patient et restent sans effet sur les phénotypes les plus sévères dit non-Th2.

Partant de ce constat, nous nous sommes intéressés, non pas aux acteurs responsables de cette pathologie, mais à ceux lui faisant défaut. L'asthme allergique se caractérise par une défaillance dans le mécanisme de tolérance immunitaire vis à vis d'antigènes normalement inoffensifs (Chinthrajah et al., 2016). La tolérance immunitaire est principalement modulée par les Treg et les cellules dendritiques dites tolérogènes, sécrétant de l'IL-10 (DC-IL-10<sup>+</sup>) (Akbari et al., 2001; Akdis et al., 2005). Dans l'asthme, cette absence de tolérance est associée à un défaut de qualitatif et quantitatif Treg et de DC-IL-10<sup>+</sup> (Lewkowich et al., 2005; Mamessier et al., 2008). En effet, une baisse du nombre de Treg a été observée dans les LBA et le sang périphériques d'enfants asthmatiques, de plus leurs Treg possédaient une capacité suppressive moindres par rapport aux sujets sains (Hartl et al., 2007). Concernant les cellules dendritiques, leurs implications dans la pathogénèse de l'asthme restent sujettes à diverses hypothèses. Lambrecht et Hammad font état de l'influence du microenvironnement dans lequel mature les cellules dendritiques, orientant vers une polarisation plutôt pro-inflammatoire que tolérogène (Lambrecht and Hammad, 2003). D'un autre côté, Wills-Karp estime que le défaut de tolérance des cellules dendritiques provient d'une absence d'éducation par le microbiote, faisant référence à la fameuse théorie de l'hygiène (Wills-Karp et al., 2001). Ces dernières années, de nombreuses études tendent à concilier ces deux hypothèses en une seule (Huang and Boushey, 2015; Jatzlauk et al., 2017).

Le rétablissement d'une tolérance via l'induction de Treg est une stratégie adoptée depuis plusieurs années avec l'ITA. En effet, celle-ci permet la génération de Treg spécifiques de l'allergène (Akdis et al., 1998) sécrétant de grandes quantités d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Francis et al., 2003; Jutel et al., 2003). Une variante de l'ITA, appelée immunothérapie peptidique, se base sur l'utilisation de fragments d'allergènes. Elle permet après injection d'un peptide dérivé de l'allergène majeur de chat Fed 1 de rétablir une tolérance via une immunomodulation IL-10 dépendante chez des patients asthmatiques allergiques aux chats (Campbell et al., 2009). Ces résultats concordent avec l'augmentation de Treg et de DC-IL-10<sup>+</sup> associée à une diminution de l'asthme observée chez nos souris allergique aux acariens après traitement avec notre peptide dérivé de Der p 2. Notre seconde approche thérapeutique se basant sur l'utilisation d'un complexe IL-2/anti-IL-2 montre également une augmentation de Treg chez les souris traitées avec une réduction de l'asthme, et donc en faveur d'un rétablissement de tolérance. Néanmoins, la ou les sous populations de Treg impliquées

restent à définir. En effet, il serait intéressant de regarder la proportion de Treg spécifiques de l'allergène induite, notamment les  $T_{R1}$ , une sous population de Treg majoritairement impliqués dans le mécanisme de tolérance (Akdis et al., 2005). D'autres Treg sont également impliqués dans cette tolérance : les Treg naturels (nTreg). La diminution de leur fréquence et de leur activité suppressive a été reportée dans l'asthme allergique chez l'homme (Hartl et al., 2007). Ils sont associés à la suppression de l'HRB, de l'inflammation et du remodelage (Burchell et al., 2009; Kearley et al., 2008). L'autre intérêt d'étudier ces nTreg réside dans leur relation avec les DC-IL-10<sup>+</sup>. De nombreux travaux étudiant cette relation, montrent que les DC-IL-10<sup>+</sup> participent à l'induction de nTreg spécifiques de l'allergènes (Henry et al., 2008; Li et al., 2010). A l'inverse, Taams montre que l'interaction entre les nTreg et des cellules dendritiques oriente ces dernières vers un état tolérogène (Taams et al., 2005). Confirmé par Lewkowich, montrant qu'une déplétion de nTreg conduit à l'augmentation de cellules dendritiques pro-inflammatoires dans l'asthme (Lewkowich et al., 2005). Révélant une potentialisation mutuelle Treg/ DC-IL-10<sup>+</sup> responsable d'une tolérance immune dans l'asthme.

L'IL-10 produite par les Treg et cellules dendritiques supprime l'activité des cellules T en bloquant le CD2, CD28 et le co-stimulateur inductible (ICOS) à leur membrane via l'homologue 2 de Src (SHP-1)(Taylor et al., 2007). Elle est capable d'inhiber les IgE totales et spécifiques de l'allergène (Akdis et al., 1998) mais également d'induire la production d'IgG4 (Meiler et al., 2008). L'augmentation d'IgG4 est associée avec le succès de l'ITA (Reisinger et al., 2005). Cette sous classe d'immunoglobuline a la capacité de lier l'allergène avant que celui-ci ne se fixe sur les IgE, empêchant ainsi la dégranulation des basophiles (Uermösi et al., 2010; Wachholz and Durham, 2004). Observant une diminution des IgE spécifiques de l'allergène après traitement par Der p 2.1 et IL-2 Cx, il serait pertinent de quantifier les taux d'IL-10 et d'IgG4 présent chez les souris traitées.

La présence d'une inflammation mixte Th2/Th17<sup>dominante</sup> associée à un infiltrat éosino-neutrophilique dans notre modèle permet d'avoir un aperçu plus global de l'efficacité de nos traitements. L'utilisation du peptide Der p 2.1 et de l'IL-2 Cx nous permet de réduire l'inflammation Th2 dans notre modèle d'asthme. De manière plus inattendue, ces traitements permettent également de réduire la neutrophilie et la production d'IL-17A. Ces deux composantes forment la bête noire des immunologistes et des pneumologues dans la

conception de traitements et la prise en charge des patients. En effet, comme décrit précédemment l'IL-17A et la neutrophilie sont en partie responsables du phénomène de corticorésistance. La difficulté de conception de nouveaux traitements contre des asthmes non-Th2 réside dans la diversité des acteurs participant à ce phénotype. En effet, l'activation des cellules Th17 et leur survie dépend de l'IL-23 (McGeachy et al., 2007). Les Th17 activés sont en mesure de produire plusieurs cytokines inflammatoires et en particulier l'IL-17A (Weaver et al., 2006). Cette cytokine est impliquée dans l'induction d'infiltrat de neutrophiles au niveau bronchique (Oda et al., 2005). Chez l'homme, son expression dans les voies aériennes est corrélée avec la sévérité de l'asthme (Molet et al., 2001). Plusieurs études montrent que l'activation des neutrophiles est également associée au tabagisme, aux polluants extérieurs et à l'inhalation d'ozone induisant des dommages à l'épithélium pulmonaire (Chalmers et al., 2001; McCreanor et al., 2007; Nightingale et al., 1999). De plus, des asthmes infectieux peuvent également causer une neutrophilie (Wang et al., 2011). Obtenant des effets inhibiteurs sur la neutrophilie et la production d'IL-17A, il serait intéressant de mesurer le taux d'IL-23 ainsi que l'impact d'agents polluants sur l'épithélium et leurs évolutions durant un traitement par Der p 2.1 ou IL-2 Cx.

Le développement de traitements contre les phénotypes d'asthmes non-Th2 se poursuivent, avec notamment la conception d'anticorps dirigés contre l'axe IL-23/Th17. Parmi ces candidats nous retrouvons les anti-IL-6, -17, -1 et -23 (Sze et al., 2019). Etant dirigés contre une cible unique parmi les nombreux acteurs que comptent l'axe IL-23/Th17, nous pouvons supposer que comme pour les biothérapies anti-Th2, leur utilisation sera restreinte à certains endotypes non-Th2. En effet, certains pourraient avoir une efficacité dans des asthmes non-Th2 à composante Th17 majoritaire, d'autres sur composante neutrophilique majeure et certains lors de dommages modérés de l'épithélium bronchique. En revanche, les traitements que nous avons développés semblent s'affranchir, chez la souris, des restrictions liées au phénotypes et endotypes d'asthme et ce grâce au rétablissement d'une tolérance.

Il est néanmoins nécessaire d'être prudent quant aux résultats obtenus. Certes ceux-ci semblent prometteurs surtout à une époque où les asthmes sévères sont un problème social et économique majeur. Il ne faut cependant pas perdre de vue que ces résultats ont été obtenu dans des modèles murin et humanisés d'asthme allergique ne présentant pas

l'ensemble des caractéristiques de l'asthme sévère non-Th2. La poursuite de ces travaux sur des modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in silico* est nécessaire pour la compréhension des mécanismes impliqués et l'effet de ces traitements sur l'ensemble des composantes du phénotype non-Th2. Ces données pourraient conduire au développement de futurs essais cliniques prometteurs.

Ces travaux montrent également que l'asthme, au-delà d'être une pathologie inflammatoire hétérogène, est avant tout le résultat d'un défaut de tolérance immune dont les origines restent méconnues. Les futurs traitements pourraient à l'avenir cibler les acteurs responsables de ce défaut de tolérance. Ces traitements pourraient également s'appliquer à d'autres pathologies respiratoires, telle que la BPCO. En effet, les Treg sont diminuées dans les parois alvéolaires et les petites voies aériennes des patients BPCO (Chu et al., 2011; Isajevs et al., 2009) et montrent également un défaut de suppression des T effecteurs (Tan et al., 2014). Les Treg contribuent également à la réparation de l'épithélium, notamment par la production d'amphiréguline (AREG) (Arpaia et al., 2015). Les patients asthmatiques et BPCO semblent posséder un épithélium bronchique plus fragile et moins tolérant vis à vis de certains antigènes. Ces deux défauts pourraient avoir un lien avec le microbiote car celui-ci se retrouve modifier dans ces deux pathologies (Chung, 2017; Dima et al., 2019).

Le microbiote joue un rôle prépondérant dans la régulation de la réponse immune (Honda and Littman, 2016) et de la tolérance avec la génération de Treg (Furusawa et al., 2013). Depuis plusieurs années, un axe intestin-poumon a été mis en évidence. Cet axe permet une communication entre le microbiote intestinal et pulmonaire par le biais de cytokines, chimiokines, cellules dendritiques, lymphocytes, etc. Cette communication permet de maintenir un environnement tolérogène au sein de l'organisme ou un état inflammatoire général lors de pathologies (Lynch and Pedersen, 2016). Une autre approche serait d'étudier les différentes voies de sensibilisations. Lors des premières étapes de la vie nous sommes confrontés à de nombreuses expositions d'antigènes. Ces expositions peuvent être par voie cutanées, orales, nasales ou par ingestion. Les barrières cutanées, intestinales, pulmonaires et buccales possèdent un épithélium dont le maintien de l'intégrité est synonyme de tolérance (Georas and Rezaee, 2014; Kim and Leung, 2018; McGuckin et al., 2009; Wang et al., 2019). La

modélisation d'asthme par exposition exclusive d'allergènes par ces différentes voies nous permettrait d'évaluer quelle voie est la plus susceptible de perdre sa fonction tolérogène.

Pour finir, l'aspect translationnel avec une application en clinique chez l'homme reste une perspective majeure dont nous avons tenu compte lors de la conception de nos deux traitements. En effet, concernant l'IL-2 Cx, celui-ci se compose d'une IL-2 humaine (Proleukin®) autorisée en clinique, notamment dans le traitement du cancer rénal et du mélanome (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006) favorisant une utilisation en phase I d'essai clinique. Néanmoins, le passage en essai clinique se retrouve limité par deux points, dont le premier réside dans l'anticorps lui-même. Effectivement, notre anti-IL-2 (1C6) est un anticorps monoclonal murin possédant des paratopes humains au niveau de ses parties variables pouvant reconnaître l'IL-2 humaine. L'administration chez l'homme d'un anticorps issu d'une espèce différente entraîne un phénomène d'immunogénicité, conduisant l'organisme à engendrer une réponse inflammatoire visant à produire des anticorps dirigés ce « xéno anticorps », supprimant ainsi son efficacité (Brüggemann et al., 1989). Dans l'asthme qui est une pathologie inflammatoire chronique, il n'est pas concevable de générer une nouvelle inflammation pouvant potentiellement aggraver l'état du patient. C'est pourquoi une étape d'humanisation complète de l'anticorps 1C6 est nécessaire pour envisager une utilisation clinique sans risque immunogène. Le second point concerne quant à lui les paramètres de biodistribution et d'élimination de l'IL-2 Cx. L'administration d'un composé complexe soulève les questions suivantes : quelle est sa répartition au sein de l'organisme (sa biodistribution) ? et quel est son devenir au cours du temps au sein de l'organisme ? (Glassman et al., 2015). Une mauvaise répartition du composé et/ou une élimination trop rapide de l'organisme peut réduire considérablement son efficacité (Kevans et al., 2018). A l'inverse, une mauvaise répartition associée à une accumulation de composés complexes au cours du temps peut conduire à des états pathologiques, notamment par une action de trop longue durée sur des cibles pharmacologiques ou une cytotoxicité (Petersdorf et al., 2013). Ces paramètres sont actuellement en cours d'évaluation au sein de notre laboratoire.

Concernant l'immunothérapie utilisant le peptide Der p 2.1, celle-ci semble plus à même d'être envisager pour développement thérapeutique chez l'homme. Tout d'abord, le peptide Der p 2.1 est un fragment de l'allergène majeur Der p 2. Cet allergène fait partie de la composition des différentes formulations existantes de l'ITA (Moreno Benítez et al., 2015). De

plus les propriétés hypoallergéniques de ce peptide et l'utilisation à de faibles doses suggèrent une meilleure tolérance par l'organisme, notamment avec une diminution d'effets secondaires (irritations, œdèmes, ...). Raffaella Campana montre également que l'injection par voie sous cutanée de peptides dérivés d'allergène de bouleau (Bet v 1) chez des sujets non allergiques prévient de la sensibilisation avec une absence d'effets secondaires (Campana et al., 2018). Ces données montrent que notre peptide pourrait être destiné prochainement pour des essais en clinique humaine. La composante mécanismes d'actions reste néanmoins à développer pour définir une approche clinique optimale.

Nos deux composés possèdent donc de nombreux arguments en faveur d'un passage thérapeutique chez l'homme, avec néanmoins la nécessité d'une exploration mécanistique plus aboutie.

En conclusion, ces dernières années de nombreux traitements ont permis de révolutionner la prise charge des patients asthmatiques modérés et sévères présentant un phénotype Th2. L'évolution du diagnostic de l'asthme avec la prise en compte des endotypes d'asthmes conduit également à une meilleure orientation thérapeutique. Même si les patients asthmatiques sévères non-Th2 ne bénéficient à l'heure actuelle d'aucun traitement efficace. Nos récents travaux montrent que de nouvelles approches thérapeutiques seraient capables d'agir efficacement sur les composantes non-Th2 des asthmes sévères. Ces résultats encourageants mettent évidence que le rétablissement d'une immunomodulation efficace est un des points clés dans la conception de nouveaux traitements visant à s'affranchir des restrictions thérapeutiques actuelles liées aux phénotypes et endotypes d'asthme.

- 1) Article 2 : *The  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$  auxiliary subunits of voltage-gated calcium channel ( $Ca_v 1$ ) are required for Th2-lymphocyte function and acute allergic airway inflammation*

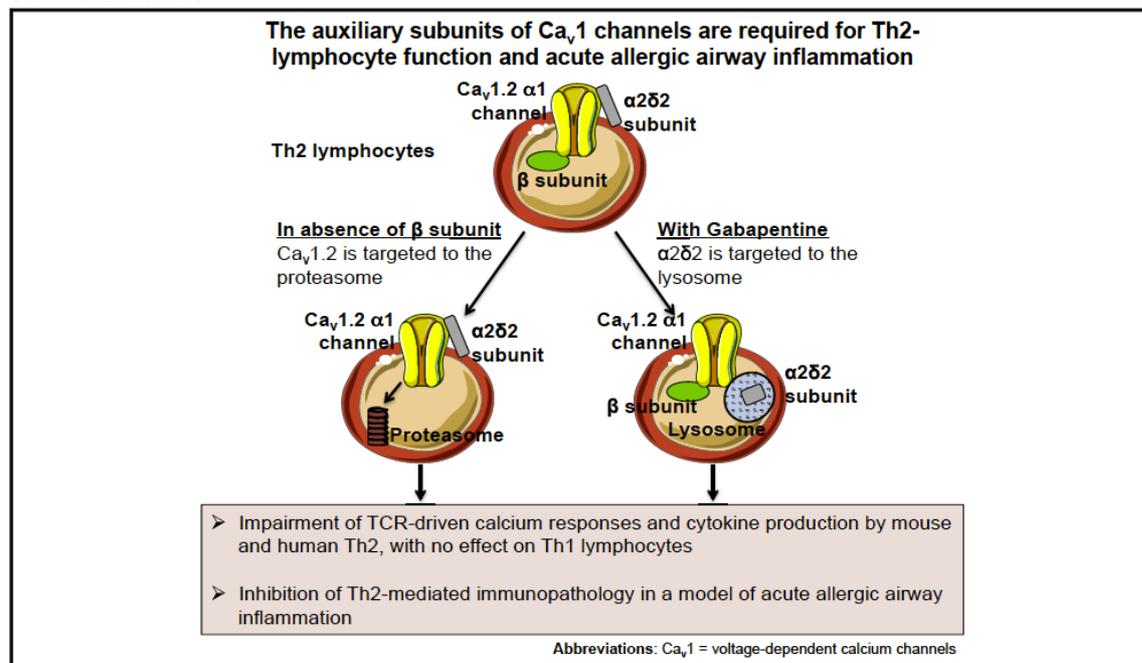
Mechanisms of allergy/immunology

**The  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$  auxiliary subunits of voltage-gated calcium channel 1 ( $Ca_v 1$ ) are required for  $T_H 2$  lymphocyte function and acute allergic airway inflammation**

Check for updates

Nicolas Rosa, PhD,<sup>a\*</sup> Emily Triffaux, PhD,<sup>a\*</sup> Virginie Robert, PhD,<sup>a\*</sup> Marion Mars, MSc,<sup>a</sup> Martin Klein, PhD,<sup>b</sup> Gregory Bouchaud, PhD,<sup>c</sup> Astrid Canivet, MSc,<sup>a</sup> Antoine Magnan, MD, PhD,<sup>b,d</sup> Jean-Charles Guéry, PhD,<sup>a</sup> Lucette Pelletier, MD, PhD,<sup>a\*</sup> and Magali Savignac, PhD<sup>a\*</sup> *Toulouse and Nantes, France*

GRAPHICAL ABSTRACT



**Background:** T lymphocytes express not only cell membrane ORAI calcium release-activated calcium modulator 1 but also voltage-gated calcium channel ( $Ca_v$ ) I channels. In excitable

cells these channels are composed of the ion-forming pore  $\alpha 1$  and auxiliary subunits ( $\beta$  and  $\alpha 2\delta$ ) needed for proper trafficking and activation of the channel. Previously, we

From <sup>a</sup>the Center of Physiopathology Toulouse Purpan, University Paul Sabatier Toulouse III, INSERM U1043, CNRS UMR 5282, Toulouse; <sup>b</sup>Institut du Thorax, INSERM CNRS, UNIV Nantes; <sup>c</sup>INRA, UR1268, BIA, Nantes; and <sup>d</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service de Pneumologie, Nantes.

\*These authors contributed equally to this work.

Supported by the French National Institute for Health and Medical research (INSERM) and grants from the French Society of Allergy and the Conseil Régional Midi-Pyrénées. N.R. was supported by a fellowship from Conseil Regional of Midi-Pyrénées and INSERM.

Disclosure of potential conflict of interest: N. Rosa's, E. Triffaux's, V. Robert's, M. Mars', J.-C. Guéry's, L. Pelletier's, and M. Savignac's institutes received grants from the French Society of Allergy and Conseil Régional de Midi-Pyrénées for this work. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication April 11, 2017; revised August 4, 2017; accepted for publication September 8, 2017.

Available online November 10, 2017.

Corresponding author: Lucette Pelletier, MD, PhD, Center of Physiopathology Toulouse Purpan, INSERM U1043, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: lucette.pelletier@inserm.fr. Or: Magali Savignac, PhD, Center of Physiopathology Toulouse Purpan, INSERM U1043, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: magali.savignac@inserm.fr.

The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749/\$36.00

© 2017 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.045>

disclosed the role of  $Ca_v1.2 \alpha 1$  in mouse and human  $T_H2$  but not  $T_H1$  cell functions and showed that knocking down  $Ca_v1 \alpha 1$  prevents experimental asthma.

**Objective:** We investigated the role of  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$  auxiliary subunits on  $Ca_v1 \alpha 1$  function in  $T_H2$  lymphocytes and on the development of acute allergic airway inflammation.

**Methods:** We used  $Ca_v\beta$  antisense oligonucleotides to knock down  $Ca_v\beta$  and gabapentin, a drug that binds to and inhibits  $\alpha 2\delta 1$  and  $\alpha 2\delta 2$ , to test their effects on  $T_H2$  functions and their capacity to reduce allergic airway inflammation.

**Results:** Mouse and human  $T_H2$  cells express mainly  $Ca_v\beta 1$ ,  $\beta 3$ , and  $\alpha 2\delta 2$  subunits.  $Ca_v\beta$  antisense reduces T-cell receptor-driven calcium responses and cytokine production by mouse and human  $T_H2$  cells with no effect on  $T_H1$  cells.  $Ca_v\beta$  is mainly involved in restraining  $Ca_v1.2 \alpha 1$  degradation through the proteasome because a proteasome inhibitor partially restores the  $\alpha 1$  protein level. Gabapentin impairs the T-cell receptor-driven calcium response and cytokine production associated with the loss of  $\alpha 2\delta 2$  protein in  $T_H2$  cells.

**Conclusions:** These results stress the role of  $Ca_v\beta$  and  $\alpha 2\delta 2$  auxiliary subunits in the stability and activation of  $Ca_v1.2$  channels in  $T_H2$  lymphocytes both *in vitro* and *in vivo*, as demonstrated by the beneficial effect of  $Ca_v\beta$  antisense and gabapentin in allergic airway inflammation. (J Allergy Clin Immunol 2018;142:892-903.)

**Key words:** Asthma,  $T_H2$ , voltage-gated calcium channel 1, calcium, cytokines

Allergic diseases, including rhinitis, atopic dermatitis, asthma, and food allergies, are induced by  $T_H2$  lymphocytes.  $T_H2$ -type responses are characterized by production of IL-4, IL-5, and IL-13, which contribute to mucus production, eosinophilia, and high levels of antigen-specific IgE. At present, treatments for allergic asthma are often symptomatic, even if in some cases specific allergenic immunotherapy and treatments targeting the cytokines (or their receptors) involved in type 2 inflammation can be beneficial.<sup>1,2</sup> The main immunosuppressants (eg, cyclosporine and tacrolimus) have also been proposed for use in patients with severe asthma resistant to glucocorticoids. However, because they decrease the activity of T cells and therefore the overall immune response by acting on calcium signaling, they have adverse effects.

Calcium is a second messenger that plays specific and key roles in various cellular functions, such as activation, differentiation, proliferation, and death. The role of store-operated  $Ca^{2+}$  entry is well described, implicating the sensing of T-cell receptor (TCR)-driven endoplasmic reticulum (ER)  $Ca^{2+}$  depletion by stromal interaction molecule 1, its oligomerization, and its localization in the vicinity of calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI1) channels at the plasma membrane, permitting sustained  $Ca^{2+}$  entry.<sup>3</sup>

In addition to these channels, the role of voltage-gated calcium channel ( $Ca_v$ ) 1 channels (defined as voltage activated in excitable cells) in T lymphocytes is now accepted.<sup>4-11</sup>

In excitable cells,  $Ca_v1$  channels are composed of the ion-forming pore  $\alpha 1$  and auxiliary  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$  subunits, with each subunit being encoded by 4 genes.  $Ca_v1.1$  to  $Ca_v1.4 \alpha 1$  form the ion pore and support the biophysical and pharmacologic properties of the channel,<sup>12-14</sup> whereas auxiliary  $\beta$  and  $\alpha 2\delta$

#### Abbreviations used

BAL:	Bronchoalveolar lavage
$[Ca^{2+}]_i$ :	Intracellular $Ca^{2+}$ concentration
$Ca_v$ :	Voltage-gated calcium channel
$Ca_v\beta AS$ :	$Ca_v\beta$ antisense
$Ca_v\beta S$ :	$Ca_v\beta$ scrambled
CRTH2:	Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on $T_H2$ cells
ER:	Endoplasmic reticulum
HPRT:	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
ORAI1:	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1
OVA:	Ovalbumin
TCR:	T-cell receptor

subunits increase  $Ca_v$  currents by enhancing the number of channels at the cell membrane and favoring channel opening.<sup>15-19</sup>  $Ca_v\beta$  would act by facilitating the correct folding of  $\alpha 1$  and promoting its exit from the ER,<sup>20</sup> whereas  $Ca_v\alpha 2\delta$  increases insertion of the channel into the cell membrane by favoring the trafficking of the channel from the post-Golgi apparatus and decreasing its turnover.<sup>21-23</sup>

While  $Ca_v\beta 2$  deletion<sup>24</sup> inhibited thymocyte development,  $Ca_v\beta 3$  and  $Ca_v\beta 4$  were found to be important for calcium influx, nuclear factor of activated T cells (NFAT) nuclear translocation, and cytokine production by peripheral  $CD4^+$  T lymphocytes. Previously, we reported that  $Ca_v1.2$  was expressed and functional in human and mouse  $T_H2$  cells.<sup>7,9,25</sup> In contrast,  $T_H1$  and  $T_H17$  lymphocytes in both species lacked  $Ca_v1.2$  expression.

Here we address whether  $Ca_v$  auxiliary subunits are required for channel functions in  $T_H2$  lymphocytes. We show that  $Ca_v\beta 1$ ,  $Ca_v\beta 3$ , and  $\alpha 2\delta 2$  subunits are expressed in mouse and human  $T_H2$  cells. Knocking down  $Ca_v\beta$  promoted degradation of  $Ca_v1.2 \alpha 1$ , which was at least partly rescued by adding MG132, a proteasome inhibitor, whereas gabapentin, an inhibitor of  $\alpha 2\delta 1/2$  subunits, decreased  $\alpha 2\delta 2$  protein levels in  $T_H2$  lymphocytes. In both cases, it was associated with a decreased TCR-dependent intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) increase and  $T_H2$  cytokine production. In accordance with our *in vitro* results, targeting either  $Ca_v\beta$  or  $\alpha 2\delta$  *in vivo* was beneficial in a model of acute allergic airway inflammation.

## METHODS

More details are provided in the [Methods](#) section in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org).

## Mice and model of acute airway allergic inflammation

Eight- to 12-week-old female BALB/c mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France), and TCR ovalbumin (OVA) transgenic DO11.10 mice were maintained in our pathogen-free animal facility. The INSERM U1043 Institutional Review Board for animal experimentation approved protocols. BALB/c mice immunized intraperitoneally with OVA (100  $\mu$ g) in alum (2 mg) were 15 days later administered intranasal OVA (50  $\mu$ g/d) in PBS for 5 days, as previously described,<sup>7</sup> with or without  $Ca_v\beta$  scrambled ( $Ca_v\beta S$ )

or  $\text{Ca}_v\beta$  antisense ( $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$ ) oligonucleotides (200  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) or gabapentin (400  $\text{mg}/\text{L}$  in drinking water) that was renewed every other day.<sup>26</sup> For  $\text{T}_\text{H}2$  transfer experiments, BALB/c mice (Janvier) were transferred intravenously with  $3 \times 10^6$  DO11.10  $\text{T}_\text{H}2$  cells transfected with  $\text{Ca}_v\beta\text{S}$  or  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  and given intranasal OVA (50  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) for 5 days. Twenty-four hours after the final OVA administration, serum, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, lungs, and draining lymph nodes were collected and processed, as described in the **Methods** section in this article's Online Repository.

### Cell culture

Mouse  $\text{T}_\text{H}1$  and  $\text{T}_\text{H}2$  cells were generated by weekly stimulation of DO11.10  $\text{CD}4^+$  T cells with antigen-presenting cells and the 323-339 OVA peptide plus appropriate differentiation cocktails: IL-12 (5  $\text{ng}/\text{mL}$ ) and anti-IL-4 antibody (11B11, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for  $\text{T}_\text{H}1$  and IL-4 (5  $\text{ng}/\text{mL}$ ) and anti-IFN- $\gamma$  antibody (XMG1.2, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for  $\text{T}_\text{H}2$ . PBMCs were obtained from Etablissement Français du Sang, and all human participants provided written informed consent. Human memory chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on  $\text{T}_\text{H}2$  cells ( $\text{CRTH}2$ )<sup>+</sup>  $\text{CD}4^+$  T and human  $\text{T}_\text{H}1$  cells were obtained and expanded, as previously reported.<sup>9</sup> Cells were transfected with 8  $\mu\text{mol}/\text{L}$  oligodeoxynucleotides (Eurogentec, Angers, France) by using TurboFect transfection reagent (Fermentas, Waltham, Mass) and collected 3 days after transfection.

### Single-cell calcium imaging

Single-cell calcium imaging was done, as previously described,<sup>7,9</sup> in cells loaded with Fura-2 AM before and after stimulation with biotinylated anti-CD3 cross-linked with streptavidin or anti-CD3/CD28-coated beads (1 bead per cell) for mouse or human T cells, respectively.

### Confocal microscopy

Cells were stained with anti-CD2 rat IgG antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom) or anti- $\alpha 2\delta 2$  rabbit antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) fixed, permeabilized and the  $\text{Ca}_v$  channel subunit staining was performed by using anti- $\text{Ca}_v1.2$  mouse IgG<sub>2b</sub> (NeuroMab, Davis, Calif), anti- $\text{Ca}_v\beta 1$  (Alomone Labs), or anti- $\text{Ca}_v\beta 3$  rabbit IgG (Santa Cruz Labs, Santa Cruz, Calif).

### Real-time quantitative PCR

RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was performed with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, Calif), and mRNA transcripts were measured by using real-time quantitative PCR with a LightCycler 480 Instrument (Roche, Mannheim, Germany).

### Immunoblotting

$\text{T}_\text{H}2$  lymphocytes or brain cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (Roche), and 30  $\mu\text{g}$  per lane for T-cell extracts and 10  $\mu\text{g}$  per lane for brain lysate were submitted to immunoblotting.

### ELISA

For *in vitro* cytokine assays,  $5 \times 10^4$   $\text{T}_\text{H}1$  and  $\text{T}_\text{H}2$  cells were seeded onto plates coated with anti-CD3 antibodies (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and stimulated with soluble anti-CD28 antibodies (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Supernatants were collected 24 hours later. For *in vivo* IgE assays, sera were isolated from blood collected into the mouse retro-orbital sinus. Cytokine and immunoglobulin levels were quantified by using the sandwich ELISA method.

