

Université de Lille – Ecole Doctorale Biologie Santé

THESE

Pour obtenir le diplôme de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Discipline : IMMUNOLOGIE

Présenté par
Mélodie Bouté

Sur le thème

Etude des mécanismes impliqués dans le remodelage bronchique dans un modèle expérimental d'asthme sévère d'endotype Th2/Th17

Soutenue publiquement le 18 septembre 2020 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe BONNIAUD **Président**
Service de Pneumologie, Hôpital François Mitterrand, Dijon

Madame le Professeur Dieudonnée TOGBE **Rapporteur**
Centre d'Immunologie Neurogénétique Expérimentale et Moléculaire, Orléans

Monsieur le Docteur Thomas TRIAN **Rapporteur**
Centre de Recherche Cardio-Thoracique, Bordeaux

Madame le Docteur Stéphanie FRY **Examineur**
Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Hôpital Calmette, Lille
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 13, Lille

Madame la Professeure Cécile CHENIVESSE **Co-Directeur**
Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Hôpital Calmette, Lille
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 13, Lille

Madame le Docteur Anne TSICOPOULOS **Co-Directeur**
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 13, Lille

**CENTRE D'INFECTION ET D'IMMUNITE DE LILLE, INSERM U1019, CNRS UMR 9017,
UNIVERSITE DE LILLE NORD DE FRANCE, INSTITUT PASTEUR DE LILLE, EQUIPE 13
« IMMUNITE PULMONAIRE »**

A mes parents,
A mon neveu, A mon filleul et A ma nièce



L'intégralité de ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Immunité Pulmonaire » du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, INSERM U1019/UMR9017, sous la Direction du Docteur Anne TSICOPOULOS et du Professeure Cécile CHENIVESSE.

Ces trois années de thèse ont pu être réalisées grâce à l'obtention d'une allocation de recherche obtenue en 2016.

« Travail soutenu par le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire, appel d'offres 2019 émis en commun avec la Fondation du Souffle ».

Je tiens à remercier la Fondation du Souffle et le Fond de Recherche en Santé Respiratoire, sans qui, cette quatrième et dernière année de thèse n'aurait pu être réalisée. Merci à tous les membres de la fondation, de nous donner l'opportunité de protéger nos poumons et de continuer à nous faire respirer.

Remerciements

Ces « *quelques mots* » sont ma façon de vous adresser tous mes remerciements, vous qui avez participé de loin, de près et de très près à la réussite de ce projet de thèse. J'ai bien peur que ces « *quelques mots* » imprimés sur ce papier ne soient pas à la hauteur des remerciements qui vous sont adressés, mais à tous, un Grand MERCI.

Un grand merci à l'ensemble de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail :

Monsieur le Professeur Philippe Bonniaud, merci d'avoir accepté la présidence de ce jury et surtout d'avoir évalué chaque année, au cours de mon Comité de Suivi Individuel, ce travail de thèse. Merci pour vos remarques constructrices et vos conseils bienveillants. C'est un honneur pour moi de vous compter dans ce jury.

Merci à mes rapporteurs, Madame le Professeur Dieudonnée Togbé et Monsieur le Docteur Thomas Trian pour avoir accepté cette lourde tâche de rapporteur.

Madame le Docteur Stéphanie Fry, merci d'avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examineur.

Je remercie plus particulièrement Madame la Professeure Cécile Chenivresse pour le co-encadrement de ma thèse. Mes connaissances sur le plan clinique ne se seraient pas aussi enrichies sans ta sagesse si pointue dans le domaine. Merci d'avoir su être présente, durant cette période de crise sanitaire que nous venons de traverser. Merci de savoir allier « plaisir » et « rigueur » professionnelle pour solidariser les liens collectifs.

Un Grand merci à Madame le Docteur Anne Tsicopoulos pour l'Encadrement de ces quatre années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance après notre entretien du 7 avril 2016 et ainsi de m'avoir laissé l'opportunité de réaliser cette thèse. Vous avez su me transmettre, votre goût inébranlable pour la science. Merci aussi d'avoir pris le temps de corriger, « si peu de fois » *my english*. Enfin, merci, car grâce à vous (et à un ESTA à 150\$), j'ai pu poser, pour la première fois, le pied sur le territoire Américain !

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Saliha Sendid pour le temps consacré à ce projet de thèse. Un grand Merci à la formatrice que tu es, pour m'avoir fait partager ton savoir-faire et la passion de ton métier. Tu as toujours su m'accorder ton aide (quand j'ai eu le courage de te le demander) et toujours pris le temps de répondre à mes questions. Ton dynamisme, ton franc parlé et ton bon cœur font de toi le Docteur que tu es devenue aujourd'hui. Merci de nous faire partager ta culture, ton couscous, et cette soupe aussi, dont j'ai perdu le nom, mmh... Même si l'élève n'apprend rien au maître, j'espère au moins t'avoir convaincue que tu peux (quelques fois) faire confiance aux souris ! Merci Docteur Saliha Sendid.

Au Médecin et au futur Docteur Camille Audousset, merci. J'ai apprécié nos discussions, souvent tardives, mais sérieuses ! J'ai également apprécié ton humour, et je sais maintenant que l'on peut rire de tout mais pas avec n'importe qui, beh non, tu n'es pas n'importe qui. Tu es l'étudiant en Master 2 qui parallèlement a soutenu sa thèse de médecine, puis, tout en étant

le chef de clinique des EFR, tu te lances dans une thèse de science. Tu es désormais un thésard qui a préparé son année de mobilité au Canada et qui en même temps, a pris soin de mes cellules ! Ta réussite professionnelle sera à la hauteur de ton investissement. A bientôt Camille.

Je souhaite également remercier le Docteur Daniel Alvarez-Simón, pour ton aide bien précieuse au cours de cette dernière année de thèse. En espérant ne pas t'avoir laissé une mauvaise image du microscope. Merci aussi de nous avoir regalé les yeux tous les midis, avec tes déjeuners faits maison. Bon vent pour la suite.

Je tiens à remercier Sophie et Elisabeth pour le temps que vous avez su m'accorder durant ces quatre années. Sophie, merci pour la formation assidue au microscope, et Elisabeth, merci pour les longues heures de formation sur l'analyse d'image, notamment sur l'utilisation du logiciel Image J et l'écriture des macros. Votre aide m'a été si précieuse.

Merci à toute l'équipe de l'animalerie pour l'entraide et la bonne humeur, tant en zone d'élevage, qu'en isoteknie.

Aux chercheurs du laboratoire avec qui j'ai pu échanger à plusieurs reprises. Phillipe Lassalle, merci pour les diverses discussions scientifiques échangées, bon courage à vous pour la nouvelle aventure qui vous attends. Odile, et Patricia, mes collègues de bureau qui ont dû supporter ma réflexion quelques fois exprimée à voix haute. Patricia, merci pour toutes les délicates attentions que tu m'as apportées au cours de ces quatre années (chocolats, crêpes, anti-histaminiques...). Je terminerai par te remercier Nathalie, pour m'avoir rassuré à maintes reprises en me disant que tout irait bien, mais aussi d'avoir pris le temps de m'expliquer les subtilités du logiciel Magellan. Et surtout, merci, car grâce à toi, j'ai eu l'occasion de faire mon premier combat de sumo (qui s'est soldé par une défaite, rhhh). Fais-moi plaisir, n'oublies pas ce que tu vaux.

Merci également aux anciens chercheurs du laboratoire, Catherine et Corine et aux anciens techniciens, Valérie et Philippe, pour les discussions professionnelles échangées.

Merci aux gestionnaires, Karine et Cathy pour la gestion de nos commandes, commandes plus ou moins facile à passer, mais toujours avec le sourire.

Merci aux étudiants du laboratoire, notamment, ceux qui comme moi, ont vécu cette aventure qu'est la thèse, Justine et Julie. Julie, je ne peux te souhaiter que bon courage pour les derniers jours avant le dénouement final. On n'oubliera pas les délices culinaires partagés en congrès et notamment à Bruxelles et aux Etats-Unis. Bon vent pour la suite.

Madleen, merci de ta joie de vivre, de ces petites histoires racontées avec l'accent du Nord, qui tes si cher. J'en profite pour te féliciter à nouveau, pour ton parcours et ce titre, tout fraîchement obtenu de Médecin. Maxence, merci de nous avoir fait partager ton expérience en tant que stagiaire de Master 2 recherche. Les « quelques » anecdotes ne seront pas oubliées. Je te souhaite bon courage pour les dernières années de l'internat.

A mon ancien voisin de bureau, Alexandre, alias Biquet. Tu aurais dû descendre dans mon estime après m'avoir fait manger une croquette de chien, mais rien de tout ça ! Merci pour nos débats enrichissants, on est de bons acteurs et je crois que nos collègues de bureau s'en souviennent encore. Merci de m'avoir fait découvrir Interstellar, comme tu me l'avais si bien évoqué, c'est un film qui fait réfléchir ! Je te félicite pour ton parcours professionnel, et dire

que j'ai failli ne pas assister à ta thèse de science... A bientôt Médecin et Docteur Alexandre Gaudet.

Je terminerai ce tour de laboratoire par ces trois (drôles, bien entendu) précieuses dames.

Lucie, (Luciaa, pour les intimes), merci de ta franchise, pas toujours facile à entendre mais c'est ce genre de franchise qui m'a fait avancer et réfléchir. Merci pour ces nombreuses soirées et notamment les soirées « jeux de sociétés », mon meilleur souvenir reste les parties où j'ai pu gagner (haha, je suis mauvaise joueuse, mais ça reste léger). Merci du temps que tu as consacré à préparer nos séances de sport durant le confinement (et là mon pire souvenir a été l'exercice du pointeur). Merci aussi de m'avoir demandé de prendre soin de ta plante, j'essaie de faire au mieux pour qu'elle survive ! Il faut noter qu'une nouvelle pousse a fait surface durant cette dernière année !

Nathanaële (Chaufferette, une fois de plus, pour les intimes), durant ces quatre années, rare sont les journées où tu n'avais pas le sourire, merci pour cela. Merci également à ta joie de vivre et à ton côté optimiste, qui aide aussi à nous faire tenir. Merci d'avoir souvent pris le temps de nous trouver de quoi nous divertir autour d'un verre et d'avoir insisté, toi et les filles pour que j'y assiste. J'ai conscience que ces moments « off » m'ont été bénéfiques. Merci aussi pour avoir agrémenter mon tiroir à chaussettes, notre péché mignon pour ce vêtement de maille doit être lié à l'année 92, j'en suis persuadée !

Joanne (alias JB, un surnom parmi tant d'autres...) rien de ces quatre années ne sera oublié !! Je te remercie réellement pour l'entraide que tu as su m'apporter, dire « non » ne fait pas parti de ton vocabulaire (me coûtant ainsi 5€, mais comme les calculs ne sont pas toujours bons... je ne me suis pas trop ruinée). Merci à ton oreille attentive et à tes paroles rassurantes que tu as souvent eues pour moi. Certaines journées, auraient été, sans toi, un peu plus grises que d'autres. Merci de m'avoir appris à parler le Ch'timi et le « Balsamelli », je tâcherai de perpétuer ce patois Nordique ! Je ne peux évoquer (car ils sont nombreux), tous les excellents Moments partagés, en si peu de lignes, mais je sais, que comme pour moi, tout est bien ancré dans notre lobe temporal !!

A toutes les trois : merci d'avoir pris soin de moi pendant ces quatre années, ce fût une belle rencontre, une si belle rencontre.

Je souhaite également remercier le Docteur Mathieu Epardaud, qui m'a fait découvrir cet organe qu'est le poumon et cette technique qu'est l'histologie, durant mon stage de Master 2. Pour tout cela, je vous en remercie à nouveau.

Maxime, et dire que la tuberculose est à l'origine de notre rencontre. Je garde un excellent souvenir de mon stage de Master 2, et grâce à toi, mes tubes de prélèvement ont toujours eu droit à de belles étiquettes. Je tiens particulièrement à te remercier pour avoir pris de mes nouvelles au cours de ces quatre années de thèse et d'avoir su trouver les mots quand cela était nécessaire. Tu tenais absolument à être là aujourd'hui, et c'est un plaisir de te savoir présent.

Je tiens particulièrement à remercier l'ensemble de mes amis musiciens qui sans forcément tout comprendre, ont pris le temps de s'intéresser à ce travail. Mon absentéisme au cours de ces années d'étude ne reflète pas le manque d'envie de jouer avec vous, bien au contraire. Merci d'être vous, cette seconde famille.

Je souhaite également adresser quelques mots à Anaïs. J'ai eu la chance de faire ta connaissance au cours de notre Master ICMVAT à Tours. Depuis le 1^{er} septembre 2015, nos chemins se sont suivis, d'abord en tant que collègue de promo, puis tu es devenue, au fil de ces années, une véritable amie. J'ai apprécié travailler à tes côtés et je te remercie de m'avoir fait partager ton savoir-faire scientifique. Mais, j'ai surtout aimé tous ces moments « off » partagé au cours de notre thèse, j'entends par là, les journées shopping, les soirées jeux de sociétés, nos dégustations culinaires et enfin, les soirées cinématographiques... Pour tout cela, Merci.

Ces derniers mots sont dédiés à ma *Famille*, et je ne sais par où commencer... Peut-être déjà par vous remercier de m'avoir toujours accordé votre confiance. A mes parents, à qui je dois TOUT, merci de m'avoir laissé prendre mon envol pour effectuer mes études, d'avoir pris le temps de m'écouter, à maintes reprises..., même si les discussions vous ont quelques fois dépassées. Merci aussi de m'avoir transmis cette curiosité, et j'en ai maintenant la preuve, ce n'est pas toujours un vilain défaut. Merci d'avoir fait de nous, la famille que nous sommes aujourd'hui. Papa, maman, je suis tellement fière de vous.

A mon frère, à ma sœur, beau-frère et belle-sœur, merci d'y avoir cru ! Merci de votre soutien indéfectible, et de l'intérêt que vous avez porté à mes études, notre lien Fraternel, a contribué, pour beaucoup à la réussite de mes études. Enfin, Axel, Yann et Elouane, merci pour votre jeune âge et votre insouciance, je suis une tata comblée, et c'est en vous regardant que j'ai compris l'importance du mot *Famille*. Je suis fière de savoir que la science continue d'avoir un intérêt au fil des générations...

Nico, tu partages ma vie depuis plus de huit ans, mais cette vie a été répartie entre toi, moi et mes études, je sais Ô combien ces années, et tout particulièrement ces quatre dernières années furent exigeantes. Merci d'avoir cru en moi et de ne jamais avoir douté, merci d'avoir, bien souvent, trouvé les mots et surtout, merci de ta patience. On nous a souvent fait remarquer que ton tempérament canalisait mon anxiété, et je sais aujourd'hui, que sans toi, rien n'aurait été possible. Il serait dommage de ne pas évoquer les nombreux repas que tu m'as préparé, sans toi, j'aurais certainement jeûné plus d'une fois. Dans la plaisanterie (parce que c'est ta force), tu m'avais demandé si toi aussi, tu serais diplômé à la fin de ma thèse, alors oui, parce que cette thèse, c'est aussi un peu la tienne. *Je t'Aime « plus que trois fois 1000 ».*

Résumé

L'asthme allergique sévère est une pathologie inflammatoire chronique conséquence d'une réponse inappropriée de l'organisme à un l'allergène. Cette pathologie, qui représente un problème de santé publique, peut se caractériser par un infiltrat pulmonaire à neutrophiles, associé à un remodelage bronchique accentué, souvent résistant aux thérapeutiques habituelles (corticoïdes inhalés), et à une expression de cytokines de type Th17, menant à un profil Th2/Th17. Les cytokines Th17 comme l'IL-17 et l'IL-22 sont trouvées dans les expectorations induites de patients asthmatiques et ont des propriétés pro-inflammatoires dans le cas de l'asthme allergique. L'IL-22 est impliquée dans le recrutement de neutrophiles, dans le remodelage tissulaire et est connue pour être induite suite à l'infection par des pathogènes de l'enfance qui contribuent au développement et aux exacerbations de l'asthme. Ces pathogènes sont reconnus par un récepteur intracellulaire de l'immunité innée, NOD2, présent au niveau des cellules épithéliales et dendritiques. Ce récepteur est capable de reconnaître un peptidoglycane, le muramyl dipeptide. Un effet synergique pourrait ainsi exister entre des éléments environnementaux que sont les allergènes et différents agents infectieux auxquels nous sommes confrontés dans la petite enfance qui pourraient avoir un effet adjuvant sur la production d'IL-22. Pour répondre à cela, un modèle murin d'asthme chronique neutrophilique à l'allergène de chien a été développé au laboratoire, reproduisant l'asthme sévère d'endotype Th2/Th17. La première partie du projet a évalué les effets de la co-stimulation par NOD2 dans ce modèle chronique, en particulier le remodelage des voies aériennes et l'origine cellulaire de la production d'IL-22. Si l'hypothèse testée d'un effet adjuvant de NOD2 sur les paramètres de l'asthme sévère n'a pas été confirmée, la formation d'inductible Tissu Lymphoïde Associé aux Bronches (iBALT) dans ce modèle nous a fait poursuivre la caractérisation phénotypique et mécanistique de la formation de ces follicules. Dans ce contexte, l'implication d'un facteur de transcription, exprimé par les cellules Th17 et essentiel à la production d'IL-22, l'Aryl hydrocarbon receptor (AhR) a été évalué. Dans notre modèle, un antagoniste de l'AhR inhibe certains paramètres de l'asthme sévère dont la production d'IL-22, mais à l'inverse, va augmenter la formation des iBALTs en diminuant légèrement la production d'IL-10. La seconde partie a pour but de déterminer le rôle de l'IL-22 dans ce modèle chronique d'asthme expérimental à l'allergène de chien, par l'utilisation de souris déficientes en IL-22. Nous observons que l'absence d'IL-22 atténue certaines réponses associées à l'asthme dont, le recrutement de neutrophiles, l'hyperréactivité bronchique, les paramètres liés à la formation de iBALTs, mais ne modifie pas la réponse humorale. La dernière partie de ce projet, vise à identifier les cellules cibles impliquées dans les effets dépendant de l'IL-22, grâce à des souris déficientes en IL-22Ra1, une sous-unité du récepteur

de l'IL-22 exprimé, notamment, sur les cellules épithéliales ou les cellules musculaires lisses/myofibroblastes. Les premiers résultats montrent un effet des deux types cellulaires sur le recrutement cellulaire global, et des cellules musculaires lisses pour la résistance des voies aériennes et la réponse humorale.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'IL-22 est une cible de choix dans le cadre d'un traitement de l'asthme allergique sévère. L'ensemble de ce projet devrait permettre la mise en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans l'asthme sévère et ouvrir la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques pulmonaires locales, ciblant l'IL-22Ra1 et potentiellement le remodelage bronchique. Un des indicateurs de sévérité de l'asthme mais pour lequel aucun traitement n'est disponible en dehors de la thermoplastie.