### Statistical analysis

Groups were compared by using the paired or unpaired *t* test as needed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, Calif).

## RESULTS

### Knocking down $\text{Ca}_v\beta$ subunits decreases cytokine production induced by TCR engagement in mouse and human $\text{T}_\text{H}2$ cells

Murine  $\text{T}_\text{H}2$  cells expressed principally  $\text{Ca}_v\beta 1$  and  $\text{Ca}_v\beta 3$  transcripts (Fig 1, A), as did human  $\text{T}_\text{H}2$  cells.<sup>9</sup> The proteins  $\text{Ca}_v\beta 1$  and  $\text{Ca}_v\beta 3$  were detected by Western blotting with the same apparent molecular weights as the control neuronal forms (Fig 1, B) and by immunofluorescence (see Fig E1, A and B, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Although  $\text{T}_\text{H}1$  cells did not express  $\text{Ca}_v\alpha 1$  subunits, they did express  $\text{Ca}_v\beta 1$  and  $\text{Ca}_v\beta 3$  at both the transcriptional (Fig 1, A) and protein levels, with lower amounts compared with those in  $\text{T}_\text{H}2$  cells (see Fig E1, A and B).

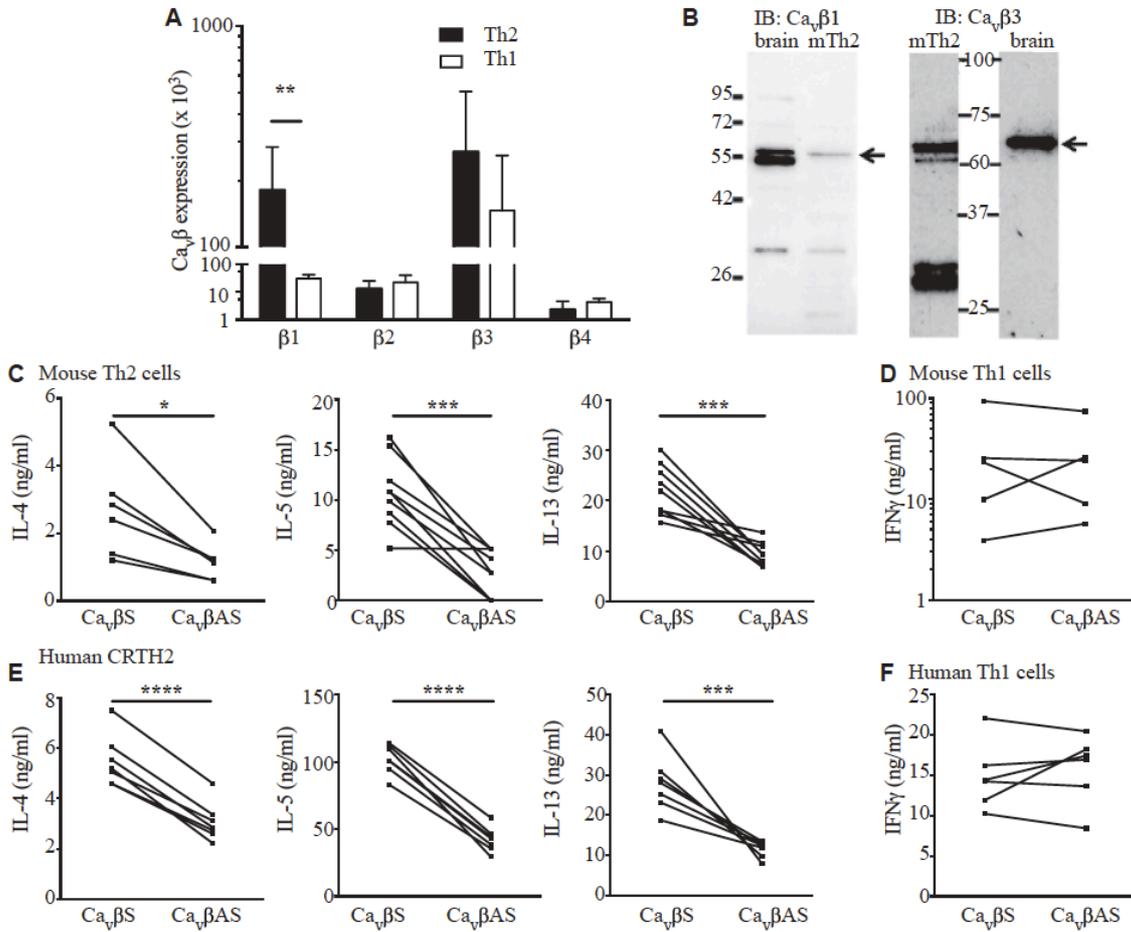
To investigate whether  $\beta$  subunits were important for  $\text{T}_\text{H}2$  functions, we used antisense oligonucleotides targeting the 4  $\text{Ca}_v\beta$  subunits in mice and human subjects.<sup>27</sup> Transfection of mouse  $\text{T}_\text{H}2$  cells with  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  decreased the amount of  $\text{Ca}_v\beta 1$  and  $\text{Ca}_v\beta 3$  subunits by Western blotting (see Fig E1, C and D) and by immunofluorescence (see Fig E1, E and F), with no effect on expression of ORA11, a calcium channel important for T-cell function (see Fig E1, C and D).  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  decreased IL-4, IL-5, and IL-13 production by 50% to 70% in mouse  $\text{T}_\text{H}2$  cells compared with  $\text{Ca}_v\beta\text{S}$ -transfected  $\text{T}_\text{H}2$  cells (Fig 1, C) without any effect on IFN- $\gamma$  production by  $\text{T}_\text{H}1$  cells (Fig 1, D).

Human memory  $\text{T}_\text{H}2$  cells were selected based on expression of the cell membrane marker  $\text{CRTH}2$  and were expanded with anti-CD3/anti-CD28-coated beads in the presence of IL-4 and IL-2. Transfection of human  $\text{T}_\text{H}2$  lymphocytes with  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  reduced the amount of  $\text{Ca}_v\beta$  subunits at the mRNA level (see Fig E1, G) associated with significant diminution of  $\text{T}_\text{H}2$  cytokine production (Fig 1, E) without any effect on IFN- $\gamma$  production by human  $\text{T}_\text{H}1$  cells (Fig 1, F).

### Knocking down $\text{Ca}_v\beta$ subunits diminishes TCR-driven calcium response in mouse and human $\text{T}_\text{H}2$ cells

To show that  $\text{Ca}_v\beta$  subunits play a role in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling of  $\text{T}_\text{H}2$  cells, we analyzed the TCR-driven  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase at the single-cell level. Mouse  $\text{T}_\text{H}2$  cells transfected with  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  displayed a decreased and delayed calcium response compared with cells transfected with  $\text{Ca}_v\beta\text{S}$  (Fig 2, A). Indeed,  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$ -transfected  $\text{T}_\text{H}2$  cells presented a significantly reduced area under the curve compared with control  $\text{T}_\text{H}2$  cells (Fig 2, B). A significant number of  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$ -transfected  $\text{T}_\text{H}2$  cells ( $21\% \pm 5\%$ ) did not show any increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  levels after TCR stimulation, whereas most control  $\text{T}_\text{H}2$  cells ( $98\% \pm 2\%$ ) did ( $P < .005$ ). Moreover, among responsive cells,  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$ -transfected  $\text{T}_\text{H}2$  cells had a delayed calcium response compared with control cells (Fig 2, C). However, ionomycin application at the end of the experiment induced a similar  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase in  $\text{T}_\text{H}2$  cells, irrespective of whether they were transfected with  $\text{Ca}_v\beta\text{S}$  or  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  (Fig 2, A), indicating that  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  did not affect loading with the Fura-2 probe.

$\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  had the same effect on the TCR-driven  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase of human  $\text{T}_\text{H}2$  lymphocytes with a delayed and reduced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase (Fig 2, D-F). Conversely, transfection of mouse (see Fig 2, G-I) or human (Fig 2, J-L)  $\text{T}_\text{H}1$  cells with  $\text{Ca}_v\beta\text{AS}$  had no effect on



**FIG 1.**  $Ca_v\beta AS$  diminishes cytokine production in mouse and human  $T_H2$  but not in  $T_H1$  cells. **A** and **B**, OVA-specific DO11.10  $T_H2$  and  $T_H1$  cells were tested for  $Ca_v\beta$  at the transcript (n = 4; Fig 1, **A**) or protein level (Fig 1, **B**). **C-F**, Mouse DO11.10  $T_H2$  (Fig 1, **C**), mouse  $T_H1$  (Fig 1, **D**), human CRTH2<sup>+</sup> (Fig 1, **E**), or human  $T_H1$  (Fig 1, **F**) cells were transfected with  $Ca_v\beta S$  or  $Ca_v\beta AS$  for 72 hours, then stimulated for 24 hours with anti-CD3/C28 antibodies, and cytokine production was measured. Each pair represents a separate experiment in Fig 1, **C** and **D**, and a donor in Fig 1, **E** and **F**. \* $P < .02$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .005$ , and \*\*\*\* $P < .001$ .

the shape and the amplitude of the calcium response induced by TCR stimulation, which is in agreement with the lack of an effect of  $Ca_v\beta AS$  on IFN- $\gamma$  synthesis by  $T_H1$  cells (Fig 1, **D** and **F**).

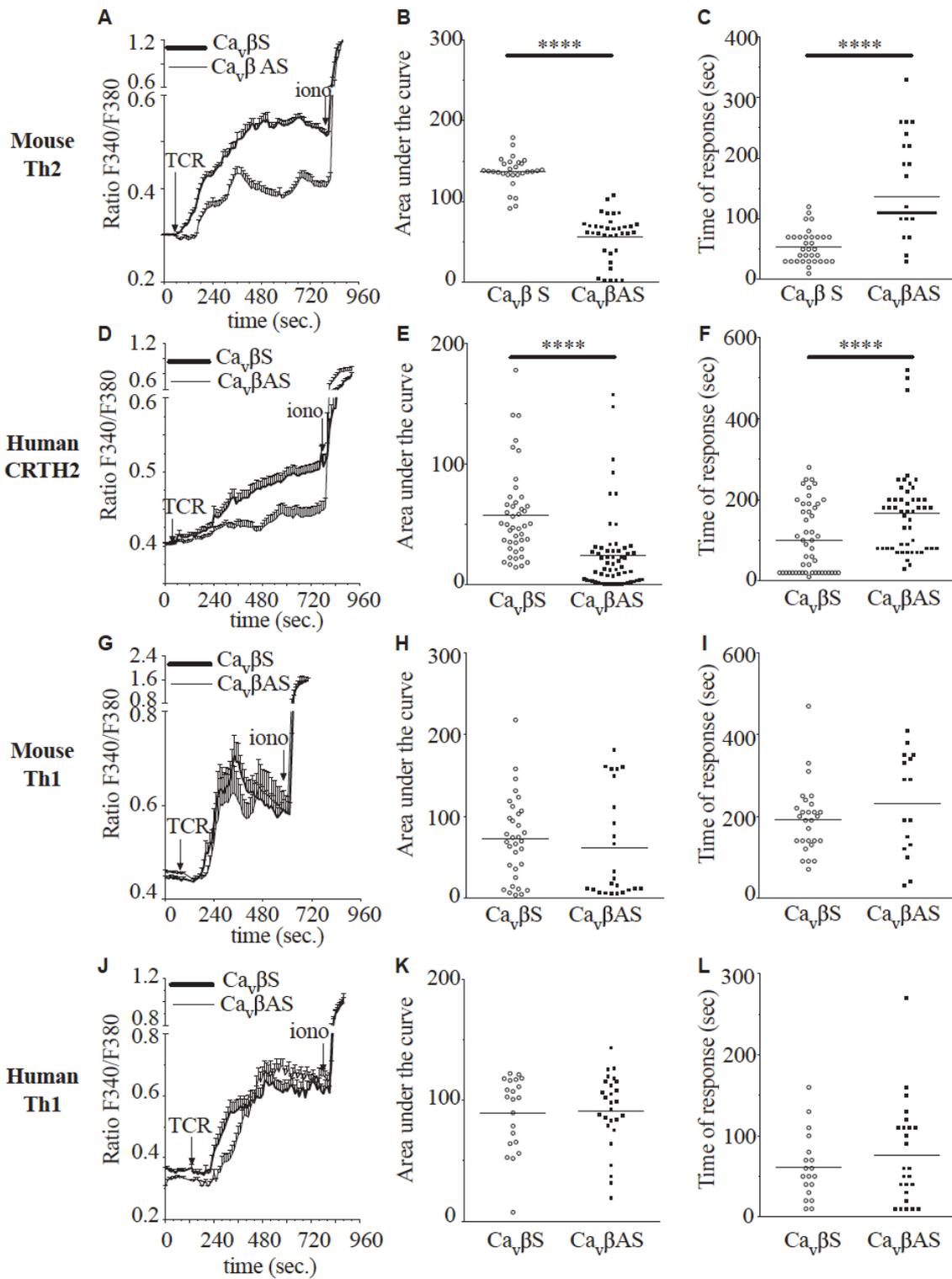
**An inhibitor of the proteasome protects the  $Ca_v1.2 \alpha 1$  subunit from degradation in the absence of  $Ca_v\beta$  but does not restore cytokine production**

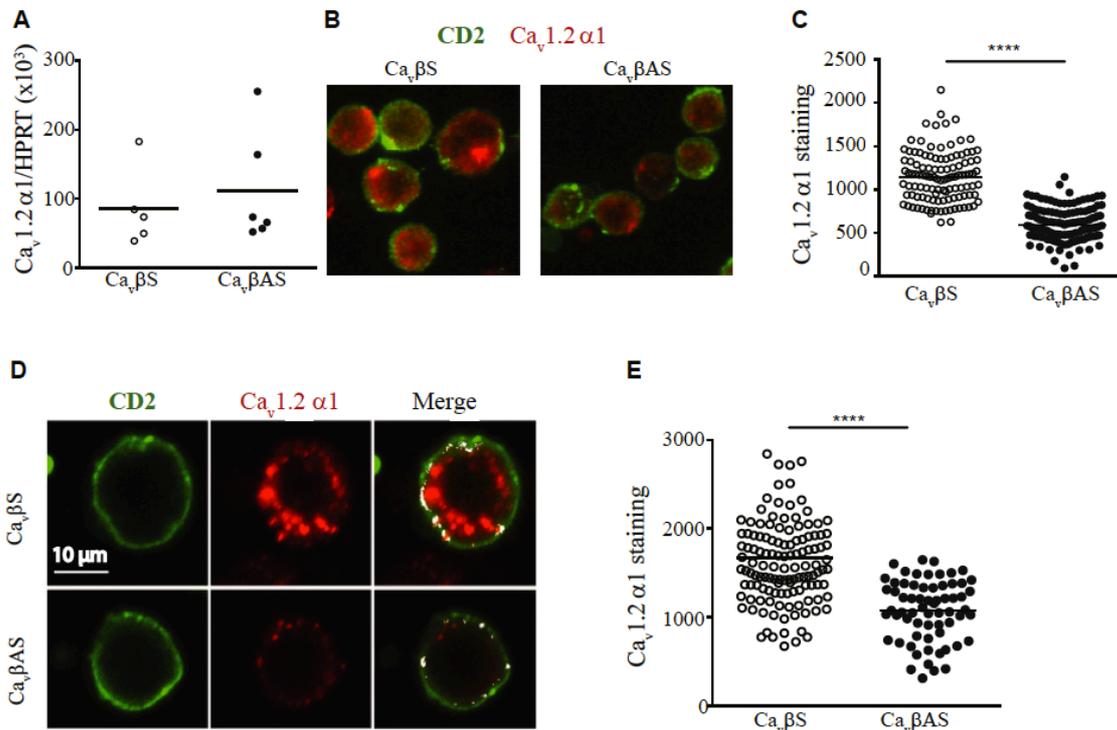
One possible role of  $Ca_v\beta$  subunits could be to prevent  $Ca_v1.2 \alpha 1$  degradation by the proteasome.<sup>28</sup> In agreement with this hypothesis, we showed that transfection of  $T_H2$  cells with  $Ca_v\beta AS$  did not affect levels of  $Ca_v1.2 \alpha 1$  transcripts (Fig 3, **A**) but strongly reduced the amount of  $Ca_v1.2 \alpha 1$  protein in mouse (Fig 3, **B** and **C**) and human (Fig 3, **D** and **E**) cells. The proteasome inhibitor MG132 had no effect on amounts of  $Ca_v\beta 1$  (Fig 4, **A**) and  $Ca_v\beta 3$  (Fig 4, **B**) proteins, but it partially restored  $Ca_v1.2 \alpha 1$  protein expression in murine  $T_H2$  cells

(Fig 4, **C**). Analysis of colocalization of  $Ca_v1.2 \alpha 1$  with CD2 used as a cell membrane marker shows that  $Ca_v\beta AS$  decreases the amount of protein localized at the cell membrane, which was partially restored by MG132 (see Fig E2 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). However, MG132 treatment did not allow restoration of cytokine production by  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v\beta AS$  (Fig 4, **D**), suggesting that the  $Ca_v\beta$  subunit could also contribute to regulate channel function, as previously reported.<sup>29-31</sup>

**Intranasal delivery of  $Ca_v\beta AS$  alleviates  $T_H2$ -dependent airway inflammation**

With the goal to investigate the role of  $Ca_v\beta$  *in vivo*, we evaluated whether  $Ca_v\beta AS$  modified the course of allergic airway inflammation. Immunization with OVA in alum followed by inhalation of OVA (Fig 5, **A**) triggered  $T_H2$ -dependent airway





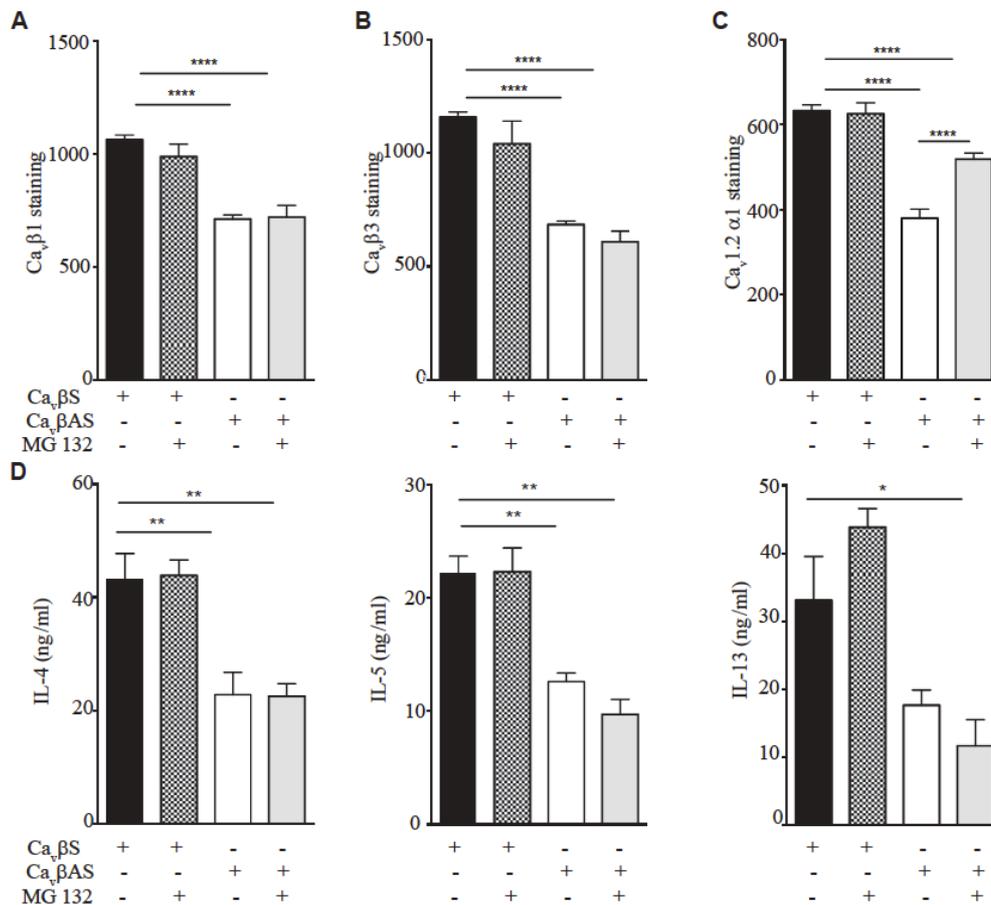
**FIG 3.** Knocking down  $Ca_v\beta$  subunits decreases  $Ca_v1\alpha1$  expression in mouse and human  $T_H2$  cells. Cells were transfected with  $Ca_v\beta S$  or  $Ca_v\beta AS$  for 72 hours. **A**, Amount of  $Ca_v1.2\alpha1$  transcripts in mouse D011.10  $T_H2$  cells. **B-E**, Staining with anti-CD2 (green) and anti- $Ca_v1.2\alpha1$  (red) mAbs in mouse D011.10  $T_H2$  cells (**B** and **C**) and human CRTH2<sup>+</sup> cells (**D** and **E**). The  $Ca_v1.2\alpha1$  cell amount over all the Z-stack sections is quantified in **Fig 3, C** and **E**. One representative experiment of 3 is shown. \*\*\*\* $P < .001$ .

inflammation marked by predominant eosinophil infiltration (**Fig 5, B**).  $Ca_v\beta AS$  administration decreased strongly the content of inflammatory cells in BAL fluid, including eosinophils and lymphocytes, compared with that seen in control mice treated or not with  $Ca_v\beta S$  (**Fig 5, B**). Consistently, histologic examination of lung tissues showed that  $Ca_v\beta AS$  administration inhibited inflammatory infiltrates (**Fig 5, C**, and see **Fig E3, A**, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). This protection was associated with defective  $T_H2$  responses, as shown by the dramatic reduction in serum IgE concentration (**Fig 5, D**) and the reduced synthesis of IL-4, IL-5, and IL-13 by OVA-stimulated T cells from lung draining lymph node cells (**Fig 5, E**). In accordance with the effects of  $Ca_v\beta AS$  on airway inflammation, mice displayed reduced airway hyperresponsiveness (see **Fig E4** in this article's Online

Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Interestingly, CD4<sup>+</sup> T cells infiltrating the lungs in  $Ca_v\beta AS$ -treated mice expressed reduced amounts of  $Ca_v1.2\alpha1$  proteins compared with CD4<sup>+</sup> T cells from mice treated with  $Ca_v\beta S$  (see **Fig E3, B-D**), suggesting that  $Ca_v\beta$  was required for the maintenance of  $Ca_v1.2\alpha1$  protein expression in lung-infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells, as shown for  $T_H2$  cells *in vitro*.

To investigate whether  $Ca_v\beta$  expression in  $T_H2$  cells was necessary and sufficient to control allergic asthma, we transferred OVA-specific TCR transgenic DO11.10  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v\beta AS$  or  $Ca_v\beta S$  in mice that were then challenged with intranasal OVA (**Fig 6, A**).  $Ca_v\beta AS$ - and  $Ca_v\beta S$ -transfected  $T_H2$  cells localized equally well in the lungs (**Fig 6, B**). However,  $Ca_v\beta AS$ -transfected  $T_H2$  cells had reduced ability to promote the  $T_H2$  response on airway challenge, as shown by the reduction in

**FIG 2.** Knocking down  $Ca_v\beta$  subunits reduces the TCR-driven  $[Ca]_i$  increase in mouse and human  $T_H2$  cells without any effect on  $T_H1$  cells. Mouse DO11.10  $T_H2$  (**A-C**), human CRTH2<sup>+</sup> (**D-F**), mouse  $T_H1$  (**G-I**), or human  $T_H1$  (**J-L**) cells were transfected with  $Ca_v\beta AS$  or  $Ca_v\beta S$  and loaded with Fura-2 AM. The fluorescence ratio at 340- and 380-nm excitation wavelengths was recorded at the single-cell level before and after TCR stimulation; ionomycin (*iono*) was added at the end of the experiment. Results in **Fig 2, A, D, G, and J** are expressed as the mean of at least 30 cells, and *bars* represent SEMs. The area under the curve between the time of stimulation and the time at which ionomycin is added is shown in **Fig 2, B, E, H, and K**. The time of response (delay between stimulation and the time showing an increase in ratio over the mean ratio plus 1 SD recorded before stimulation) is shown in **Fig 2, C, F, I, and L**. One representative experiment of 4 to 6 is shown. \*\*\*\* $P < .001$ .



**FIG 4.** MG132 partially restores Ca<sub>v</sub>1.2 α1 in T<sub>H</sub>2 cells knocked down for Ca<sub>v</sub>β without an effect on T<sub>H</sub>2 cytokine production. Mouse DO11.10 T<sub>H</sub>2 cells were transfected with Ca<sub>v</sub>βS or Ca<sub>v</sub>βAS for 48 hours before addition of MG132 (0.5 μmol/L) or vehicle for an additional 24 hours. Cells were then recovered and analyzed by immunofluorescence (A-C) or stimulated for 24 hours with anti-CD3/C28 antibodies (D). A-C, T<sub>H</sub>2 cells were labeled with anti-Ca<sub>v</sub>β1 (Fig 4, A), anti-Ca<sub>v</sub>β3 (Fig 4, B), or anti-Ca<sub>v</sub>1.2 α1 (Fig 4, C) mAbs. Immunofluorescence was summed over all Z-sections. Results are expressed as the mean of 50 to 200 cells. Bars represent SEMs. One representative experiment of 3 is shown. D, Cytokine production was measured by ELISA. Results are expressed as the mean of 4 experiments, and bars represent SDs. \**P* < .05, \*\**P* < .01, and \*\*\*\**P* < .001.

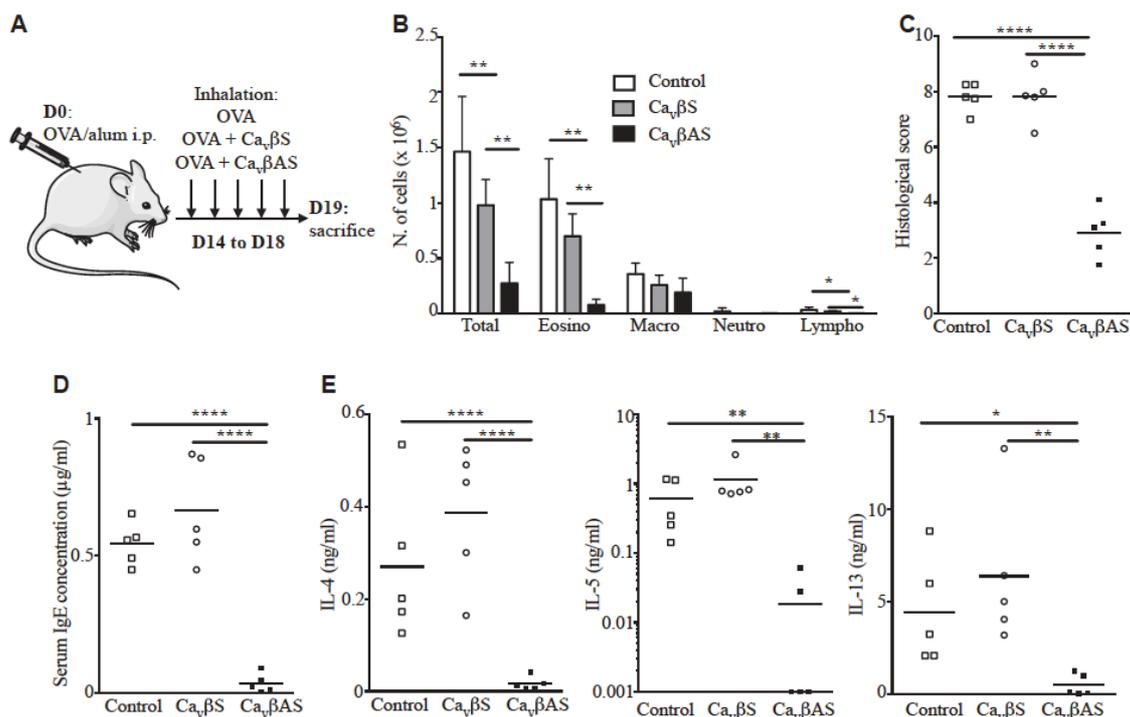
lung inflammation (Fig 6, C and D, and see Fig E3, E), the lower serum IgE concentration (Fig 6, E), and the impaired T<sub>H</sub>2 cytokine production after recall of antigen-specific draining lymph node T cells with OVA (Fig 6, F). This was not associated with a shift toward a T<sub>H</sub>1 response, as shown by the similar IFN-γ production by OVA-stimulated draining lymph node cells from both groups (Fig 6, F).

#### Gabapentin, an inhibitor of Ca<sub>v</sub>α2δ, impairs T<sub>H</sub>2 function and reduces allergic airway inflammation

Mouse T<sub>H</sub>2 cells expressed mainly Ca<sub>v</sub> α2δ2 (Fig 7, A), as did human T<sub>H</sub>2 cells.<sup>9</sup> Blotting and probing T<sub>H</sub>2 cell or brain lysates with anti-α2δ2 antibodies showed similar bands of around 140 kDa (Fig 7, B). To investigate the role of α2δ in Ca<sub>v</sub>1-dependent T<sub>H</sub>2 function, we used gabapentin, a ligand binding to Ca<sub>v</sub> α2δ1 and α2δ2 but not to the other α2δ

subunits.<sup>32</sup> Chronic *in vitro* treatment with this drug is known to inhibit Ca<sub>v</sub> currents. Accordingly, treatment of T<sub>H</sub>2 cells with gabapentin for 72 hours decreased and delayed the TCR-driven calcium response (Fig 7, C), as shown by quantification of the area under the curve and time of response, respectively (Fig 7, D and E). This decrease in calcium signaling was associated with reduced T<sub>H</sub>2 cytokine production (Fig 7, F). However, gabapentin had no effect on calcium response and IFN-γ production in T<sub>H</sub>1 lymphocytes (see Fig E5 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

Because gabapentin was reported to induce loss of the Ca<sub>v</sub>2 complex at the cell membrane,<sup>33,34</sup> we tested its effect on Ca<sub>v</sub>1.2 protein expression in T<sub>H</sub>2 cells. The amount of α2δ2 protein was strongly reduced in gabapentin-treated T<sub>H</sub>2 cells (Fig 7, G, and see Fig E6 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), with no effect on Ca<sub>v</sub>1.2 expression



**FIG 5.**  $Ca_v\beta AS$  administration strongly diminishes allergic airway inflammation. **A**, BALB/c mice were immunized with OVA in alum and challenged 15 days later with intranasal OVA only or OVA plus scrambled  $Ca_v\beta$  ( $Ca_v\beta S$ ) or OVA plus  $Ca_v\beta$  antisense ( $Ca_v\beta AS$ ) every day for 5 days. *i.p.*, Intraperitoneal. **B**, Number of cells in BAL fluid. **C**, Hematoxylin and eosin–stained sections from mice were scored on a 0- to 12-point scale. **D**, Serum IgE concentrations were measured at the time of death. **E**, Mediastinal lymph nodes were collected, cell suspensions were recultured for 72 hours with OVA, and cytokine production was measured by ELISA. Results in Fig 5, *B–E*, are means of 5 mice and representative of 2 independent experiments. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\*\* $P < .001$ .