Mots-clés : Asthme, inflammation, NOD2, remodelage bronchique, AhR, IL-22

Abstract

Mechanisms involved in bronchial remodeling in an experimental model of chronic Th2/Th17 endotype severe asthma

Severe allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the airways in response to an allergen. This disease is a public health problem and can be associated with bronchial remodeling, for which no treatment is yet available, except thermoplasty with neutrophil recruitment in the lung, and Th17 cytokine production as well as mixed Th2/Th17 responses. Among Th17 cytokines, IL-17 and IL-22 are pro-inflammatory cytokines in asthma and are found in sputum of asthmatics patients. IL-22 is involved in neutrophil recruitment, tissue remodeling and is induced in response to infectious agents, some of which can promote the development and exacerbation of asthma. These pathogens are recognized by an innate immunity receptor, NOD2, present in epithelial and dendritic cells. This receptor is able to recognize a peptidoglycan named muramyl di peptide. So, our hypothesis was that co-stimulation between an allergen and the NOD2 ligand could promote the development of severe allergic asthma through IL-22. To answer this, a murine model of chronic neutrophilic asthma induced by dog allergen has been developed in the laboratory, which reproduces the Th17 severe asthma endotype. The PhD project has been divided in three parts. The first one has evaluated the effects of NOD2 co-stimulation in the model of chronic dog-induced experimental asthma, in particular on lung remodeling, and the cellular origin of IL-22. Despite the absence of adjuvant effect of NOD2 co-stimulation on asthma parameters, the discovery of induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (iBALT) in this model prompted us to pursue the phenotypic and mechanistic characterization of the formation of these follicles. A transcription factor, Aryl hydrocarbon receptor (AhR) expressed in Th17 cells and necessary for IL-22 production, has been studied in our model. An AhR antagonist inhibited some parameters of asthma including IL-22 production but also increased the formation of iBALTs with decreased IL-10 production. The aim of the second part was to determine the role of IL-22 in the chronic experimental model by using IL-22 deficient mice. IL-22 deficiency induced a decrease in lung neutrophil recruitment, airway hyperresponsiveness, and parameters associated with iBALT formation, but not modification in humoral response. The last part consisted in identifying the target cells involved in the IL-22 dependent effects, by using Cre LoxP mice allowing to specifically delete the IL-22 receptor, IL-22Ra1 from epithelial or smooth muscle cells. The first results show that both cells types are involved in Broncho-Alveolar Lavage cell recruitment whereas only smooth muscle cells are involved in airway hyperresponsiveness and humoral response.

In conclusion, our results show that IL-22R is a target for treatment of severe allergic asthma. Altogether this project should identify novel mechanisms involved in this disease and opens the way towards novel therapeutic strategies in severe asthma, potentially by local administration targeting IL-22R, and potentially bronchial remodelling, an indicator of severe asthma.

Keywords: Asthma, inflammation, NOD2, bronchial remodeling, AhR, IL-22

Table des matières

Liste des abréviations	15
Liste des figures/tableaux	17
Introduction.....	18
I. L'asthme	18
A. Introduction générale.....	18
1. Généralités	18
2. Les phénotypes.....	19
3. Les endotypes.....	20
B. Physiopathologie de l'asthme allergique	21
1. La réaction allergique	22
2. Les allergènes	25
a. Cas particulier de l'allergène de chien	26
3. Molécules d'intérêt de notre étude dans l'asthme allergique sévère	28
a. Les cytokines de type Th17	28
b. L'Aryl hydrocarbon receptor (AhR)	34
c. Un récepteur de l'immunité innée : NOD2	40
II. Le remodelage bronchique	41
1. Origine du remodelage bronchique	42
2. Les caractéristiques du remodelage bronchique	43
a. La fibrose sous-épithéliale.....	43
i. Le collagène.....	44
ii. Les métalloprotéases et leurs inhibiteurs	46
b. Hyperplasie, hypertrophie et métaplasie.....	47
i. Le mucus.....	47
ii. Le muscle lisse	50
iii. La transition épithélio-mésenchymateuse	52
III. Les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT)	53
Première partie	59
Objectifs de travail	60
Matériels et Méthodes.....	61
Résultats	69
Deuxième partie	83
Objectifs de travail	84
Matériels et Méthodes.....	85

Résultats	89
Discussion Générale	94
Bibliographie	106
Annexes	125

Liste des abréviations

AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ARNm	ARN messenger
BALT	Tissu lymphoïdes associé aux bronches
Breg	Cellules B régulatrices
Ca²⁺	Calcium
Can f	<i>Canis familiaris</i>
CD	Cellules Dendritiques
CML	Cellules Musculaires Lisses
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FDC	Cellules Dendritiques Folliculaires
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazole
GATA3	GATA binding protein 3
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HSP	Heat Shock Protein
iBALT	BALT inductible
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC	Innate Lymphoid Cells
KO	Knock-Out
LBA	Lavages Broncho-Alvéolaires
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphotoxine
LTi	Cellules inductrices de tissus lymphoïdes
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MPD	Muramyl dipeptide
MMP	Métalloprotéases matricielles
MOG	Myelin Oligodendrocyte peptide 35-55
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MUC	Mucines
NLR	NOD Like Receptors
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaires
OLT	Organes Lymphoïdes Tertiaires
PRTM 1	Protéine arginine méthyltransférase 1
RORyt	Retinoic acid-related orphan receptor γ t
ROS	Reactive Oxygen Species
RS	Réticulum Sarcoplasmique
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper
TIMP	Tissue inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	Cellules T régulatrices

TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
WT	Wild Type
α-SMA	α -Smooth Muscle Actin

Liste des figures/tableaux

Figure 1 : Phénotypes de l'asthme et association aux deux endotypes : T2 et non T2

Figure 2 : Réponse effectrice au cours de la réaction allergique

Figure 3 : Polarisation et maturation des cellules Th17 murines et humaines

Figure 4 : Représentation de l'interaction entre l'IL-22 et les domaines extra-cellulaires de l'IL-22Ra1 et l'IL-10 β 1

Figure 5 : Mécanisme d'action de l'Aryl hydrocarbon receptor (AhR)

Figure 6 : Représentation de la structure tripartite du récepteur NOD1 et NOD2

Figure 7 : Représentation d'une bronche de patient non asthmatique (à gauche) et asthmatique (à droite)

Figure 8 : Photographie et représentation histologique d'une bronche de patient non asthmatique (**A** et **C**) et d'un patient asthmatique sévère (**B** et **D**)

Figure 9 : Origines du remodelage bronchique

Figure 10 : Représentation de la structure du collagène

Figure 11 : Altération de l'expression des mucines (MUC) MUC5AC et MUC5B dans l'asthme

Figure 12 : Contraction du muscle lisse bronchique

Figure 13 : Modèle de développement d'inductibles tissus lymphoïdes associés aux bronches (iBALTs).

Tableau 1 : Liste non exhaustive des ligands de l'Aryl hydrocarbon receptor (AhR)

Tableau 2 : Gènes des mucines (MUC) humaines trouvées dans le poumon chez l'homme

Introduction

I. L'asthme

A. Introduction générale

1. Généralités

« L'asthme est une maladie hétérogène habituellement caractérisée par une inflammation chronique des voies aériennes. Elle se définit par plusieurs symptômes respiratoires, à savoir, des sifflements, une dyspnée une oppression thoracique et une toux. Ces symptômes, qui varient en intensité mais également au cours du temps, sont la conséquence d'une limitation des débits expiratoires ». Ainsi, l'inflammation chronique initie l'obstruction des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique chez le patient (1).

L'asthme, pathologie chronique non transmissible la plus fréquente, affecte aujourd'hui 334 millions de personnes dans le monde (2). La prévalence de l'asthme a augmenté avec l'industrialisation des pays depuis les années 50, mais tend à se stabiliser depuis ces dernières années (3). En France, la prévalence de l'asthme est de 6% chez l'adulte contre 9% chez l'enfant (4). En 2007, l'asthme a été responsable de plus de 54 000 hospitalisations avec une durée de séjour moyen de 2,8 jours (4). A cela, s'ajoute un absentéisme scolaire et professionnel important et une altération de la qualité de vie des asthmatiques. Tous ces facteurs de morbidité ont un coût économique important, estimé entre 840€ (asthmes légers) et 4100€ (formes plus sévères) en France (5), ces dépenses englobant les coûts directs (soins médicaux) et les coûts indirects (cessation ou diminution de l'activité professionnelle). Une diminution du nombre de décès a été observée entre 1990 et 2010, de 380 200 et 345 700 décès dans le monde (6). En France, en 2006, 1038 décès ont été recensés (DOM-TOM inclus) affectant majoritairement les femmes (4) et en 2014, 851 décès (hors Mayotte).

Aujourd'hui, les formes d'asthme léger à modéré peuvent être contrôlées avec l'arsenal thérapeutique existant alors que l'asthme sévère reste difficile à prendre en charge avec des traitements associés à des effets secondaires inacceptables comme la corticothérapie orale au long cours, voire qui restent au-delà de toute ressource thérapeutique. Dans l'asthme, le traitement a pour but de contrôler les symptômes, c'est-à-dire qu'ils soient peu fréquents et peu sévères et de limiter le nombre d'exacerbations sévères (moins de deux exacerbations sévères par an). Les corticoïdes inhalés constituent le traitement de fond des asthmatiques et ce traitement peut être réajusté si ces deux critères ne sont pas bien contrôlés. Les deux premiers paliers thérapeutiques correspondent à l'administration de corticoïdes inhalés à faible

dose. Si les symptômes persistent, des agonistes β_2 de longue durée d'action sont co-administrés avec les corticoïdes inhalés à faibles doses, c'est le troisième palier. Enfin, si les symptômes ne sont pas contrôlés et/ou que les exacerbations sévères sont fréquentes, des traitements de paliers quatre et cinq sont alors mis en place où la dose de corticoïdes inhalés est augmentée et des traitements additionnels introduits (anti-cholinergiques inhalés, anti-leucotriènes etc....). Chaque palier thérapeutique définit un niveau de sévérité de l'asthme : léger (paliers 1 et 2), modéré (palier 3), sévère (paliers 4 et 5). Dans l'asthme sévère, il est possible d'administrer des traitements additionnels tels qu'un anti-Immunoglobuline (Ig) E (Omalizumab) ou un anti-Interleukine (IL)-5 (Mépilizumab) / anti-IL-5R (Benralizumab), en fonction du phénotype de l'asthme (7). L'asthme sévère (5 à 10% des patients) est un asthme persistant qui justifie une charge thérapeutique de niveau quatre ou cinq. Il peut être contrôlé sous la prise de médicaments de palier cinq ou non contrôlé (persistance de symptômes, au moins deux exacerbations sévères dans l'année nécessitant des corticoïdes oraux ou une hospitalisation, un Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) inférieur à 80% après l'administration de bronchodilatateurs), malgré ces traitements.

2. Les phénotypes

L'asthme n'est pas une pathologie unique, ainsi, pour mieux comprendre son hétérogénéité, le terme « phénotype » a émergé depuis plusieurs années. Un phénotype se définit par l'observation de manifestations cliniques qui résultent de l'interaction entre des facteurs génétiques du patient et environnementaux (7). On distingue de nombreux phénotypes d'asthme sur la base de caractéristiques cliniques, biologiques, fonctionnelles, observés en pratique clinique.

Le premier phénotype bien caractérisé est l'asthme allergique. L'asthme de phénotype allergique se traduit par des symptômes liés à l'exposition à l'allergène, une sensibilisation aux aéro-allergènes avec la présence d'IgE dans le sérum et/ou un résultat positif du test cutané (prick-test). Ce phénotype est généralement de début précoce, est majoritairement retrouvé chez les enfants et persiste à l'âge adulte. Certaines formes stéréotypées associant la survenue successives des comorbidités allergiques (dermatite atopique, allergies alimentaires et une rhinite allergique) sont dénommées « marche atopique » (8).

Un autre phénotype, dit éosinophilique est un asthme d'apparition plus tardive, aux alentours de 40 à 50 ans. Ce phénotype concerne un peu plus les hommes que les femmes et est associé à la présence d'une rhino-sinusite chronique et d'une polypose naso-sinusienne. L'asthme éosinophilique est caractérisé par un pourcentage d'éosinophiles supérieur à 3%

dans les expectorations induites (8). Ce prélèvement étant difficile en pratique clinique, on utilise un taux d'éosinophiles circulants $\geq 300/\text{mm}^3$.

Un autre phénotype d'asthme bien caractérisé est l'asthme exacerbé par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et l'aspirine. Chez les asthmatiques, sa prévalence est de 3% chez l'adulte, avec une majorité de femmes, et 2% chez les enfants. Il est caractérisé par la survenue d'une congestion nasale et de symptômes d'asthme dans les 30 à 60 minutes qui suivent l'ingestion d'aspirine. Cette réaction peut être plus retardée, survenant dans les trois heures qui suivent, surtout lorsqu'une petite dose est ingérée (de 30 à 100mg) (9).

L'asthme induit par l'exercice caractérise des patients dont les symptômes surviennent après un effort physique. Ces patients ont un asthme léger avec une bronchoconstriction réversible. Ce phénotype est associé aux épisodes de froids secs. Aujourd'hui, aucun facteur génétique et biomarqueurs n'ont été décrits pour ce phénotype.

D'autres phénotypes sont répertoriés, comme l'asthme associé à l'obésité, et au tabac (8).

3. Les endotypes

En clinique, les phénotypes permettent d'identifier le profil asthmatique du patient qui est généralement associé à des mécanismes immunologiques et inflammatoires spécifiques, appelés « endotypes ». Un endotype est défini par un mécanisme pathophysiologique et vise notamment à identifier des biomarqueurs pour associer au mieux, chaque patient à un endotype. Ces endotypes sont nécessaires pour identifier une thérapeutique plus ciblée et personnalisée. La distinction des endotypes est basée sur des études moléculaires, génétiques et épigénétiques. On sépare actuellement les endotypes en T2 (T2 high) ou non T2 (T2 low).

Les asthmes de types T2 englobent les endotypes allergiques et éosinophiliques non allergiques qui sont définis respectivement, par une inflammation bronchique IgE-médiée et éosinophilique, le plus souvent associés à une concentration sérique élevée d'IL-5 et d'IL-13, et une production de mucus (10). Les endotypes T2 sont habituellement associés aux phénotypes d'asthme allergique, l'asthme éosinophilique, l'asthme exacerbé par les AINS, et l'asthme induit par l'effort physique.

Les endotypes non T2 sont caractérisés par l'absence d'inflammation allergique et/ou éosinophilique. Il peut s'agir d'une inflammation neutrophilique dans les expectorations induites et avec un profil de réponse inflammatoire de type T helper (Th) 1/Th17 (11) (12) ou paucigranulocytaire (absence de processus inflammatoire observable) (8) mais il existe

probablement de nombreux endotypes actuellement mal caractérisés au sein de cette entité. Des biothérapies ciblant les asthmes d'endotypes non T2 ont été testés chez les asthmatiques, mais ne sont pas encore disponibles sur le marché. L'endotype non T2 est classiquement associé aux phénotypes d'asthme lié au tabac ou à l'obésité, bien que ce dernier type d'asthme peut aussi être affilié à un endotype T2, puisque certains patients obèses avec un asthme sévère ont des éosinophiles au niveau du tissu bronchique (13).

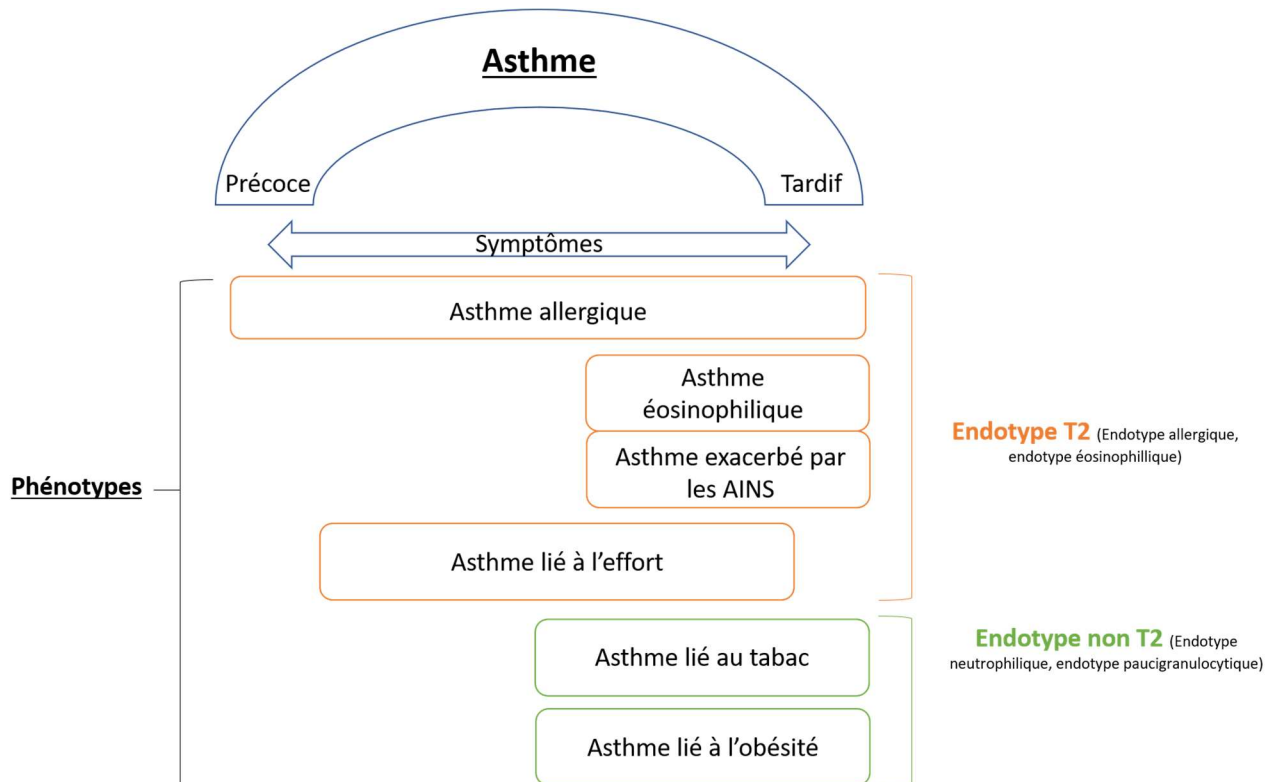


Figure 1 : Phénotypes de l'asthme et association aux deux endotypes : T2 et non T2. L'endotype T2 inclut les asthmes allergiques, qui se développent dans l'enfance et persistent à l'âge adulte, l'asthme éosinophilique, l'asthme exacerbé par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), et l'asthme induit par l'effort. Concernant l'endotype non T2, il est associé à l'asthme lié au tabagisme et à l'obésité (adapté de Wenzel, 2012).

B. Physiopathologie de l'asthme allergique

La réaction allergique comprend deux phases : la phase de sensibilisation et la phase effectrice, toutes les deux induites par les allergènes présents dans l'environnement intérieur et extérieur. Chez des sujets non atopiques, aucune réaction ne se produira, en revanche, chez un sujet atopique cet allergène est perçu comme un « danger » et fait alors intervenir le système immunitaire de l'hôte, qui va alors lutter contre ce « danger ».

L'immunophysiopathologie de l'asthme allergique implique l'activation du système immunitaire innée et adaptatif, aboutissant à une inflammation des voies aériennes, à une bronchoconstriction, et à un remodelage bronchique.

1. La réaction allergique

La phase de sensibilisation commence dès le premier contact entre l'individu et l'allergène. La sensibilisation reflète la capacité de l'allergène à induire la production des IgE par les lymphocytes B et induire la polarisation des lymphocytes T naifs en Th2. L'inhalation de l'allergène, provoque la libération, par les cellules épithéliales bronchiques de chimiokines comme CCL19, CCL20 et CCL27 qui sont responsables de la migration des cellules dendritiques (CD) au niveau de l'épithélium bronchique. Des cytokines comme l'IL-25, l'IL-33 et le Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), appelées des alarmines, sont produites par les cellules épithéliales, tout comme le Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et conduisent à la maturation des CD qui deviennent alors des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces cellules ont la capacité de phagocyter l'allergène qui a traversé la barrière épithéliale et de le digérer en peptide antigénique. Les CPA migrent dans le ganglion lymphatique, et forment une synapse immunologique avec les cellules T naïves exprimant un récepteur des cellules T spécifique des peptides antigéniques qu'elles présentent, via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de type II.

Durant la présentation antigénique, des cytokines pro-Th2, comme l'IL-4, sont produites favorisant une polarisation de type Th2 et une activation des facteurs de transcription Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 6 et GATA binding protein 3 (GATA3). L'origine cellulaire de l'IL-4 n'est pas bien définie (14). Ensuite, les cellules Th2 migrent au niveau de la muqueuse sous épithéliale où elles sécrètent les cytokines IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13. Chacune de ces cytokines joue un rôle essentiel dans la pathophysiologie de l'asthme. L'IL-13, tout comme l'IL-4, favorise la commutation isotypique des cellules B pour la production des IgE. Cette synthèse fait suite à l'interaction entre le récepteur des cellules B et les cellules Th2 en présence d'IL-4 et d'IL-13 mais également des molécules de co-stimulation telles que le CD40 et CD40L exprimés sur les lymphocytes B et les cellules Th2, respectivement (14). Une fois les IgE spécifiques de l'antigène synthétisés par les cellules B, ils se lient à la chaîne α de leur récepteur Fc ϵ R1 exprimés au niveau de la membrane plasmique des mastocytes et des basophiles. Ces premières réponses immunitaires correspondent donc à la phase de sensibilisation qui reste asymptomatique chez les patients puisqu'aucun processus inflammatoire n'est mis en place.

Après un deuxième contact avec ce même allergène, se met en place la phase effectrice, elle-même divisée en une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce est associée aux symptômes immédiats de l'asthme, tels que la toux, la dyspnée, les sifflements et la phase tardive est associée à une inflammation chronique et au remodelage bronchique, pouvant mener à une dégradation de la fonction respiratoire (trouble ventilatoire obstructif non réversible).

Lors de l'exposition ultérieure à l'allergène au niveau de l'épithélium respiratoire, celui-ci est capté par les CD mais est également reconnu par les IgE fixés sur les mastocytes et les basophiles. La fixation de l'antigène sur les IgE entraîne l'activation de tyrosines kinases comme Lyn ou encore Syk, suivie de la phosphorylation de LAT, qui recrute SPLP-76, VAV, aboutissant à la dégranulation des mastocytes. Les granules des mastocytes contiennent une grande variété de médiateurs, qui ne sont pas tous libérés en même temps. En effet, dans les cinq minutes qui suivent le contact avec l'allergène, ce sont des granules composés d'histamine, de sérotonine, de protéoglycanes ou encore de protéases qui sont libérés. L'histamine, molécule fortement impliquée dans les réactions allergiques, agit via ses quatre récepteurs (HR 1-4) exprimés sur les cellules immunes, nerveuses et musculaires lisses (15). La sérotonine agit également via ses récepteurs, au nombre de sept (5-HTR-1-7). Son niveau est augmenté chez les patients asthmatiques et corrèle avec la sévérité de l'asthme (16). Les protéases, comme la tryptase ou la chymase sont augmentées dans le sérum de patients décédés d'asthme mais le rôle qu'ils jouent dans l'asthme allergique n'est pas bien défini (17). La seconde vague de granules libérés relarguent des médiateurs lipidiques comme, les leucotriènes et les prostaglandines dérivés de l'acide arachidonique via la 5-lipoxygénase pour les leucotriènes et la cyclooxygénase pour les prostaglandines (18) (19). L'ensemble de ces médiateurs participe à l'inflammation, à la bronchoconstriction, à la perméabilité vasculaire et à la production de mucus.

La phase tardive se caractérise par le recrutement cellulaire survenant quelques heures après l'inhalation de l'allergène, induit par les cytokines et chimiokines sécrétées directement ou indirectement lors de la réaction immédiate. En plus du large spectre de médiateurs libérés par les mastocytes, ces derniers sécrètent des cytokines et des chimiokines comme l'IL-6, le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , le MCP-1. Les cellules Th2, polarisées par les CD, participent à cette phase tardive (figure 2) (20). Parmi les cytokines Th2, l'IL-13 exerce de multiples fonctions dans la pathogenèse de l'asthme. Son récepteur est exprimé sur les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses (CML). Cette cytokine est responsable de la contraction du muscle lisse, favorise l'hyperplasie des cellules caliciformes, ainsi que l'hypersécrétion de mucus via la synthèse des mucines MUC5AC et MUC5B, engendre l'hyperréactivité des voies aériennes et la fibrose sous-épithéliale. L'IL-13 est également

capable de favoriser le recrutement et la rétention des éosinophiles au niveau du tissu pulmonaire (21) (22) (23). Le rôle de l'IL-5 est d'assurer la maturation, l'activation et la migration des éosinophiles de la moelle osseuse à la muqueuse pulmonaire via la production de chimiokines telles que l'éotaxine 1, 2 et 3 (24). Le niveau d'IL-5 est augmenté dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients avec un asthme atopique (25) et d'autres études montrent l'implication de l'IL-5 dans l'inflammation et la bronchoconstriction (26). L'implication de l'IL-5 dans la bronchoconstriction peut potentiellement être réalisée par l'intermédiaire des éosinophiles, qui induisent l'hyperréactivité bronchique et participent au remodelage des voies aériennes. Les éosinophiles sécrètent des protéines cationiques éosinophiliques qui favorisent la synthèse de médiateurs du remodelage, comme le Transforming Growth Factor (TGF)- β , les métalloprotéinases et la fibronectine qui influencent le remodelage de la matrice extra-cellulaire (27) (28) (29). Les éosinophiles ont donc un rôle majeur dans le maintien de l'inflammation sur le long terme. Les alarmines interviennent également dans la réponse de type 2, en activant les Innate Lymphoid Cells (ILC) de type 2, qui sont « phénotypiquement » le miroir des cellules Th2. En effet, elles produisent également de l'IL-13, de l'IL-5 et de l'IL-4 et expriment le facteur GATA3, mais ne possèdent pas de récepteur à l'antigène. Les ILC2 sont impliquées dans l'immunité contre les helminthes mais participent également à la pathogenèse de l'asthme, en favorisant la sécrétion de mucus, le recrutement des éosinophiles ou encore en favorisant l'hyperréactivité bronchique (30) (31) (figure 2).

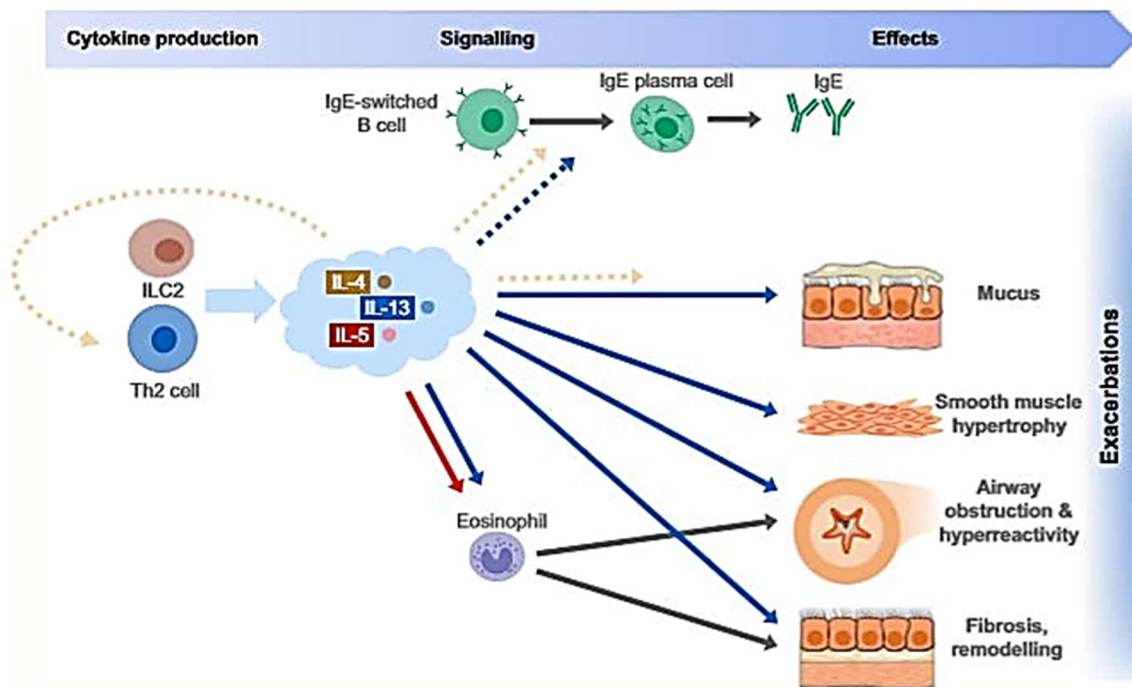


Figure 2 : Réponse effectrice au cours de la réaction allergique. Les cytokines de type Th2 induisent le recrutement des éosinophiles, le switch isotypique pour la synthèse des IgE et induisent le recrutement des Innate Lymphoid Cells 2 (ILC2). Ces mêmes cytokines participent également aux phénomènes caractérisant l'asthme, à savoir, la production de mucus, l'hyperréactivité et le remodelage bronchique, ainsi que la fibrose sous-épithéliale (Robinson et al, 2017).

Si la réaction allergique est dans la majorité des cas corticosensible, certains patients montrent une résistance face à la corticothérapie. Cette corticorésistance suppose l'intervention d'autres mécanismes immunologiques comme une inflammation mixte Th2/Th17, et l'implication de voies supplémentaires comme, l'activation de récepteurs de l'immunité innée ou de facteurs de transcription impliqués dans la polarisation des lymphocytes.

2. Les allergènes

A la naissance, les fonctions de la barrière épithéliale sont intactes. Les différents dommages, causés par les virus mais aussi les allergènes, entraînent un défaut de la barrière épithéliale avec une formation incomplète des jonctions serrées, une diminution de la résistance trans-épithéliale et donc une augmentation de la perméabilité membranaire (32). Un grand nombre d'allergènes ont une activité protéolytique, qui favorise la cassure des jonctions serrées présentes au pôle apical des cellules épithéliales ciliées et sécrétoires (33) (34). Ces anomalies favorisent le passage des allergènes au niveau des muqueuses respiratoires.

L'asthme allergique se développe en réponse à un allergène, qu'il soit aéro-porté (aéro-allergène), ou qu'il soit ingéré par l'alimentation. Les allergènes sont des antigènes responsables de la production des IgE chez des individus génétiquement prédisposés. Les allergènes sont des protéines ou des glycoprotéines de faible poids moléculaire, très conservées au cours de l'évolution des espèces. Leur nomenclature est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Union Internationale des Sociétés Immunologiques (35). Les allergènes, qui sont ubiquitaires, sont répartis en plusieurs catégories : les trophallergènes, allergènes ingérés responsables des allergies alimentaires (lait, œuf, fruits à coques...), les allergènes transcutanés (les métaux) responsables de dermatite de contact, les aéro-allergènes qui sont des allergènes inhalés, responsables des allergies respiratoires. On distingue deux types d'aéro-allergène, les perannuels et les saisonniers. Parmi ces derniers, sont recensés les pollens (graminées, arbres, herbacés) et les moisissures extérieures. Les aéro-allergènes perannuels incluent les acariens (dont *Dermatophagoïdes farinae* et *Dermatophagoïdes pteronyssinus* trouvés dans les poussières domestiques), les moisissures intérieures (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*...), les blattes et les animaux domestiques. Parmi les animaux domestiques, les chiens et les chats sont les principales sources d'allergènes respiratoires trouvés chez l'homme. En effet, ces animaux sont très populaires et le nombre de propriétaires continue d'augmenter. Un contact intensif avec les allergènes de ces animaux peut favoriser le développement des maladies allergiques comme l'asthme notamment (36).

a. Cas particulier de l'allergène de chien

Nous détaillons ici l'allergène de chien qui est celui utilisé dans le modèle expérimental de nos études. Les allergènes de chien, *Canis familiaris* (Can f), ont des caractéristiques aérodynamiques qui favorisent leur dispersion dans l'environnement (lieux publics, écoles, centres de soins...), augmentant le risque d'exposition à l'homme. Il a été estimé que 5 à 10% de la population mondiale est allergique aux phanères de chien (37) (38). En 2009, une étude Européenne révèle que 24,6% des français sont sensibilisés aux allergènes de chien (39), et parmi ces allergiques, 47% présentent une forme sévère de la maladie (40). Ainsi, les modèles expérimentaux d'asthme allergique aux phanères de chien pourraient être un moyen d'étudier ces formes sévères observées chez l'homme.

Les allergènes de chien sont produits dans le foie ou les glandes sécrétrices et sont trouvés, en concentrations différentes, sur la peau (poils), dans la cavité buccale (salive) et dans l'urine. On compte aujourd'hui huit allergènes de chien différents, nommés de Can f 1 à Can f 8.

Can f 1

Can f 1 est une protéine de 22 à 25 kiloDalton (kD). Elle a été purifiée pour la première fois en 1991 à partir de poils et de squames de chien (41). Can f 1 est trouvée de façon abondante dans la salive (42), mais également sur la peau (poils, fourrure) (43). Elle appartient à la famille des lipocalines, protéines caractérisées par leur capacité à transporter de petites molécules hydrophobes, dont les phéromones, vitamines ou encore les stéroïdes (44). Can f 1 est un allergène majeur, avec 70% des patients allergiques au chien qui ont des IgE spécifiques dirigés contre Can f 1 (45).