(Fig 7, *H*, and see Fig E6). Moreover, Bafilomycin A1, an inhibitor of the vacuolar  $H^+$  ATPase that inhibited acidification and protein degradation in lysosomes, partially restored the amount of  $\alpha 2\delta 2$  in gabapentin-treated  $T_H2$  lymphocytes (Fig 7, *G*, and see Fig E6), demonstrating that gabapentin targeted  $\alpha 2\delta 2$  in lysosomes for its degradation.

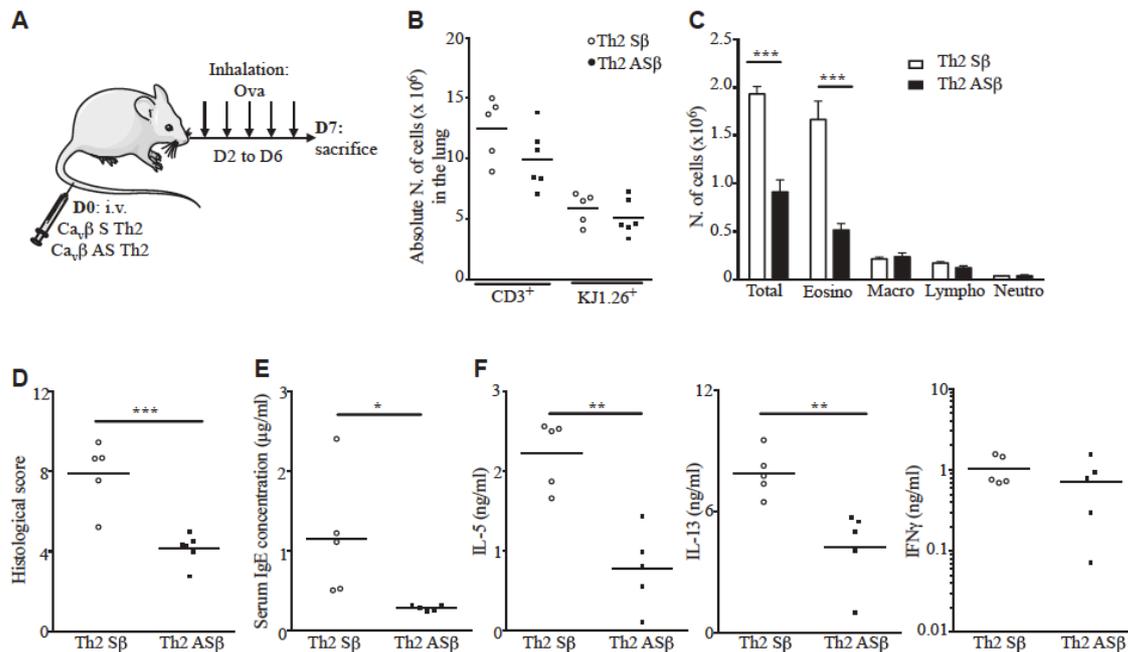
We then examined the effect of gabapentin administration on the development of allergic airway inflammation (Fig 8, *A*). Administration of gabapentin during OVA challenge partially reduced airway inflammation, as shown by the reduction in the number of inflammatory cells, including eosinophils in BAL fluid (Fig 8, *B*) and histologic examination of lung sections (Fig 8, *C* and *D*). Expression of  $T_H2$  cytokines and mucins 5ac and 5b, which are the major components of mucus in the lungs,<sup>35</sup> was decreased in the lungs of gabapentin-treated mice (Fig 8, *E*), supporting a beneficial effect of gabapentin on  $T_H2$ -mediated inflammation.

## DISCUSSION

Previously, we reported that knocking down  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v1.3$   $\alpha 1$  subunits in  $T_H2$  cells impaired their functions and protected against asthma.<sup>7</sup> These subunits are voltage-gated calcium

ion-forming pores in excitable cells. However, we and other groups showed that they are not voltage gated in lymphocytes. We then investigated whether auxiliary subunits, such as  $Ca_v\beta$  and  $Ca_v\alpha 2\delta$ , are required for  $T_H2$  cell functions and can be targeted beneficially in acute allergic airway inflammation. Our results now show that (1) knocking down  $Ca_v\beta$  expression with  $Ca_v\beta AS$  designed to target the 4  $\beta$ -subunits reduces the TCR-driven  $[Ca^{2+}]_i$  increase and  $T_H2$  cytokine production by mouse and human  $T_H2$  cells while sparing  $T_H1$  cell responses; (2) this is associated with the loss of  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  protein, which can be partially overcome by a proteasome inhibitor; (3) intranasal delivery of  $Ca_v\beta AS$  strongly diminishes  $T_H2$ -mediated immunopathology in a model of acute allergic airway inflammation; and (4) the  $Ca_v\alpha 2\delta 1/2$  inhibitor gabapentin impairs calcium signaling and reduces OVA-induced asthma.

Although  $Ca_v\beta 3$  can regulate calcium signaling independently of  $\alpha 1$  by limiting inositol 1, 4, 5-triphosphate generation in pancreatic cells,<sup>36</sup> this is unlikely in  $T_H2$  cells because knocking down  $Ca_v\beta$  decreases and not enhances  $[Ca^{2+}]_i$  level. In addition,  $Ca_v\beta AS$  does not affect the calcium signal in  $T_H1$  cells that express  $Ca_v\beta 3$  but no  $Ca_v1$   $\alpha 1$  subunits. Moreover, our results favor a role of  $Ca_v\beta$  related to its interaction with  $Ca_v1$   $\alpha 1$ , as supported by the loss of expression of  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  in  $T_H2$  cells



**FIG 6.**  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v1.2$ AS have impaired ability to induce type 2 airway inflammation. **A**,  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v1.2$ S or  $Ca_v1.2$ AS were injected into BALB/c mice given intranasal OVA. *i.v.*, Intravenous. **B**, Lung-infiltrating cells were purified and analyzed by means of flow cytometry to enumerate  $CD3^+$  and  $CD3^+KJ1.26^+$  cells. **C**, Inflammatory cells were enumerated in BAL fluid. **D**, Lung sections were scored for inflammation. **E**, Serum IgE concentrations were measured at the time of death. **F**, Lung draining lymph node cells were recalled with OVA for determination of cytokine production. Each group comprised 5 mice. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\* $P < .005$ .

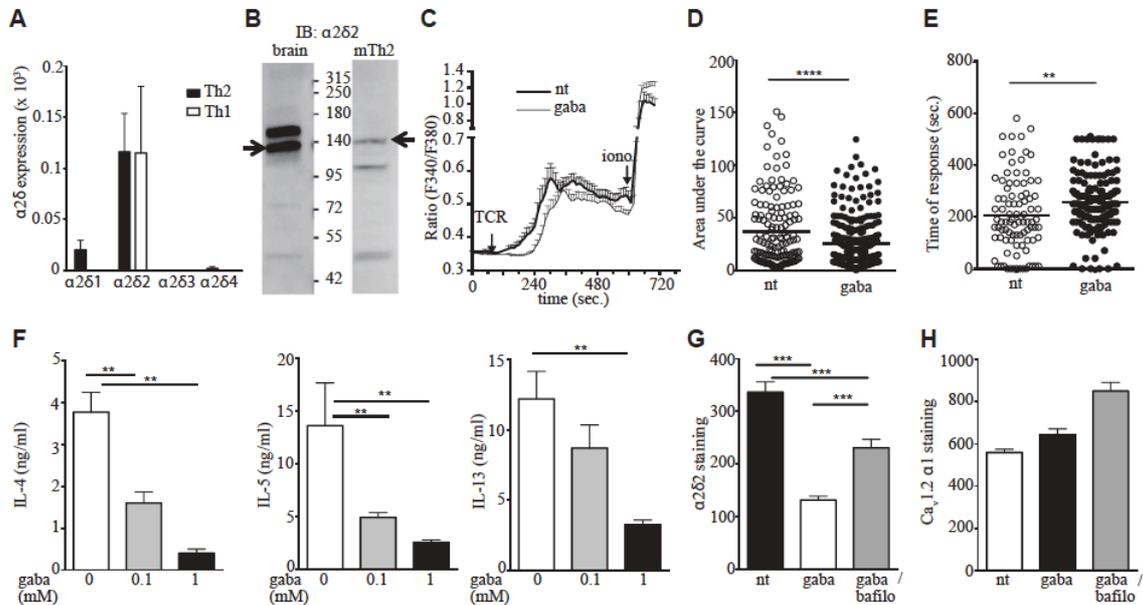
transfected with  $Ca_v1.2$ AS. In  $T_H2$  cells,  $Ca_v1.2$  prevents the degradation of  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$ , which is consistent with findings showing that  $\beta 1$  or  $\beta 2$  might be required for  $Ca_v1.2$  or  $Ca_v2.1$   $\alpha 1$  protein expression.<sup>28,37</sup> Surprisingly, transfection of ventricular myocytes with the same  $Ca_v1.2$ AS we used in our study resulted in  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  sequestration without increased cardiac  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  degradation.<sup>38</sup> This apparent discrepancy could be related to differences in  $Ca_v1.2$  subunit equipment and/or regulation in these cell types. Along this line, it has been shown that the absence of  $Ca_v1.4$  resulted in decreased expression of  $Ca_v1.1$  but not  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  protein in  $CD4^+$  T cells.<sup>6</sup>

Two mechanisms have been proposed to explain how  $Ca_v1.2$  can protect the  $\alpha 1$  subunit from degradation. First, interaction of  $\beta 2$  with  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  might limit degradation of the channel in lysosomes.<sup>39</sup> Second, interaction of  $\beta 1$  or  $\beta 2$  with  $Ca_v1.2$  or  $Ca_v2.2$   $\alpha 1$  prevents  $\alpha 1$  being addressed to and degraded by the proteasome.<sup>28,37</sup> This second mechanism is in agreement with our data in  $T_H2$  cells. Indeed, we show that knocking down  $Ca_v1.2$   $\beta$  diminished the total amount of endogenous  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$ , which was partially restored on proteasome inhibition in  $T_H2$  cells. Whether  $\beta$  subunits are also required for the export of  $\alpha 1$  subunits to reach the cell surface is controversial.<sup>23,28,40</sup> Knocking down  $Ca_v1.2$   $\beta$  resulted in lower expression of  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  at the cell membrane, which was restored in part by the proteasome inhibitor, indicating that  $Ca_v1.2$   $\beta$  was not absolutely

required for the channel to exit from the ER or that the remaining  $Ca_v1.2$  subunits were sufficient to promote trafficking of the channel at the cell membrane. The absence of  $Ca_v1.2$   $\beta$ , even in the presence of proteasome inhibitor, did not allow restoration of cytokine production by  $T_H2$  cells, which could be due to the incomplete restoration of  $Ca_v1.2$   $\alpha 1$  and/or a role of  $Ca_v1.2$   $\beta$  on function of the channel at the cell membrane.

Mouse  $T_H2$  cells express predominantly both  $\beta 1$  and  $\beta 3$  subunits, as do human  $T_H2$  cells.<sup>9</sup> It was reported previously that the  $\beta 1$  variant preferentially interacts with  $Ca_v1.1$   $\alpha 1$ , allowing interaction of  $Ca_v1.1$  with ER-localized type 1 ryanodine receptors<sup>41</sup> and leading to calcium depletion in the ER. It would be interesting to investigate the respective roles of  $Ca_v1.2$   $\beta 1$  and  $Ca_v1.2$   $\beta 3$  in  $Ca_v1.2$  function. Interestingly,  $Ca_v1.2$   $\beta$  can interact with G proteins, scaffolding proteins,<sup>42</sup> and especially AHNAK, which might be required for plasma membrane localization of the channel, as described for  $Ca_v1.1$   $\alpha 1$  channels in T cells.<sup>43</sup>

We found predominantly  $\alpha 2\delta 2$  at the mRNA level in  $T_H2$  cells. We also detected the protein by using Western blotting with the same apparent weight as in neurons and by means of immunofluorescence. Nerve injury can be responsible for chronic pain caused by  $\alpha 2\delta 1$  overexpression in injured sensory neurons.<sup>44,45</sup> Gabapentin is beneficial because this drug, which binds to  $\alpha 2\delta 1$  and  $\alpha 2\delta 2$  but not the other  $\alpha 2\delta$  isoforms,<sup>34</sup> might decrease expression of  $Ca_v2$  channels at the cell



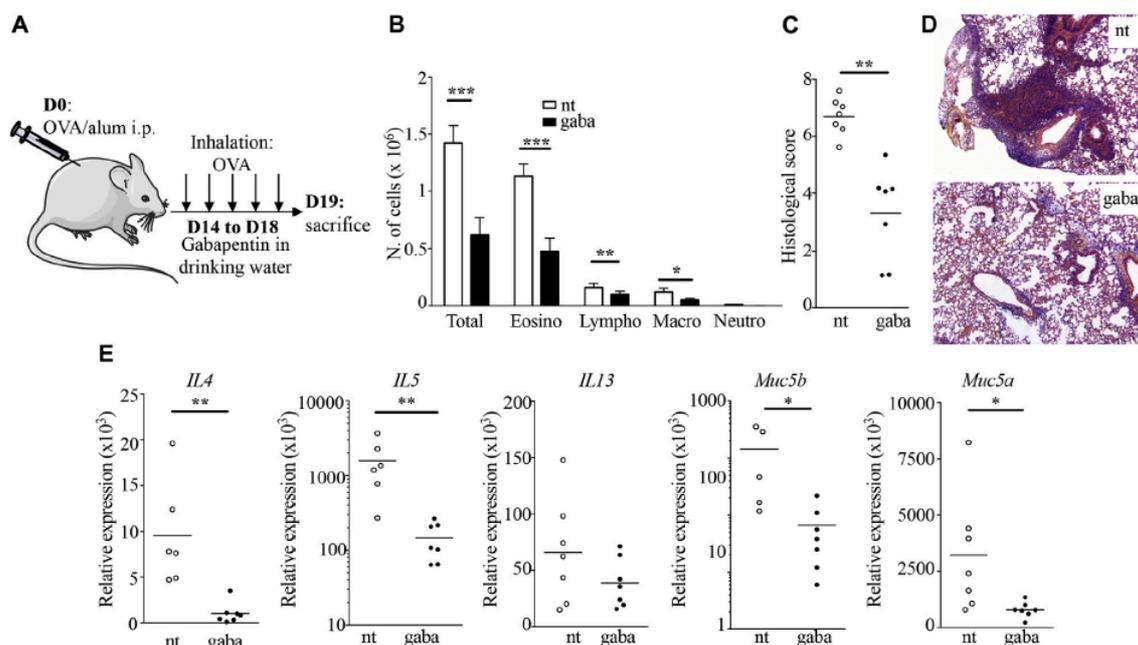
**FIG 7.** Gabapentin (*gaba*), an inhibitor of  $Ca_v\alpha2\delta$  auxiliary subunits, reduces calcium signaling and cytokine production by mouse  $T_H2$  cells. **A**, Mouse DO11.10  $T_H2$  cells were analyzed for expression of  $\alpha2\delta$  transcripts ( $n = 4$ ). **B**,  $T_H2$  and brain (positive control) lysates were blotted and stained with anti- $\alpha2\delta$  antibodies. **IB**, Immunoblotting.  $T_H2$  cells were preincubated with gabapentin (1 mmol/L) for 72 hours in Fig 7. **C-H**, Cells were then loaded with the calcium probe Fura-2 AM, and the fluorescence ratio at 340- and 380-nm excitation wavelengths was recorded at the single-cell level. Results are expressed as the mean of at least 50 cells, and bars represent SEMs. Fig 7, **D** and **E**, show, respectively, the area under the curve and the time of response for each cell defined as in Fig 3. Data are representative of 3 experiments. **F**,  $T_H2$  cells were stimulated in the presence or not of gabapentin for an additional 24 hours with anti-CD3/anti-CD28 antibodies. Cytokine content was then measured. **G** and **H**,  $T_H2$  cells were incubated or not with bafilomycin (*bafilo*; 0.5  $\mu$ mol/L) for the last 24 hours. Cells were stained with anti- $\alpha2\delta$  (Fig 7, **G**) or anti- $Ca_v1.2 \alpha1$  (Fig 7, **H**) antibodies. Immunofluorescence was summed all over the Z-stack sections. One representative experiment of 2 is shown. \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .005$ , and \*\*\*\* $P < .001$ .

membrane,<sup>33,34,46</sup> leading to a reduction in  $Ca_v$  calcium currents. However, the authors did not report an effect of gabapentin on the total amount of  $\alpha2\delta$  and  $Ca_v \alpha1$  subunits. Unexpectedly,  $T_H2$  cells treated with gabapentin show reduced total amounts of  $\alpha2\delta$ , which are restored by an inhibitor of the vacuolar  $H^+$  ATPase. This suggests that gabapentin favors  $\alpha2\delta$  degradation in an acidic compartment, such as lysosomes. Along this line, gabapentin was shown to prevent recycling of  $\alpha2\delta$  from Rab11-positive recycling endosomes to the plasma membrane.<sup>47</sup> We show here that gabapentin neither affects the total amount of  $Ca_v1.2$  protein nor its localization at the plasma membrane in  $T_H2$  cells. However, the calcium response was decreased on TCR activation, suggesting that  $\alpha2\delta$  can contribute to the function of  $Ca_v1.2 \alpha1$ , as described for  $\alpha2\delta1$ .<sup>48</sup> Altogether, our results obtained with gabapentin and knockdown of  $Ca_v\beta$  in the presence of MG132 indicate that the level of  $Ca_v1.2 \alpha1$  is not the only parameter limiting the calcium response and suggest that both auxiliary subunits are required in addition to  $Ca_v1.2 \alpha1$  for  $T_H2$  functions.

Altogether, these data stress the role of auxiliary subunits ( $Ca_v\beta$  and  $\alpha2\delta$ ) in  $Ca_v1.2$  channel function in  $T_H2$  cells and show that the auxiliary subunits of  $Ca_v1$  channels represent potential new therapeutic targets in allergy. Consistently,  $Ca_v\beta$ AS has a

marked effect on  $T_H2$  functions, airway inflammation, and hyperreactivity.  $CD4^+$  T cells infiltrating the lungs express the  $Ca_v1.2 \alpha1$  channel, and this expression is diminished in mice during  $Ca_v\beta$ AS treatment, suggesting that  $Ca_v\beta$ AS acts in a similar way *in vitro* and *in vivo*. Chronic administration of gabapentin decreased  $T_H2$  functions and inflammation. Because  $Ca_v\beta$ AS and gabapentin act in different ways to decrease  $Ca^{2+}$  signaling and  $T_H2$  function, it is tempting to propose a combination of drugs targeting  $Ca_v\beta$  and  $Ca_v\alpha2\delta$ . In that respect, gabapentin is already used for the treatment of chronic cough,<sup>49</sup> a symptom that is currently found in asthmatic patients. Interestingly, peptides stapling the  $Ca_v \alpha1$  domain interacting with  $Ca_v\beta$  subunits and shown to inhibit  $Ca_v$  functions have been recently described<sup>50</sup> and could be tested for their efficacy in allergic diseases.

We thank F. E. L'Faqihi-Olive, V. Duplan-Eche, and A. L. Iscache for technical assistance at the Flow cytometry facility of INSERM UMR 1043, CPTP and also the imaging platforms (INSERM U1043, CPTP), the animal facility, and the histology platforms (Anexplo Toulouse). We also thank Joris Hien-Turpin for his technical assistance and P. Lory for the gift of plasmids that encode  $Ca_v\beta$  subunits. Helpful discussion was provided by the BM1406 COST Action.



**FIG 8.** Gabapentin (*gaba*), an inhibitor of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  subunits, decreases type 2 airway inflammation. **A**, BALB/c mice were immunized with OVA in alum and then challenged with intranasal OVA for 5 days. Gabapentin was or was not given in drinking water for the last 5 days. *i.p.*, Intraperitoneal. **B**, The next day, mice were killed, and BAL fluid was collected and analyzed for inflammatory cell content. **C**, Hematoxylin and eosin histologic sections were scored on a 0- to 12-point scale. **D**, Lung inflammation in mice given control (*nt*) and gabapentin. **E**, Expression of *IL4*, *IL5*, *IL13*, *Muc5a*, and *Muc5b* was quantified in lungs by using quantitative PCR and normalized to housekeeping gene expression. Each experiment includes 6 to 7 mice per group. One representative experiment of 2 is shown. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\* $P < .001$ .

**Clinical implications:** The demonstration that auxiliary subunits are involved in calcium signaling through  $\text{Ca}_v1$  channels and the function of mouse and human  $\text{T}_H2$  lymphocytes supports their potential beneficial effect on allergic asthma.

#### REFERENCES

- Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15025.
- Becerra-Diaz M, Wills-Karp M, Heller NM. New perspectives on the regulation of type II inflammation in asthma. *F1000Res* 2017;6:1014.
- Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAL. *Annu Rev Immunol* 2010;28:491-533.
- Savignac M, Badou A, Moreau M, Leclerc C, Guery JC, Paulet P, et al. Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *FASEB J* 2001;15:1577-9.
- Gomes B, Savignac M, Moreau M, Leclerc C, Lory P, Guery JC, et al. Lymphocyte calcium signaling involves dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels: facts and controversies. *Crit Rev Immunol* 2004;24:425-47.
- Badou A, Jha MK, Matza D, Mehal WZ, Freichel M, Flockerzi V, et al. Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15529-34.
- Djata Cabral M, Paulet PE, Robert V, Gomes B, Renoud ML, Savignac M, et al. Knocking-down Cav1 calcium channels implicated in Th2-cell activation prevents experimental asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1310-7.
- Omilusik K, Priatel JJ, Chen X, Wang YT, Xu H, Choi KB, et al. The  $\text{Ca}_v1.4$  calcium channel is a critical regulator of T cell receptor signaling and naive T cell homeostasis. *Immunity* 2011;35:349-60.
- Robert V, Triffaux E, Paulet PE, Guery JC, Pelletier L, Savignac M. Protein kinase C-dependent activation of  $\text{Ca}_v1.2$  channels selectively controls human  $\text{TH}2$ -lymphocyte functions. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1175-83.
- Davenport B, Li Y, Heizer JW, Schmitz C, Perraud AL. Signature channels of excitability no more: L-type channels in immune cells. *Front Immunol* 2015;6:375.
- Matza D, Badou A, Klemic KG, Stein J, Govindarajulu U, Nadler MJ, et al. T cell receptor mediated calcium entry requires alternatively spliced Cav1.1 channels. *PLoS One* 2016;11:e0147379.
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:521-55.
- Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW. L-Type Cav1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 2014;94:303-26.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 2015;67:821-70.
- Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L, Stefani E. Potentiation by the  $\beta$  subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* 1993;262:575-8.
- Canù C, Davies A, Berrow NS, Butcher AJ, Page KM, Dolphin AC. Evidence for two concentration-dependent processes for  $\beta$ -subunit effects on  $\alpha 1\text{B}$  calcium channels. *Biophys J* 2001;81:1439-51.
- Richards MW, Butcher AJ, Dolphin AC.  $\text{Ca}^{2+}$  channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:626-32.
- Hofmann F, Belkacemi A, Flockerzi V. Emerging alternative functions for the auxiliary subunits of the voltage-gated calcium channels. *Curr Mol Pharmacol* 2015;8:162-8.
- Savalli N, Pantazis A, Sigg D, Weiss JN, Neely A, Olcese R. The  $\alpha 2\delta$ -1 subunit remodels  $\text{Ca}_v1.2$  voltage sensors and allows  $\text{Ca}^{2+}$  influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol* 2016;148:147-59.
- Bichet D, Cornet E, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, et al. The I-II loop of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 2000;25:177-90.

21. Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Hebllich F, Wratten J, Richards MW, et al. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11230-5.
22. Bernstein GM, Jones OT. Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: role of the alpha2/delta subunit. *Cell Calcium* 2007;41:27-40.
23. Dolphin AC. Calcium channel auxiliary  $\alpha 2\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:542-55.
24. Jha A, Singh AK, Weissgerber P, Freichel M, Flockerzi V, Flavell RA, et al. Essential roles for Cavb2 and Cav1 channels in thymocyte development and T cell homeostasis. *Sci Signal* 2015;8:1-12.
25. Gomes B, Cabral MD, Gallard A, Savignac M, Paulet P, Druet P, et al. Calcium channel blocker prevents T helper type 2 cell-mediated airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1117-24.
26. Warnier M, Roudbaraki M, Derouiche S, Delcourt P, Bokhobza A, Prevarskaya N, et al. CACNA2D2 promotes tumorigenesis by stimulating cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 2015;34:5383-94.
27. Berrow NS, Campbell V, Fitzgerald EM, Brickley K, Dolphin AC. Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol* 1995;482:481-91.
28. Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, et al. The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* 2011;14:173-80.
29. Link S, Meissner M, Held B, Beck A, Weissgerber P, Freichel M, et al. Diversity and developmental expression of L-type calcium channel beta2 proteins and their influence on calcium current in murine heart. *J Biol Chem* 2009;284:30129-37.
30. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a003947.
31. Brunet S, Emrick MA, Sadilek M, Scheuer T, Catterall WA. Phosphorylation sites in the Hook domain of Cav $\beta$  subunits differentially modulate Cav1.2 channel function. *J Mol Cell Cardiol* 2015;87:248-56.
32. Marais E, Klugbauer N, Hofmann F. Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and gabapentin binding. *Mol Pharmacol* 2001;59:1243-8.
33. Hebllich F, Tran-Van-Minh A, Hendrich J, Watschinger K, Dolphin AC. Time course and specificity of the pharmacological disruption of the trafficking of voltage-gated calcium channels by gabapentin. *Channels (Austin)* 2008;2:4-9.
34. Hendrich J, Van Minh AT, Hebllich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, et al. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3628-33.
35. Curran DR, Cohn L. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42:268-75.
36. Berggren PO, Yang SN, Murakami M, Efanov AM, Uhles S, Kohler M, et al. Removal of Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* 2004;119:273-84.
37. Waithe D, Ferron L, Page KM, Chaggar K, Dolphin AC. Beta-subunits promote the expression of Ca(V)2.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2011;286:9598-611.
38. Leach RN, Brette F, Orchard CH. Antisense oligonucleotide against the Ca channel beta subunit decreases L-type Ca current in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:794-8.
39. Catalucci D, Zhang DH, DeSantiago J, Aimond F, Barbara G, Chemin J, et al. Akt regulates L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. *J Cell Biol* 2009;184:923-33.
40. Fang K, Colecraft HM. Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (CaV)1.2 channels. *J Physiol* 2011;589:4437-55.
41. Schredelseker J, Di Biase V, Obermair GJ, Felder ET, Flucher BE, Franzini-Armstrong C, et al. The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17219-24.
42. Buraei Z, Yang J. The beta subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev* 2010;90:1461-506.
43. Matza D, Badou A, Kobayashi KS, Goldsmith-Pestana K, Masuda Y, Komuro A, et al. A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation. *Immunity* 2008;28:64-74.
44. Li CY. Spinal dorsal horn calcium channel 2-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 2004;24:8494-9.
45. Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J Physiol* 2016;594:5369-90.
46. Cassidy JS, Ferron L, Kadurin I, Pratt WS, Dolphin AC. Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary alpha2delta-1 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:8979-84.
47. Tran-Van-Minh A, Dolphin AC. The alpha2delta ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit alpha2delta-2. *J Neurosci* 2010;30:12856-67.
48. Segura E, Bourdin B, Tetreault MP, Briot J, Allen BG, Mayer G, et al. Proteolytic cleavage of the hydrophobic domain in the Cavalpha2delta1 subunit improves assembly and activity of cardiac Cav1.2 channels. *J Biol Chem* 2017;292:11109-24.
49. Ji RR. Neuroimmune interactions in itch: do chronic itch, chronic pain, and chronic cough share similar mechanisms? *Pulm Pharmacol Ther* 2015;35:81-6.
50. Findeisen F, Campiglio M, Jo H, Abderemane-Ali F, Rumpf CH, Pope L, et al. Stapled voltage-gated calcium channel (CaV) alpha-interaction domain (AID) peptides act as selective protein-protein interaction inhibitors of CaV function. *ACS Chem Neurosci* 2017;8:1313-26.

**METHODS****Oligonucleotide sequences**

The sequences for Ca<sub>v</sub>βS (5'-gaagtaggtcttgggtggg-3') and Ca<sub>v</sub>βAS (5'-accagcctccgaccaccagctcatt-3'; Eurogentec) were chosen from Bichet et al.<sup>E1</sup> Ca<sub>v</sub>βAS has 92% complementarity to mouse or human β1 and β3 mRNA.

**Model of acute allergic airway inflammation**

BAL fluid was collected, and the content in inflammatory cells was determined, as previously described.<sup>E2</sup> Lung tissue was fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and then placed in 70% ethanol before embedding in paraffin. Sections (4 μm) were stained with hematoxylin and eosin. Histologic disease scores of 0 to 3 were attributed based on the severity of peribronchial, perivascular, and interstitial immune cell infiltration and thickening of peribronchial epithelium, resulting in a maximum score of 12. Lung draining lymph nodes were harvested, and 2 × 10<sup>5</sup> cells were stimulated with OVA (100 μg/mL) for 3 days. Cytokine concentrations were measured in supernatants by means of ELISA. In some experiments CD4<sup>+</sup> T cells were purified from the lungs, stained with anti-Ca<sub>v</sub>1.2 antibodies, and analyzed by using confocal microscopy.

**Airway hyperresponsiveness**

Anesthetized and ventilated mice were connected through an endotracheal cannula to a whole-body plethysmograph for ventilation (Emka Technologies, Paris, France). After initiating mechanical ventilation, the mouse was paralyzed with an intraperitoneal injection of 0.1 mL of a 10 mg/mL solution of rocuronium bromide. The animal was ventilated at a respiratory rate of 150 breaths/min and a tidal volume of 10 mL/kg against a positive end-expiratory pressure of 3 cm of H<sub>2</sub>O. Then mice were exposed to increasing doses of methacholine aerosol generated through a nebulizer containing 0 to 20 mg/mL methacholine in PBS. Dynamic lung resistance was measured with iox software (Emka Technologies).

**Cell culture**

Cells were cultured in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS [Lonza, Allendale, NJ], 1% pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, and 50 μmol/L β-mercaptoethanol).