Can f 2

Can f 2 est également un membre de la famille des lipocalines, elle a un poids moléculaire qui varie de 24 à 27 kD et tout comme Can f 1, elle a été purifiée en 1991 (45) (46). Cette protéine est trouvée dans la salive des chiens et notamment au niveau des glandes parotides (42) (47). Can f 2 est considéré comme étant un allergène mineur, en effet, seul 23% des patients allergiques au chien ont des IgE spécifiques dirigés contre cet allergène (45).

Can f 3

Une troisième source allergénique présente chez le chien est Can f 3. Cet allergène est une albumine sérique de 69 kD. Can f 3 est considéré comme un allergène mineur, puisque 35 à 40% des sujets allergiques ont des IgE dirigés contre ce dernier (48) (49), et il montre une forte réactivité croisée avec d'autres albumines de mammifères (50). Can f 3 est trouvé à la fois dans les squames, la salive, l'urine et le sang (38).

Can f 4

Can f 4 est une lipocaline de 16kD principalement trouvé dans la salive et les squames cutanées des chiens. Mattsson et al, purifie cette protéine à partir de squames de chien en 2010, puis produit une protéine recombinante de Can f 4 afin d'étudier ces caractéristiques immunologiques. Can f 4 est également un allergène mineur, 35% des patients présentent des IgE spécifiques. Can f 4 a été montré pour avoir une réaction croisée avec une protéine isolée de squames de vache, suggérant un possible lien entre les allergies aux chiens et aux bovins (51).

Can f 5

Plus récemment, a été découvert un nouvel allergène de chien, Can f 5. Ce dernier est une kallikréine prostatique identifié dans l'urine des chiens mais peut également être trouvé sur la peau (poils, fourrures). Cette protéine de 28kD est un allergène majeur, puisque 70% des

allergiques au chien ont des IgE spécifiques à Can f 5. Une réactivité croisée est également observée entre cette kallicréine et les Antigènes Prostatiques Spécifiques (PSA) humains (52).

Can f 6

Can f 6 est une lipocaline de 27 à 29kD, elle est produite dans les glandes sous-maxillaires et est détectée dans les squames (53). Parmi les patients sensibilisés au chien, 38% possèdent des IgE spécifiques de Can f 6, le qualifiant ainsi d'allergène mineur. De plus, Can f 6 présente 67 et 55% d'homologie de séquence avec Fel d 4 et Equ c 1, les allergènes majeurs du chat et du cheval, respectivement. Ces données suggèrent une réaction croisée entre ces trois espèces (54).

Can f 7

Ce dernier allergène a été découvert en 2015. On parle de protéine de type C2 Niemann Pick, appartenant à la famille MD-2 related lipid recognition. C'est une protéine de 16kD et la prévalence de sensibilisation à Can f 7 est de 10 à 20%, faisant de cette protéine, un allergène mineur (55).

Can f 8

Ce dernier allergène de 14kD a été découvert en 2019. Il s'agit d'une cystatine, marqueur de la filtration glomérulaire du rein. Quinze des 113 patients ont des IgE contre cette protéine allergisante, soit 13% des patients allergiques. Cette cystatine peut être trouvée dans la peau et sur la fourrure des chiens (Christiane Hilger, Department of Infection and Immunity, données non publiées, Luxembourg).

3. Molécules d'intérêt de notre étude dans l'asthme allergique sévère

a. Les cytokines de type Th17

Un type de cellules T effectrices, distinct des Th1 et des Th2 a été identifié et appelé les Th17, défini par la production de la cytokine IL-17 (56). Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les pathogènes, mais peuvent aussi induire une inflammation pathologique bronchique. La famille de l'IL-17 comprend six membres, allant de l'IL-17A à l'IL-17F. La première cytokine identifiée est CTLA8 en 1993 renommée IL-17A (aussi appelé IL-17) en 1995. Les cytokines IL-17 les mieux caractérisées sont l'IL-17 et l'IL-17F qui présentent 50% d'homologie. Ces cytokines sont sécrétées soit sous la forme d'homodimères, IL-17 et IL-17F, ou sous la forme d'hétérodimères IL-17/IL-17F. Les IL-17 agissent par leur liaison à

des récepteurs qui sont au nombre de cinq (de l'IL-17RA à l'IL-17RE). L'IL-17 et l'IL-17F se lient au même récepteur qui est formé par deux sous-unités d'IL-17RA et une sous-unité d'IL-17RC. Ces deux sous unités sont exprimées au niveau des cellules Th17, des CD8, des cellules $T\gamma\delta$, des cellules Natural Killer (NK) et NKT. La source cellulaire de l'IL-17 est variée. En effet, cette cytokine peut être produite par les CD4+, les CD8+, les $T\gamma\delta$, les ILC3, les NKs, les inducers NKT (iNKT) et les cellules inductrices de tissus lymphoïdes (LTi) (57) (58).

La polarisation des cellules Th17 murines à partir des lymphocytes T naïfs peut être induite par l'action combinée de l'IL-6 et du TGF- β . L'IL-6 induit l'expression du facteur de transcription STAT3 par les cellules T en présence de TGF- β . L'activation de STAT3, en présence de TGF- β , induit l'expression du facteur de transcription retinoic acid-related orphan receptor γ t (ROR γ t), qui se fixe au promoteur du gène de l'*Il-17* et induit son expression (59). ROR γ t a ainsi été identifié comme un facteur de transcription spécifique pour la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules Th17. L'IL-23, produit par les CD, participe à la survie et la croissance des Th17 qui expriment son récepteur (IL-23R) sous l'action combinée de l'IL-6 et du TGF- β . Ainsi l'IL-23 n'influence pas la différenciation vers un profil Th17, mais joue un rôle régulateur essentiel dans la stabilisation des lignées Th17. Enfin, l'IL-21, produit de façon autocrine par les Th17, est capable d'induire la polarisation Th17 en présence de TGF- β et pourrait ainsi avoir un rôle d'auto-amplification (59). Chez l'homme, le rôle des cytokines impliquées dans la différenciation Th17 n'est pas bien défini, avec des études suggérant l'intervention du cocktail TGF- β , IL-6, IL-23 et IL-1 β (60), alors que d'autres suggèrent que le rôle du TGF- β n'est pas essentiel et que l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-1 β suffisent au développement des Th17 à partir de cellules naïves (61) (figure 3).

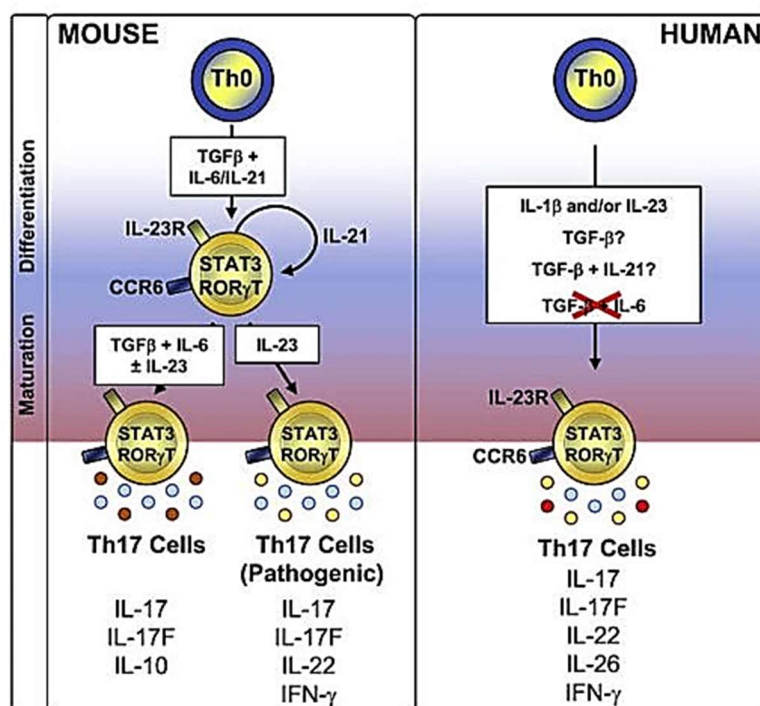


Figure 3 : Polarisation et maturation des cellules Th17 murines et humaines. Chez les souris, le TGF- β avec l'IL-6 et l'IL-21 conduisent à l'activation de STAT3 et à l'expression de ROR γ T et au récepteur de l'IL-23 (IL-23R). L'IL-23 assure le maintien des Th17. Chez l'homme, la polarisation des Th17 n'est pas bien définie avec un rôle du TGF- β controversé (Louten et al, 2009).

Dans le poumon, le rôle de l'IL-17 est controversé avec un rôle à la fois protecteur (défense de l'hôte) et néfaste (inflammation/fibrose). Chez la souris, une déficience en IL-17, favorise l'infection par *Staphylococcus aureus*, suggérant un rôle protecteur contre des pathogènes opportunistes (62). L'effet protecteur de l'IL-17 est aussi observé dans des modèles murins d'infection fongique où elle diminue la dissémination de *Cryptococcus neoformans* dans le cerveau et le sang (63). Par ailleurs, des souris déficientes en IL-23 infectées par *Streptococcus pneumoniae* échouent à produire de l'IL-17, ayant pour conséquence une charge bactérienne importante dans le poumon et dans le sang (64). Parallèlement, des études ont montré un rôle potentiellement pathologique des cellules Th17. Une augmentation de l'ARN messager (ARNm) de l'IL-17 est observée dans les cellules mononuclées de sang de patients souffrant de rhinite allergique (65). De récentes études impliquent les Th17 dans la physiopathologie de l'asthme. En effet, des données issues d'expérimentation animale *in vivo* chez le rat, montrent que l'IL-17 initie le recrutement et active les neutrophiles dans les voies aériennes, via la libération de chimiokines comme l'IL-8 (66). Chez l'homme, le nombre de cellules IL-17 positives et le niveau d'ARNm sont augmentés dans les biopsies bronchiques des asthmatiques modérés à sévères, et cette augmentation est associée à la sévérité de la pathologie (67). Pour finir, l'IL-17 participe au remodelage tissulaire en favorisant la

prolifération des CML. En effet, les CML expriment les récepteurs de l'IL-17, IL-17RA et IL-17RC, dont l'activation, par les cytokines Th17, a un effet anti-apoptotique et favorise donc la survie de ces cellules. *In vitro*, bloquer ces récepteurs diminue la capacité des cytokines Th17 à induire la prolifération des CML. L'action de l'IL-17 sur les cellules du muscle lisse dépend de la voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) (68). De plus, l'IL-17 pourrait participer à l'hyperplasie des cellules caliciformes et à la production de mucus, comme cela a été montré dans la polypose naso-sinusienne avec une corrélation entre l'expression d'IL-17, de MUC5AC, et l'hyperplasie des cellules caliciformes (69). Dans un modèle d'asthme expérimental induit par l'acarien, bloquer la différenciation et l'activation des cellules Th17 au moment de la sensibilisation, diminue le recrutement des cellules au niveau du poumon, notamment les éosinophiles et les neutrophiles, et diminue la production de mucus par les cellules caliciformes (70). De nouveau, dans un modèle induit par l'acarien, une déficience soit au niveau de l'IL-17RA ou en IL-17 ou en IL-17F, suffit à atténuer l'asthme allergique avec une diminution du recrutement des éosinophiles, des neutrophiles, mais aussi une diminution de l'hyperréactivité bronchique.

La neutralisation de l'IL-17 et de l'IL-17F dès la sensibilisation atténue également ces mêmes paramètres, mais le blocage de ces cytokines seulement pendant la phase de provocation ne diminue pas l'hyperréactivité bronchique, suggérant un rôle de l'IL-17 dans l'initiation de la réponse allergique (71). En effet, dans un modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine, l'administration d'IL-17 durant les provocations allergéniques, diminue l'hyperréactivité et le recrutement des éosinophiles comparé aux souris recevant seulement l'ovalbumine (72). En revanche, des résultats contradictoires sont obtenus, dans un modèle d'asthme chronique expérimental induit par l'ovalbumine, où la neutralisation de l'IL-17 au moment des provocations suffit à diminuer l'hyperréactivité, le recrutement des cellules et les marqueurs du remodelage comme les fibres de collagène (73). Dans des modèles expérimentaux d'inflammation pulmonaire induit par l'ovalbumine ou par l'acarien, les cytokines Th17 favorisent, non seulement le recrutement de neutrophiles au niveau du poumon (74) (75), l'hyperréactivité des voies aériennes (75) (76) et le remodelage bronchique avec notamment un dépôt de collagène et un marquage accentué de l'alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) (77). De plus, dans ces mêmes modèles expérimentaux, les cytokines Th17 ne répondent pas aux corticoïdes, comme le dexaméthasone (74). Chez l'homme aussi, le niveau d'IL-17 dans les expectorations induites corrèle positivement avec le degrés d'hyperréactivité (78), et une résistance aux dexaméthasone est également observée chez les patients asthmatiques présentant un profil de réponse Th17 (79).

L'IL-22 est une deuxième cytokine majeure des Th17, qui pourrait jouer un rôle dans l'inflammation pulmonaire de patients souffrant d'asthme sévère (65). Cette cytokine, découverte en 2000, appartient à la famille de l'IL-10, et est produite par plusieurs types de cellules. Les cellules T $\alpha\beta$ incluant les CD4+, les Th22, les CD8+, les cellules T $\gamma\delta$, les ILC3 dont les LTi, les cellules NK, et les NKT. Bien que l'IL-22 soit produite en grande partie par des cellules lymphoïdes, il a également été montré que l'IL-22 est produite par les mastocytes (80), les macrophages et les neutrophiles lors de dommages pulmonaires (81).

L'IL-22 agit par un récepteur dimérique : l'IL-10R β 2 (IL-10R2 ou CRF2-4) et l'IL-22Ra1 (IL-22R1 ou CRF2-9) (82). Ces deux sous-unités contiennent un domaine intra-cellulaire, transmembranaire et extra-cellulaire, où le domaine intra-cellulaire de l'IL-22Ra1 est plus long que celui de l'IL-10R β 2. Les domaines extra-cellulaires de ces deux sous-unités forment deux domaines en tandem : un domaine N-terminal D1 et un domaine C-terminal D2 qui est positionné à proximité de la membrane cellulaire. D1 et D2 contiennent des sites de liaisons nécessaires à l'ancrage de l'IL-22 (83) (84). L'IL-22 a une affinité plus forte pour la sous-unité IL-22Ra1 que pour la sous-unité IL-10R β 2. Ainsi, l'IL-22 va d'abord se lier au domaine extra-cellulaire de l'IL-22Ra1 entraînant un changement conformationnel de la cytokine permettant au complexe de se lier à l'IL-10R β 2, et ainsi former un récepteur de haute affinité pour l'IL-22 (85). La voie de signalisation de l'IL-22 passe par les composants JAK1 (Janus kinase 1), TYK2 (Tyrosine kinase 2), et STAT, situés au niveau des domaines cytoplasmiques de l'IL-22Ra1 et l'IL-10R β 2 (86) (figure 4). Contrairement à la sous-unité IL-10R β 2, l'IL-22Ra1 est exprimé exclusivement sur les cellules non hématopoïétiques incluant les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les myofibroblastes/CML (87) (88).

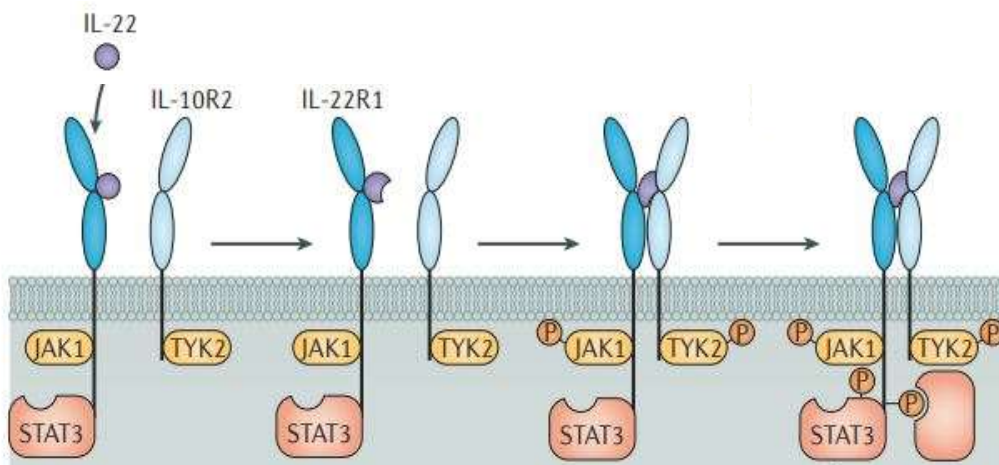


Figure 4 : Représentation de l'interaction entre l'IL-22 et les domaines extra-cellulaires de l'IL-22Ra1 et l'IL-10R β 2. L'IL-22 se lie à la sous-unité IL-22Ra1 (IL-22R1) avec qui elle a une affinité plus forte, puis le complexe IL-22Ra1-IL-22 se lie à l'IL-10R β 2 (IL-10R2) pour former un récepteur de haute affinité pour l'IL-22. La liaison de l'IL-22 à ses deux sous-unités entraîne la phosphorylation de JAK1 et TYK2 aboutissant à la phosphorylation de STAT3, notamment (Sabat et al, 2014).