**Single-cell calcium imaging**

Cells were loaded with Fura-2 AM, as previously described.<sup>E2,E3</sup> in culture medium containing 5% heat-inactivated FBS for 30 minutes at 37°C. Cells were then washed, plated, and excited in 10-second intervals by using 340- and 380-nm excitation filters. Emission was recorded with 510/540-nm bandpass filters by using a CCD camera before and after stimulation with biotinylated anti-CD3 cross-linked with streptavidin- or anti-CD3/CD28-coated beads (1 bead per cell) for mouse or human T cells, respectively. Fluorescence ratio images at wavelengths of 340 and 380 nm were then calculated with Metafluor software. The curve represents the mean + SEM of fluorescence ratio of 40 to 60 cells. Each experiment was repeated 3 or 4 times. For each cell, we calculated the area under the curve between TCR stimulation and ionomycin application with the GraphPad Prism software. The time of response was defined as the delay for which the fluorescence ratio becomes superior to the mean basal value + 1 SD.

**Confocal microscopy**

Cells were seeded onto glass slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) and then fixed with 4% paraformaldehyde. Staining was performed with anti-CD2 rat IgG antibody (Abcam) or anti-α2δ2 rabbit antibody (Alomone Labs) and revealed with the appropriate secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, Ore). Cells were then permeabilized with PBS containing 0.1% saponin and 0.5% BSA. Ca<sub>v</sub> channel subunit

staining was performed with anti-Ca<sub>v</sub>1.2 mouse IgG<sub>2b</sub> (NeuroMab), anti-Ca<sub>v</sub>β1 (Alomone Labs), or anti-Ca<sub>v</sub>β3 rabbit IgG (Santa Cruz Labs) overnight and revealed with the appropriate secondary antibodies (Molecular Probes). Slides were analyzed by using an LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Staining with control isotypes was constantly negative. The total fluorescence intensity of each cell was determined on the sum of overall Z sections with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Md). For membrane Ca<sub>v</sub>1.2 staining, a membrane surface was created by using CD2 staining, and this surface was duplicated on Ca<sub>v</sub>1.2 staining to measure the intensity of Ca<sub>v</sub>1.2 at the membrane with the Imaris software (8.4.1; Bitplane) module called Surface. Each measurement was done for each cell individually.

**Real-time quantitative PCR**

T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells were lysed, and RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Transcripts were measured by using real-time quantitative PCR with a LightCycler 480 Instrument (Roche) and the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche). We used the following primers: Ca<sub>v</sub>β1, 5'-gcagagcggccagcccta-3' and 5'-tgatggcaccctccgtaca-3'; Ca<sub>v</sub>β2, 5'-cgaacagagagccaagcaa-3' and 5'-ggcactatgtaccacaaa-3'; Ca<sub>v</sub>β3, 5'-tggcatttgcctgtgagga-3' and 5'-ccgaccaccagctcattgc-3'; Ca<sub>v</sub>β4, 5'-gagcga gaacgcaagcag-3' and 5'-tcaaagagatggctgtgc-3'; Ca<sub>v</sub>α2δ1, 3' acgccaactggtt gaattg 5' and 3' cttgcaaatcttccctcca 5'; Ca<sub>v</sub>α2δ2, 3' attccagaagcccatcg 5' and 3' gcttggatccctctcca 5'; Ca<sub>v</sub>α2δ3, 3' catttgggtgacgctcagtg 5' and 3' ttccctcagacaaggttcc 5'; Ca<sub>v</sub>α2δ4, 3' ggaagtgcaggctgttgg 5' and 3' ctccacgtagttgcccttct 5'; and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), 5'-ctggtgaaaggacctctcg-3' and 5'-tgaagtactcattatgatcaaggca-3'. Primers for *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Muc5ac*, and *Muc5b* were purchased from Qiagen. Quantification of target gene expression was calculated by normalizing values relative to expression of the housekeeping gene HPRT. Amounts of mRNA were expressed as arbitrary units relative to HPRT as follows:

$$\left(2^{-[Ct \text{ interest gene} - Ct \text{ HPRT}]}\right) \times 10^{-3}$$

**Immunoblotting**

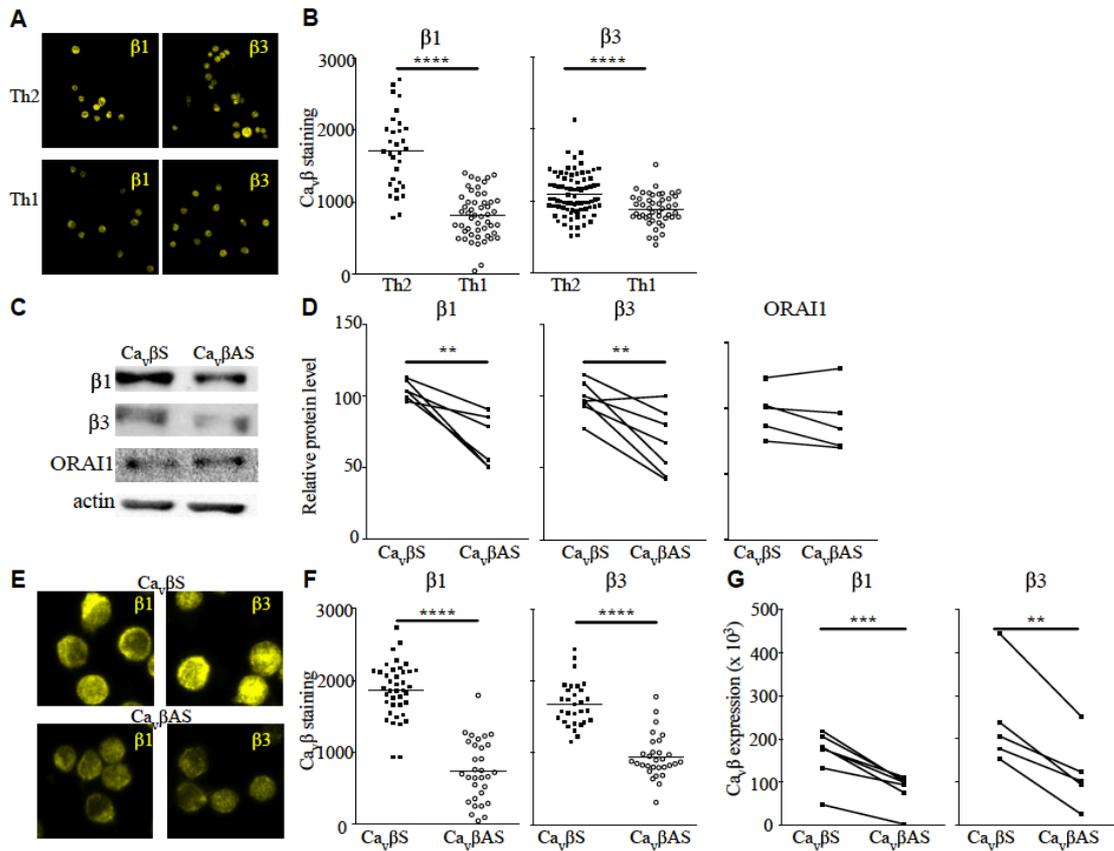
T<sub>H</sub>2 lymphocytes or brain cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (Roche). Lysates (30 μg/lane for T-cell extracts and 10 μg/lane for brain lysates) were submitted to 10% SDS electrophoresis, transferred to Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham, Piscataway, NJ), and then blotted with anti-Ca<sub>v</sub>β1 (Alomone Labs), anti-Ca<sub>v</sub>β3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif), or anti-α2δ2 (Alomone Labs) primary antibodies. We then stained blots with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, Mass) before detection and visualization with the ECL Prime (Amersham) using a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif). The specificity of anti-Ca<sub>v</sub>β1 and β3 antibodies was verified on human embryonic kidney cells transfected with the corresponding plasmids using Western blotting.

**ELISA**

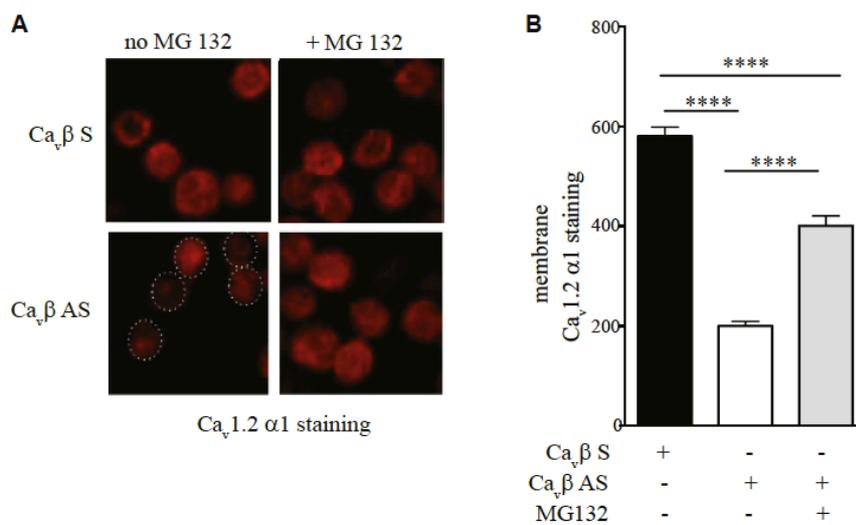
Supernatants or sera were incubated into 96-well plates coated with anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-13 (eBioscience, San Diego, Calif), anti-IFN-γ, or anti-IgE (Serotec). Bound cytokines and IgE were then labeled with biotinylated anti-IL-4 (eBioscience), anti-IL-5 (eBioscience), anti-IL-13 (eBioscience), anti-IFN-γ (eBioscience), or anti-IgE (BD PharMingen, San Jose, Calif). Biotinylated antibodies were revealed by means of incubation with alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa) and subsequent addition of the alkaline phosphatase substrate pNPP disodium salt hexahydrate (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 405 to 650 nm by using an EMax Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif). Cytokine and immunoglobulin concentrations were calculated from standard curves generated by means of titration of recombinant mouse cytokines and purified IgE. Human cytokine ELISAs were performed, as previously described.<sup>E3</sup>

**REFERENCES**

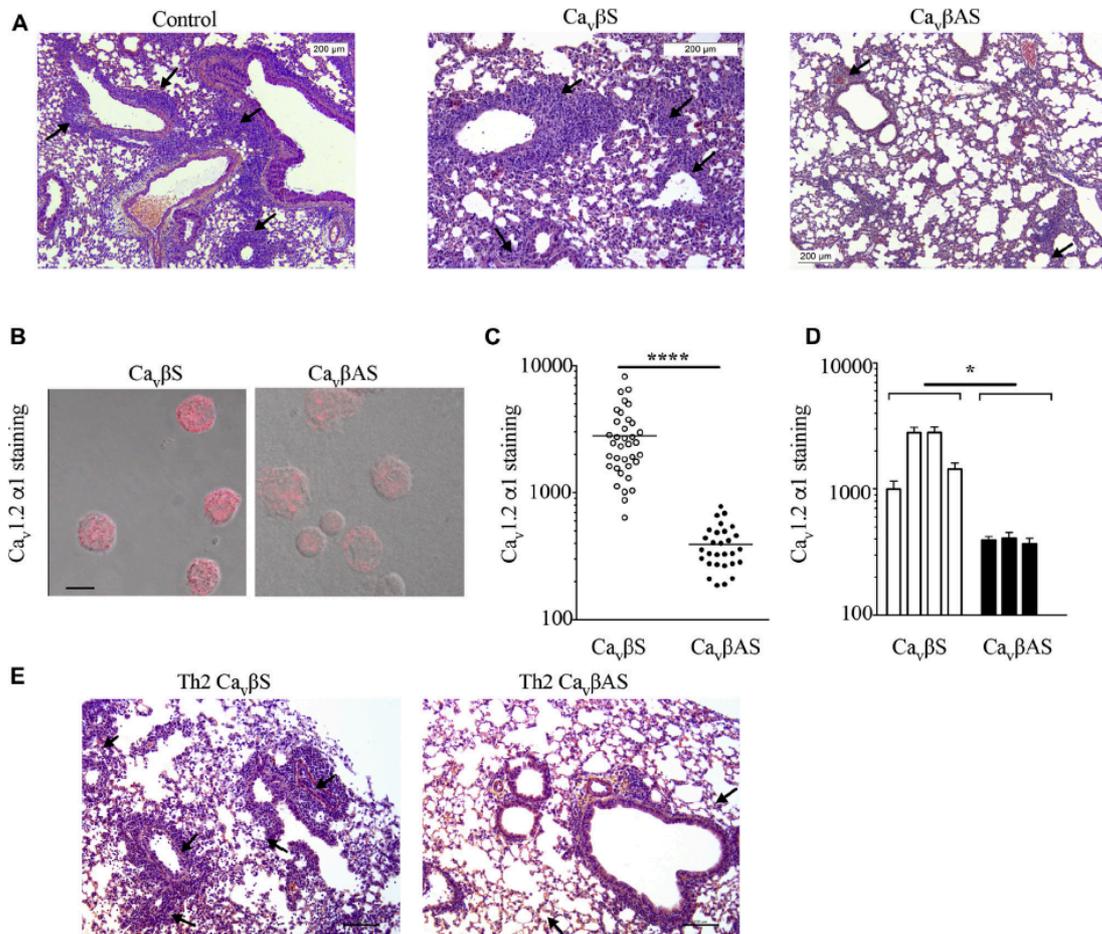
- E1. Bichet D, Cornet E, Geib S, Carrier E, Volsen S, Hoshi T, et al. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 2000;25:177-90.
- E2. Djata Cabral M, Paulet PE, Robert V, Gomes B, Renoud ML, Savignac M, et al. Knocking-down Cav1 calcium channels implicated in Th2-cell activation prevents experimental asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1310-7.
- E3. Robert V, Triffaux E, Paulet PE, Guery JC, Pelletier L, Savignac M. Protein kinase C-dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1175-83.



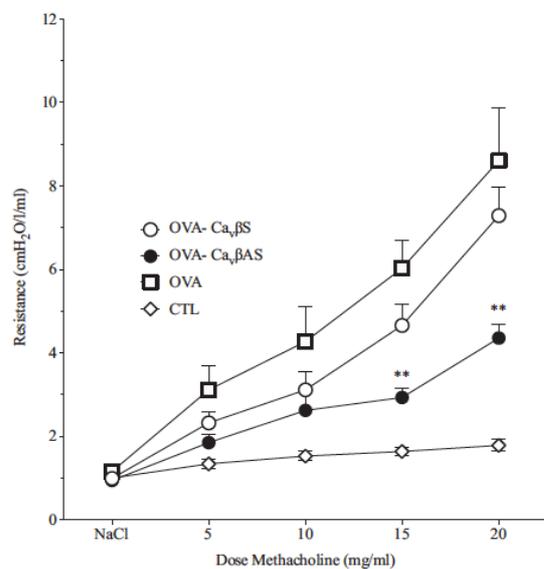
**FIG E1.**  $Ca_v\beta AS$  targets  $Ca_v\beta 1$  and  $Ca_v\beta 3$  subunits in mouse and human  $T_H2$  cells. **A**, OVA-specific DO11.10  $T_H2$  and  $T_H1$  cells were stained with anti- $Ca_v\beta 1$  and anti- $Ca_v\beta 3$  antibodies. **B**, Expression of  $Ca_v\beta$  per cell. One experiment of 3 was depicted, and each *point* represents 1 cell. **C**, Cell lysates were prepared from mouse  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v\beta S$  or  $Ca_v\beta AS$  after 3 days of transfection. One representative blot is shown. **D**, Protein bands were quantified by using Image Lab software. The ratio between the protein of interest and  $\beta$ -actin was calculated. Results are expressed as the relative protein level to  $Ca_v\beta S$  and shown as separate paired experiments. **E** and **F**,  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v\beta S$  or  $Ca_v\beta AS$  were stained with anti- $Ca_v\beta 1$  and anti- $Ca_v\beta 3$  antibodies. Expression of  $Ca_v\beta$  per cell is shown in Fig E1. **F**, One experiment of 3 is depicted, and each *point* represents 1 cell. **G**, CRTH2<sup>+</sup> cells transfected with  $Ca_v\beta S$  or  $Ca_v\beta AS$  were analyzed for  $Ca_v\beta 1$  and  $Ca_v\beta 3$  transcript expression. Results are shown as separate paired experiments. \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .005$ , and \*\*\*\* $P < .0001$ .



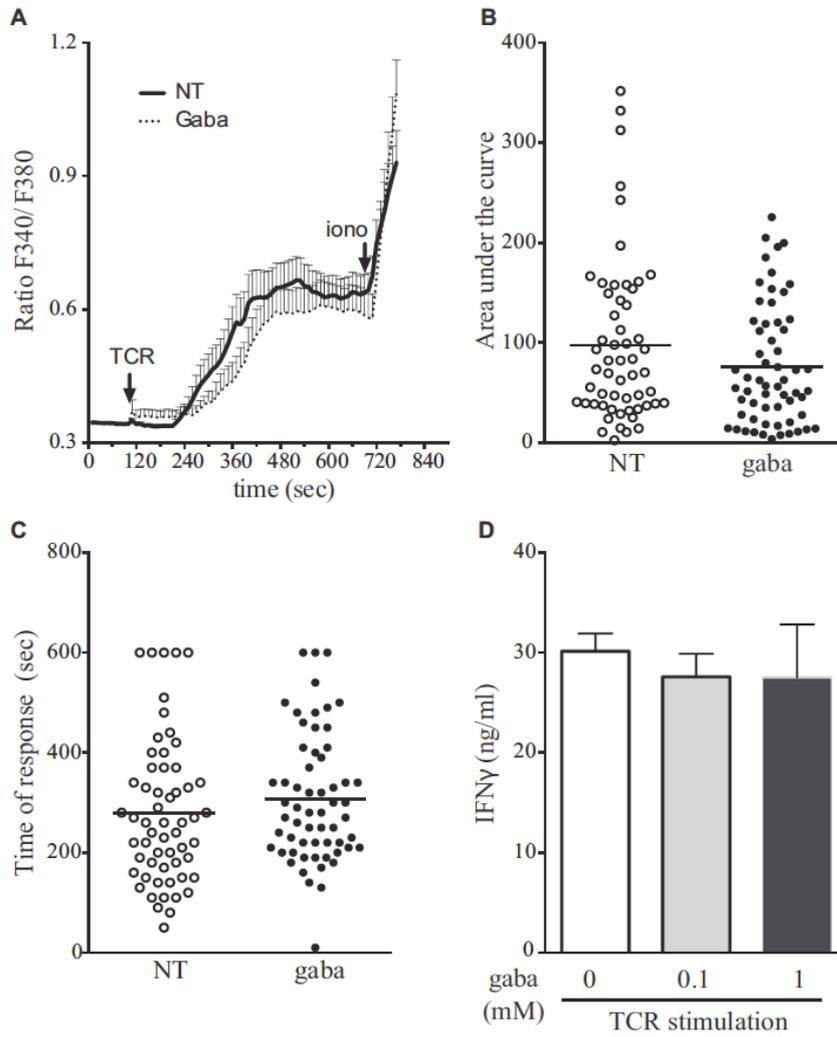
**FIG E2.** The proteasome inhibitor MG132 partially restores total Ca<sub>v</sub>1.2 α1 levels and its expression at the cell membrane. **A**, Mouse DO11.10 T<sub>H</sub>2 cells were transfected with control (Ca<sub>v</sub>βS) or antisense Ca<sub>v</sub>βAS oligonucleotides for 48 hours before addition of MG132 (0.5 μmol/L) or vehicle for an additional 24 hours. Cells were then recovered and labeled with anti-Ca<sub>v</sub>1.2 α1 mAb. *Dotted lines* indicate cells. **B**, T<sub>H</sub>2 cells treated as in Fig E2, **A**, were labeled with both anti-CD2 and anti-Ca<sub>v</sub>1.2 α1 mAbs, and colocalization determined with Imaris software is shown. Results are expressed as means of at least 50 cells, and *bars* represent SEMs. \*\*\*\**P* < .001.



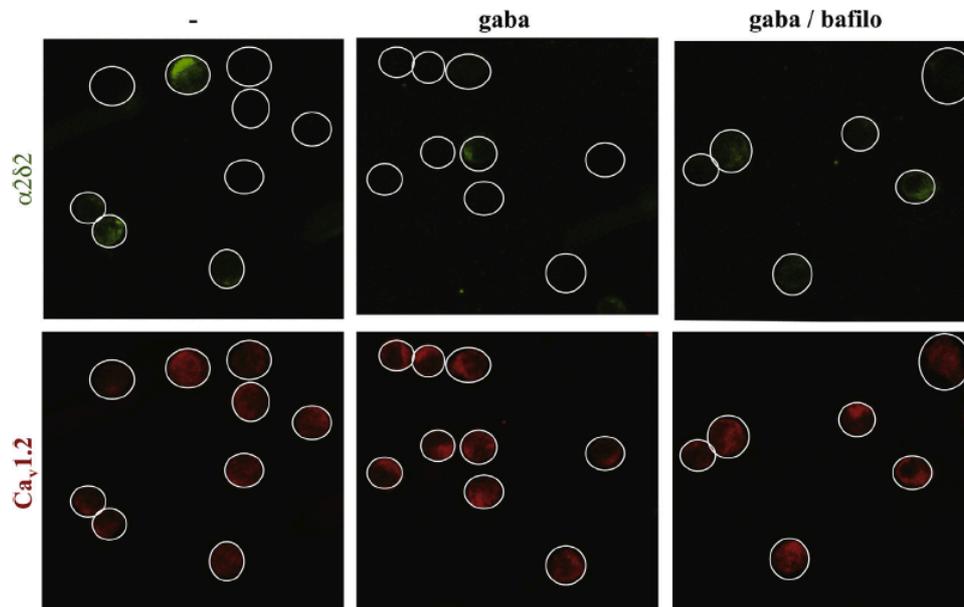
**FIG E3.**  $Ca_v\beta AS$  alleviates type 2 airway inflammation. **A**, BALB/c mice were immunized with OVA in alum and challenged 15 days later with intranasal OVA only (control), OVA plus  $Ca_v\beta S$ , or OVA plus  $Ca_v\beta AS$  every day for 5 days. Representative hematoxylin and eosin-stained sections are shown, and *arrows* indicate inflammatory infiltrates. **B-D**,  $CD4^+$  T cells were purified from lung tissue and stained with anti- $Ca_v1.2 \alpha 1$  mAb. Optical sections are shown in Fig E3, **B**. Quantification was done by collecting data from all the Z-stack sections of each cell. Examples are given in Fig E3, **C**, where each point corresponds to a cell from 1 representative  $Ca_v\beta S$ - or  $Ca_v\beta AS$ -treated mouse. Fig E3, **D**, summarized results obtained from different mice. Each *bar* represents the mean plus 1 SD of at least 30 cells from 1 mouse. \* $P < .05$  and \*\*\*\* $P < .001$ . **E**, Representative hematoxylin and eosin-stained lung sections from mice injected with  $T_H2$  cells transfected with  $Ca_v\beta S$  or  $Ca_v\beta AS$  and given intranasal OVA.



**FIG E4.** Ca<sub>v</sub>β5AS decreased airway hyperreactivity in a mouse model of allergic airway inflammation. BALB/c mice were immunized with OVA in alum (OVA) or PBS (CTL) and challenged 15 days later with intranasal OVA only, OVA plus Ca<sub>v</sub>β5S or OVA plus Ca<sub>v</sub>β5AS every day for 5 days. Dynamic lung resistance was measured with iox software (Emka Technology). All data are expressed as means + SEMs of 10 mice per group. \*\**P* < .01.



**FIG E5.** T<sub>H</sub>1 cell functions are not affected by gabapentin (*gaba*) treatment. T<sub>H</sub>1 cells were preincubated with gabapentin (1 mmol/L) for 72 hours before loading with the calcium probe Fura-2 AM (A-C) or stimulated in the presence or not of gabapentin for an additional 24 hours with anti-CD3/anti-CD28 antibodies (D). Fig E5, A, Fluorescence ratio at 340- and 380-nm excitation wavelengths was recorded at the single-cell level before and after TCR stimulation. Results are expressed as the mean of at least 50 cells, and bars represent SEMs. Fig E5, B and C, Area under the curve and time of response for each cell, respectively, defined as in Fig 3. Data are representative of 2 experiments. Fig E5, D, Cytokine content.



**FIG E6.** Gabapentin (*gaba*) reduces protein levels of the  $\alpha 2\delta 2$  auxiliary subunit in  $T_H2$  cells.  $T_H2$  cells were incubated with gabapentin (1 mmol/L) for 96 hours with or without bafilomycin (*bafilo*; 0.5  $\mu$ mol/L) for the last 24 hours. Cells were stained with anti- $\alpha 2\delta 2$  or anti- $Ca_v 1.2$   $\alpha 1$  antibodies. Immunofluorescence was summed over all the Z-stack sections. One representative experiment of 2 is shown. A *white line* surrounds each cell.

2) Article 3 : CD9<sup>+</sup> Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients



# CD9<sup>+</sup> Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients

Carole Brosseau<sup>1,2,3,4</sup>, Maxim Durand<sup>1,2,5</sup>, Luc Colas<sup>1,2,4,5</sup>, Eugénie Durand<sup>1,2</sup>,  
Aurore Foureau<sup>3,4</sup>, Marie-Aude Cheminant<sup>3</sup>, Gregory Bouchaud<sup>3,6</sup>, Laure Castan<sup>3,5,6</sup>,  
Martin Klein<sup>3,5</sup>, Antoine Magnan<sup>3,4†</sup> and Sophie Brouard<sup>1,2,7\*†</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Olivier Garraud,  
Institut National de la Transfusion  
Sanguine, France

### Reviewed by:

Hermelijn Helene Smits,  
Leiden University, Netherlands  
Rizgar A. Mageed,  
Queen Mary University of London,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Sophie Brouard  
sophie.brouard@univ-nantes.fr

† These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 28 August 2018

Accepted: 07 December 2018

Published: 21 December 2018

### Citation:

Brosseau C, Durand M, Colas L,  
Durand E, Foureau A,  
Cheminant M-A, Bouchaud G,  
Castan L, Klein M, Magnan A and  
Brouard S (2018) CD9<sup>+</sup> Regulatory B  
Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10  
and Are Reduced in Severe Asthmatic  
Patients. *Front. Immunol.* 9:3034.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.03034

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>2</sup> Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, CHU Nantes, Nantes, France, <sup>3</sup> Institut du thorax, Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>4</sup> Institut du Thorax, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>5</sup> Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>6</sup> INRA Centre Angers-Nantes, Nantes, France, <sup>7</sup> Centre d'Investigation Clinique (CIC) Biothérapie, CHU Nantes, Nantes, France

CD9 was recently identified as a marker of murine IL-10-competent regulatory B cells. Functional impairments or defects in CD9<sup>+</sup> IL-10-secreting regulatory B cells are associated with enhanced asthma-like inflammation and airway hyperresponsiveness. In mouse models, all asthma-related features can be abrogated by CD9<sup>+</sup> B cell adoptive transfer. We aimed herein to decipher the profiles, features, and molecular mechanisms of the regulatory properties of CD9<sup>+</sup> B cells in human and mouse. The profile of CD9<sup>+</sup> B cells was analyzed using blood from severe asthmatic patients and normal and asthmatic mice by flow cytometry. The regulatory effects of mouse CD9<sup>+</sup> B cells on effector T cell death, cell cycle arrest, apoptosis, and mitochondrial depolarization were determined using yellow dye, propidium iodide, Annexin V, and JC-1 staining. MAPK phosphorylation was analyzed by western blotting. Patients with severe asthma and asthmatic mice both harbored less CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, although these cells displayed no defect in their capacity to induce T cell apoptosis. Molecular mechanisms of regulation of CD9<sup>+</sup> B cells characterized in mouse showed that they induced effector T cell cycle arrest in sub G0/G1, leading to apoptosis in an IL-10-dependent manner. This process occurred through MAPK phosphorylation and activation of both the intrinsic and extrinsic pathways. This study characterizes the molecular mechanisms underlying the regulation of CD9<sup>+</sup> B cells to induce effector T cell apoptosis in mice and humans via IL-10 secretion. Defects in CD9<sup>+</sup> B cells in blood from patients with severe asthma reveal new insights into the lack of regulation of inflammation in these patients.

**Keywords: regulatory B cells, CD9<sup>+</sup> B cells, severe asthma, apoptosis, effector T cells**

## INTRODUCTION

Beyond their capacity to secrete antibodies, B cells are also able to produce cytokines (1), express major histocompatibility complex and co-stimulatory molecules (2), present antigens (3), and regulate T-cell-mediated immune responses (4). Depending on the specific subset, B cells may thus promote, enhance, and/or regulate inflammation depending on the pro- and anti-inflammatory cytokines secreted, the balance of which influences the immune response (4). It is now well-established that specific B cell subtypes are involved in the maintenance of homeostasis of the immune system and regulate inflammation in pathological situations (5, 6). Also called regulatory B cells (Bregs), these specific B cells have immunosuppressive properties; their functional impairment is associated with exacerbated and/or persistent autoimmune processes (7–11), whereas their presence correlates with a state of tolerance in transplantation (12–17).

Although the presence and role of Bregs are thus clearly evidenced in different models and pathologies, their full molecular characterization remains elusive, primarily because no specific markers or transcription factors have been identified in rodents and humans (18). To date, the most commonly used marker is IL-10 secretion (7, 18). Interestingly, allergic patients display a lower frequency of IL-10-secreting Bregs with altered function than healthy volunteers (HV) or allergen-tolerant patients (19, 20). Patients with allergic asthma harbor a defective expansion of such IL-10-producing B cells in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation and a weaker IL-10 response to house dust mite (HDM) allergen-activated T cells (21–23). We have previously demonstrated that murine IL-10<sup>+</sup> Bregs are enriched in a CD9<sup>+</sup> B cell subset (24). Induction of allergic asthma in mice alters the homeostasis of IL-10<sup>+</sup> Bregs, and adoptive transfer of CD9<sup>+</sup> B cells alone is sufficient to abrogate asthma in an IL-10-dependent manner (24). Finally, we have shown that CD9 expression in humans is dramatically increased at the surface of CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> immature B cells, thus defining an important IL-10 Breg subset (24). This finding has been confirmed by others (25–27), and CD9 thus appears to be a reliable marker for defining both mouse and human Bregs.

We show herein, for the first time, that mouse and human CD9<sup>+</sup> B cells elicit regulatory properties through IL-10 secretion, and transitional CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells expressing CD9 are decreased in the blood of severe asthmatic patients. We report that CD9<sup>+</sup> B cells induce effector T cell apoptosis via the secretion of IL-10. In mouse, T cell proliferation is blocked at the sub G0/G1 cell cycle phase, leading to activation of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways via a MAPK-dependent mechanism. These data reveal new insights on the lack of regulation of inflammation in severe asthmatic patients and help pave the way to the discovery of potential novel therapies.