Le rôle de cette cytokine est clairement identifié dans plusieurs organes et son effet dépend de sa localisation tissulaire. En effet, l'IL-22 a des propriétés anti-infectieuses notamment dans le tractus intestinal où elle favorise une immunité antibactérienne contre *Citrobacter rodentium* (89). Au niveau des kératinocytes, l'IL-22 induit une production de peptides anti-microbiens servant à protéger des infections cutanées. Cette cytokine peut également induire l'expression de métalloprotéines, nécessaires à la migration des cellules épithéliales lors de réparations tissulaires (90). Dans l'asthme, des études *in vitro* ont montré que l'IL-22 associée au TGF- β , favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) de cellules épithéliales issues de biopsies bronchiques de patients asthmatiques (voir section remodelage bronchique) (91). De plus, cette cytokine joue un rôle dans la migration et la prolifération des CML humaines (68) (92). Ces deux phénomènes jouent un rôle crucial dans le remodelage bronchique qui est augmenté dans l'asthme sévère.

Il a été montré, *ex vivo*, que l'IL-22 est augmentée dans le sérum de patients asthmatiques, et que l'expression d'ARNm de l'IL-22 est augmentée dans les cellules mononuclées du sang de patients asthmatiques sévères par rapport aux patients souffrant d'asthme modéré (65) (93). *In vivo*, des études contradictoires indiquent un double rôle de l'IL-22 pouvant être soit délétère, soit protecteur. Un modèle expérimental d'asthme allergique induit par *Aspergillus fumigatus*, montre que l'IL-22 contribue à l'inflammation pulmonaire en favorisant l'obstruction des voies aériennes, et que l'absence d'IL-22 atténue les réponses inflammatoires, la production de mucus et la résistance pulmonaire (94). De même, dans un modèle expérimental d'asthme allergique induit par l'ovalbumine, la neutralisation de l'IL-22 durant la phase de sensibilisation diminue les réponses inflammatoires. En revanche, dans ce même modèle, la neutralisation de l'IL-22 durant la phase de provocation allergénique, exacerbe l'inflammation ainsi que la production des cytokines Th2 et des alarmines (93). D'autres études réalisées avec ce même allergène, montrent que la neutralisation de l'IL-22 avant la provocation allergénique, favorise le recrutement des éosinophiles, l'hyperplasie des cellules caliciformes et l'hyperréactivité bronchique en réponse à l'acétylcholine (95). L'administration de l'IL-22 recombinant avant les provocations allergéniques, réduit l'obstruction des voies aériennes en diminuant significativement le recrutement des éosinophiles (95). Des souris ayant reçu une injection de CD stimulées avec de l'ovalbumine et de l'IL-22, induisent significativement moins de CCL17 dans le poumon et ont moins d'éosinophiles recrutés comparé aux CD stimulées avec l'ovalbumine seul (96). Plus récemment, dans un modèle d'asthme expérimental induit par l'acarien, il a été montré que le rôle bénéfique de l'IL-22 sur la réponse allergique passe par l'induction de Reg3 γ . La neutralisation de ces deux médiateurs est associée à une augmentation, de la réponse inflammatoire allergique, de la réponse humorale et une augmentation de l'hyperréactivité bronchique (97).

Enfin, il a également été montré que l'IL-22 est capable d'orchestrer une réponse antivirale, en favorisant le recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection par l'intermédiaire de chimiokines, comme CXCL1 (KC) (98). L'IL-22 répond à d'autres pathogènes en étant induite en réponse aux agents infectieux, comme *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, le virus respiratoire syncytial (VRS) ou encore les rhinovirus. À terme, ces infections de la petite enfance augmentent le risque de développer un asthme tardif (99) (100). Au final, si l'IL-22 a un rôle bénéfique dans la réparation tissulaire au décours d'une agression bronchique, elle pourrait agir de façon néfaste dans l'asthme sévère par un processus de réparation excessif ou inapproprié menant à un remodelage bronchique.

b. L'Aryl hydrocarbon receptor (AhR)

L'AhR, est un facteur de transcription hautement conservé qui régule l'expression de nombreux gènes. L'ensemble des tissus humains expriment l'AhR et particulièrement le tissu pulmonaire. Son activation se fait suite à sa liaison avec ses différents ligands. Dans sa forme inactive, l'AhR est couplé à des molécules chaperonnes comme la Heat Shock Protein (HSP) 90, la co-chaperone p23 et la protéine kinase SRC. Ce complexe, AhR/chaperones stabilise l'AhR dans le cytoplasme lui permettant de garder sa conformation de haute affinité pour ses ligands. Une fois le ligand lié à l'AhR, les molécules chaperonnes libèrent le récepteur AhR qui est ensuite transporté dans le noyau de la cellule. Là, l'AhR se lie avec l'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) pour former un hétérodimère. Cet hétérodimère régule l'expression des gènes en se liant à l'ADN au niveau des éléments de réponse de l'AhR : xénobiotiques (XRE) ou dioxin (DRE). Ces éléments de réponse ont en commun un motif d'ADN du type : 5'GCGTC 3'. Parmi les gènes régulés par l'AhR, on trouve le 1^{er} et le 2^{ème} membre de la sous famille A du cytochrome P450 : le *CYP1A1* et le *CYP1A2*, respectivement. Ainsi que le 1^{er} membre de la sous famille B du cytochrome P450, le *CYP1B1*, la polymérase *TIRAP* et l'*AHRR* qui est le régulateur négatif de l'AhR via une étape de rétro régulation. Il est supposé, que le profil de régulation de l'expression des gènes soit dépendant du type de ligand de l'AhR (figure 5) (101).

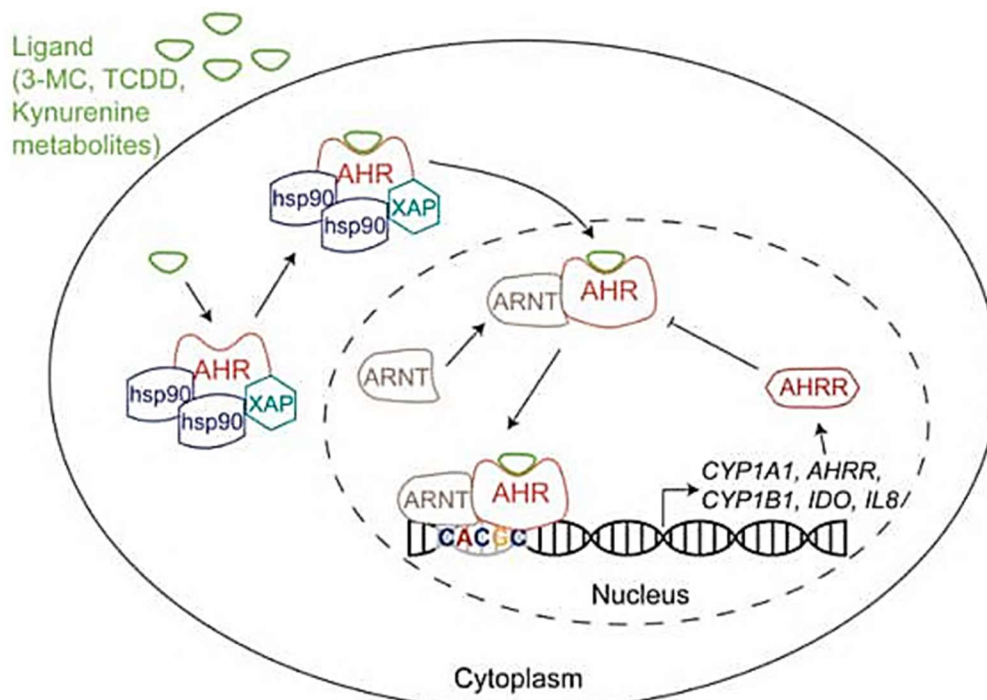


Figure 5 : Mécanisme d'action de l'Aryl hydrocarbon receptor (AhR). La liaison de l'AhR à ses molécules chaperonnes lui permet de maintenir sa localisation dans le cytoplasme, et d'avoir une haute affinité pour ses ligands. Une fois la liaison avec les ligands, les chaperonnes se détachent et l'AhR migre dans le noyau où il se lie l'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). Ce complexe va alors se lier à l'ADN pour réguler l'expression de ces gènes (Neavin et al, 2018).

Les agonistes ou ligands de l'AhR sont classés en deux catégories. Les ligands xénobiotiques (substance étrangère présente dans un organisme vivant, souvent toxique) qui incluent les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les produits chimiques, et les ligands physiologiques non xénobiotiques qui sont des composants des aliments ou des métabolites (101) (102) (tableau 1).

Ligands de l'Ahr	Abréviation	Source
<u>Ligands xénobiotiques</u>		
<u>Synthétiques d'origine exogène</u>		
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	TCDD	Contaminant chimique
Benzo[a]pyrene	BaP	Combustion, cigarette
3-Methylcholanthrene	3-MC	Combustion
...		
<u>Ligands non xénobiotiques</u>		
<u>Métabolites naturels d'origine endogène</u>		
Kynurénine	KYN	Tryptophane
Tryptamine	TRYP	Tryptophane
Indole-3-acetic acid	IAA	Tryptophane, produits du microbiome
6-Formylindolo[3,2-b]carbazole	FICZ	Photo produits du tryptophane
...		
<u>Composants alimentaires naturels d'origine exogène</u>		
Indole-3-carbinole	I3C	Végétaux (brassicacées)
3,3'-diindolylmethane	DIM	Végétaux (brassicacées)

Tableau 1 : Liste non exhaustive des ligands de l'Aryl hydrocarbon receptor (AhR). Les ligands sont divisés en deux groupes, les ligands xénobiotiques ou toxiques d'origine exogène et les ligands non xénobiotiques naturels d'origine exogène ou endogène (adapté de Neavin et al, 2018 et Rothhammer et al, 2019).

D'après ces études, le rôle de l'Ahr est essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ce facteur de transcription est impliqué dans la différenciation des cellules T régulatrices (Treg) chez l'homme et chez la souris. En effet, des cellules T CD4+, isolées à partir de cellules mononuclées de sang humain, traitées avec du TCDD (ligand exogène de l'Ahr) présentent un profil de cellules régulatrices avec l'expression génique du facteur de transcription *FOXP3* et une production augmentée d'*IL-10* (103). Chez l'homme et la souris notamment, il a été montré que le gène de *FOXP3* a des domaines de liaison à l'Ahr conservés (CABS) et non conservés (NCABS) au cours de l'évolution, et que le traitement de cellules T CD4+ avec du TCDD favorise la liaison de l'Ahr à ces domaines, permettant la modulation de l'expression de Foxp3. Par ailleurs, le TCDD convertit environ 13% de cellules T CD4+ vers un profil Treg CD4+ Foxp3+. Dans un modèle d'encéphalomyélite expérimentale induit par le MOG 35-55 (myelin oligodendrocyte peptide 35-55), le TCDD diminue les signes cliniques et histologiques de la maladie, et, cette diminution est la conséquence de l'activation de l'Ahr par le TCDD, aboutissant à une augmentation du nombre de cellules Treg Foxp3+. Dans ce même modèle d'encéphalomyélite induit par du TCDD, des souris portant l'allèle *d* du gène de l'*Ahr* (qui diminue la liaison avec ces ligands), n'ont pas d'augmentation du niveau de cellules T CD4+ Foxp3+ et, n'ont pas de diminution du développement de la maladie. Ainsi, le TCDD active l'Ahr aboutissant à un profil T régulateur, et ces cellules exercent une activité suppressive dans l'encéphalomyélite (104).

L'Ahr est un facteur dont l'expression est également trouvée dans les cellules B et les cellules B régulatrices (Breg). Son expression peut être induite suite à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) et l'engagement du récepteur des cellules B (BCR). Récemment, une étude a montré qu'*in vivo*, chez la souris, l'Ahr régule négativement la différenciation des plasmocytes sécrétant des anticorps, en relation avec une diminution du switch isotypique (105). De plus, des cellules B murines stimulées pour induire l'expression de l'Ahr sont capables de se différencier en cellules Breg qui produisent de l'IL-10. Plus l'Ahr est activé, plus la production d'IL-10 par les Breg est importante. Des souris déficientes en Ahr spécifiquement dans les cellules B, développent une forme plus sévère d'arthrite comparé aux souris contrôles, avec une perte du profil régulateur compensé par un profil inflammatoire Th1 et Th17 (106). Les cellules souches mésenchymateuses sont à l'origine de la lymphopoïèse des cellules B, puisqu'elles induisent la croissance et la différenciation de ces cellules. Or, lorsque des cellules de moelle osseuse murines sont co-cultivées avec des agonistes de l'Ahr, l'apoptose des cellules pré-B, régulée par CYP1A1, est observée (107) (108). De même, une co-culture de cellules hématopoïétiques humaines et de cellules stromales humaines stimulée par le TCDD, impacte la lymphopoïèse des cellules B (109). En présence d'un antagoniste de l'Ahr, l' α -naphthoflavone, l'apoptose des cellules pré-B est abolie (107).

La différenciation des cellules Th17 nécessite des cytokines comme le TGF- β , l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-1 β . Le FICZ (ligands endogène, dérivé du tryptophane), en association avec ces cytokines, induit le développement des cellules Th17 *in vitro* et ce profil est bloqué par l'ajout d'un antagoniste de l'Ahr (104). Sous des conditions induisant un profil Th17 (ajout de cytokines), des cellules T CD4⁺ murines traitées avec du FICZ, augmentent la production d'IL-17A, d'IL-17F et augmentent aussi le nombre de cellules produisant de l'IL-22. Des résultats similaires sont observés chez l'homme, où l'activation de l'Ahr par le β -naphthoflavone aboutit à l'augmentation de l'ARNm de l'IL-17A, IL-17F, IL-22 et de CYP1A1 (traduit l'activation de l'Ahr). De nouveau, dans un modèle d'encéphalomyélite expérimental induit par le MOG avec un traitement par le FICZ, une augmentation des cellules T CD4⁺ produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 est observée dans les souris Wild Type (WT). Alors que la production de ces cytokines par ces cellules est réduite, voire même abrogée pour l'IL-22 dans les souris déficientes pour l'Ahr. Ces résultats suggèrent que le FICZ active l'Ahr et oriente vers un profil inflammatoire avec le développement de cellules Th17, qui favorisent le développement de pathologies comme l'encéphalite (110). Bien que les ligands exogènes de l'Ahr, comme le TCDD, soit associé avec un profil T régulateur, une étude a montré que le FICZ, dans un modèle de fibrose induit par la bléomycine, pouvait aussi orchestrer une réponse régulatrice avec une augmentation de cellules CD4⁺ Foxp3⁺. Cette réponse diminue la destruction du tissu pulmonaire mais également le dépôt de collagène soluble dans le poumon (111).

Chez l'homme, il a été montré que l'activation de l'Ahr favorisait la production d'IL-22 mais diminuait la production de l'IL-17. Le niveau d'expression de ROR γ t et de l'Ahr est élevé dans les Th17, mais la production de l'IL-17 reste dépendante de son facteur de transcription ROR γ t et la production d'IL-22 est, elle, régulée par l'Ahr. En effet, des cellules T CD4⁺ humaines traitées avec un small interfering ARN (siARN) spécifique de l'Ahr, diminue de 40% la sécrétion de l'IL-22 alors que la production d'IL-17 n'est pas affectée. Des cellules T CD4⁺, isolées à partir de sang de cordon ombilical, et stimulées sous des conditions Th17 en présence d'agonistes de l'Ahr montrent un fort pourcentage de cellules IL-22⁺ mais un faible pourcentage de cellules IL-17⁺ (112). Un antagoniste de l'Ahr, le CH-223191, inverse ce phénomène en provoquant une production d'IL-17 et en diminuant la production de l'IL-22 dans les cellules T CD4⁺ humaines traitées au TCDD (113).

Tout comme l'IL-22, le rôle de l'Ahr peut être bénéfique, ou au contraire, délétère dans les pathologies immunes et inflammatoires. En effet, l'Ahr induit des réponses anti-inflammatoires avec une production d'IL-10 et de reactive oxygen species (ROS) pour lutter contre *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* ou encore l'herpès virus simplex. Au niveau intestinal, l'Ahr est impliqué dans les interactions entre le microbiome et l'intestin de l'hôte, et maintient l'intégrité de la barrière épithéliale. Dans le cas des colites ulcérales, une déficience de l'Ahr contribue à la sévérité de la maladie. Concernant les pathologies cutanées, un traitement par un agoniste de l'Ahr (FICZ) diminue le développement du psoriasis, ainsi que l'expression des gènes pro-inflammatoires associés à cette pathologie. Enfin, au niveau pulmonaire, l'activation de ce facteur de transcription par une exposition chronique à l'ozone semble protéger contre l'inflammation, l'hyperréactivité et le remodelage tissulaire (114). Cependant, il est essentiel, de noter que l'effet de l'Ahr sur ces pathologies, dépend de son ligand. En effet, dans le cas de l'herpès virus simplex, le TCDD protège de l'infection, alors que le FICZ ne montre pas la même efficacité (101).

Le rôle de l'Ahr a aussi été fortement étudié dans des pathologies asthmatiques/allergiques. Les cellules mononuclées de sang de patients asthmatiques ont une augmentation du niveau de RORC et de CYP1A1, reflétant l'activité de l'Ahr, comparés aux patients non asthmatiques (115). Des cellules épithéliales bronchiques humaines stimulées avec du TCDD, favorisent l'expression de l'IL-8 via l'activation de l'Ahr. Cette cytokine est connue pour son effet chimioattractant sur les neutrophiles provoquant leur migration tissulaire (116). D'autres études montrent la potentielle implication de l'Ahr dans l'asthme. Dans des modèles expérimentaux induit par l'ovalbumine, l'activation de l'Ahr dès la phase de sensibilisation allergénique, oriente vers un profil anti-inflammatoire avec une diminution de la réponse humorale, de l'éosinophilie pulmonaire et de la production de cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-5 (117) (118). Ces observations sont confirmées dans un autre modèle, où des souris

déficientes en AhR et sensibilisées à l'ovalbumine, développent une inflammation pulmonaire plus importante par rapport aux souris contrôles. *In vitro*, des CD stimulées par le LPS et issues de souris déficientes en AhR, induisent une plus grande production d'IL-6 et de TNF- α favorisant la différenciation des cellules Th2 inflammatoires, comparé aux CD de souris contrôles (119). Enfin, une étude montre que l'activation de l'AhR par le TCDD protège de l'inflammation pulmonaire, grâce au recrutement de cellules souches mésenchymateuses dans le poumon, dans un modèle d'inflammation allergique induit par le cafard (120). A l'inverse, des études expérimentales montrent qu'une co-sensibilisation avec un allergène et des particules de diesel (ligand xénobiotique de l'AhR) augmente drastiquement les réponses allergiques avec un profil mixte Th2/Th17 (121) (122). De même, les enfants asthmatiques qui sont fortement exposés aux particules de diesel, ont un niveau d'IL-17 élevé dans le sérum par rapport aux enfants faiblement exposés aux particules (121). L'activation de l'AhR par les particules de diesel favorise l'inflammation allergique induit par l'ovalbumine, dans une voie dépendante de Notch. Des souris déficientes en AhR au niveau des CD et co-sensibilisées avec de l'ovalbumine et des particules de diesel, ont une inflammation allergique réduite comparé aux souris exprimant l'AhR (123). Ces études mettent en avant le rôle pro-inflammatoire de l'AhR dans l'inflammation allergique.

Plusieurs études ont aussi évoqué le rôle de l'AhR dans la production de mucus. *In vivo* et *in vitro*, dans une lignée cellulaire humaine, une injection de TCDD provoque une augmentation de la production de la mucine *MUC5AC* (124) et un traitement par le benzo-a-pyrène induit le même effet sur *MUC5AC* mais ne modifie pas la production de *MUC5B*. Une étude révèle le rôle des ROS dans la sur-production de mucines au niveau des cellules épithéliales bronchiques. En effet, un traitement par le benzo-a-pyrène augmente la synthèse des ROS partiellement associée à la production de *MUC5AC* (125). Une explication proposée sur cette augmentation de mucines, serait que les cellules de Clara se différencient en cellules caliciformes sous l'effet des agonistes de l'AhR. En effet, après traitement de cellules dérivées de cellules de Clara avec du TCDD, une diminution de leur marqueur, le CCSP (CC10), est observée, suggérant une perte du phénotype des cellules de Clara pour un phénotype de cellules caliciformes (124).

Pour finir, l'AhR affecte l'expression des molécules d'adhésion. Des cellules épithéliales mammaires de souris gestantes exposées au TCDD montrent une diminution d'expression de la E-cadhérine (126). La perte de la E-cadhérine est observée dans la TEM, phénomène également impliqué dans le remodelage bronchique dans l'asthme. L'ensemble de ces études évoquent le rôle que peut jouer l'AhR dans la réponse immunitaire associé à l'asthme et au remodelage bronchique.

c. Un récepteur de l'immunité innée : NOD2

Parmi les infections de la petite enfance, certaines sont associées au développement de l'asthme, dans les six premières années de vie de l'enfant (99) (100). Parmi ces agents infectieux, *Streptococcus pneumoniae* est notamment reconnu par un récepteur appartenant à la famille des NOD like receptors (NLRs). Les NLRs sont des récepteurs intra-cellulaires reconnaissant des motifs présents sur la paroi des pathogènes. La famille des NLRs est constituée de deux récepteurs nommés Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) 1 et NOD2. NOD2 est majoritairement exprimé par les cellules épithéliales et les CD mais également par les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages (127) (128). Le récepteur est constitué de trois domaines fonctionnels, le domaine de reconnaissance du ligand *leucine rich repeats* (LRR), un domaine de liaison des nucléotides *nucleotide binding domain* (NBD) et un domaine permettant les interactions protéines-protéines *caspase-activating and recruitment domain* (CARD) (127) (128). NOD2 a la particularité de posséder deux domaines CARD, contrairement à NOD1 qui n'en possède qu'un seul (figure 6).

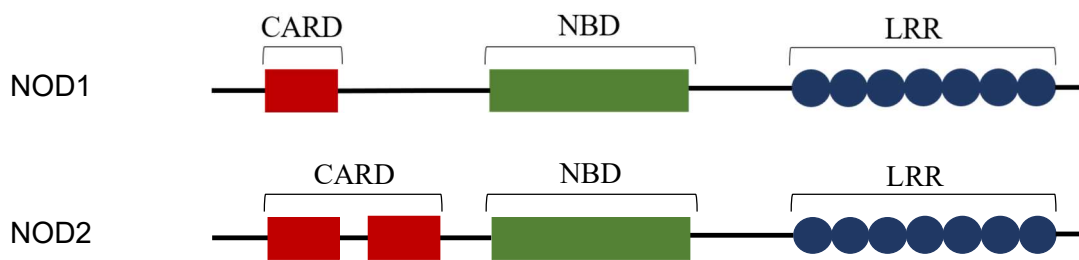


Figure 6 : Représentation de la structure tripartite du récepteur NOD1 et NOD2. LRR: Leucine Rich Repeats. NBD: Nucleotide Binding Domaine. CARD: Caspase-Activating and Recruitment Domain (adapté de Philpott et al, 2014).

NOD2 est capable de reconnaître un peptidoglycane de la paroi bactérienne : le muramyl dipeptide (MDP), retrouvé chez les bactéries Gram+, comme *Streptococcus pneumoniae* et les bactéries Gram- (128). NOD2 intervient comme adjuvant de la réponse immune adaptative Th2 lors de l'immunisation allergénique par voie systémique à l'ovalbumine (129). De plus chez l'homme, la combinaison du MDP et différents agonistes des Toll Like Receptors (TLRs) augmente la production d'IL-23 et d'IL-1 α et β par les CD, qui oriente la production d'IL-17 par les cellules T mémoires (130). NOD2 orchestre également une réponse Th17 lors de pathologies infectieuses de l'intestin provoquée par *Citrobacter* et *Salmonella* (131). Par ailleurs, des polymorphismes génétiques de NOD2 ont été identifiés dans l'asthme (132) et les allergies (133). Le gène qui code pour le récepteur NOD2, *CARD15*, est localisé sur le chromosome 16q12, et des substitutions d'acides aminés au niveau des exons 8 et 12

(localisés au niveau du domaine LRR) entraînent une augmentation du niveau d'IgE dans le sérum et favorise le risque de développer de l'asthme, respectivement.

II. Le remodelage bronchique

Le terme « remodelage bronchique », se définit comme des anomalies structurales des voies aériennes aboutissant à l'épaississement ascendant de la paroi des bronches. Le remodelage consiste en l'accumulation de cellules dysfonctionnelles, en rapport avec des processus de métaplasie (transformation d'un tissu en un autre), d'hypertrophie (augmentation de la taille des cellules) et d'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules) des cellules de structures. Malgré la prise en charge thérapeutique des patients asthmatiques, certains répondent mal aux traitements avec une inflammation et des symptômes persistants, voire quelques fois une obstruction bronchique irréversible des voies aériennes (figure 7).

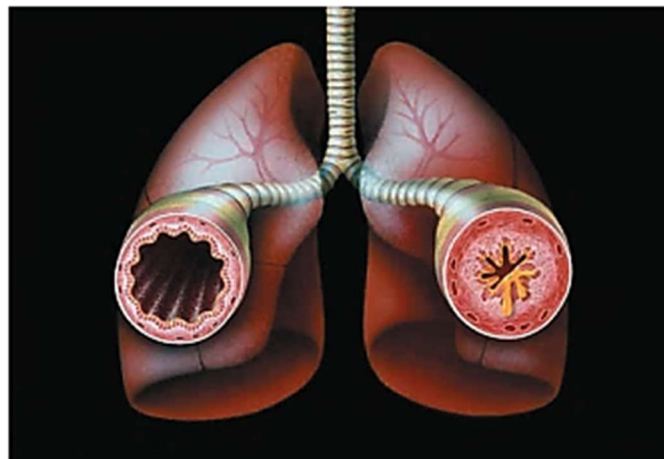


Figure 7 : Représentation d'une bronche de patient non asthmatique (à gauche) et asthmatique (à droite). L'obstruction bronchique est provoquée par un épaississement de la paroi des voies aériennes, avec une inflammation chronique et un remodelage tissulaire. Cela marque une diminution de la lumière bronchique associé à une diminution du passage de l'air (Peter K, 2001).

Le remodelage bronchique est décrit pour la première fois en 1922 par Hubert et Koessler suite à l'autopsie de 21 patients décédés d'asthme aigu grave. Ces premières études post-mortem, ont permis de découvrir les changements structuraux de la paroi bronchique qui, aujourd'hui, caractérisent le remodelage bronchique dans l'asthme (134). D'un point de vue histologique, le remodelage bronchique se caractérise par une desquamation de l'épithélium, une hypertrophie et une hyperplasie des CML, une hypersécrétion de mucus ainsi qu'un épaississement des fibres de collagène associé à une fibrose sous-épithéliale et à une augmentation des fibroblastes suite à la dédifférenciation des cellules épithéliales en cellules fibroblastiques (figure 8).

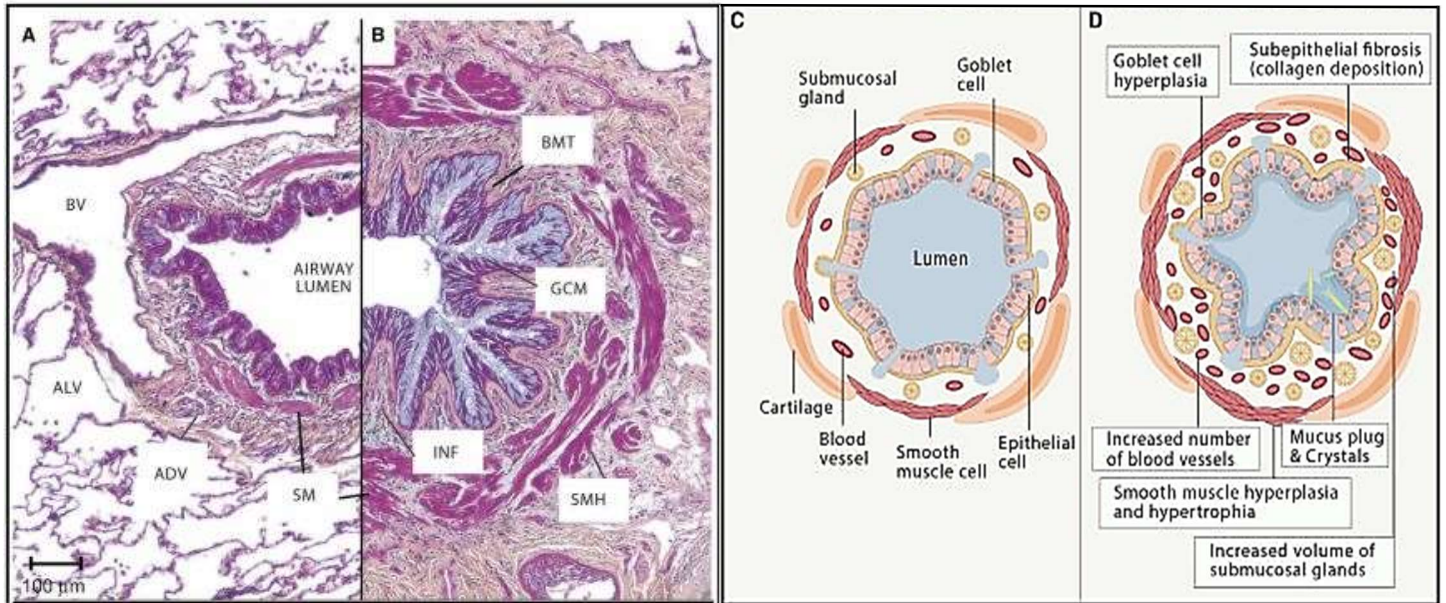


Figure 8 : Photographie et représentation histologique d'une bronche de patient non asthmatique (A et C) et d'un patient asthmatique sévère (B et D). Chez le patient asthmatique, la lumière de la bronche est réduite en raison de l'inflammation (INF), de l'augmentation de l'épaisseur de la membrane basale (BMT), de la prolifération du muscle lisse (SMH), de l'augmentation du nombre de vaisseaux (GCM) et des cellules à mucus. Chez le patient non asthmatique, ces critères sont absents, conséquence d'une structure bronchique aérée et non pathologique (Lambrecht et al, 2019).

1. Origine du remodelage bronchique

L'origine du développement du remodelage bronchique est multifactorielle. Le remodelage est entretenu par des lésions de l'épithélium bronchique, suivis de processus de réparation tissulaire anormalement effectués. L'explication proposée à cette anomalie de réparation est une apoptose accrue (processus physiologique de mort cellulaire qui est normalement régulé et nécessaire à la survie des organismes), s'accompagnant d'un défaut de prolifération des cellules de l'épithélium bronchique. Une fibrose sous-épithéliale est observée et s'accompagne d'un déséquilibre quantitatif entre les métalloprotéases matricielles (MMP), et leur inhibiteur endogène TIMP, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases. Le phénomène de fibrose est également associé à un déficit d'apoptose et à une prolifération excessive des fibroblastes et myofibroblastes. Ce même déséquilibre apoptose/prolifération, est observé au niveau des cellules du muscle lisse augmentant ainsi sa masse musculaire. A cela, s'ajoute une augmentation de la taille des glandes séro-muqueuses avec une sécrétion importante de mucus. Ces phénomènes sont la conséquence d'une hypertrophie, d'une hyperplasie et d'une métaplasie des cellules (figure 9) (135).

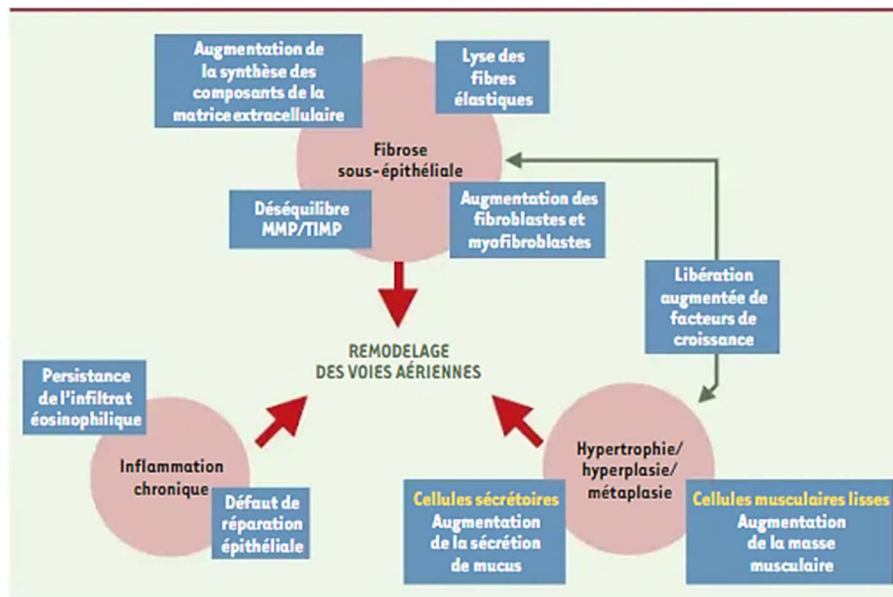


Figure 9 : Origines du remodelage bronchique. Trois principaux phénomènes participent au remodelage bronchique : l'inflammation chronique des bronches, une hypertrophie, hyperplasie et métaplasie du tissu et une fibrose sous-épithéliale. Ces phénomènes surviennent suite à des modifications fonctionnelles et morphologiques du tissu. MMP : métalloprotéinases matricielles, TIMP : Tissue Inhibitor of matrix Metalloproteinases (Benayoun et Pretolani, 2003).

2. Les caractéristiques du remodelage bronchique

Parmi les trois phénomènes qui caractérisent le remodelage des voies aériennes, à savoir l'inflammation chronique, l'hyperplasie/hypertrophie/métaplasie et la fibrose, le plus étudié est celui de la fibrose sous-épithéliale.

a. La fibrose sous-épithéliale

La fibrose sous-épithéliale est une modification structurale du tissu bronchique, caractérisée par l'augmentation des constituants de la matrice extra-cellulaire, l'accumulation des cellules de structures (fibroblastes, myofibroblastes) et la perte d'élasticité du tissu.