## MATERIALS AND METHODS

### Asthmatic Patients

This study was performed in accordance with the recommendations of the University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from

Biologic Risks with written informed consent from all subjects. All subjects provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks. Blood samples were collected from patients included in the EXPRESA clinical study (NCT00721097), which is a prospective cohort of severe asthmatic patients (28). Pulmonary function tests, clinical data, and blood samples were collected each month for 1 year. Nine severe asthmatic patients were selected within EXPRESA cohort based absence of asthma exacerbation in the previous month, absence of systemic corticosteroids (short and long course) and frozen PBMC samples availability. Ten age- and sex-matched Healthy Volunteers (HV), who were free from atopy, asthma (whatever phenotype), allergic rhinitis, atopic dermatitis any other inflammatory diseases, and drugs (whatever route) were used as controls. All severe asthmatic patients had high doses of inhaled corticosteroids (>1,200 microg of beclomethasone or equivalent). In HV, % of predicted FEV1 and its coefficient of variation was assumed to 100% (70–130) and age-matched according to reference lung values consensus (29, 30). ACQ7 score was assumed to be at 0 in HV (Supplementary Data Table 1).

### Immunophenotyping of Asthmatic Patient Samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation and frozen. Immunophenotyping of PBMCs from 9 severe asthmatic patients was performed using flow cytometry. PBMCs from 10 HV were analyzed as controls. PBMCs were rapidly thawed by placing cryovials at 37°C, washed and stained according to standard protocols using the following mAbs: CD19-BUV395, CD27-BUV737, CD38-BV605, CD24-PerCP-Cy5.5, and CD9-BV510 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). These markers were used to distinguish CD19<sup>+</sup> B lymphocytes, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory cells, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naïve cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitional cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> plasma cells, and CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> Bregs. For all experiments, dead cells were excluded using the Zombie NIR™ Fixable Viability kit (BioLegend, London, UK). Human anti-IL-10 (BD Biosciences) was used to inhibit the IL-10 pathway. Samples were assessed on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and the data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

### Asthmatic Mouse Model

Six week-old wild-type BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories (Ecully, France). Allergic inflammation was induced using a total House Dust Mite (HDM) extract (Dermatophagoïdes farinae) provided by Stallergenes (Antony, France), as previously described (31). This study was performed in accordance with the recommendations of the Regional Ethical Committee for Animal Experiments of Pays de la Loire (ceea.2012.77) under accreditation number 3455.

The protocol was approved by the Regional Ethical Committee for Animal Experiments of Pays de la Loire.

### Cell Sorting

Six week-old wild-type BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories (Ecully, France). Splenic cells were isolated and stained with the following antibodies for cell sorting by flow cytometry: CD19-APC-H7 (1D3), CD9-BV421 (KMC8), CD4-FITC (GK1.5) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France); and CD3-APC (145-2C11), and CD25-PE (PC61.5) (eBioscience, Paris, France). These markers were used to distinguish CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> non-regulatory B cells, CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> Breg cells and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells. Cells were sorted on a BD FACSAria III (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France).

### Cell Activation, Co-culture, and Treatments

Mouse cells (1 million/mL) were cultured for 48 h in RPMI-1640 medium with 10% fetal calf serum and 2 mM glutamine. CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> non-regulatory B cells or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> Breg cells were activated with 2 µg/mL anti-CD40 (HM40-3) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 48 h and 10 µg/mL LPS for 5 h. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were activated with 100 U/mL interleukin-2 (IL-2) for 48 h. Effector T cells were then co-cultured for 48 h with non-regulatory or Breg cells at a ratio of 1:1 and at a concentration of 1 million/ml on plates coated with anti-CD3 (145-2C11) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). T cells alone were cultured as controls. For human co-culture experiments, the same protocol was used except that B cells were activated with 50 ng/mL recombinant human soluble CD40L (R&D Systems Europe, Lille, France) plus 2.5 mg/mL CpG oligodeoxynucleotide 2006 (InvivoGen, San Diego, CA, USA), and T cells were activated with 50 U/mL recombinant IL-2 (SARL Pharmaxie, Aigueperse, France). During co-culture, the cells were treated with 50 nM Z-VAD (R&D Systems Europe, Lille, France) to inhibit apoptosis. To inhibit IL-10 and the transforming growth factor-beta (TGF-β) and Fas pathways, the cells were treated during co-culture with 10 µg/mL anti-IL-10 (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), 10 µg/mL anti-TGF-β1 (Abcam, Inc., Cambridge, UK), or 20 µg/mL anti-Fas ligand (R&D Systems Europe, Lille, France), respectively. To block CD9 function, the cells were treated during co-culture with 0.2 µg/µL KMC8 monoclonal antibody (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). To activate the IL-10 pathway, the cells were treated with 10 ng/mL recombinant IL-10 (R&D Systems Europe, Lille, France).

### Viability, Apoptosis, and Cell Cycle Assays

To determine the percentage of dead CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells, the cells were stained using a LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit according to the manufacturer's recommendation (Invitrogen, Waltham, US). B cells were removed from the analysis using a gating strategy based on CD19-APC-H7 (1D3) staining. T cell cycle stages were assessed using propidium iodide (PI) staining (Beckman Coulter, Roissy CDG, France) and the percentage of apoptotic T cells by Annexin V-FITC staining (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France).

Samples were run on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and the data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

### Western Blotting

The analysis of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells protein expression was performed by western blotting after negative selection with MACS columns (Miltenyi Biotec, Paris, France). The following primary antibodies were used: anti-Bid, anti-actin, and anti-cleaved and total caspase 8, 9, and 12 (Cell Signaling Technology, St Quentin en Yvelines, France).

### Measurement of Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was measured using the potential-sensitive fluorescent probe tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Cells were incubated in Hank's Balanced Salt Solution (Gibco Life Technologies, Saint-Aubin, France) with JC-1 at 5 mg/mL for 30 min at 37°C. CD19-APC-H7 (1D3) antibody staining allowed the removal of B cells from the analysis. Samples were assessed on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and the data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

### Measurement of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Phosphorylation

After 48 h of co-culture, cells were stained with the following Phosflow antibodies: anti-phospho-p38-PeCy-7 and anti-phospho-JNK-PE (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France); anti-phospho-ERK1/2-PE (eBioscience, Paris, France); and CD19-APC-H7 (1D3) antibody to remove B cells from the analysis. Samples were assessed on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and the data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

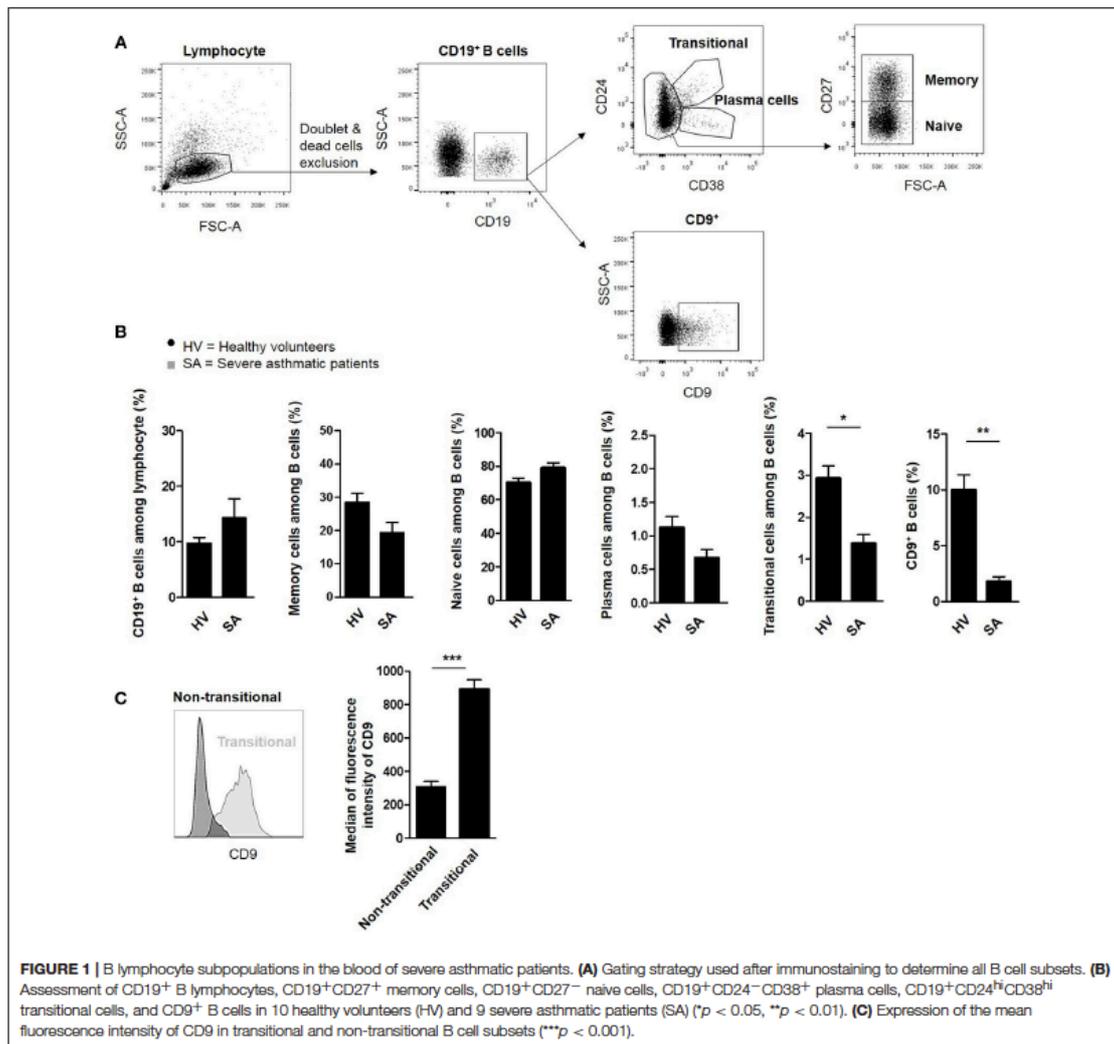
### Statistical Analyses

Comparisons of experimental values between the two groups were analyzed using the Mann-Whitney *U*-test. The non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's posttest were used for comparisons between more than two groups. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v7 (La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

### Severe Asthmatic Patients and Asthmatic Mice Harbor a Defect in CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B Cell Frequency

The frequencies of CD19<sup>+</sup> B lymphocytes, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory cells, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naive cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitional cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> plasma cells, and CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells were assessed by flow cytometry using PBMCs from severe asthmatic patients and HV as controls (gating strategy shown in Figure 1A). The total CD19<sup>+</sup> B cell

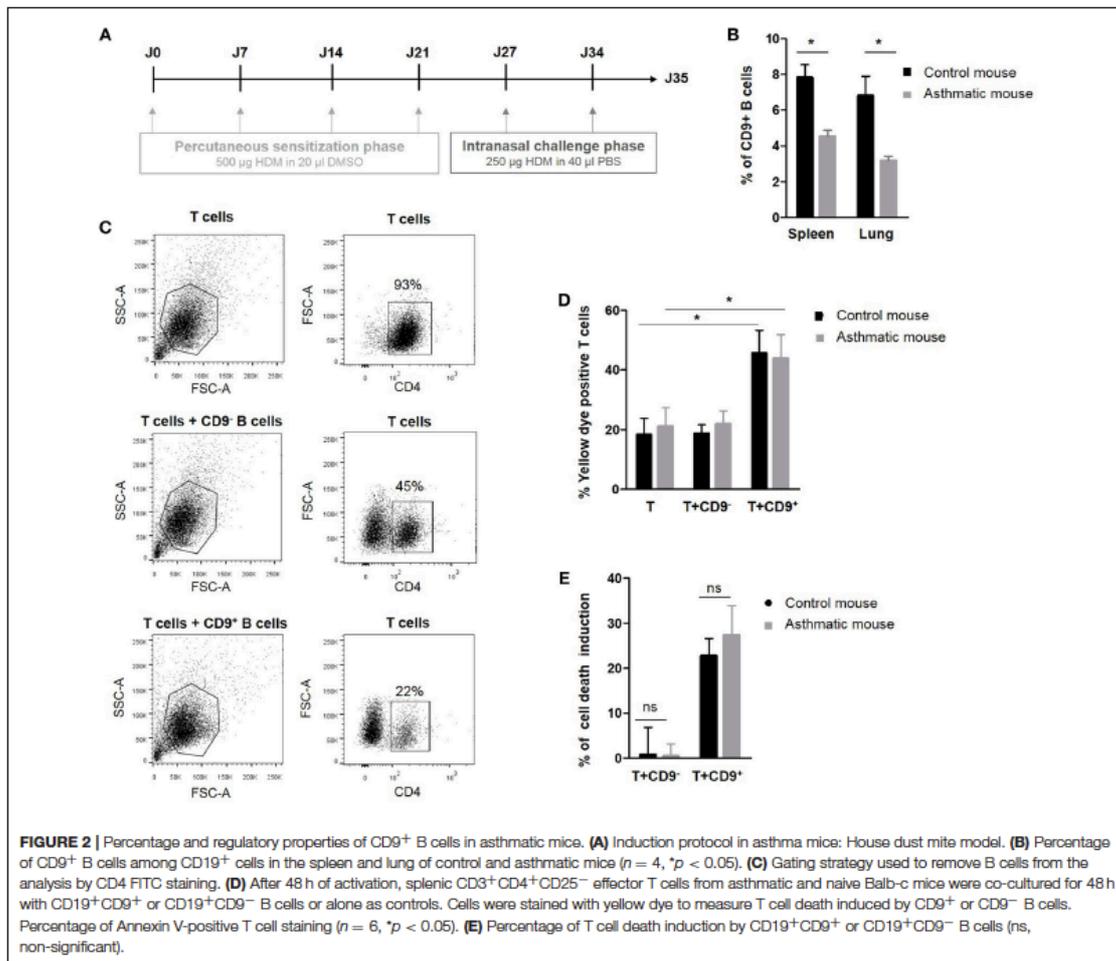


**FIGURE 1** | B lymphocyte subpopulations in the blood of severe asthmatic patients. **(A)** Gating strategy used after immunostaining to determine all B cell subsets. **(B)** Assessment of CD19<sup>+</sup> B lymphocytes, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory cells, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naive cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> plasma cells, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitional cells, and CD9<sup>+</sup> B cells in 10 healthy volunteers (HV) and 9 severe asthmatic patients (SA) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). **(C)** Expression of the mean fluorescence intensity of CD9 in transitional and non-transitional B cell subsets (\*\* $p < 0.001$ ).

frequency was not significantly different between HV and severe asthmatic patients (Figure 1B), suggesting the absence of a systemic effect of the treatment. No significant differences were observed for naive, memory and, plasma cell subtypes between the two groups. The frequencies of CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitional and CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, however, were significantly lower in asthmatic patients than in HV ( $2.9\% \pm 0.3$  and  $9.9\% \pm 1.3$  vs.  $1.3\% \pm 0.2$  and  $1.8\% \pm 0.3$  for HV and asthmatic patients, respectively,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ). Interestingly, all CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitional B cells expressed CD9 (median fluorescence intensity of CD9  $306\% \pm 34$  vs.  $894\% \pm 52$  in non-transitional and transitional cells, respectively,  $p < 0.001$ ) (Figure 1C), showing that CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>

transitional cells were included in the CD9<sup>+</sup> B cell subset.

We have previously demonstrated that murine IL-10<sup>+</sup> Bregs are enriched in a CD9<sup>+</sup> B cell subset and that adoptive transfer of CD9<sup>+</sup> B cells alone is sufficient to abrogate asthma in an IL-10-dependent manner (24). To decipher the regulatory potential of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells under inflammatory conditions, allergic asthma was induced in a mouse model using HDM as previously described (31) and summarized in Figure 2A. The percentage of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells was estimated in the spleen and lung of control and asthmatic mice using flow cytometry (Figure 2B). Asthmatic mice had significantly fewer CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells in the spleen and lung than control mice ( $4.5\% \pm 0.3$  and  $3.1\% \pm 0.2$

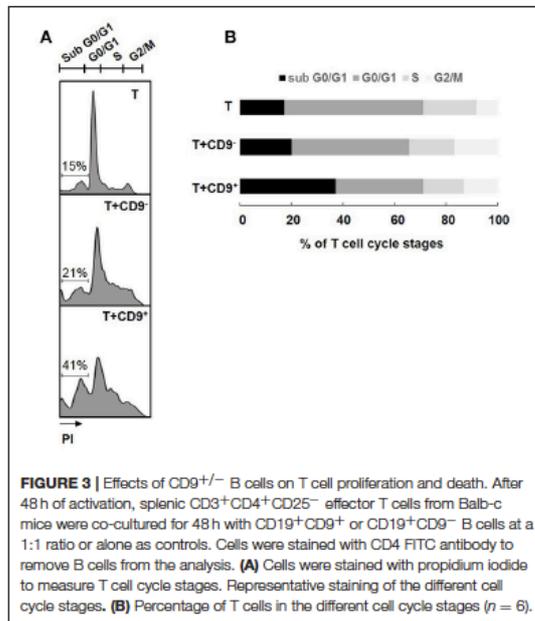


vs.  $7.8 \pm 0.7$  and  $6.8 \pm 1$  in the spleen and lung of asthmatic and control mice, respectively,  $p < 0.05$ ). These data validate the mouse as a relevant model for asthma in humans. All together, we report that patients with severe asthma and asthmatic mice both harbor a defect in number of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells.

### CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B Cells From Asthmatic Mice Harbor no Suppressive Property Defects

The next step was to analyze the regulatory function of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells in normal and pathologic situations. Thus, we analyzed the effects of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells from asthmatic and wild type control mice on CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell death in co-cultures. To achieve this goal, splenic CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells were activated for 48 h with anti-CD40/LPS. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were activated

for 48 h with IL-2. CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells were then co-cultured for 48 h with CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells at a 1:1 ratio, and cell death was measured using yellow dye staining (Figure 2C). CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells from asthmatic mice or controls both induced CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell death ( $18.2 \pm 5.5$  vs.  $45.6 \pm 7.6$  in T cells alone or co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, respectively, in control mice,  $p < 0.01$ ;  $21 \pm 6.2$  vs.  $43.8 \pm 8$  in T cells alone or co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, respectively, in asthmatic mice,  $p < 0.01$ ) (Figure 2D). Moreover, the percentages of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell death induced by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells from asthmatic mice or controls were the same ( $22.7 \pm 3.8$  vs.  $27.3 \pm 6.5$  in control and asthmatic mice, respectively, non-significant-ns) (Figure 2E). Finally, CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells from asthmatic mice or controls did not induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell death ( $0.8 \pm 5.9$  vs.  $0.4 \pm 2.6$  in control and



asthmatic mice, respectively, ns). These data show that although asthmatic mice have reduced number of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, these cells display no defects in their capacity to induce T cell apoptosis. Although CD9 has been identified as a marker of B cells that are secreting IL-10, their full regulatory mechanisms remain unknown. Because there was no difference in function between CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> from naive and asthmatic mouse, we further investigated the regulatory properties of these cells to decipher the molecular pathway leading to T cell death in naive mice.

### CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B Cells Induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effector T Cell Cycle Arrest in subG0/G1 and Cell Death

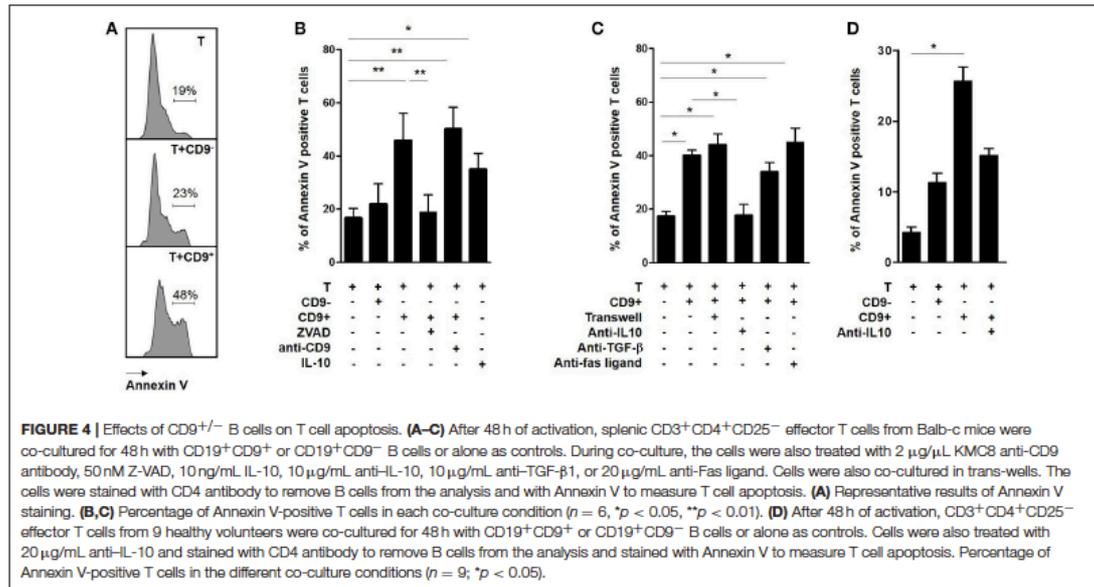
Determination of the cell cycle stage at which a cell is stopped is a good indicator of the type of cell death induced (32). CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, but not CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, induced significant CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell cycle arrest in sub G0/G1, as shown by PI staining (37.8% ± 4.28 and 20.2% ± 3.29 for T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells and T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, respectively; *p* < 0.01) (Figures 3A,B). No difference was observed when T cells were co-cultured with or without CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell S-phase progression did not appear to be significantly altered under any of the conditions, showing that B cells had no effect on T cell proliferation *per se*. All together, these data show that CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, but not CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell cycle arrest in sub G0/G1, resulting in cell death.

### CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B Cells Induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effector T Cell Apoptosis via an IL10-Dependent Mechanism

Cells in sub G0/G1 display sub-diploid content, which is an indicator of the DNA fragmentation characteristic of apoptotic cells (33). Activated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells for 48 h and then stained with Annexin V (Figure 4A). The percentage of Annexin V-positive CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells was significantly higher following co-culture with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells than that of T cells alone (42.1% ± 5.5 vs. 18.6% ± 3.3, respectively; *p* < 0.001), whereas no difference was observed for T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells (21% ± 6.5; ns) (Figure 4B). Treatment with an anti-CD9 agonist had no effect on the T cell death induced by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, showing that this effect was not mediated by CD9 (50.3% ± 4.6; ns compared with T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells). Treatment with Z-VAD, a specific inhibitor of apoptotic cell death, blocked the T cell apoptosis induced by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells (18.8% ± 5.6; *p* < 0.01). Taken together, these data show that CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell cycle arrest in sub G0/G1, leading to apoptosis.

To determine whether direct B cell-T cell contact was necessary for CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells to induce T cell apoptosis, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells in classical or trans-well plate assays (Figure 4C). CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells induced T cell death in both situations (44% ± 4.1 vs. 40% ± 2, respectively, ns). Moreover, the T cell death induced by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells was not affected when the co-culture was performed in the presence of anti-TGF-β (40% ± 2 vs. 33.8% ± 3.6 with or without anti-TGF-β, respectively, ns) nor anti-Fas ligand (45% ± 5.1, ns compared with T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells). In contrast, anti-IL-10 prevented T cell death and fully restored T cell viability (17.2% ± 1.9 vs. 17.6% ± 4.1 for T cells alone and T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells/anti-IL-10, respectively, ns). Interestingly, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells treated with IL-10 underwent apoptosis (35% ± 3.4 *p* < 0.05 compared with T cells alone), confirming its involvement in T cell apoptosis induced by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells. In summary, these data show that T cell-B cell contact is not necessary for T cell apoptosis induction by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells and that apoptosis induction is dependent on IL-10.

To determine whether the regulatory molecular pathways of CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells is similar in humans, CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were sorted from the PBMCs of HV. Cells were activated for 48 h (anti-CD40 + CpG for CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> and CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells and IL-2 for CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells). CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were co-cultured for 48 h with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells at ratios of 1:1 or alone as controls. The percentage of apoptotic T cells was analyzed by Annexin V staining (Figure 4D). As for the mice, only human CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, but not CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, induced apoptosis of T cells (2.8% ± 0.8 for T cells alone,



14.3% ± 1.7 for T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, and 21.4% ± 2.7 for T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells; T cells alone vs. T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, *p* < 0.001). Treatment with anti-IL-10 reduced apoptosis induced by human T cells (15.7% ± 1.1; T cells alone vs. T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells/anti-IL-10, ns). Taken together, these data show that, as in mice, human CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell apoptosis via IL-10.

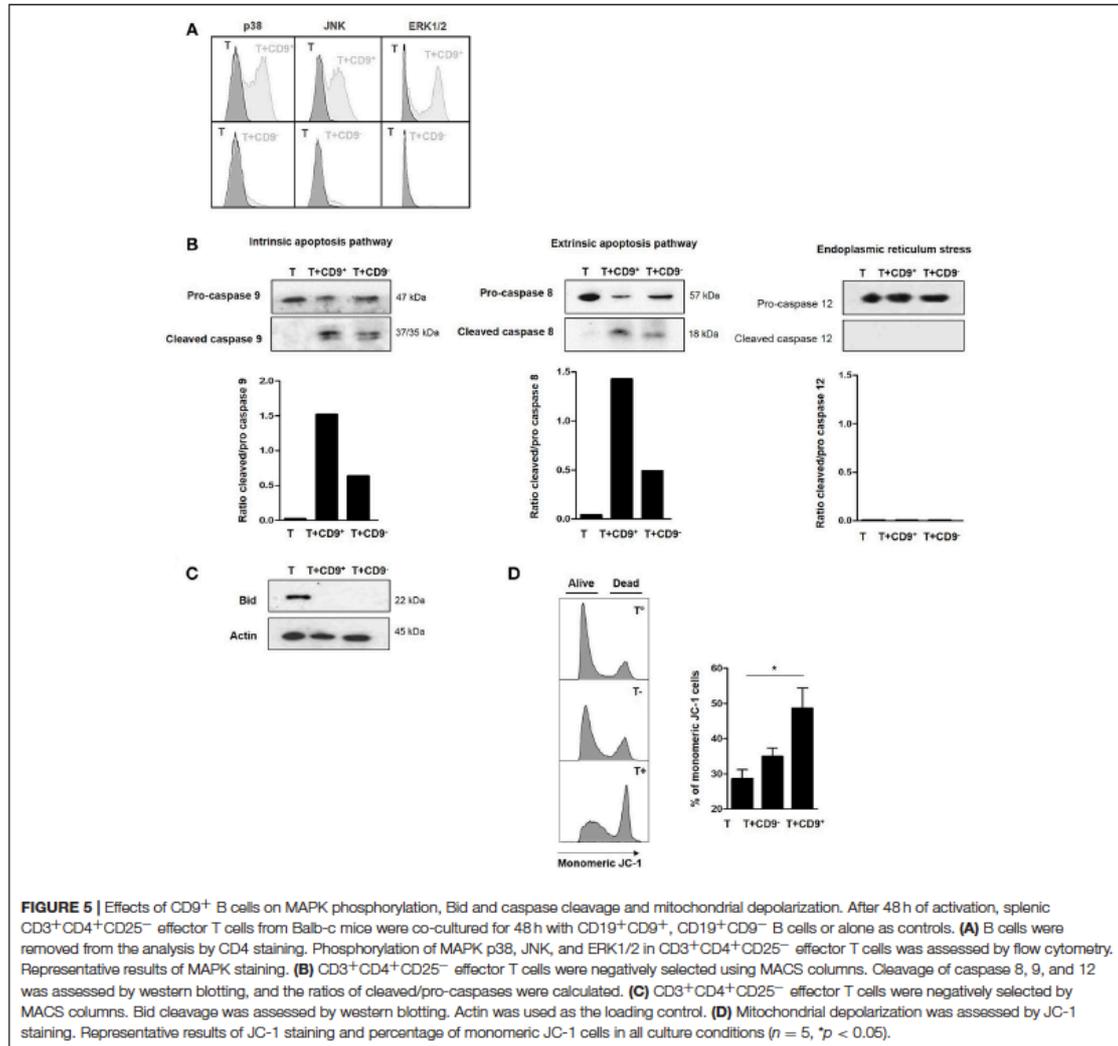
### CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B Cells Induce Apoptosis of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effector T Cells Through Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways via a MAPK-Dependent Mechanism

To determine the molecular pathways that were activated by CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, we used flow cytometry to analyze the phosphorylation levels of MAPK p38, extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinases (JNK), transcription factors that are known to be major activators of apoptosis (34, 35), in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells after co-culture with or without CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells. Only CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells, but not CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, induced phosphorylation of p38, JNK, and ERK1/2 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells undergoing apoptosis (Figure 5A). Cleavage of caspases 8 and 9 is characteristic of the activation of the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis, respectively. Caspase 12 cleavage is characteristic of endoplasmic reticulum stress. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> or CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells and negatively selected by MACS columns to perform western blotting only on T cells (purity, 94% ± 2). CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>

effector T cells cultured alone were used as controls. Both caspase 8 and 9 were cleaved when CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells (Figure 5B) (ratio of cleaved/pro-caspases was 1.5 and 1.4, respectively). Caspases 8 and 9 were also cleaved when CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> B cells, but to a reduced extent, probably due to the small percentage of Bregs not expressing CD9 (ratio of cleaved/pro-caspases was 0.7 and 0.4, respectively). Caspase 12 was not cleaved under any condition. This finding correlated with the cleavage and activation of the pro-apoptotic protein Bid, linking the intrinsic and extrinsic pathways (Figure 5C). Finally, the significantly higher percentage of monomeric JC-1 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells co-cultured with CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells confirmed the mitochondrial depolarization of T cells and activation of the intrinsic pathway of apoptosis (48.6% ± 5.7 vs. 28.6% ± 2.5, respectively; *p* < 0.05) (Figure 5D). Taken together, these data show that CD19<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> B cells induce CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell apoptosis via both extrinsic and intrinsic pathways through MAPK activation.

## DISCUSSION

The prevalence of allergic asthma has dramatically increased worldwide during the last decade. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways associated with airway hyper-responsiveness to inhaled allergens and deregulation of type 2 immunity (36); however, its pathogenesis is still not fully understood. Asthma is characterized by an expansion of CD4<sup>+</sup> helper T lymphocytes (Th2, Th17), increased production



of the Th2 cytokines IL-4, IL-5, and IL-13, an increased level of allergen-specific immunoglobulin E (IgE), eosinophilia and inflammation of the airways (37). The roles of other T cells, including natural killer T cells,  $\gamma\delta$  T cells, and CD8 T cells, has also been reported in asthma, although the relative importance of these different cell populations remains to be confirmed (38). The role of “conventional” B cells, as an actor in immunity, has been clearly demonstrated in asthma (22, 39), and several studies in mice and humans that have also evidenced a role for “specific subsets” of B cells with regulatory properties have reported that these “Breg cells” are involved in the suppression and control of airway inflammation (6, 10). Their numbers are a crucial determinant that clearly contributes to the regulation

of the immune system, and their deficiency in asthma is now well-demonstrated (21, 22, 24).