Dans l'ensemble des tissus qui constitue notre organisme, l'espace extra-cellulaire est occupé par la matrice extra-cellulaire qui joue un rôle essentiel dans le maintien tissulaire, mais aussi dans des processus physiologiques tels que la régulation des fonctions cellulaires, la différenciation et la prolifération. Cette matrice est constituée d'un réseau de molécules dont la composition évolue selon diverses situations (la croissance, la réparation/cicatrisation ou

bien encore, le remodelage). La matrice extra-cellulaire est constituée d'une association de trois types de macromolécules que sont :

- Les protéines fibreuses (collagène et élastine)
- Les glycoprotéines (fibronectine, lamine)
- Les protéoglycanes (l'acide hyaluronique)

La matrice extra-cellulaire est en constant renouvellement, assurant l'équilibre entre la synthèse et l'élimination de ces constituants. Dans le cas du remodelage bronchique, un défaut de cet équilibre est observé et devient alors pathologique, avec l'apparition d'une fibrose sous épithéliale. La fibrose sous-épithéliale se manifeste notamment par un dépôt de collagène, une augmentation des cellules mésenchymateuses et des métalloprotéases.

i. Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez l'homme, et parmi les glycoprotéines de la matrice, la plus abondante dans le poumon comprenant 6 à 20% du poids sec de l'organe (136). La famille des collagènes montre une diversité, tant sur leur distribution tissulaire, que sur leur fonction biologique et l'organisation moléculaire. Les différents types de collagène partagent une structure commune avec trois chaînes polypeptidiques α assemblées en triple hélice. Ces triples hélices polymérisent pour former le collagène. Le long de chaque chaîne α , un triplet de type « Glycine-Proline-X » (où X est souvent une hydroxyproline) est fréquemment répété. Chacun des différents types de collagène contient au moins, un domaine en triple hélice dans la matrice extracellulaire (figure 10) (137). Les différences observées entre les différents collagènes sont associées à la séquence en acides aminés, et notamment aux différents niveaux d'hydroxylation et de glycosylation des résidus de lysines et de prolines. Mais également à la présence de ponts disulfures et de liaisons covalentes. Aujourd'hui, on distingue 29 molécules de collagènes réparties en six groupes. Le collagène fibrillaire, le collagène associé aux fibrilles (FACITs), le collagène des membranes basales, le collagène à chaîne courte, le collagène transmembranaire et les multiplexines.

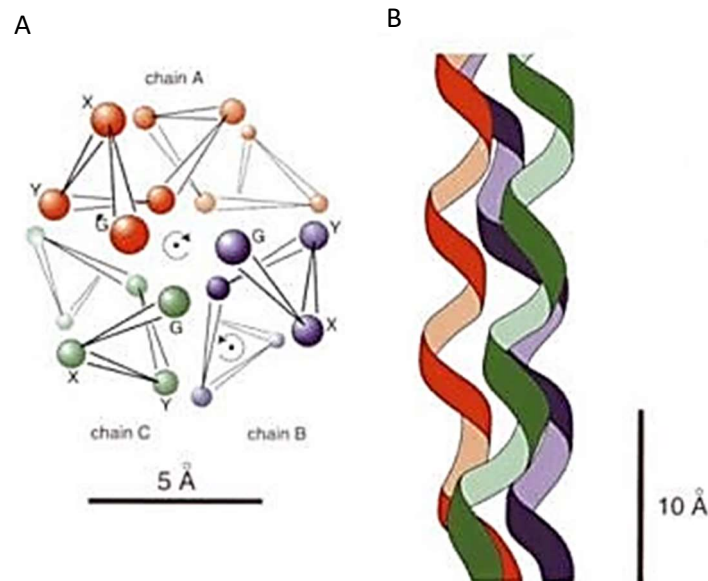


Figure 10 : Représentation de la structure du collagène : **A**, coupe transversale, **B**, coupe longitudinale. Les trois chaînes α s'assemblent pour former une triple hélice de collagène. Le triplet « G-X-Y » est répété le long de la chaîne α . G : glycine, X : proline et Y : hydroxyproline (adapté de Beck et Brodsky, 1998).

Le collagène fibrillaire comprend sept types différents de collagène : I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII. Ces collagènes sont composés d'une grande triple hélice continue (COL1), bordés par un domaine N et C-terminal appelés le propeptide N et C, respectivement. Le collagène associé aux fibrilles comprend lui, neuf types de collagène différent : IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI. Une caractéristique de ces collagènes est la succession de domaines en triple hélice interrompus, connectés à de courts domaines non collagènes et de taille variable. Les FACITs, sont généralement impliqués dans la stabilisation et l'intégrité de la matrice extracellulaire. Ensuite, les collagènes transmembranaires comprennent eux, quatre membres : XIII, XXIII, XXV et XVII. Ces types de collagènes sont des protéines transmembranaires de types II avec un domaine N-terminal intra-cellulaire, un domaine transmembranaire et une succession de domaines de collagène extra-cellulaires. Les collagènes des membranes basales avec trois collagènes : IV, VII et XXVIII. Les collagènes à chaînes courtes avec : VI, VIII, X et XXIX. Pour finir, les multiplexines contiennent deux types de collagène : XV et XVIII. Ils contiennent une multitude de domaines en triple hélice (neuf pour le XV et dix pour le XVIII). Leur fonction biologique est bien distincte, le type XV est trouvé dans le muscle, le XVIII dans les yeux (136) (138) (139).

Dans le remodelage bronchique, une augmentation du nombre de fibres de collagènes de types I et III a été observée. Le collagène de type III est fortement augmenté dans des biopsies de patients asthmatiques sévères comparés aux patients non asthmatiques. La synthèse de collagène est plus importante dans les formes sévères d'asthme comparés aux asthmes

intermittents ou modérés (140). Dans un modèle expérimental induit par l'ovalbumine, le procollagène de type I, qui est principalement distribué dans les cellules, et le procollagène de type III, présent autour des bronches, sont significativement augmentés après exposition à l'ovalbumine (141). De même, dans un autre modèle expérimental d'asthme induit par l'ovalbumine, la surface de collagène par membrane basale est significativement supérieure chez les souris sensibilisées comparé aux souris contrôles (142). Cette synthèse accrue de fibres de collagènes, s'explique par la prolifération des fibroblastes et myofibroblastes qui sont également des constituants de la matrice extra-cellulaire du tissu conjonctif. Une augmentation significative du nombre de fibroblastes est observée dans des biopsies de patients asthmatiques sévères, comparé aux sujets contrôles ou aux asthmatiques légers à modérés (140). Les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel dans ce processus. Dans l'asthme, lorsque l'épithélium bronchique est endommagé, les cellules épithéliales sécrètent différents facteurs de croissance fibrotique comme le TGF- β et le basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) qui induisent la prolifération des fibroblastes et des myofibroblastes (143). Les cellules épithéliales sont également capables de sécréter des protéines de stress comme les HSP, dont la HSP-60 qui induit l'expression d'une protéine arginine méthyltransférase 1 (PRTM 1), dans les fibroblastes augmentant leur prolifération (144). L'inhibition de l'activité de PRTM 1 diminue le dépôt de collagène de type I dans les CML de patients asthmatiques (145).

ii. Les métalloprotéases et leurs inhibiteurs

La fibrose est également associée à un déséquilibre des MMPs et de leurs inhibiteurs : les TIMPs. Les MMPs, sont des enzymes impliquées dans la protéolyse des composants de la matrice extra-cellulaire comme le collagène, la fibronectine ou encore la ténascine. L'activité enzymatique des MMPs dépend de l'atome de zinc situé dans le domaine catalytique des MMPs. La libération de cet atome de zinc, par clivage protéolytique, facilite l'activation du domaine catalytique des MMPs qui peuvent alors se lier à leurs substrats et les dégrader. Son expression est régulée par des inhibiteurs endogènes, les TIMPs, qui se lient au site catalytique des MMPs empêchant la libération de l'atome de zinc, et bloque ainsi la dégradation des composants de la matrice extra-cellulaire (146). Six classes de MMPs sont répertoriées en fonction de leur structure, parmi elles, les gélatinases MMP-2 et MMP-9, dirigées contre la dégradation du collagène dénaturé de type I, II et III de la matrice extra-cellulaire. La MMP-9 (ou gélatinase B) et son inhibiteur TIMP-1, sont faibles ou absents dans les tissus normaux, mais peuvent être induits en cas de remaniement tissulaire. En effet, leurs niveaux sont augmentés dans les expectorations de patients asthmatiques, mais également après un challenge allergénique (147) (148).

b. Hyperplasie, hypertrophie et métaplasie

L'hyperplasie, l'hypertrophie et la métaplasie sont le deuxième phénomène caractérisant le remodelage bronchique. Ce phénomène comprend le changement de structure des glandes muqueuses accompagné de la sécrétion de mucus et la prolifération du muscle lisse.

i. Le mucus

La muqueuse respiratoire comporte des cellules cylindriques mobiles appelées cellules caliciformes ou cellules en gobelet. Les cellules caliciformes, présentes dans l'épithélium et dans les glandes séro-muqueuses, sécrètent des glycoprotéines densément glycosylées et avec un haut poids moléculaire que l'on nomme les mucines (MUC). On distingue chez l'homme, 21 gènes qui codent pour des mucines divisées en 3 sous-groupes : les MUC associées aux membranes, les MUC sécrétées riches en cystéines (formant des gels) et les MUC sécrétées mais pauvres en cystéines. Parmi ces 21 gènes, 11 sont exprimés dans le poumon humain (tableau 1) (149) (150) et 3 mucines sont trouvées dans les sécrétions bronchiques (MUC2, MUC5AC et MUC5B). La sécrétion des mucines dépend de deux mécanismes. Une faible sécrétion mais de façon constitutive ou une sécrétion stimulée/accélérée par des stimuli et régulée par l'exocytose des granules à mucines. Dans le premier cas, l'ensemble des mucines sécrétées forme un gel de mucus qui tapisse l'épithélium. Le mucus qui est constitué à 95% d'eau apparaît visqueux et translucide. Dans le poumon il est la première barrière contre les irritants ou bien encore contre les agents infectieux. La synthèse continue de mucines assure un maintien du gel qui peut être éliminé par les mouvements péristaltiques, il participe donc au bon fonctionnement du poumon. En revanche, lors de pathologies telles que l'asthme, une surproduction de mucus est observée et conduit à un dépôt plus visqueux responsable de l'encombrement bronchique avec une gêne respiratoire. Les mucines sont libérées de façon accélérée à la surface apicale de la cellule caliciforme, soit par une libération des granules de mucines déjà stockées, soit par une libération de granules une par une. Les mucines sont alors exocytées et conduisent à la formation d'une cavité profonde au niveau de la membrane apicale (149) (151). Ainsi, une exocytose des mucines excessive et prolongée résulte dans une hypersécrétion de mucus.

Gènes humains codants pour les :	Distribution tissulaire
1. <u>Mucines associées aux membranes</u>	
<i>MUC1</i>	Poumon , rein, œsophage, pancréas...
<i>MUC4</i>	Poumon , reins, petit intestin...
<i>MUC11</i>	Poumon , thymus, colon, foie...
<i>MUC13</i>	Poumon , estomac, colon, rein...
<i>MUC20</i>	Poumon , foie, rein, placenta...
<i>MUC21</i>	Poumon , thymus, testicules...
2. <u>Mucines sécrétées riches en cystéines (formes des gels)</u>	
<i>MUC2</i>	Poumon , prostate, nasopharynx...
<i>MUC5AC</i>	Poumon , vésicule biliaire, estomac...
<i>MUC5B</i>	Poumon , glandes sous muqueuses, duodénum...
<i>MUC19</i>	Poumon , glandes salivaires, rein, foie...
3. <u>Mucines sécrétées pauvres en cystéines</u>	
<i>MUC7</i>	Poumon , nez, glandes lacrymales...

Tableau 2 : Gènes des mucines (MUC) humaines trouvées dans le poumon chez l'homme. Parmi 21 gènes de mucines exprimés chez l'homme, 11 sont exprimés dans le poumon. Les mucines sont divisées en trois groupes, les mucines associées aux membranes, les mucines sécrétées qui forment un gel protecteur au niveau de l'épithélium (riches en cystéines) et les mucines sécrétées mais pauvres en cystéines. Ces deux derniers groupes sont sécrétés par les cellules caliciformes aussi appelées les cellules en gobelet (adapté de Rogers, 2007 et Dharmani et al, 2009).

Le remodelage est associé à une augmentation du nombre de cellules caliciformes. Dans les asthmes sévères et fatals, une augmentation de trente fois le nombre de ces cellules a été remarquée. Bien que le mécanisme conduisant à l'augmentation des cellules caliciformes reste non élucidé, les mécanismes d'hyperplasie et de métaplasie ont été proposés (152). L'anormalité du nombre de ces cellules est accompagnée d'un changement d'expression des MUC. Chez les individus non asthmatiques comme chez les asthmatiques, MUC5AC est produit par les cellules caliciformes de l'épithélium de surface alors que MUC5B est produit par les glandes sous-muqueuses. Si MUC5B est la mucine prédominante dans les sécrétions de patients sains, chez les asthmatiques, sa concentration et son niveau ARNm sont diminués et la concentration de MUC5AC est augmentée (153). L'expression de ces deux mucines est

régulée par les cellules Th2 et les ILC2 qui produisent notamment de l'IL-13. L'IL-13 augmente la proportion de cellules positives pour MUC5AC *in vitro*, lors de la différenciation mucociliaire des cellules épithéliales des voies aériennes humaines (154). La stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par l'IL-13, augmente également la concentration de MUC5AC mais diminue la production de MUC5B (155). En plus de l'IL-13, l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), intervient dans la production de mucus. L'expression de l'ARNm de l'*EGFR* est observée chez les patients asthmatiques et cette expression est réduite chez les patients non asthmatiques. Une co-localisation de MUC5AC et de l'EGFR a été observée dans les cellules caliciformes, suggérant que l'activation de l'EGFR est impliquée dans l'expression des mucines (156). Un autre facteur, le Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) stimule l'angiogenèse dans l'asthme et favorise l'expression de MUC5AC *in vitro* dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (157). Des modèles expérimentaux d'asthme allergique chronique induit par l'ovalbumine, montrent une hyperplasie des cellules caliciformes s'associant avec une hypersécrétion de mucus (142) (158). Ainsi, dans le cas de l'asthme, l'expression de MUC5B est diminuée et celle de MUC5AC est surexprimée aboutissant à une production importante de mucus au niveau de l'épithélium. Le domaine extra-cellulaire de MUC5AC finit par s'attacher aux cellules caliciformes qui la produisent altérant la clairance muco-ciliaire. Le mucus s'accumule et forme alors des bouchons de mucus à l'origine de l'obstruction bronchique, qui se manifeste alors par des symptômes comme une dyspnée sifflante (figure 11) (159).

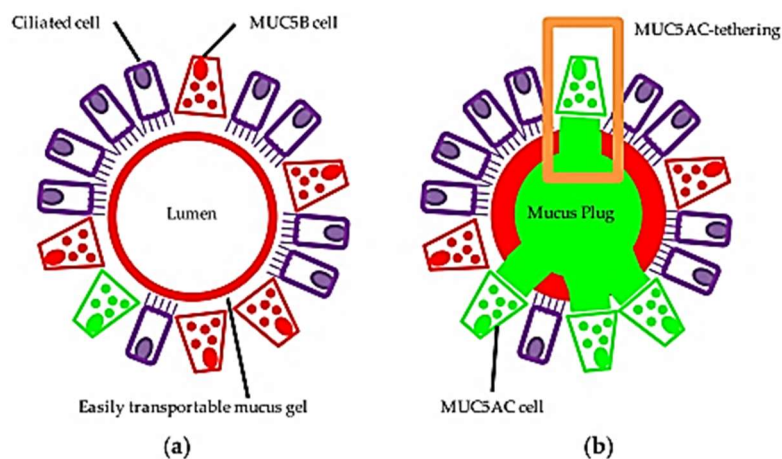


Figure 11 : Altération de l'expression des mucines (MUC) MUC5AC et MUC5B dans l'asthme. **a**, chez des patients non asthmatiques, MUC5B (rouge) est la mucine principalement produite et compose majoritairement le mucus. Le mucus est facilement transportable via les cellules ciliées (violet) empêchant l'obstruction bronchique. **b**, chez les patients asthmatiques, c'est MUC5AC (vert) qui est essentiellement produit alors que la production de MUC5B est diminuée. Le domaine extracellulaire de MUC5AC est attaché aux cellules caliciformes qui la produisent (rectangle orange) empêchant la clairance muco-ciliaire. Cela provoque une obstruction bronchique faisant apparaître des symptômes cliniques (essoufflements, respiration sifflante) (Bonser et Erle, 2017).

ii. Le muscle lisse

Une anomalie dans la structure et dans la morphologie du muscle lisse bronchique a été identifiée comme une caractéristique propre, liée à l'asthme, et plus particulièrement aux formes d'asthme sévère. La limitation des débits aériens est la conséquence de deux phénomènes, une contraction augmentée des CML et une hypertrophie/ hyperplasie de ces cellules.

Comme d'autres muscles, la contraction du muscle lisse est régulée par le calcium (Ca^{2+}) intracellulaire qui est libéré essentiellement du réticulum sarcoplasmique (RS), organelle cytoplasmique impliqué dans la synthèse et la libération de lipides et de protéines. Dans des conditions non pathologiques, le RS séquestre du Ca^{2+} cytosolique à une concentration de 100nM, qui sera libéré au moment d'une contraction musculaire. En revanche, lors d'une exacerbation, la concentration de Ca^{2+} cytosolique est augmentée. Grâce à un influx de Ca^{2+} extra-cellulaire dans les CML, suite à l'ouverture des canaux calciques au niveau de la membrane plasmique, et à une libération de Ca^{2+} intra-cellulaire par le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3), présent au niveau de la membrane du RS. La métacholine ou l'acétylcholine se fixent sur les récepteurs muscariniques conduisant à l'activation de la phospholipase C qui forme l'IP3. Le Ca^{2+} cytosolique se lie ensuite à la calmoduline (CaM) (protéine ubiquitaire assurant le bon fonctionnement des canaux ioniques) qui forme un complexe Ca^{2+} /CaM. Ce complexe va subir des changements conformationnels pour faciliter son interaction avec des protéines contractiles, comme la kinase des chaînes légères de la myosine (kCLM) qui va phosphoryler la chaîne légère de la myosine (CLM). A l'état phosphorylé, la myosine (pCLM) est activée par l'actine qui provoque la contraction des cellules du muscle lisse et donc la bronchoconstriction. La contraction du muscle lisse est régulée par la CLM qui est déphosphorylé par la phosphatase de la CLM (PCLM). Ce phénomène est appelé « sensibilisation au calcium » et diminue la contraction.