The most commonly used marker of Bregs is their ability to produce and have a suppressive effect via IL-10, but other cytokines or molecules, such as TGF- $\beta$ , IL-35, and granzyme B, have been shown to mediate regulatory properties on different immune cell targets (1, 12, 14, 23), and no exclusive cell surface marker has yet been evidenced for this Breg population (5, 18). We have previously reported that asthmatic mice are characterized by a lack of IL-10-secreting Bregs enriched in a CD9<sup>+</sup> B cell subset. The adoptive transfer of these CD9<sup>+</sup> B cells alone is thus sufficient to abrogate asthma in an IL-10-dependent manner (24). The ability of Bregs to normalize lung function and

airway inflammation and the notable alterations of this Breg pool in asthmatic mice clearly point to these cells as an interesting target in allergic diseases.

We demonstrated that these cells regulate effector T cell proliferation, but the mechanisms responsible for such an effect remain unknown. In this study, we demonstrated that CD9<sup>+</sup> B cells harbored strong suppressive properties. These cells induced the death of effector T cells via the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in an IL-10-dependent manner and through the MAPK cascade. We also confirmed these findings, for the first time, in humans and reported that severe asthmatic patients have reduced number of CD9<sup>+</sup> B cells with regulatory properties.

CD9 is a tetraspanin molecule that is involved in different mechanisms, including adhesion, migration, cell fusion and membrane signaling (40, 41). Interestingly, CD9 is also involved in the enhancement and maintenance of IL-10 secretion in murine and human antigen-presenting cells (40, 41). We have demonstrated that an IL10<sup>+</sup> B cell population is enriched in a CD9<sup>+</sup> B cell subset that is decreased in asthmatic mice (24). Similar data have been published by Sun and Matsushita, who identified CD9 as a marker of murine IL-10-competent Bregs (26, 27). It has been reported that the PI3K-Akt pathway is essential for their development and is involved in their regulatory effects in a model of contact hypersensitivity (27). These data confirmed a study conducted by Ostrowski et al. in a model of foot-and-mouth disease virus-infected mice, in which CD9<sup>+</sup> B cells were the main source of splenic IL-10 (25). Thus, these data not only clearly support CD9 as a potential biomarker of Bregs but also suggest a possible role in asthma pathophysiology, differing from the classical role of B cells as IgE producers. However, no mechanism of action has yet been reported for CD9<sup>+</sup> B cells.

The unique link between CD9 and asthma is related to the observation that certain tetraspanins interact with tetrameric high-affinity IgE receptors (FcεRI) on effector cells (42, 43). This interaction is associated with the negative regulation of FcεRI-mediated degranulation of mast cells, which may at least in part explain their possible role in asthma. We suggest herein another or complementary potential mechanism for CD9 Breg cells in this pathology. We report that CD9<sup>+</sup> B cells induce T cell cycle arrest in sub G0/G1, leading to the cell death of effector T cells by apoptosis via IL-10 secretion and activation of the MAPK cascade independently from CD9 itself. Apoptosis is a physiologically programmed cell death program that is also involved in defense mechanisms against damaged or stressed cells and cells stimulated by any agent to prevent the accumulation of non-functional cells in tissues (44). Apoptosis may be activated via two different pathways: the intrinsic and extrinsic pathways (45, 46). Following the activation of different signaling cascades, both pathways converge at the final caspase 3 activation step and commonly lead to the cleavage of different proteins leading to cell death. The link between IL-10 and apoptosis is clear, and our data are concordant with those of O'Farrell's data showing that IL-10 increases the expression of p19 to inhibit macrophage proliferation through cell cycle arrest in G1 and implicating the MAPK phosphorylation cascade (47). In our experiments, IL10

alone is able to induce the apoptosis of T cells as CD9<sup>+</sup> B cells. IL-10 inhibits the proliferation of other cells with various other effects, such as the induction of endoplasmic reticulum stress (48). These cells did not induce cleavage of caspase 12, which is characteristic of endoplasmic reticulum stress, nor necroptosis, as treatment with necrostatin-1 did not abrogate T cell death (data not shown), confirming the involvement of apoptosis.

The intrinsic apoptosis pathway is initiated by the activation of pro-apoptotic mediators leading to mitochondrial depolarization, the release of cytochrome c and cleavage of caspase 9 (49). The extrinsic pathway is activated when death receptors are ligated, resulting in caspase 8 activation (50). Caspase 8 can directly induce apoptosis or activate the intrinsic pathway by cleavage of Bid. Here, we report that CD9<sup>+</sup> B cells induced T cell apoptosis through both the extrinsic and intrinsic pathways, involving caspases 8 and 9 and cleavage of the molecule Bid required for apoptosis activation. Activation of the intrinsic pathway in T cells by CD9<sup>+</sup> Bregs was confirmed by mitochondrial depolarization. These data corroborate Bailey's results showing that IL-10 induces apoptosis in mast cells and macrophages via the intrinsic cascade through mechanisms involving caspase 3 cleavage and mitochondrial depolarization (51). Surprisingly, when T cells are co-cultured with non-regulatory CD9<sup>-</sup> B cells, low levels of caspase 8 and 9, and Bid are cleaved. These phenomena could explain the small but substantial number of apoptotic cells compared with T cells alone. This low level of T cell death is more likely a consequence of CD9 as a known marker of enrichment of IL-10-secreting B cells (88% of total IL-10 secreting B cells) (26) and the presence of a few Breg cells in the CD9<sup>-</sup> subset.

We have also confirmed that CD9<sup>+</sup> B cells also exist in humans. CD9<sup>+</sup> B cells from HV induced apoptosis of autologous effector T cells in an IL-10-dependent manner, as observed for mouse CD9<sup>+</sup> B cells. Finally, we report for the first time that CD9<sup>+</sup> B cells, which are also associated with a CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitional B cell phenotype, were reduced in number in the blood of severe asthmatic patients. There is evidence in different models that enhanced activity of Bregs producing IL-10 strongly suppresses inflammatory processes (4–7, 20), and conversely, Van Der Vlugt reported that patients with allergic asthma displayed B cells with impaired regulatory activity (21). Here, we report that the number of CD9<sup>+</sup> B cells was reduced in the blood of severe asthmatic patients, as demonstrated in asthmatic mice lacking CD9<sup>+</sup> B cells but displaying no functional defect. Furthermore, these cells were able to induce effector T cell apoptosis in the same manner as CD9<sup>+</sup> B cells from wild type mice.

Interestingly, we also report herein that severe asthmatic patients had fewer CD9<sup>+</sup> B cells not only at basal levels between exacerbations but also following acute inflammation events (data not shown), suggesting that even under a strong inflammatory environment, patients are not able to upregulate CD9<sup>+</sup> Breg production. These data suggest that the restoration of a normal number of CD9<sup>+</sup> B cells may "correct" a potential defect and suggest that increasing Breg cells in allergic/asthmatic patients may be envisioned as a new therapeutic strategy. In mice, the adoptive transfer of CD9<sup>+</sup> B cells reverses asthma

(24), and the adoptive transfer of CD1d<sup>hi</sup> Bregs suppresses airway inflammation by inducing natural forkhead box protein 3-positive CD4<sup>+</sup> regulatory T cell recruitment into the lungs (10). Interestingly, parasites and infectious agents drive Breg expansion and have been proposed as a potential mechanism for reducing host immune responses (19, 52–54). The potential for use of helminth molecules as a new anti-inflammatory therapy has been postulated using the worm's molecules to generate Breg cells (54, 55). Modulation of anti-inflammatory cytokines (56), the possibility to expand Breg cells *in vitro* (9, 57) or strategies aimed at controlling signaling pathways in favor of *in vivo* Breg expansion (58) have been seriously considered. Compared with allergen-specific immunotherapy or non-specific treatments, such strategies may offer the possibility for a reduced treatment time and superior effects resulting from self-sustaining or the induction of regulatory mechanisms since targeting Breg cells may also embrace other regulatory systems simultaneously, such as IL-10-producing regulatory T cells (19).

In conclusion, our data are the first to characterize the molecular mechanisms of the regulation of CD9<sup>+</sup> B cells to induce effector T cell apoptosis in mice and humans. The lack of CD9<sup>+</sup> Breg cells in severe asthmatic patients suggests Bregs as a potential target for future therapeutic strategies. A better understanding of the immunological mechanisms underlying allergic diseases is essential for the development of new preventive and therapeutic Breg interventions.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB, MD, LuC, GB, SB, and AM: study conception and design. CB, MD, and ED: acquisition of data. CB, MD, LuC, GB, SB, and AM: analysis and interpretation of data. All authors critical revision for important intellectual content. CB and MD: statistical analysis. CB, MD, AM, and SB: obtained funding. ED, AF, M-AC, LuC, and MK: administrative, technical, or material

support. SB and AM: carried out study supervision. All authors approved the final version of the manuscript prior to submission.

## FUNDING

This work was supported by a grant from l'Institut de Recherche en Santé Respiratoire-Pays de la Loire. This work was achieved in the context of the BASAL project financed by Région Pays de la Loire and the IHU-Cesti project, the DHU Oncogreffe and the LabEX IGO thanks to French government financial support managed by the National Research Agency via the Investment into the Future program (ANR-10-IBHU-005 and ANR-11-LABX-0016-01). The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the participating patients and their families, whose trust, support, and cooperation were essential for the collection of the data used in this study. We also thank the main EXPRESA investigators: Pr. Patrice Diot, Dr. Christophe Leroyer, Dr. Chantal Belleguic, Dr. Marion Verdaguer, and Dr. Hakima Ouksel. We also thank the pulmonology team of CIC-Thorax (Meggy Bernard, Régine Valéro, and Annick Joly) for the EXPRESA follow-up. We further thank J. Desfrancois-Noel, N. Marec, and L. Haro from the Cytocell Cytometry Facility in Nantes (SFR Bonamy), and the Unité Thérapeutique Expérimentale in Nantes for the animal experimentation facility.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03034/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Fillatreau S. Cytokine-producing B cells as regulators of pathogenic and protective immune responses. *Ann Rheum Dis.* (2013) 72(Suppl. 2):ii80–4. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202253
- Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell-B-cell interactions. *Rheum Dis Clin North Am.* (2004) 30:175–91, vii–viii. doi: 10.1016/S0889-857X(03)00111-X
- Zanetti M, Castiglioni P, Rizzi M, Wheeler M, Gerloni MB. Lymphocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines. *Immunol Rev.* (2004) 199:264–78. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00152.x
- Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4<sup>+</sup> T cell immunity. *Nat Rev Immunol.* (2010) 10:236–47. doi: 10.1038/nri2729
- Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* (2015) 42:607–12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005
- van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* (2016) 138:654–65. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.006
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderson SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* (2002) 3:944–50. doi: 10.1038/ni833
- Ray A, Dittel BN. Mechanisms of regulatory B cell function in autoimmune and inflammatory diseases beyond IL-10. *J Clin Med.* (2017) 6:12. doi: 10.3390/jcm6010012
- Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* (2009) 182:3492–502. doi: 10.4049/jimmunol.0803052
- Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* (2010) 125:1114–24.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2010.01.018
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* (2003) 197:489–501. doi: 10.1084/jem.20021293
- Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- $\alpha$  expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol.* (2014) 25:1575–85. doi: 10.1681/ASN.2013080837
- Nouël A, Simon Q, Jamin C, Pers J-O, Hillion S. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front Immunol.* (2014) 5:11. doi: 10.3389/fimmu.2014.00011

14. Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, et al. tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties. *J Am Soc Nephrol*. (2015) 26:2588–98. doi: 10.1681/ASN.2014040404
15. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant*. (2015) 15:1384–91. doi: 10.1111/ajt.13122
16. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood* (2014) 124:2034–45. doi: 10.1182/blood-2014-04-571125
17. Chong AS, Khiew SH. Transplantation tolerance: don't forget about the B cells. *Clin Exp Immunol*. (2017) 189:171–80. doi: 10.1111/cei.12927
18. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*. (2015) 27:479–86. doi: 10.1093/intimm/dxv038
19. van der Vlugt LEPM, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhani A, Lievers E, Gloudemans AK, Liu K-Y, et al. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. *PLoS ONE* (2012) 7:e30883. doi: 10.1371/journal.pone.0030883
20. Noh J, Lee JH, Noh G, Bang SY, Kim HS, Choi WS, et al. Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br1) in Cow Milk Allergy. *Cell Immunol*. (2010) 264:143–9. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.05.013
21. van der Vlugt LEPM, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhani A, Janssen Bonas M, Dijkstra TR, Labuda LA, et al. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy* (2014) 44:517–28. doi: 10.1111/cea.12238
22. Kamekura R, Shigehara K, Miyajima S, Jitsukawa S, Kawata K, Yamashita K, et al. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin Immunol*. (2015) 158:204–11. doi: 10.1016/j.clim.2015.02.016
23. Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy* (2014) 69:1454–63. doi: 10.1111/all.12490
24. Braza F, Chesne J, Durand M, Diraud S, Brosseau C, Mahay G, et al. A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy* (2015) 70:1421–31. doi: 10.1111/all.12697
25. Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, Zamorano PI, Sadir AM, Gefner JR, et al. The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. *J Virol*. (2007) 81:9357–67. doi: 10.1128/JVI.00677-07
26. Sun J, Wang J, Pefanis E, Chao J, Rothschild G, Tachibana I, et al. Transcriptomics identify CD9 as a marker of murine IL-10-competent regulatory B cells. *Cell Rep*. (2015) 13:1110–7. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.070
27. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, et al. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. *J Allergy Clin Immunol*. (2016) 138:1170–82.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1319
28. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American thoracic society. *Am J Respir Crit Care Med*. (2000) 162:2341–51. doi: 10.1164/ajrccm.162.6.ats9-00
29. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J*. (2012) 40:1324–43. doi: 10.1183/09031936.00080312
30. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. (2014) 43:343–73. doi: 10.1183/13993003.52020-2013
31. Chesné J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant M-A, Loy J, et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J Allergy Clin Immunol*. (2015) 135:1643–1643.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1872
32. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* (2013) 32:3789–97. doi: 10.1038/onc.2012.556
33. Crowley LC, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. (2016) 2016:905–10. doi: 10.1101/pdb.prot087247
34. Brosseau CM, Pirianov G, Colston KW. Involvement of stress activated protein kinases (JNK and p38) in 1,25 dihydroxyvitamin D3-induced breast cell death. *Steroids* (2010) 75:1082–8. doi: 10.1016/j.steroids.2010.07.007
35. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* (2004) 23:2838–49. doi: 10.1038/sj.onc.1207556
36. Edwards MR, Saglani S, Schwarze J, Skevaki C, Smith JA, Ainsworth B, et al. Addressing unmet needs in immune tolerance to allergens: from the European asthma research and innovation partnership (EARIP) work package (WP)2 collaborators. *Eur Respir J*. (2017) 49:1602448. doi: 10.1183/13993003.02448-2016
37. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. (2014) 133:621–31. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1088
38. Robinson DS. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. (2010) 126:1081–91; quiz 1092–3. doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.025
39. Lundy SK, Berlin AA, Martens TF, Lukacs NW. Deficiency of regulatory B cells increases allergic airway inflammation. *Inflamm Res*. (2005) 54:514–21. doi: 10.1007/s00011-005-1387-0
40. Peng WM, Yu CF, Kolanus W, Mazzocca A, Bieber T, Kraft S, et al. Tetraspanins CD9 and CD81 are molecular partners of trimeric FcεRI on human antigen-presenting cells. *Allergy* (2011) 66:605–611. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02524.x
41. Ha CT, Waterhouse R, Wessells J, Wu JA, Dveksler GS. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1. *J Leukoc Biol*. (2005) 77:948–57. doi: 10.1189/jlb.0804453
42. Higginbottom A, Wilkinson I, McCullough B, Lanza F, Azorsa DO, Partridge LJ, et al. Antibody cross-linking of human CD9 and the high-affinity immunoglobulin E receptor stimulates secretion from transfected rat basophilic leukaemia cells. *Immunology* (2000) 99:546–52. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00992.x
43. Moseley GW. Tetraspanin-Fc receptor interactions. *Platelets* (2005) 16:3–12. doi: 10.1080/09537100400004363
44. Dillon CP, Green DR. Molecular cell biology of apoptosis and necroptosis in cancer. *Adv Exp Med Biol*. (2016) 930:1–23. doi: 10.1007/978-3-319-39406-0\_1
45. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2014) 15:49–63. doi: 10.1038/nrm3722
46. Brosseau C, Dousset C, Touzeau C, Maiga S, Moreau P, Amiot M, et al. Combination of lenalidomide with vitamin D3 induces apoptosis in mantle cell lymphoma via demethylation of BIK. *Cell Death Dis*. (2014) 5:e1389. doi: 10.1038/cddis.2014.346
47. O'Farrell AM, Parry DA, Zindy F, Roussel MF, Lees E, Moore KW, et al. Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. *J Immunol*. (2000) 164:4607–15. doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4607
48. Lee T-S, Chau L-Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*. (2002) 8:240–6. doi: 10.1038/nm0302-240
49. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. (2009) 122:437–41. doi: 10.1242/jcs.031682
50. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2010) 11:621–32. doi: 10.1038/nrm2952
51. Bailey DP, Kashyap M, Bouton LA, Murray PJ, Ryan JJ. Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *J Leukoc Biol*. (2006) 80:581–9. doi: 10.1189/jlb.0405201
52. Husaarts L, van der Vlugt LEPM, Yazdanbakhsh M, Smits HH. Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. (2011) 128:733–9. doi: 10.1016/j.jaci.2011.05.012
53. Tian F, Hu X, Xian K, Zong D, Liu H, Wei H, et al. B10 cells induced by *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens modulated regulatory T cells and cytokine production of T cells. *Parasitol Res*. (2015) 114:3827–34. doi: 10.1007/s00436-015-4613-x

54. Haerberlein S, Obieglo K, Ozir-Fazalikhhan A, Chayé MAM, Veninga H, van der Vlugt LEPM, et al. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. *PLoS Pathog.* (2017) 13:e1006539. doi: 10.1371/journal.ppat.1006539
55. Fallon PG, Alcami A. Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? *Trends Immunol.* (2006) 27:470–6. doi: 10.1016/j.it.2006.08.002
56. Dong J, Wong CK, Cai Z, Jiao D, Chu M, Lam CWK. Amelioration of allergic airway inflammation in mice by regulatory IL-35 through dampening inflammatory dendritic cells. *Allergy* (2015) 70:921–32. doi: 10.1111/all.12631
57. Chesneau M, Pallier A, Braza F, Lacombe G, Le Gallou S, Baron D, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant.* (2014) 14:144–55. doi: 10.1111/ajt.12508
58. Korczak-Kowalska G, Stelmaszyk-Emmel A, Bocian K, Kiernozek E, Drela N, Domagała-Kulawik J. Expanding diversity and common goal of regulatory

T and B cells. II: in allergy, malignancy, and transplantation. *Arch Immunol Ther Exp.* (2017) 65:523–35. doi: 10.1007/s00005-017-0471-9

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Brosseau, Durand, Colas, Durand, Foureau, Cheminant, Bouchaud, Castan, Klein, Magnan and Brouard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Références bibliographiques

- Adachi, T., Motojima, S., Hirata, A., Fukuda, T., and Makino, S. (1995). Eosinophil viability-enhancing activity in sputum from patients with bronchial asthma, Contributions of interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *151*, 618–623.
- Adcock, I.M., Lane, S.J., Brown, C.R., Lee, T.H., and Barnes, P.J. (1995). Abnormal glucocorticoid receptor-activator protein 1 interaction in steroid-resistant asthma. *J. Exp. Med.* *182*, 1951–1958.
- Afshar, R., Medoff, B.D., and Luster, A.D. (2008). Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *38*, 1847–1857.
- Agache, I., Akdis, C., Jutel, M., and Virchow, J.C. (2012). Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* *67*, 835–846.
- Agache, I., Lau, S., Akdis, C.A., Smolinska, S., Bonini, M., Cavkaytar, O., Flood, B., Gajdanowicz, P., Izuhara, K., Kalayci, O., et al. (2019). EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: House dust mite-driven allergic asthma. *Allergy* *74*, 855–873.
- Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S.A. (2006). IL-2 administration increases CD4<sup>+</sup> CD25(hi) Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in cancer patients. *Blood* *107*, 2409–2414.
- Aikawa, T., Shimura, S., Sasaki, H., Ebina, M., and Takishima, T. (1992). Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* *101*, 916–921.
- Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* *2*, 725–731.
- Akdis, C.A., and Akdis, M. (2011). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 18–27.
- Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., and Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* *102*, 98–106.
- Akdis, M., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2005). T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 961–968; quiz 969.
- Al-Muhsen, S., Johnson, J.R., and Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 451–462; quiz 463–464.
- Al-Ramli, W., Préfontaine, D., Chouiali, F., Martin, J.G., Olivenstein, R., Lemièrre, C., and Hamid, Q. (2009). TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 1185–1187.

Alvarez, M.J., Echechipía, S., García, B., Tabar, A.I., Martín, S., Rico, P., and Olaguibel, J.M. (2002). Liposome-entrapped *D. pteronyssinus* vaccination in mild asthma patients: effect of 1-year double-blind, placebo-controlled trial on inflammation, bronchial hyperresponsiveness and immediate and late bronchial responses to the allergen. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 32, 1574–1582.

Ameal, A., Vega-Chicote, J.M., Fernández, S., Miranda, A., Carmona, M.J., Rondón, M.C., Reina, E., and García-González, J.J. (2005). Double-blind and placebo-controlled study to assess efficacy and safety of a modified allergen extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic asthma. *Allergy* 60, 1178–1183.

Amigorena, S. (2002). Fcγ Receptors and Cross-Presentation in Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 195, f1–f3.

Anderson, S.D. (2010). Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 138, 25S-30S.

Anderson, S.D., and Brannan, J.D. (2003). Methods for “indirect” challenge tests including exercise, eucapnic voluntary hyperpnea, and hypertonic aerosols. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 24, 27–54.

Anderson, S.D., Rodwell, L.T., Daviskas, E., Spring, J.F., and du Toit, J. (1996). The protective effect of nedocromil sodium and other drugs on airway narrowing provoked by hyperosmolar stimuli: a role for the airway epithelium? *J. Allergy Clin. Immunol.* 98, S124-134; discussion S140-142.

Anderson, S.D., Charlton, B., Weiler, J.M., Nichols, S., Spector, S.L., Pearlman, D.S., and A305 Study Group (2009). Comparison of mannitol and methacholine to predict exercise-induced bronchoconstriction and a clinical diagnosis of asthma. *Respir. Res.* 10, 4.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J., and Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975–987.

Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J., and Boyman, O. (2015). Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol.* 36, 763–777.

Arpaia, N., Green, J.A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* 162, 1078–1089.

Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K., Strachan, D.P., Weiland, S.K., and Williams, H. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 368, 733–743.

Bahadori, K., Doyle-Waters, M.M., Marra, C., Lynd, L., Alasaly, K., Swiston, J., and FitzGerald, J.M. (2009). Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm. Med.* 9.

Bai, T.R. (2010). Evidence for airway remodeling in chronic asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *10*, 82–86.

Bai, C.H., Song, S.-Y., and Kim, Y.-D. (2007). The inhibitory effect of the leukotriene receptor antagonist on leukotriene D<sub>4</sub>-induced MUC2/5AC gene expression and mucin secretion in human airway epithelial cells. *Auris. Nasus. Larynx* *34*, 203–206.

Ballardini, N., Bergström, A., Wahlgren, C.-F., van Hage, M., Hallner, E., Kull, I., Melén, E., Antó, J.M., Bousquet, J., and Wickman, M. (2016). IgE antibodies in relation to prevalence and multimorbidity of eczema, asthma, and rhinitis from birth to adolescence. *Allergy* *71*, 342–349.

Barczyk, A., Pierzchala, W., Caramori, G., Wiaderkiewicz, R., Kaminski, M., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2014). Decreased percentage of CD4+Foxp3+TGF-β+ and increased percentage of CD4+IL-17+ cells in bronchoalveolar lavage of asthmatics. *J. Inflamm. Lond. Engl.* *11*, 22.

Barkauskas, C.E., Chung, M.-I., Fioret, B., Gao, X., Katsura, H., and Hogan, B.L.M. (2017). Lung organoids: current uses and future promise. *Development* *144*, 986–997.

Barnes, P.J. (2004). Distribution of receptor targets in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.* *1*, 345–351.

Barnes, P.J. (2006a). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br. J. Pharmacol.* *148*, 245–254.

Barnes, P.J. (2006b). Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur. Respir. J.* *27*, 413–426.

Barnes, P.J. (2011). Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 29–43.

Barnes, P.J., Pedersen, S., and Busse, W.W. (1998). Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *157*, S1-53.

Basomba, A., Tabar, A.I., de Rojas, D.H.F., García, B.E., Alamar, R., Olaguíbel, J.M., del Prado, J.M., Martín, S., and Rico, P. (2002). Allergen vaccination with a liposome-encapsulated extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* *109*, 943–948.

Bateman, E.D., Hurd, S.S., Barnes, P.J., Bousquet, J., Drazen, J.M., FitzGerald, J.M., Gibson, P., Ohta, K., O’Byrne, P., Pedersen, S.E., et al. (2008). Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur. Respir. J.* *31*, 143–178.

Beckett, P.A., and Howarth, P.H. (2003). Pharmacotherapy and airway remodelling in asthma? *Thorax* *58*, 163–174.

Begueret, H., Berger, P., Vernejoux, J.M., Dubuisson, L., Marthan, R., and Tunon-de-Lara, J.M.

(2007). Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 62, 8–15.

Bel, E.H., Wenzel, S.E., Thompson, P.J., Prazma, C.M., Keene, O.N., Yancey, S.W., Ortega, H.G., and Pavord, I.D. (2014). Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1189–1197.

Benayoun, L., Druilhe, A., Dombret, M.-C., Aubier, M., and Pretolani, M. (2003). Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1360–1368.

Berger, P., Compton, S.J., Molimard, M., Walls, A.F., N’Guyen, C., Marthan, R., and Tunon-De-Lara, J.M. (1999). Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 29, 804–812.

Berger, P., Girodet, P.-O., Begueret, H., Ousova, O., Perng, D.-W., Marthan, R., Walls, A.F., and Tunon de Lara, J.M. (2003). Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 2139–2141.

Bergeron, C., Tulic, M.K., and Hamid, Q. (2007). Tools used to measure airway remodelling in research. *Eur. Respir. J.* 29, 596–604.

Bergeron, C., Al-Ramli, W., and Hamid, Q. (2009). Remodeling in asthma. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 301–305.

Bernstein, D.I., Wanner, M., Borish, L., Liss, G.M., and Immunotherapy Committee, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (2004). Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 1129–1136.

Bernstein, D.I., Jr, J.A.B., Fogh, B.S., Kaur, A., Li, Z., and Nolte, H. (2017). A practical guide to the sublingual immunotherapy tablet adverse event profile: implications for clinical practice. *Postgrad. Med.* 129, 590–597.

Bihouée, T., Bouchaud, G., Chesné, J., Lair, D., Rolland-Debord, C., Braza, F., Cheminant, M.-A., Aubert, P., Mahay, G., Sagan, C., et al. (2014). Food allergy enhances allergic asthma in mice. *Respir. Res.* 15, 142.

Billerbeck, E., Barry, W.T., Mu, K., Dorner, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2011). Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R $\gamma$ (null) humanized mice. *Blood* 117, 3076–3086.

Bischoff, S.C., Brunner, T., Weck, A.L.D., and Dahinden, C.A. (1990). Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. *J. Exp. Med.* 172, 1577–1582.

Bleecker, E.R., FitzGerald, J.M., Chanez, P., Papi, A., Weinstein, S.F., Barker, P., Sproule, S.,

Gilmartin, G., Aurivillius, M., Werkström, V., et al. (2016). Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting  $\beta$ 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *388*, 2115–2127.

Bochner, B.S., Udem, B.J., and Lichtenstein, L.M. (1994). Immunological Aspects of Allergic Asthma. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 295–335.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* *110*, 1225–1232.

Bosma, G.C., Custer, R.P., and Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* *301*, 527–530.

Bouchaud, G., Braza, F., Chesné, J., Lair, D., Chen, K.-W., Rolland-Debord, C., Hassoun, D., Roussey-Bihouée, T., Cheminant, M.-A., Brouard, S., et al. (2015). Prevention of allergic asthma through Der p 2 peptide vaccination. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 197-200.e1.

Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., and Vignola, A.M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *161*, 1720–1745.

Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A.A., Denburg, J., Fokkens, W.J., Togias, A., Zuberbier, T., Baena-Cagnani, C.E., Canonica, G.W., van Weel, C., et al. (2008). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* *63 Suppl 86*, 8–160.

Bousquet, P.-J., Chinn, S., Janson, C., Kogevinas, M., Burney, P., Jarvis, D., and European Community Respiratory Health Survey I (2007). Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy* *62*, 301–309.

Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 180–190.

Boyman, O., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006a). Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* *6*, 1323–1331.

Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006b). Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* *311*, 1924–1927.

Bradding, P., Walls, A.F., and Holgate, S.T. (2006). The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *117*, 1277–1284.

Brightling, C.E., Chanez, P., Leigh, R., O'Byrne, P.M., Korn, S., She, D., May, R.D., Streicher, K., Ranade, K., and Piper, E. (2015). Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med.* *3*, 692–701.

Brittain, R.T. (1990). Approaches to a long-acting, selective beta 2-adrenoceptor stimulant. *Lung* *168 Suppl*, 111–114.

Brittain, R.T., Farmer, J.B., Jack, D., Martin, L.E., and Simpson, W.T. (1968). Alpha-[(t-Butylamino)methyl]-4-hydroxy-m-xylene-alpha 1,alpha 3-diol (AH.3365): a selective beta-adrenergic stimulant. *Nature* *219*, 862–863.

Brüggemann, M., Winter, G., Waldmann, H., and Neuberger, M.S. (1989). The immunogenicity of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* *170*, 2153–2157.

Bryce, P.J., Falahati, R., Kenney, L., Leung, J., Bebbington, C., Tomasevic, N., Krier, R.A., Hsu, C.-L., Shultz, L.D., Greiner, D.L., et al. (2016). Humanized Mouse Model of Mast Cell-Mediated Passive Cutaneous Anaphylaxis and Passive Systemic Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *138*, 769–779.

Buckland, G.L. (2011). Harnessing opportunities in non-animal asthma research for a 21st-century science. *Drug Discov. Today* *16*, 914–927.

Bullens, D.M.A., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P.W., Dupont, L.J., and Ceuppens, J.L. (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* *7*, 135.

Bullowa, J.G.M., and Gottlieb, C. (1922). Additional experimental studies in bronchial function. *The Laryngoscope* *32*, 284–289.

Burchell, J.T., Wikstrom, M.E., Stumbles, P.A., Sly, P.D., and Turner, D.J. (2009). Attenuation of allergen-induced airway hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *296*, L307-319.

Busse, W.W. (2010). The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* *138*, 4S-10S.

Busse, W.W., Holgate, S., Kerwin, E., Chon, Y., Feng, J., Lin, J., and Lin, S.-L. (2013). Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Study of Brodalumab, a Human Anti-IL-17 Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate to Severe Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *188*, 1294–1302.

Calderón, M.A., Vidal, C., Rodríguez Del Río, P., Just, J., Pfaar, O., Tabar, A.I., Sánchez-Machín, I., Bubel, P., Borja, J., Eberle, P., et al. (2017). European Survey on Adverse Systemic Reactions in Allergen Immunotherapy (EASSI): a real-life clinical assessment. *Allergy* *72*, 462–472.

Campana, R., Marth, K., Ziegelmayer, P., Weber, M., Lupinek, C., Zhernov, Y., Elisyutina, O., Khaitov, M., Rigler, E., Westritschnig, K., et al. (2018). Vaccination of non-allergic individuals with recombinant hypoallergenic fragments of birch pollen allergen Bet v 1: Safety, effects and mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Campbell, J.D., Buckland, K.F., McMillan, S.J., Kearley, J., Oldfield, W.L.G., Stern, L.J., Grönlund, H., van Hage, M., Reynolds, C.J., Boyton, R.J., et al. (2009). Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J. Exp. Med.* *206*, 1535–1547.

Carmichael, J., Paterson, I.C., Diaz, P., Crompton, G.K., Kay, A.B., and Grant, I.W.B. (1981). Corticosteroid Resistance In Chronic Asthma. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* *282*, 1419–1422.

Carroll, N., Elliot, J., Morton, A., and James, A. (1993). The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* *147*, 405–410.

Carroll, N.G., Mutavdzic, S., and James, A.L. (2002). Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* *57*, 677–682.

Castle, W., Fuller, R., Hall, J., and Palmer, J. (1993). Serevent nationwide surveillance study: comparison of salmeterol with salbutamol in asthmatic patients who require regular bronchodilator treatment. *BMJ* *306*, 1034–1037.

Castro, M., Mathur, S., Hargreave, F., Boulet, L.-P., Xie, F., Young, J., Wilkins, H.J., Henkel, T., Nair, P., and Res-5-0010 Study Group (2011). Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 1125–1132.

Castro, M., Wenzel, S.E., Bleecker, E.R., Pizzichini, E., Kuna, P., Busse, W.W., Gossage, D.L., Ward, C.K., Wu, Y., Wang, B., et al. (2014). Benralizumab, an anti-interleukin 5 receptor  $\alpha$  monoclonal antibody, versus placebo for uncontrolled eosinophilic asthma: a phase 2b randomised dose-ranging study. *Lancet Respir. Med.* *2*, 879–890.

Chalmers, G.W., MacLeod, K.J., Thomson, L., Little, S.A., McSharry, C., and Thomson, N.C. (2001). Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest* *120*, 1917–1922.

Chan, M.A., Gigliotti, N.M., Dotson, A.L., and Rosenwasser, L.J. (2013). Omalizumab may decrease IgE synthesis by targeting membrane IgE<sup>+</sup> human B cells. *Clin. Transl. Allergy* *3*, 29.

Chanez, P., Wenzel, S.E., Anderson, G.P., Anto, J.M., Bel, E.H., Boulet, L.-P., Brightling, C.E., Busse, W.W., Castro, M., Dahlen, B., et al. (2007). Severe asthma in adults: what are the important questions? *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1337–1348.

Chanez, P., Contin-Bordes, C., Garcia, G., Verkindre, C., Didier, A., De Blay, F., de Lara, M.T., Blanco, P., Moreau, J.-F., Robinson, P., et al. (2010). Omalizumab-induced decrease of Fc $\epsilon$ RI

expression in patients with severe allergic asthma. *Respir. Med.* *104*, 1608–1617.

Chang, T.W. (2000). The pharmacological basis of anti-IgE therapy. *Nat. Biotechnol.* *18*, 157–162.

Chen, C.-C., Kobayashi, T., Iijima, K., Hsu, F.-C., and Kita, H. (2017). IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 1351-1363.e7.

Chen, K.-W., Blatt, K., Thomas, W.R., Swoboda, I., Valent, P., Valenta, R., and Vrtala, S. (2012). Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 435-443.e4.

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* *265*, 1237–1240.

Chesné, J., Braza, F., Mahay, G., Brouard, S., Aronica, M., and Magnan, A. (2014). IL-17 in Severe Asthma. Where Do We Stand? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *190*, 1094–1101.

Chesné, J., Braza, F., Chadeuf, G., Mahay, G., Cheminant, M.-A., Loy, J., Brouard, S., Sauzeau, V., Loirand, G., and Magnan, A. (2015). Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* *135*, 1643-1645.e5.

Chetta, A., Foresi, A., Del Donno, M., Bertorelli, G., Pesci, A., and Olivieri, D. (1997). Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest* *111*, 852–857.

Chiba, Y., Tanoue, G., Suto, R., Suto, W., Hanazaki, M., Katayama, H., and Sakai, H. (2017). Interleukin-17A directly acts on bronchial smooth muscle cells and augments the contractility. *Pharmacol. Rep. PR* *69*, 377–385.

Chinthrajah, R.S., Hernandez, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., and Nadeau, K.C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 984–997.

Chu, E.K., and Drazen, J.M. (2005). Asthma: one hundred years of treatment and onward. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 1202–1208.

Chu, S., Zhong, X., Zhang, J., Lao, Q., He, Z., and Bai, J. (2011). The expression of Foxp3 and ROR gamma t in lung tissues from normal smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int. Immunopharmacol.* *11*, 1780–1788.

Chung, K.F. (2017). Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients: A target for prevention and treatment? *J. Allergy Clin. Immunol.* *139*, 1071–1081.

Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P.J., Adcock, I.M., Bateman, E.D., Bel, E.H., Bleecker, E.R., et al. (2014). International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.* *43*, 343–373.

Cieri, R.L. (2019). Pulmonary smooth muscle in vertebrates: A comparative review of the structure and function. *Integr. Comp. Biol.*

Cisternas, M.G., Blanc, P.D., Yen, I.H., Katz, P.P., Earnest, G., Eisner, M.D., Shiboski, S., and Yelin, E.H. (2003). A comprehensive study of the direct and indirect costs of adult asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, 1212–1218.

Clark, A.R. (2003). MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J. Endocrinol.* *178*, 5–12.

Clutterbuck, E.J., Hirst, E.M., and Sanderson, C.J. (1989). Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* *73*, 1504–1512.

Cockcroft, D.W. (2010). Direct challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* *138*, 18S-24S.

Compalati, E., Passalacqua, G., Bonini, M., and Canonica, G.W. (2009). The efficacy of sublingual immunotherapy for house dust mites respiratory allergy: results of a GA2LEN meta-analysis. *Allergy* *64*, 1570–1579.

Conway, S.J., Izuhara, K., Kudo, Y., Litvin, J., Markwald, R., Ouyang, G., Arron, J.R., Holweg, C.T.J., and Kudo, A. (2014). The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 1279–1288.

Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., et al. (2011). Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N. Engl. J. Med.* *365*, 1088–1098.

Corren, J., Parnes, J.R., Wang, L., Mo, M., Roseti, S.L., Griffiths, J.M., and van der Merwe, R. (2017). Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. *N. Engl. J. Med.* *377*, 936–946.

Corrigan, C.J., Collard, P., Nagy, L., and Kay, A.B. (1991). Cultured peripheral blood mononuclear cells derived from patients with acute severe asthma (“status asthmaticus”) spontaneously elaborate a neutrophil chemotactic activity distinct from interleukin-8. *Am. Rev. Respir. Dis.* *143*, 538–544.

Coughlan, A.M., Harmon, C., Whelan, S., O’Brien, E.C., O’Reilly, V.P., Crotty, P., Kelly, P., Ryan, M., Hickey, F.B., O’Farrelly, C., et al. (2016). Myeloid Engraftment in Humanized Mice: Impact of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment and Transgenic Mouse Strain. *Stem Cells Dev.* *25*, 530–541.

Courtney, L.P., Phelps, J.L., and Karavodin, L.M. (1994). An anti-IL-2 antibody increases serum

half-life and improves anti-tumor efficacy of human recombinant interleukin-2. *Immunopharmacology* 28, 223–232.

Croisant, S. (2014). Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 795, 17–29.

Cullum, V.A., Farmer, J.B., Jack, D., and Levy, G.P. (1969). Salbutamol: a new, selective beta-adrenoceptive receptor stimulant. *Br. J. Pharmacol.* 35, 141–151.

Daubeuf, F., and Frossard, N. (2013). Acute Asthma Models to Ovalbumin in the Mouse. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 3, 31–37.

Davies, J.R., Herrmann, A., Russell, W., Svitacheva, N., Wickström, C., and Carlstedt, I. (2002). Respiratory tract mucins: structure and expression patterns. *Novartis Found. Symp.* 248, 76–88; discussion 88–93, 277–282.

Devillier, P., Fadel, R., and de Beaumont, O. (2016). House dust mite sublingual immunotherapy is safe in patients with mild-to-moderate, persistent asthma: a clinical trial. *Allergy* 71, 249–257.

Dima, E., Kyriakoudi, A., Kaponi, M., Vasileiadis, I., Stamou, P., Koutsoukou, A., Koulouris, N.G., and Rovina, N. (2019). The lung microbiome dynamics between stability and exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current perspectives. *Respir. Med.* 157, 1–6.

Donn, R., Berry, A., Stevens, A., Farrow, S., Betts, J., Stevens, R., Clayton, C., Wang, J., Warnock, L., Worthington, J., et al. (2007). Use of gene expression profiling to identify a novel glucocorticoid sensitivity determining gene, BMPRII. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 402–414.

Donohue, J.H., and Rosenberg, S.A. (1983). The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 130, 2203–2208.

Dostert, A., and Heinzl, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2807–2816.

Douglass, J.A., Dhimi, D., Gurr, C.E., Bulpitt, M., Shute, J.K., Howarth, P.H., Lindley, I.J., Church, M.K., and Holgate, S.T. (1994). Influence of interleukin-8 challenge in the nasal mucosa in atopic and nonatopic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 1108–1113.

Downie, G.H., Ryan, U.S., Hayes, B.A., and Friedman, M. (1992). Interleukin-2 directly increases albumin permeability of bovine and human vascular endothelium in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 58–65.

El-Shazly, A., Berger, P., Girodet, P.-O., Ousova, O., Fayon, M., Vernejoux, J.-M., Marthan, R., and Tunon-de-Lara, J.M. (2006). Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 1860–1868.

Epstein, M.M. (2004). Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int. Arch. Allergy Immunol.* *133*, 84–100.

Epstein, M.M. (2006). Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp. Toxicol. Pathol.* *57*, 41–44.

Epstein, T.G., Liss, G.M., Murphy-Berendts, K., and Bernstein, D.I. (2016). Risk factors for fatal and nonfatal reactions to subcutaneous immunotherapy: National surveillance study on allergen immunotherapy (2008-2013). *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* *116*, 354-359.e2.

Erin, E.M., Zacharasiewicz, A.S., Nicholson, G.C., Tan, A.J., Neighbour, H., Engelstätter, R., Hellwig, M., Kon, O.M., Barnes, P.J., and Hansel, T.T. (2008). Rapid effect of inhaled ciclesonide in asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Chest* *134*, 740–745.

Evans, M.J., Fanucchi, M.V., Plopper, C.G., and Hyde, D.M. (2010). Postnatal development of the lamina reticularis in primate airways. *Anat. Rec. Hoboken NJ* *2007* *293*, 947–954.

Farahnak, S., McGovern, T.K., Kim, R., O’Sullivan, M., Chen, B., Lee, M., Yoshie, H., Wang, A., Jang, J., Al Heialy, S., et al. (2017). Basic Fibroblast Growth Factor 2 Is a Determinant of CD4 T Cell-Airway Smooth Muscle Cell Communication through Membrane Conduits. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *199*, 3086–3093.

Fehrenbach, H., Wagner, C., and Wegmann, M. (2017). Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res.* *367*, 551–569.

Finkbeiner, W.E. (1999). Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respir. Physiol.* *118*, 77–83.

Finkelman, F.D., Hogan, S.P., Hershey, G.K.K., Rothenberg, M.E., and Wills-Karp, M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *184*, 1663–1674.

FitzGerald, J.M., Bleecker, E.R., Nair, P., Korn, S., Ohta, K., Lommatzsch, M., Ferguson, G.T., Busse, W.W., Barker, P., Sproule, S., et al. (2016). Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor  $\alpha$  monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *388*, 2128–2141.

Flanagan, S.P. (1966). ‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* *8*, 295–309.

Francis, J.N., Till, S.J., and Durham, S.R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, 1255–1261.

Franzese, C. (2015). Management of acute asthma exacerbations. *Int. Forum Allergy Rhinol.* *5* *Suppl 1*, S51-56.

Fryer, A.D., and Jacoby, D.B. (1998). Muscarinic Receptors and Control of Airway Smooth Muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *158*, S154–S160.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.

Gauvreau, G.M., O’Byrne, P.M., Boulet, L.-P., Wang, Y., Cockcroft, D., Bigler, J., FitzGerald, J.M., Boedigheimer, M., Davis, B.E., Dias, C., et al. (2014). Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. *N. Engl. J. Med.* *370*, 2102–2110.

Gelfand, E.W., Joetham, A., Cui, Z.-H., Balhorn, A., Takeda, K., Taube, C., and Dakhama, A. (2004). Induction and maintenance of airway responsiveness to allergen challenge are determined at the age of initial sensitization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 1298–1306.

Georas, S.N., and Rezaee, F. (2014). Epithelial barrier function: at the frontline of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 509–520.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723–737.

Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., and Liebhaver, S.A. (1972). Suppressor T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *108*, 586–590.

Giannetti, M.P., and Cardet, J.C. (2016). Interleukin-5 Antagonists Usher in a New Generation of Asthma Therapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *16*.

Gibson, P.G. (2009). Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin. Respir. J.* *3*, 198–206.

Gibson, G.J., Loddenkemper, R., Lundbäck, B., and Sibille, Y. (2013). Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur. Respir. J.* *42*, 559–563.

Gibson, P.G., Saltos, N., and Borgas, T. (2000). Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid-treated asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *105*, 752–759.

Gibson, P.G., Saltos, N., and Fakes, K. (2001). Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonide in asthma: a randomized controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 32–36.

Giembycz, M.A., Kaur, M., Leigh, R., and Newton, R. (2008). A Holy Grail of asthma management: toward understanding how long-acting beta(2)-adrenoceptor agonists enhance the clinical efficacy of inhaled corticosteroids. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 1090–1104.

Glassman, P.M., Abuqayyas, L., and Balthasar, J.P. (2015). Assessments of antibody biodistribution. *J. Clin. Pharmacol.* *55*, S29–S38.

Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., and Adam, S.A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14, 505–514.

Gour, N., and Wills-Karp, M. (2015). IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease. *Cytokine* 75, 68–78.

Gras, D., Bourdin, A., Vachier, I., de Senneville, L., Bonnans, C., and Chanez, P. (2012). An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1259-1266.e1.

Gras, D., Petit, A., Charriot, J., Knabe, L., Alagha, K., Gamez, A.S., Garulli, C., Bourdin, A., Chanez, P., Molinari, N., et al. (2017). Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth. *BMC Pulm. Med.* 17.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Haby, M.M., Anderson, S.D., Peat, J.K., Mellis, C.M., Toelle, B.G., and Woolcock, A.J. (1994). An exercise challenge protocol for epidemiological studies of asthma in children: comparison with histamine challenge. *Eur. Respir. J.* 7, 43–49.

Haldar, P., Pavord, I.D., Shaw, D.E., Berry, M.A., Thomas, M., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J., and Green, R.H. (2008). Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 218–224.

Halken, S., Larenas-Linnemann, D., Roberts, G., Calderón, M.A., Angier, E., Pfaar, O., Ryan, D., Agache, I., Ansotegui, I.J., Arasi, S., et al. (2017). EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Prevention of allergy. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 28, 728–745.

Hallstrand, T.S., Moody, M.W., Aitken, M.L., and Henderson, W.R. (2005). Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 586–593.

Hamelmann, E., Tateda, K., Oshiba, A., and Gelfand, E.W. (1999). Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model. *Allergy* 54, 297–305.

Hamelmann, E., Tateda, K., Oshiba, A., Gelfand, E.W., Gelfand, E.W., and Street, J. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness ± a murine model. 9.

Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 193–204.

Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M.A.M., Kool, M., Muskens, F., and Lambrecht, B.N. (2010). Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med.* *207*, 2097–2111.

Hanania, N.A., Noonan, M., Corren, J., Korenblat, P., Zheng, Y., Fischer, S.K., Cheu, M., Putnam, W.S., Murray, E., Scheerens, H., et al. (2015). Lebrikizumab in moderate-to-severe asthma: pooled data from two randomised placebo-controlled studies. *Thorax* *70*, 748–756.

Harrington, L.E., Mangan, P.R., and Weaver, C.T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 349–356.

Hartl, D., Koller, B., Mehlhorn, A.T., Reinhardt, D., Nicolai, T., Schendel, D.J., Griese, M., and Krauss-Etschmann, S. (2007). Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1258–1266.

Hawrylowicz, C.M. (2005). Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J. Exp. Med.* *202*, 1459–1463.

He, R., Oyoshi, M.K., Jin, H., and Geha, R.S. (2007). Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15817–15822.

Heialy, S.A., Zeroual, M., Farahnak, S., McGovern, T., Risse, P.-A., Novali, M., Lauzon, A.-M., Roman, H.N., and Martin, J.G. (2015). Nanotubes Connect CD4+ T Cells to Airway Smooth Muscle Cells: Novel Mechanism of T Cell Survival. *J. Immunol.* *194*, 5626–5634.

Henry, E., Desmet, C.J., Garzé, V., Fiévez, L., Bedoret, D., Heirman, C., Faisca, P., Jaspar, F.J., Gosset, P., Jacquet, A.P.A., et al. (2008). Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 7230–7242.

Hill, S.J. (1990). Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol. Rev.* *42*, 45–83.

Hirota, N., and Martin, J.G. (2013). Mechanisms of airway remodeling. *Chest* *144*, 1026–1032.  
Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* *18*, 673–683.

Hollins, F., Kaur, D., Yang, W., Cruse, G., Saunders, R., Sutcliffe, A., Berger, P., Ito, A., Brightling, C.E., and Bradding, P. (2008). Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2772–2780.

Holmes, A.M., Solari, R., and Holgate, S.T. (2011). Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discov. Today* *16*, 659–670.

Holt, P.G., Strickland, D.H., Hales, B.J., and Sly, P.D. (2014). Defective respiratory tract immune surveillance in asthma: a primary causal factor in disease onset and progression. *Chest* 145, 370–378.

Honda, K., and Littman, D.R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535, 75–84.

Huang, Y.J., and Boushey, H.A. (2015). The microbiome in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 25–30.

Huang, C.-D., Chen, H.-H., Wang, C.-H., Chou, C.-L., Lin, S.-M., Lin, H.-C., and Kuo, H.-P. (2004). Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation. *Life Sci.* 74, 2479–2492.

Huch, M., and Koo, B.-K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 142, 3113–3125.

Inoue, H., Kozawa, M., Milligan, K.L., Funakubo, M., Igarashi, A., and Loeffroth, E. (2019). A retrospective cohort study evaluating healthcare resource utilization in patients with asthma in Japan. *Npj Prim. Care Respir. Med.* 29, 13.

Irusen, E., Matthews, J.G., Takahashi, A., Barnes, P.J., Chung, K.F., and Adcock, I.M. (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 649–657.

Irvin, C., Zafar, I., Good, J., Rollins, D., Christianson, C., Gorska, M.M., Martin, R.J., and Alam, R. (2014). Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1175-1186.e7.

Isajevs, S., Taivans, I., Strazda, G., Kopeika, U., Bukovskis, M., Gordjusina, V., and Kratovska, A. (2009). Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur. Respir. J.* 33, 61–67.

Ito, K., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6891–6903.

Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., et al. (2002). NOD/SCID/ $\gamma$ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175–3182.

Ito, R., Takahashi, T., Katano, I., Kawai, K., Kamisako, T., Ogura, T., Ida-Tanaka, M., Suemizu, H., Nunomura, S., Ra, C., et al. (2013). Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF–Transgenic NOG Mice. *J. Immunol.* 191, 2890–2899.

Ito, R., Maruoka, S., Soda, K., Katano, I., Kawai, K., Yagoto, M., Hanazawa, A., Takahashi, T.,

Ogura, T., Goto, M., et al. (2018). A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. *JCI Insight* 3.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.-H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X.-F., Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2008). Two functional subsets of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28, 870–880.

Iwakura, Y., and Ishigame, H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 1218–1222.

Izuhara, K., Conway, S.J., Moore, B.B., Matsumoto, H., Holweg, C.T.J., Matthews, J.G., and Arron, J.R. (2016). Roles of Periostin in Respiratory Disorders. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 949–956.

Jackson, M. (2009). *Asthma: The Biography* (OUP Oxford).

Jatzlauk, G., Bartel, S., Heine, H., Schloter, M., and Krauss-Etschmann, S. (2017). Influences of environmental bacteria and their metabolites on allergies, asthma, and host microbiota. *Allergy* 72, 1859–1867.

Jeffery, P.K. (2004). Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 176–183.

Jeffery, P.K., Wardlaw, A.J., Nelson, F.C., Collins, J.V., and Kay, A.B. (1989). Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1745–1753.

Jia, G., Erickson, R.W., Choy, D.F., Mosesova, S., Wu, L.C., Solberg, O.D., Shikotra, A., Carter, R., Audusseau, S., Hamid, Q., et al. (2012). Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 647-654.e10.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294.

Jung, P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., et al. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat. Med.* 17, 1225–1227.

Juniper, E.F., Kline, P.A., Vanzielegem, M.A., Ramsdale, E.H., O’Byrne, P.M., and Hargreave, F.E. (1990). Long-term effects of budesonide on airway responsiveness and clinical asthma severity in inhaled steroid-dependent asthmatics. *Eur. Respir. J.* 3, 1122–1127.

Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczy, M., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2003). IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 33, 1205–1214.

Jutel, M., Rudert, M., Kreimendahl, F., and Kuna, P. (2018). Efficacy and tolerability of a house dust mite allergoid in allergic bronchial asthma: a randomized dose-ranging trial. *Immunotherapy* 10, 1149–1161.

Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2 $\alpha$  expression on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32, 91–103.

Kasaian, M.T., Marquette, K., Fish, S., DeClercq, C., Agostinelli, R., Cook, T.A., Brennan, A., Lee, J., Fitz, L., Brooks, J., et al. (2013). An IL-4/IL-13 dual antagonist reduces lung inflammation, airway hyperresponsiveness, and IgE production in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 37–46.

Kearley, J., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. (2008). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 617–624.e6.

Keating, G.M. (2015). Mepolizumab: First Global Approval. *Drugs* 75, 2163–2169.

Ketchell, R.I., Jensen, M.W., Lumley, P., Wright, A.M., Allenby, M.I., and O’connor, B.J. (2002). Rapid effect of inhaled fluticasone propionate on airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in mild asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 603–606.

Kevans, D., Murthy, S., Mould, D.R., and Silverberg, M.S. (2018). Accelerated Clearance of Infliximab is Associated With Treatment Failure in Patients With Corticosteroid-Refractory Acute Ulcerative Colitis. *J. Crohns Colitis* 12, 662–669.

Kim, B.E., and Leung, D.Y.M. (2018). Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 10, 207–215.

King, M., Pearson, T., Shultz, L.D., Leif, J., Bottino, R., Trucco, M., Atkinson, M.A., Wasserfall, C., Herold, K.C., Woodland, R.T., et al. (2008). A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 126, 303–314.

Klein, M., Dijoux, E., Dilasser, F., Hassoun, D., Moui, A., Loirand, G., Colas, L., Magnan, A., Sauzeau, V., and Bouchaud, G. (2019). Nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l’asthme. *Presse Médicale* 48, 255–261.

Knolle, M.D., Rana, B.M., and McKenzie, A.N.J. (2015). IL-25 as a potential therapeutic target in allergic asthma. *Immunotherapy* 7, 607–610.

Knowles, M.R., and Boucher, R.C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 109, 571–577.

Knudsen, T.B., Thomsen, S.F., Nolte, H., and Backer, V. (2009). A Population-based Clinical Study of Allergic and Non-allergic Asthma. *J. Asthma* 46, 91–94.

Koike, M., Nakamura, K., Furuya, A., Iida, A., Anazawa, H., Takatsu, K., and Hanai, N. (2009). Establishment of humanized anti-interleukin-5 receptor alpha chain monoclonal antibodies having a potent neutralizing activity. *Hum. Antibodies* *18*, 17–27.

Kool, M., Pétrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, I.M., Castillo, R., Lambrecht, B.N., and Tschopp, J. (2008). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3755–3759.

Kouro, T., and Takatsu, K. (2009). IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int. Immunol.* *21*, 1303–1309.

Krieg, C., Letourneau, S., Pantaleo, G., and Boyman, O. (2010). Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11906–11911.

Kumar, R.K., Herbert, C., and Foster, P.S. (2008). The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr. Drug Targets* *9*, 485–494.

Kumar, R.K., Herbert, C., and Foster, P.S. (2016). Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. *Respirol. Carlton Vic* *21*, 842–849.

Kuroda, E., Ishii, K.J., Uematsu, S., Ohata, K., Coban, C., Akira, S., Aritake, K., Urade, Y., and Morimoto, Y. (2011). Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* *34*, 514–526.

Lai, C.K.W., Beasley, R., Crane, J., Foliaki, S., Shah, J., Weiland, S., and the ISAAC Phase Three Study Group (2009). Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* *64*, 476–483.

Lajoie, S., Lewkowich, I.P., Suzuki, Y., Clark, J.R., Sproles, A.A., Dienger, K., Budelsky, A.L., and Wills-Karp, M. (2010). Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat. Immunol.* *11*, 928–935.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2003). Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 994–1003.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* *16*, 45–56.

Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* *345*, 1247125.

Langley, R.G., Elewski, B.E., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C.E.M., Papp, K., Puig, L.,

Nakagawa, H., Spelman, L., Sigurgeirsson, B., et al. (2014). Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N. Engl. J. Med.* *371*, 326–338.

Laviolette, M., Gossage, D.L., Gauvreau, G., Leigh, R., Olivenstein, R., Katial, R., Busse, W.W., Wenzel, S., Wu, Y., Datta, V., et al. (2013). Effects of benralizumab on airway eosinophils in asthmatic patients with sputum eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 1086-1096.e5.

Lazaar, A.L., Albelda, S.M., Pilewski, J.M., Brennan, B., Puré, E., and Panettieri, R.A. (1994). T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J. Exp. Med.* *180*, 807–816.

Legrand, N., Weijer, K., and Spits, H. (2008). Experimental model for the study of the human immune system: production and monitoring of “human immune system” Rag2-/-gamma c-/- mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *415*, 65–82.

Lepus, C.M., Gibson, T.F., Gerber, S.A., Kawikova, I., Szczepanik, M., Hossain, J., Ablamunits, V., Kirkiles-Smith, N., Herold, K.C., Donis, R.O., et al. (2009). Comparison of Human Fetal Liver, Umbilical Cord Blood, and Adult Blood Hematopoietic Stem Cell Engraftment in NOD-scid/γc-/-, Balb/c-Rag1-/-γc-/-, and C.B-17-scid/bg Immunodeficient Mice. *Hum. Immunol.* *70*, 790–802.

Letourneau, S., van Leeuwen, E.M.M., Krieg, C., Martin, C., Pantaleo, G., Sprent, J., Surh, C.D., and Boyman, O. (2010). IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor subunit CD25. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 2171–2176.

Lewkowich, I.P., Herman, N.S., Schleifer, K.W., Dance, M.P., Chen, B.L., Dienger, K.M., Sproles, A.A., Shah, J.S., Köhl, J., Belkaid, Y., et al. (2005). CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J. Exp. Med.* *202*, 1549–1561.

Li, X., Yang, A., Huang, H., Zhang, X., Town, J., Davis, B., Cockcroft, D.W., and Gordon, J.R. (2010). Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *42*, 190–199.

Liem, J.J., Kozyrskyj, A.L., Cockcroft, D.W., and Becker, A.B. (2008). Diagnosing asthma in children: what is the role for methacholine bronchoprovocation testing? *Pediatr. Pulmonol.* *43*, 481–489.

Liesker, J.J.W., Ten Hacken, N.H., Zeinstra-Smith, M., Rutgers, S.R., Postma, D.S., and Timens, W. (2009). Reticular basement membrane in asthma and COPD: similar thickness, yet different composition. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *4*, 127–135.

Linden, A., Hoshino, H., and Laan, M. (2000). Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur. Respir. J.* *15*, 973–977.

Lindqvist, C.A., Christiansson, L.H., Simonsson, B., Enblad, G., Olsson-Strömberg, U., and Loskog, A.S.I. (2010). T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of

soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology* 131, 371–376.

Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., and Robinson, D.S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *The Lancet* 363, 608–615.

Lipworth, B.J., Short, P.M., Williamson, P.A., Clearie, K.L., Fardon, T.C., and Jackson, C.M. (2012). A randomized primary care trial of steroid titration against mannitol in persistent asthma: STAMINA trial. *Chest* 141, 607–615.

Litt, M. (1970). Mucus Rheology: Relevance to Mucociliary Clearance. *Arch. Intern. Med.* 126, 417–423.

Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.

Lloyd, C.M., Gonzalo, J.-A., Coyle, A.J., and Gutierrez-Ramos, J.-C. (2001). Mouse models of allergic airway disease. In *Advances in Immunology*, (Academic Press), pp. 263–295.

Lockridge, J.L., Zhou, Y., Becker, Y.A., Ma, S., Kenney, S.C., Hematti, P., Capitini, C.M., Burlingham, W.J., Gendron-Fitzpatrick, A., and Gumperz, J.E. (2013). Mice engrafted with human fetal thymic tissue and hematopoietic stem cells develop pathology resembling chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 19, 1310–1322.

van der Loo, J.C., Hanenberg, H., Cooper, R.J., Luo, F.Y., Lazaridis, E.N., and Williams, D.A. (1998). Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells. *Blood* 92, 2556–2570.

Lötvall, J., Akdis, C.A., Bacharier, L.B., Bjermer, L., Casale, T.B., Custovic, A., Lemanske, R.F., Wardlaw, A.J., Wenzel, S.E., and Greenberger, P.A. (2011). Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 355–360.

Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Chensue, S.W., and Kunkel, S.L. (1994). Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 526–532.

Lynch, S.V., and Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2369–2379.

Ma'ayan, A. (2017). Complex systems biology. *J. R. Soc. Interface* 14.

MacGlashan, D. (2008). IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 717–723.

MacGlashan, D.W., Bochner, B.S., Adelman, D.C., Jardieu, P.M., Togias, A., McKenzie-White, J., Sterbinsky, S.A., Hamilton, R.G., and Lichtenstein, L.M. (1997). Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 1438–1445.

Macklin, C.C. (1929). The musculature of the bronchi and lungs. *Physiol. Rev.* *9*, 1–60.

Magnan, A., and Blanc, F.-X. (2013). Médecine personnalisée dans l'asthme : c'est maintenant. *Rev. Mal. Respir.* *30*, 601–604.

Mak, J.C., Nishikawa, M., Shirasaki, H., Miyayasu, K., and Barnes, P.J. (1995). Protective effects of a glucocorticoid on downregulation of pulmonary beta 2-adrenergic receptors in vivo. *J. Clin. Invest.* *96*, 99–106.

Mak, J.C.W., Chuang, T.T., Harris, C.A., and Barnes, P.J. (2002). Increased expression of G protein-coupled receptor kinases in cystic fibrosis lung. *Eur. J. Pharmacol.* *436*, 165–172.

Malek, T.R., and Castro, I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* *33*, 153–165.

Mamessier, E., Nieves, A., Lorec, A.-M., Dupuy, P., Pinot, D., Pinet, C., Vervloet, D., and Magnan, A. (2008). T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy* *63*, 1202–1210.

Manni, M.L., Robinson, K.M., and Alcorn, J.F. (2014). A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. *Expert Rev. Respir. Med.* *8*, 25–42.

Manni, M.L., Mandalapu, S., McHugh, K.J., Elloso, M.M., Dudas, P.L., and Alcorn, J.F. (2016). Molecular Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in a Murine Model of Steroid-Resistant Airway Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *196*, 963–977.

Manz, M.G., and Di Santo, J.P. (2009). Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. *Nat. Immunol.* *10*, 1039–1042.

Martínez-Rivera, C., Crespo, A., Pinedo-Sierra, C., García-Rivero, J.L., Pallarés-Sanmartín, A., Marina-Malanda, N., Pascual-Erquicia, S., Padilla, A., Mayoralas-Alises, S., Plaza, V., et al. (2018). Mucus hypersecretion in asthma is associated with rhinosinusitis, polyps and exacerbations. *Respir. Med.* *135*, 22–28.

Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., and Beasley, R. (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* *59*, 469–478.

Matthews, J.G., Ito, K., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2004). Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* *113*, 1100–1108.

May, R.D., Monk, P.D., Cohen, E.S., Manuel, D., Dempsey, F., Davis, N.H.E., Dodd, A.J., Corkill,

D.J., Woods, J., Joberty-Candotti, C., et al. (2012). Preclinical development of CAT-354, an IL-13 neutralizing antibody, for the treatment of severe uncontrolled asthma. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 177–193.

McCreanor, J., Cullinan, P., Nieuwenhuijsen, M.J., Stewart-Evans, J., Malliarou, E., Jarup, L., Harrington, R., Svartengren, M., Han, I.-K., Ohman-Strickland, P., et al. (2007). Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N. Engl. J. Med.* *357*, 2348–2358.

McDermott, D.F., and Atkins, M.B. (2004). Application of IL-2 and other cytokines in renal cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* *4*, 455–468.

McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* *8*, 1390–1397.

McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H.J., and Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 100–113.

Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* *63*, 1455–1463.

Meyer, C.H., Bond, J.F., Chen, M.-S., and Kasaian, M.T. (1994). Comparison of the levels of the major allergens Der p I and Der p II in standardized extracts of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin. Exp. Allergy* *24*, 1041–1048.

Mitzner, W. (2004). Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *169*, 787–790.

Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Pagé, N., Olivenstein, R., Elias, J., and Chakir, J. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* *108*, 430–438.

Montefort, S., Roberts, J.A., Beasley, R., Holgate, S.T., and Roche, W.R. (1992). The site of disruption of the bronchial epithelium in asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* *47*, 499–503.

Morcillo, E.J., and Cortijo, J. (2006). Mucus and MUC in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* *12*, 1–6.

Moreno Benítez, F., Espinazo Romeu, M., Letrán Camacho, A., Mas, S., García-Cózar, F.J., and Tabar, A.I. (2015). Variation in allergen content in sublingual allergen immunotherapy with house dust mites. *Allergy* *70*, 1413–1420.

Mosbech, H., Deckelmann, R., de Blay, F., Pastorello, E.A., Trebas-Pietras, E., Andres, L.P., Malcus, I., Ljørring, C., and Canonica, G.W. (2014). Standardized quality (SQ) house dust mite sublingual immunotherapy tablet (ALK) reduces inhaled corticosteroid use while maintaining asthma control: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 568-575.e7.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *136*, 2348–2357.

Munkholm, M., and Mortensen, J. (2014). Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* *34*, 171–177.

Nadeau, K., McDonald-Hyman, C., Noth, E.M., Pratt, B., Hammond, S.K., Balmes, J., and Tager, I. (2010). Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 845-852.e10.

Nelson, H.S., Weiss, S.T., Bleecker, E.R., Yancey, S.W., Dorinsky, P.M., and SMART Study Group (2006). The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest* *129*, 15–26.

Nguyen, K.D., Vanichsarn, C., and Nadeau, K.C. (2010). TSLP directly impairs pulmonary Treg function: association with aberrant tolerogenic immunity in asthmatic airway. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *6*, 4.

Nightingale, J.A., Rogers, D.F., and Barnes, P.J. (1999). Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* *54*, 1061–1069.

Nolte, H., Maloney, J., Nelson, H.S., Bernstein, D.I., Lu, S., Li, Z., Kaur, A., Ziegelmayer, P., Ziegelmayer, R., Lemell, P., et al. (2015). Onset and dose-related efficacy of house dust mite sublingual immunotherapy tablets in an environmental exposure chamber. *J. Allergy Clin. Immunol.* *135*, 1494-1501.e6.

Noon, L. (1911). PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. *The Lancet* *177*, 1572–1573.

Noonan, M., Korenblat, P., Mosesova, S., Scheerens, H., Arron, J.R., Zheng, Y., Putnam, W.S., Parsey, M.V., Bohlen, S.P., and Matthews, J.G. (2013). Dose-ranging study of lebrikizumab in asthmatic patients not receiving inhaled steroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 567-574.e12.

Ntontsi, P., Loukides, S., Bakakos, P., Kostikas, K., Papatheodorou, G., Papathanassiou, E., Hillas, G., Koulouris, N., Papiris, S., and Papaioannou, A.I. (2017). Clinical, functional and inflammatory characteristics in patients with paucigranulocytic stable asthma: Comparison with different sputum phenotypes. *Allergy* *72*, 1761–1767.

Nunes, C., Pereira, A.M., and Morais-Almeida, M. (2017). Asthma costs and social impact. *Asthma Res. Pract.* *3*.

Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., and Lefrançois, L. (2010). CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 193–198.

O'Brien, R., Ooi, M.A., Clarke, A.H., and Thomas, W.R. (1996). Immunologic responses following respiratory sensitization to house dust mite allergens in mice. *Immunol. Cell Biol.* *74*, 174–179.

O'Byrne, P.M., Pedersen, S., Busse, W.W., Tan, W.C., Chen, Y.-Z., Ohlsson, S.V., Ullman, A., Lamm, C.J., Pauwels, R.A., and START Investigators Group (2006). Effects of early intervention with inhaled budesonide on lung function in newly diagnosed asthma. *Chest* *129*, 1478–1485.

O'Byrne, P.M., Gauvreau, G.M., and Brannan, J.D. (2009). Provoked models of asthma: what have we learnt? *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *39*, 181–192.

Oda, N., Canelos, P.B., Essayan, D.M., Plunkett, B.A., Myers, A.C., and Huang, S.-K. (2005). Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 12–18.

O'Hickey, S.P., Arm, J.P., Rees, P.J., Spur, B.W., and Lee, T.H. (1988). The relative responsiveness to inhaled leukotriene E<sub>4</sub>, methacholine and histamine in normal and asthmatic subjects. *Eur. Respir. J.* *1*, 913–917.

Oliver, J.M., Tarleton, C.A., Gilmartin, L., Archibeque, T., Qualls, C.R., Diehl, L., Wilson, B.S., and Schuyler, M. (2010). Reduced FcεRI-mediated release of asthma-promoting cytokines and chemokines from human basophils during omalizumab therapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *151*, 275–284.

Ortega, V.E., and Peters, S.P. (2010). Beta-2 adrenergic agonists: focus on safety and benefits versus risks. *Curr. Opin. Pharmacol.* *10*, 246–253.

Ortega, H.G., Liu, M.C., Pavord, I.D., Brusselle, G.G., FitzGerald, J.M., Chetta, A., Humbert, M., Katz, L.E., Keene, O.N., Yancey, S.W., et al. (2014). Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1198–1207.

Otis, A.B. (1983). A perspective of respiratory mechanics. *J. Appl. Physiol.* *54*, 1183–1187.

Pandya, H.C., Snetkov, V.A., Twort, C.H.C., Ward, J.P.T., and Hirst, S.J. (2002). Oxygen regulates mitogen-stimulated proliferation of fetal human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *283*, L1220-1230.

Panettieri, R.A., Goldie, R.G., Rigby, P.J., Eszterhas, A.J., and Hay, D.W. (1996). Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 191–197.

Panettieri, R.A., Sjöbring, U., Péterffy, A., Wessman, P., Bowen, K., Piper, E., Colice, G., and Brightling, C.E. (2018). Tralokinumab for severe, uncontrolled asthma (STRATOS 1 and STRATOS 2): two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 clinical trials. *Lancet Respir. Med.* *6*, 511–525.

Papp, K.A., Reich, K., Paul, C., Blauvelt, A., Baran, W., Bolduc, C., Toth, D., Langley, R.G., Cather, J., Gottlieb, A.B., et al. (2016). A prospective phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* *175*, 273–286.

Pauwels, R., Joos, G., and Van der Straeten, M. (1988). Bronchial hyperresponsiveness is not bronchial hyperresponsiveness is not bronchial asthma. *Clin. Allergy* *18*, 317–321.

Pavord, I.D., Korn, S., Howarth, P., Bleecker, E.R., Buhl, R., Keene, O.N., Ortega, H., and Chanez, P. (2012). Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 651–659.

Pearce, N., Pekkanen, J., and Beasley, R. (1999). How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* *54*, 268–272.

Pearson, T., Greiner, D.L., and Shultz, L.D. (2008). Creation of “humanized” mice to study human immunity. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 15*, Unit 15.21.

Penn, R.B. (2008). Embracing emerging paradigms of G protein-coupled receptor agonism and signaling to address airway smooth muscle pathobiology in asthma. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *378*, 149–169.

Penn, R.B., Pronin, A.N., and Benovic, J.L. (2000). Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc. Med.* *10*, 81–89.

Pepe, C., Foley, S., Shannon, J., Lemiere, C., Olivenstein, R., Ernst, P., Ludwig, M.S., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2005). Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 544–549.

Petersdorf, S.H., Kopecky, K.J., Slovak, M., Willman, C., Nevill, T., Brandwein, J., Larson, R.A., Erba, H.P., Stiff, P.J., Stuart, R.K., et al. (2013). A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* *121*, 4854–4860.

Pezzulo, A.A., Starner, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.-G., Crystal, R.G., McCray, P.B., and Zabner, J. (2011). The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *300*, L25-31.

Piper, E., Brightling, C., Niven, R., Oh, C., Faggioni, R., Poon, K., She, D., Kell, C., May, R.D., Geba, G.P., et al. (2013). A phase II placebo-controlled study of tralokinumab in moderate-to-severe asthma. *Eur. Respir. J.* *41*, 330–338.

Pitsios, C., Demoly, P., Bilò, M.B., Gerth van Wijk, R., Pfaar, O., Sturm, G.J., Rodriguez del Rio, P., Tsoumani, M., Gawlik, R., Paraskevopoulos, G., et al. (2015). Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy* *70*, 897–909.

PMC, E. (2017). Healthcare Access and Quality Index based on mortality from causes amenable to personal health care in 195 countries and territories, 1990-2015: a novel analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond. Engl.* *390*, 231–266.

Polanczyk, M.J., Hopke, C., Vandembark, A.A., and Offner, H. (2007). Treg suppressive activity involves estrogen-dependent expression of programmed death-1 (PD-1). *Int. Immunol.* *19*, 337–343.

Porsbjerg, C., Brannan, J.D., Anderson, S.D., and Backer, V. (2008). Relationship between airway responsiveness to mannitol and to methacholine and markers of airway inflammation, peak flow variability and quality of life in asthma patients. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *38*, 43–50.

Presta, L.G., Lahr, S.J., Shields, R.L., Porter, J.P., Gorman, C.M., Fendly, B.M., and Jardieu, P.M. (1993). Humanization of an antibody directed against IgE. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 2623–2632.

Prytherch, Z., Job, C., Marshall, H., Oreffo, V., Foster, M., and Bérubé, K. (2011). Tissue-Specific stem cell differentiation in an in vitro airway model. *Macromol. Biosci.* *11*, 1467–1477.

Rackemann, F.M. (1947). A working classification of asthma. *Am. J. Med.* *3*, 601–606.

Radulovic, S., Jacobson, M.R., Durham, S.R., and Nouri-Aria, K.T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* *121*, 1467-1472.e1.

Ramis, I., Otal, R., Carreño, C., Domènech, A., Eichhorn, P., Orellana, A., Maldonado, M., De Alba, J., Prats, N., Fernández, J.-C., et al. (2015). A novel inhaled Syk inhibitor blocks mast cell degranulation and early asthmatic response. *Pharmacol. Res.* *99*, 116–124.

Ramos-Barbón, D., Presley, J.F., Hamid, Q.A., Fixman, E.D., and Martin, J.G. (2005). Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J. Clin. Invest.* *115*, 1580–1589.

Ray, A., and Kolls, J.K. (2017). Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol.* *38*, 942–954.

Reisinger, J., Horak, F., Pauli, G., van Hage, M., Cromwell, O., König, F., Valenta, R., and Niederberger, V. (2005). Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 347–354.

Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1711–1723.

Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., and Kay, A.B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte

population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* 326, 298–304.

Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W.J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 480–490.

Rodríguez Del Río, P., Vidal, C., Just, J., Tabar, A.I., Sanchez-Machin, I., Eberle, P., Borja, J., Bubel, P., Pfaar, O., Demoly, P., et al. (2017). The European Survey on Adverse Systemic Reactions in Allergen Immunotherapy (EASSI): A paediatric assessment. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 28, 60–70.

Rogers, D.F. (2003a). The airway goblet cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1–6.

Rogers, D.F. (2003b). Pulmonary mucus: Pediatric perspective. *Pediatr. Pulmonol.* 36, 178–188.

Rogers, D.F. (2004). Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 241–250.

Rosenwasser, L.J., and Meng, J. (2005). Anti-CD23. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 29, 61–72.

Rosewich, M., Arendt, S., El Moussaoui, S., Schulze, J., Schubert, R., and Zielen, S. (2013). Bronchial allergen provocation: a useful method to assess the efficacy of specific immunotherapy in children. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 24, 434–440.

Rubin, L.A., and Nelson, D.L. (1990). The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann. Intern. Med.* 113, 619–627.

Sadatsafavi, M., Lynd, L., Marra, C., Carleton, B., Tan, W.C., Sullivan, S., and Fitzgerald, J.M. (2010). Direct health care costs associated with asthma in British Columbia. *Can. Respir. J.* 17, 74–80.

Salpeter, S.R., Buckley, N.S., Ormiston, T.M., and Salpeter, E.E. (2006). Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann. Intern. Med.* 144, 904–912.

Sato, J., Hamaguchi, N., Doken, K., Gotoh, K., Ootsu, K., Iwasa, S., Ogawa, Y., and Toguchi, H. (1993). Enhancement of anti-tumor activity of recombinant interleukin-2 (rIL-2) by immunocomplexing with a monoclonal antibody against rIL-2. *Biotherapy Dordr. Neth.* 6, 225–231.

Schäcke, H., Döcke, W.-D., and Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 23–43.

Scheffold, A., Murphy, K.M., and Höfer, T. (2007). Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat. Immunol.* 8, 1285–1287.

Schmidt, M.R., Appel, M.C., Giassi, L.J., Greiner, D.L., Shultz, L.D., and Woodland, R.T. (2008). Human BlyS facilitates engraftment of human PBL derived B cells in immunodeficient mice. *PLoS One* 3, e3192.

Schroeder, J.T., Bieneman, A.P., Chichester, K.L., Hamilton, R.G., Xiao, H., Saini, S.S., and Liu, M.C. (2010). Decreases in human dendritic cell-dependent T(H)2-like responses after acute in vivo IgE neutralization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 896-901.e6.

Schuijs, M.J., Willart, M.A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M.J., Madeira, F.B., Beyaert, R., van Loo, G., Bracher, F., et al. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* 349, 1106–1110.

Scott, H.A., Gibson, P.G., Garg, M.L., and Wood, L.G. (2011). Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. *Eur. Respir. J.* 38, 594–602.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723–735.

Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., Cicora, L., Ludwig, M., Hamid, Q., and Martin, J.G. (2008). Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest* 133, 420–426.

Shi, H.Z., Sun, J.J., Pan, H.L., Lu, J.Q., Zhang, J.L., and Jiang, J.D. (1999). Alterations of T-lymphocyte subsets, soluble IL-2 receptor, and IgE in peripheral blood of children with acute asthma attacks. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 388–394.

Shin, Y.S., Takeda, K., and Gelfand, E.W. (2009). Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 1, 10–18.

Shirley, M. (2017). Dupilumab: First Global Approval. *Drugs* 77, 1115–1121.

Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6477–6489.

Sidebotham, H.J., and Roche, W.R. (2003). Asthma deaths; persistent and preventable mortality. *Histopathology* 43, 105–117.

Slager, R.E., Otulana, B.A., Hawkins, G.A., Yen, Y.P., Peters, S.P., Wenzel, S.E., Meyers, D.A., and Bleecker, E.R. (2012). IL-4 receptor polymorphisms predict reduction in asthma exacerbations during response to an anti-IL-4 receptor  $\alpha$  antagonist. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 516-522.e4.

Smith, P.G., Janiga, K.E., and Bruce, M.C. (1994). Strain increases airway smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 85–90.

Smyth, L.J.C., Eustace, A., Kolsum, U., Blaikely, J., and Singh, D. (2010). Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest* 138, 905–912.

Sont, J.K., Willems, L.N., Bel, E.H., van Krieken, J.H., Vandenbroucke, J.P., and Sterk, P.J. (1999). Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1043–1051.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149.

Sumino, K., Sugar, E.A., Irvin, C.G., Kaminsky, D.A., Shade, D., Wei, C.Y., Holbrook, J.T., Wise, R.A., Castro, M., and American Lung Association Asthma Clinical Research Centers (2012). Methacholine challenge test: diagnostic characteristics in asthmatic patients receiving controller medications. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 69-75.e6.

Swain, S.L., McKenzie, D.T., Weinberg, A.D., and Hancock, W. (1988). Characterization of T helper 1 and 2 cell subsets in normal mice. Helper T cells responsible for IL-4 and IL-5 production are present as precursors that require priming before they develop into lymphokine-secreting cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 141, 3445–3455.

Sze, E., Bhalla, A., and Nair, P. (2019). Mechanisms and therapeutic strategies for non-T2 asthma. *Allergy*.

Taams, L.S., van Amelsfort, J.M.R., Tiemessen, M.M., Jacobs, K.M.G., de Jong, E.C., Akbar, A.N., Bijlsma, J.W.J., and Lafeber, F.P.J.G. (2005). Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 66, 222–230.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481–484.

Takeda, K., Hamelmann, E., Joetham, A., Shultz, L.D., Larsen, G.L., Irvin, C.G., and Gelfand, E.W. (1997). Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 186, 449–454.

Tam, A., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S.F.P., and Sin, D.D. (2011). The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 5, 255–273.

Tan, D.B.A., Fernandez, S., Price, P., French, M.A., Thompson, P.J., and Moodley, Y.P. (2014). Impaired function of regulatory T-cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Immunobiology* 219, 975–979.

Taniguchi, T., and Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73, 5–8.

Tao, T., Lan, J., Lukacs, G.L., Haché, R.J.G., and Kaplan, F. (2006). Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 668–680.

Taylor, A., Akdis, M., Joss, A., Akkoç, T., Wenig, R., Colonna, M., Daigle, I., Flory, E., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2007). IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 76–83.

Thomson, N.C., and Spears, M. (2005). The influence of smoking on the treatment response in patients with asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5, 57–63.

To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A.S., Bateman, E.D., Cruz, A.A., and Boulet, L.-P. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* 12.

Tran, T.N., Zeiger, R.S., Peters, S.P., Colice, G., Newbold, P., Goldman, M., and Chipps, B.E. (2016). Overlap of atopic, eosinophilic, and TH2-high asthma phenotypes in a general population with current asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 116, 37–42.

Triani, T., Allard, B., Dupin, I., Carvalho, G., Ousova, O., Maurat, E., Bataille, J., Thumerel, M., Begueret, H., Girodet, P.-O., et al. (2015). House dust mites induce proliferation of severe asthmatic smooth muscle cells via an epithelium-dependent pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 538–546.

Turton, J.A., Glasgow, N.J., and Brannan, J.D. (2012). Feasibility and acceptability of using bronchial hyperresponsiveness to manage asthma in primary care: a pilot study. *Prim. Care Respir. J. J. Gen. Pract. Airw. Group* 21, 28–34.

Uermösi, C., Beerli, R.R., Bauer, M., Manolova, V., Dietmeier, K., Buser, R.B., Kündig, T.M., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2010). Mechanisms of allergen-specific desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 375–383.

Ultsch, M., Bevers, J., Nakamura, G., Vandlen, R., Kelley, R.F., Wu, L.C., and Eigenbrot, C. (2013). Structural basis of signaling blockade by anti-IL-13 antibody Lebrikizumab. *J. Mol. Biol.* 425, 1330–1339.

Undem, B.J., McAlexander, M., and Hunter, D.D. (1999). Neurobiology of the upper and lower airways. *Allergy* 54 Suppl 57, 81–93.

Usmani, O.S., Ito, K., Maneechotesuwan, K., Ito, M., Johnson, M., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2005). Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 704–712.

Van Schoor, J., Joos, G.F., and Pauwels, R.A. (2000). Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology and implications for clinical research. *Eur. Respir. J.* 16,

514–533.

Van Schoor, J., Pauwels, R., and Joos, G. (2005). Indirect bronchial hyper-responsiveness: the coming of age of a specific group of bronchial challenges. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *35*, 250–261.

Vazquez-Tello, A., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., Leung, D.Y., Eidelman, D.H., and Hamid, Q. (2010). Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *40*, 1312–1322.

Vazquez-Tello, A., Halwani, R., Hamid, Q., and Al-Muhsen, S. (2013). Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells. *J. Clin. Immunol.* *33*, 466–478.

Virchow, J.C., Backer, V., Kuna, P., Prieto, L., Nolte, H., Villesen, H.H., Ljørring, C., Riis, B., and de Blay, F. (2016). Efficacy of a House Dust Mite Sublingual Allergen Immunotherapy Tablet in Adults With Allergic Asthma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* *315*, 1715–1725.

Vrugt, B., Wilson, S., Bron, A., Holgate, S.T., Djukanovic, R., and Aalbers, R. (2000). Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur. Respir. J.* *15*, 1014–1021.

de Waal Malefyt, R., Figdor, C.G., Huijbens, R., Mohan-Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J., Dang, W., Zurawski, G., and de Vries, J.E. (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 6370–6381.

Wachholz, P.A., and Durham, S.R. (2004). Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *4*, 313–318.

Walker, B.L., and Leigh, R. (2008). Use of biologicals as immunotherapy in asthma and related diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *4*, 743–756.

Walker, J.K.L., Kraft, M., and Fisher, J.T. (2013). Assessment of murine lung mechanics outcome measures: alignment with those made in asthmatics. *Front. Physiol.* *3*.

Wang, F., He, X.Y., Baines, K.J., Gunawardhana, L.P., Simpson, J.L., Li, F., and Gibson, P.G. (2011). Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur. Respir. J.* *38*, 567–574.

Wang, H., Lin, X., Hao, C., Zhang, C., Sun, B., Zheng, J., Chen, P., Sheng, J., Wu, A., and Zhong, N. (2006). A double-blind, placebo-controlled study of house dust mite immunotherapy in Chinese asthmatic patients. *Allergy* *61*, 191–197.

Wang, L., Yin, J., Fadel, R., Montagut, A., de Beaumont, O., and Devillier, P. (2014). House dust mite sublingual immunotherapy is safe and appears to be effective in moderate, persistent asthma. *Allergy* *69*, 1181–1188.

Wang, S.-S., Tang, Y.-L., Pang, X., Zheng, M., Tang, Y.-J., and Liang, X.-H. (2019). The maintenance of an oral epithelial barrier. *Life Sci.* 227, 129–136.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677–688.

Webster, K.E., Walters, S., Kohler, R.E., Mrkvan, T., Boyman, O., Surh, C.D., Grey, S.T., and Sprent, J. (2009). In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J. Exp. Med.* 206, 751–760.

Weitnauer, M., Mijošek, V., and Dalpke, A.H. (2016). Control of local immunity by airway epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 9, 287–298.

Wenzel, S.E. (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet Lond. Engl.* 368, 804–813.

Wenzel, S.E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 18, 716–725.

Wenzel, S., Wilbraham, D., Fuller, R., Getz, E.B., and Longphre, M. (2007). Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet Lond. Engl.* 370, 1422–1431.

Wenzel, S., Ford, L., Pearlman, D., Spector, S., Sher, L., Skobieranda, F., Wang, L., Kirkesseli, S., Rocklin, R., Bock, B., et al. (2013). Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N. Engl. J. Med.* 368, 2455–2466.

Wenzel, S., Castro, M., Corren, J., Maspero, J., Wang, L., Zhang, B., Pirozzi, G., Sutherland, E.R., Evans, R.R., Joish, V.N., et al. (2016). Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting  $\beta_2$  agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. *Lancet Lond. Engl.* 388, 31–44.

Wenzel, S.E., Schwartz, L.B., Langmack, E.L., Halliday, J.L., Trudeau, J.B., Gibbs, R.L., and Chu, H.W. (1999). Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1001–1008.

Wenzel, S.E., Balzar, S., Cundall, M., and Chu, H.W. (2003). Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 1345–1352.

Willart, M.A.M., Deswarte, K., Pouliot, P., Braun, H., Beyaert, R., Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J. Exp. Med.* 209, 1505–1517.

Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., and Donaldson, D.D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258–2261.

Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C.L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 69–75.

Woodruff, P.G., Dolganov, G.M., Ferrando, R.E., Donnelly, S., Hays, S.R., Solberg, O.D., Carter, R., Wong, H.H., Cadbury, P.S., and Fahy, J.V. (2004). Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 1001–1006.

Wright, D., Sharma, P., Ryu, M.-H., Rissé, P.-A., Ngo, M., Maarsingh, H., Koziol-White, C., Jha, A., Halayko, A.J., and West, A.R. (2013). Models to study airway smooth muscle contraction in vivo, ex vivo and in vitro: implications in understanding asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 26, 24–36.

Wu, R., Sato, G.H., and Whitcutt, M.J. (1986). Developing Differentiated Epithelial Cell Cultures: Airway Epithelial Cells. *Toxicol. Sci.* 6, 580–590.

Wuest, S.C., Edwan, J.H., Martin, J.F., Han, S., Perry, J.S.A., Cartagena, C.M., Matsuura, E., Maric, D., Waldmann, T.A., and Bielekova, B. (2011). A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat. Med.* 17, 604–609.

Wunderlich, M., Chou, F.-S., Link, K.A., Mizukawa, B., Perry, R.L., Carroll, M., and Mulloy, J.C. (2010). AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia* 24, 1785–1788.

Xystrakis, E., Kusumakar, S., Boswell, S., Peek, E., Urry, Z., Richards, D.F., Adikibi, T., Pridgeon, C., Dallman, M., Loke, T.-K., et al. (2006). Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J. Clin. Invest.* 116, 146–155.

Yamanaka, S. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* 10, 678–684.

Yang, Z.-Z., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Manske, M.K., Witzig, T.E., Novak, A.J., and Ansell, S.M. (2011). Soluble IL-2R $\alpha$  facilitates IL-2-mediated immune responses and predicts reduced survival in follicular B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 118, 2809–2820.

van der Zee, J.S., van Swieten, P., Jansen, H.M., and Aalberse, R.C. (1988). Skin tests and histamine release with P1-depleted Dermatophagoides pteronyssinus body extracts and purified P1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81, 884–896.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596.

Zielen, S., Kardos, P., and Madonini, E. (2010). Steroid-sparing effects with allergen-specific immunotherapy in children with asthma: a randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 942–949.

Zosky, G.R., and Sly, P.D. (2007). Animal models of asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *37*, 973–988.

Zou, H., Fang, Q.-H., Ma, Y.-M., and Wang, X.-Y. (2014). Analysis of growth factors in serum and induced sputum from patients with asthma. *Exp. Ther. Med.* *8*, 573–578.

(2013). *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity* (Springer Basel).

---

**Titre :** Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'asthme.

**Mots clés :** asthme, allergie, immunothérapie, modèle animal, Treg, peptide

**Résumé :** Aujourd'hui, l'asthme est une des maladies inflammatoires chroniques la plus répandue dans le monde. Cette pathologie s'exprime au travers de différents phénotypes et endotypes, évoluant au cours de la vie des patients. La majorité des traitements actuels ciblent des asthmes de phénotype Th2 or aucun traitement n'es actuellement disponible pour les pour les patients asthmatiques non-Th2. Bien que ces patients représentent 5 à 10% des asthmatiques sévères, ils représentent à eux seuls plus de 50% des coûts liés à l'asthme. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour ces patients. A l'aide d'un modèle murin mimant l'asthme allergique aux acariens, nous avons évalué l'effet de deux approches thérapeutiques visant à rétablir la tolérance immune faisant défaut dans l'asthme.

L'utilisation d'un peptide déviré de l'allergène *Dermatophagoides pteronyssinus* et d'un complexe cytokine/anti-cytokine permettent de réduire l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation innée et adaptative, notamment les réponses Th2 et Th17. Cette diminution des caractéristiques de l'asthme est associée à une augmentation de lymphocytes T régulateurs et de cellules dendritiques tolérogènes induites par ces traitements. Ainsi, nos résultats montrent que le rétablissement de la tolérance est un des points clé dans l'élaboration de nouveaux traitements dans l'asthme, et ce quel que soit le phénotype.

---

**Title:** Development of new therapeutic strategies in asthma.

**Keywords:** asthma, allergy, immunotherapy, animal model, Treg, peptide

**Abstract:** Asthma is one of the most frequent chronic inflammatory disease in the world. This pathology evolves through le patient's life and expresses different phenotype and endotype. Most of asthma treatments are focused on the Th2 phenotype but there are no efficient treatments for the non Th2 phenotype. Even though non th2 patients only represent 5 to 10% of severe asthma, they are responsible for more 50% of asthma related costs. Thus, it is necessary to develop new therapeutic strategies for them. Thanks to a mouse model of HDM-induced asthma we analyzed the efficacy of two treatments designed to reestablish the defect of immune tolerance in asthma.

The use of a *Dermatophagoides pteronyssinus*-derived peptide and a cytokines/anti-cytokines complex allow us to decrease airway hyperresponsiveness and innate and adaptive immunity, especially the Th2 and Th17 responses. This decrease of asthma features is associated to an increase of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells. Our results prove the great importance that the tolerance reestablishment is a key stone for design of new treatment in asthma regardless the asthma phenotype.