Cependant, cette PCLM est régulée négativement par la voie RhoA/Rho kinase, qui peut aussi être initiée par des médiateurs comme la métacholine. RhoA/Rho kinase inhibe l'activité de la PCLM, ayant pour conséquence une augmentation de myosine phosphorylée (pCLM) et donc une contraction plus importante du muscle lisse bronchique (figure 12) (160) (161). Dans l'asthme, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans la contraction du muscle lisse, et parmi elles, les cytokines Th2 comme l'IL-13. *In vitro*, des CML bronchiques humaines traitées avec de l'IL-13 à une dose de 100ng/mL induisent une augmentation d'expression de RhoA, un résultat similaire est observée à partir de CML bronchiques issues de souris naïves (162). Les cytokines Th17 sont également impliquées dans la contraction du muscle lisse. Dans un modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine et l'acarien, IL-17A

augmente l'expression de RhoA dans le muscle lisse trachéal (76). Par conséquent, ces cytokines Th2/Th17 participent à la contraction du muscle lisse et potentiellement à l'obstruction bronchique associée à l'asthme sévère.

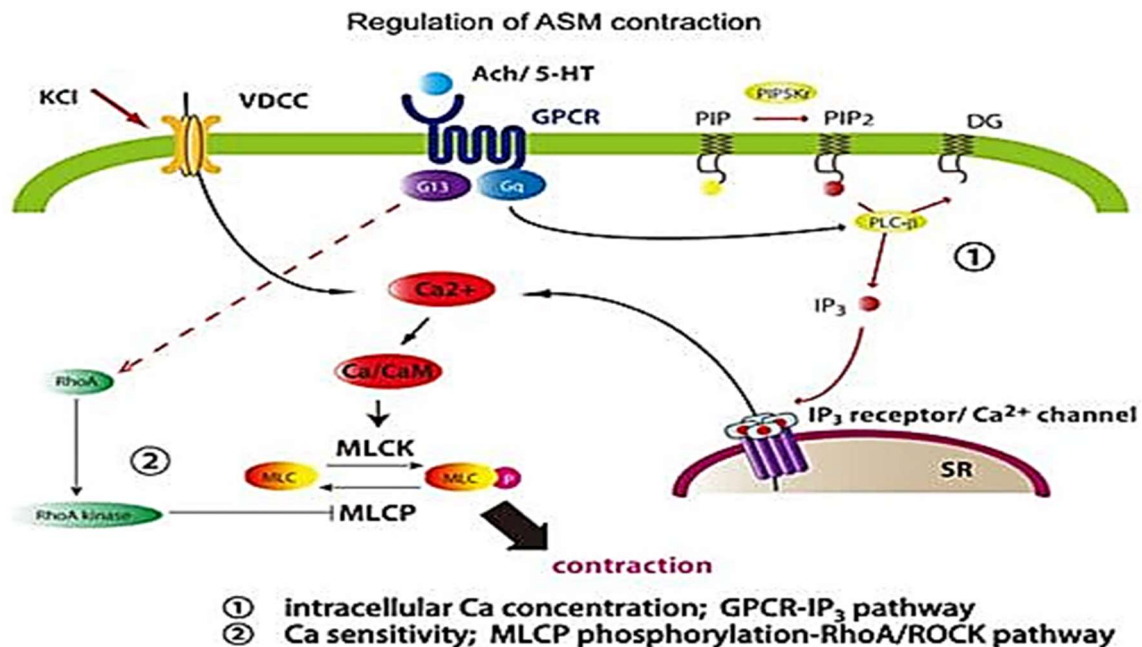


Figure 12 : Contraction du muscle lisse bronchique. La contraction du muscle est induite par le calcium (Ca^{2+}) dont la source est principalement le réticulum sarcoplasmique (RS). En cas de stimuli (métacholine, acétylcholine, sérotonine), le Ca^{2+} séquestré dans le RS est libéré par le récepteur de l'inositol trisphosphate (IP_3) augmentant la quantité de Ca^{2+} cytosolique. Un complexe Ca^{2+} /calmoduline ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) se forme aboutissant à l'activation de la chaîne légère de myosine (CLM) grâce à sa phosphorylation (pCLM) par la kinase de la chaîne légère de myosine (kCLM). Ce phénomène provoque la contraction du muscle lisse, qui se relâche une fois la CLM déphosphorylée. Cette contraction est régulée négativement par la voie de RhoA/Rho kinase qui maintient la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (pCML) et donc maintient une contraction du muscle favorisant une obstruction bloquant le passage du flux aérien (Kudo et al, 2013).

L'hypertrophie et l'hyperplasie conditionnent l'épaississement du muscle lisse bronchique avec une prolifération accrue des cellules. L'augmentation de la masse du muscle lisse peut s'expliquer par l'intervention de plusieurs facteurs, notamment le TGF- β . La synthèse de TGF- β par les cellules du muscle lisse chez l'homme peut être orchestrée par des bronchoconstricteurs comme la métacholine et l'activité du TGF- β est augmentée chez les patients asthmatiques. Parmi les trois formes de TGF- β , le TGF- β 1 est élevé dans le LBA des patients souffrant d'asthme, et ce niveau augmente chez ces patients suite à une exposition à l'allergène (163). Ce facteur est également capable d'induire la prolifération et donc le remodelage des CML via la surexpression des microARN (miARN) (164). Un modèle expérimental d'asthme induit par l'allergène, a démontré que la neutralisation du TGF- β

réduisait la prolifération des CML bronchiques, notamment (165). L'influx de Ca^{2+} extra-cellulaire a également suscité de nombreuses études. Des patients asthmatiques sévères traités au gallopamil durant un an, ont un remodelage bronchique atténué avec une diminution de l'épaisseur du muscle lisse bronchique par rapport au groupe ayant reçu le placebo (166). Le gallopamil est connu pour bloquer les canaux calciques et donc l'influx de Ca^{2+} responsable de la contraction du muscle lisse. Une étude décrit également que l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} extra-cellulaire favorise la biogenèse mitochondriale, avec une augmentation de la masse et de l'activité de cet organite, dans les CML bronchiques de patients asthmatiques sévères. Et cette augmentation de la biogenèse mitochondriale augmente à son tour la prolifération des cellules du muscle bronchique observée chez les asthmatiques (167). Un autre mécanisme associé à l'augmentation de la masse des CML est la migration des fibrocytes. *In vitro*, les fibrocytes migrent au niveau des CML, grâce à leur pouvoir chimioattractant médié, en partie par le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), chez les patients asthmatiques (168). La stimulation de l'épithélium bronchique, formé à partir de cellules épithéliales bronchiques de patients asthmatiques sévères, par des acariens augmente la prolifération des CML bronchiques. Cette prolifération est associée à une production de leucotriène par l'épithélium ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur des leucotriènes dans les CML bronchiques des asthmatiques (169). Dans le contexte d'un asthme allergique, la contribution des IgE dans le remodelage tissulaire a été étudiée. Les CML bronchiques expriment le récepteur de haute et de faible affinité pour les IgE, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ et $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$, respectivement. Les IgE, après fixation au $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ entraîne la phosphorylation des MAPK dont ERK1/2, et l'activation de STAT3 aboutissant à la prolifération des CML. Une inhibition des MAPK et de STAT3 abroge la prolifération des cellules du muscle lisse (170). Certains métabolites du cytochrome P450, comme l'époxyde hydrolase soluble, passent également par les voies de signalisation ERK1/2 et STAT3 pour induire un remodelage avec notamment une augmentation de l' α -SMA qui cible l' α actine du muscle lisse reflétant sa prolifération (171). La voie MAPK ERK1/2 module également l'expression de la méthyltransférase PRTM 1, qui est augmentée dans les CML de patients asthmatiques et corrèle avec leurs taux de prolifération (145).

iii. La transition épithélio-mésenchymateuse

Un autre phénomène intervenant dans le remodelage bronchique chez les asthmatiques est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). C'est un processus biologique où les cellules épithéliales se différencient et perdent leurs caractéristiques épithéliales comme leur polarité et leur adhésion, conséquence de la fragilité des jonctions serrées, mais gagnent des

propriétés mésenchymateuses comme l'invasion et la migration. Normalement, les cellules épithéliales se connectent entre elles et forment des jonctions serrées, elles ont une polarité envers le cytosquelette et se lient à la lame basale, alors que les cellules mésenchymateuses perdent cette polarité. La TEM est divisée en trois groupes : le type I pour le développement des organes, le type II pour la cicatrisation, la régénération tissulaire et la fibrose et enfin le type III pour la progression cancéreuse et les métastases. Le type II est donc impliqué dans le remodelage bronchique. La TEM peut être initiée par des signaux extra-cellulaires et des facteurs de croissance. Parmi ces derniers, le TGF- β joue un rôle important dans la TEM et le remodelage. En effet, il est responsable de la perte des marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine (molécule transmembranaire d'adhésion cellulaire), et la cytokératine (protéine du cytosquelette responsable de la formation des filaments intermédiaires). Ces molécules assurent une fonction de barrière pour empêcher les pathogènes de l'environnement extérieurs de pénétrer dans l'épithélium. Et le gain de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine (protéine constituant les filaments intermédiaires), la N-cadhérine (molécule transmembranaire d'adhésion cellulaire) (160) (172).

III. Les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT)

Les organes lymphoïdes secondaires (OLS) qui comprennent les plaques de Peyer, les ganglions lymphatiques ou encore la rate permettent la mise en place de la réponse immunitaire adaptative primaire. Cependant, en l'absence de ces organes, la réponse immunitaire est tout de même assurée, notamment par les organes lymphoïdes tertiaires (OLT). Ces organes forment le tissu lymphoïde tertiaire, parmi lesquels sont répertoriés le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), le tissu lymphoïde associé aux nez (NALT) ou encore le tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT).

Le BALT est un tissu lymphoïde muqueux non pathologique, présent de façon constitutive chez les lapins ou les rats. Dans le poumon de l'homme et de la souris, la formation de BALT peut être induit par des maladies auto-immunes ou suite à une infection/inflammation chronique, on parle dans ce cas de BALT inductibles (iBALTs) (173) (174). La définition exacte des iBALTs n'est pas claire, certains les définissent comme des follicules trouvés exclusivement à côté des bronches proximales et distales avec un épithélium non cilié (175), alors que d'autres mentionnent que ces follicules peuvent aussi se former dans l'espace péri-vasculaire au niveau des vaisseaux sanguins du poumon (176). Les iBALTs sont constitués de leucocytes arrangés en deux zones, des zones de cellules B et des zones de cellules T. L'organisation de ces deux aires est assurée par la présence de cellules stromales qui

produisent des chimiokines. Dans les zones de cellules B, les cellules dendritiques folliculaires (FDC) expriment la chimiokine CXCL13 qui se lie à son récepteur CXCR5, pour assurer le recrutement des cellules B, et participe à la formation et au maintien des follicules et des centres germinatifs. Dans les aires de cellules T, les cellules réticulaires fibroblastiques expriment les deux chimiokines CCL19 et CCL21. Ces deux chimiokines, en se liant à leur récepteur CCR7, assurent l'organisation des zones de cellules T, et attirent les CD activées et les lymphocytes T naïfs du sang. Les iBALTs sont caractérisés par la présence de veinules à endothélium épais qui sont localisées à l'extérieur des follicules de cellules B, dans les zones de cellules T. Ces veinules endothéliales expriment aussi CCL21 et des molécules d'adhésion comme VCAM-1 qui facilite le recrutement des cellules T dans le iBALT (figure 13) (173) (174).

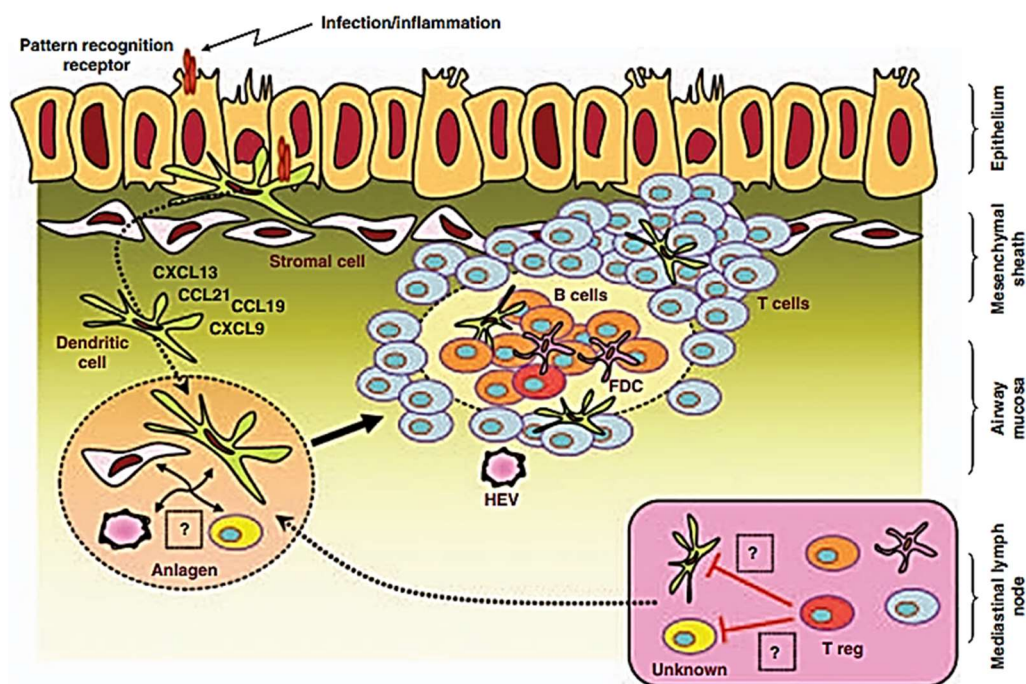


Figure 13 : Modèle de développement d'inductibles tissus lymphoïdes associés aux bronches (iBALTs). Sous des conditions inflammatoires et/ou infectieuses, les cellules dendritiques activées interagissent avec les cellules stromales. Une libération de cytokines et de chimiokines (CXCL13, CCL19, CCL21) et l'expression de molécules d'adhésion sur les veinules endothéliales (HEV) favorisent le recrutement de cellules B et T qui forment deux aires bien distinctes. Les cellules T régulatrices, dans les ganglions lymphatiques, peuvent inhiber la formation des iBALTs mais le mécanisme qui médie cette inhibition n'est pas bien défini (Foo et Philipps, 2010).

Plusieurs cellules participent à la formation et au maintien des iBALTs. Les cellules endothéliales lymphatiques Thy1+ qui en plus d'exprimer CCL19 et CCL21, produisent de l'IL-7 assurant la survie des lymphocytes naïfs dans les iBALTs (177). La formation de BALT est

essentiellement observée chez les jeunes enfants comparés aux adultes, et lors d'une infection, le nombre de iBALTs est fortement augmenté mais reste plus élevé chez les enfants et les nourrissons comparé aux adultes. Une étude expérimentale a montré que plus de 90% de souriceaux exposés à du LPS avaient des iBALTs dans leur poumon, alors que seulement 20% des souris âgées de trois semaines développaient des iBALTs. Il a été suggéré que les Treg pouvaient être responsables de ce phénomène puisque le nombre de Treg est supérieur chez les souris âgées de trois semaines comparées aux souriceaux (178). Chez les nouveau-nés, l'absence d'activité suppressive, assurée par les Treg, favorise le recrutement des cellules T effectrices pour former les iBALTs. A l'âge adulte, le recrutement des Treg au niveau des ganglions lymphatiques est assuré par le récepteur CCR7. Une déficience de ce récepteur diminue le recrutement de Treg et favorise le développement de iBALT, même en l'absence de stimulus inflammatoire (179). Ainsi, les Treg contrôlent le développement des iBALTs par leur activité immunosuppressive dans les ganglions lymphatiques, mais le mécanisme par lequel ils exercent cette activité suppressive dans les ganglions n'est pas connu.

Une large variété de stimuli, incluant les bactéries, les virus, les allergènes, induisent des infections et/ou inflammations pulmonaires aboutissant à la formation de iBALTs dont la fonction peut être protectrice ou à l'inverse, délétère. Les iBALTs, peuvent participer aux réponses immunes, notamment, lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), pathologie caractérisée par la formation de granulomes pulmonaires, qui ont des caractéristiques communes avec la formation des iBALTs. Des souris infectées par *Mtb*, mais avec une forme latente de la maladie, ont des structures folliculaires bien organisées autour des granulomes, alors que les souris présentant une forme active de la maladie présentent une déstructuration de ces follicules (180). Concernant les infections virales, les iBALTs éliminent plus rapidement le SARS-coronavirus ou les pneumovirus chez des souris grâce à une réponse anticorps accélérée (181). Dans le cas de la grippe, il est clairement montré que les iBALTs sont suffisant pour éliminer le virus et ainsi augmenter la survie des animaux infectés. Ce phénomène est indépendant des OLS, suggérant que les iBALTs assurent une réponse adaptative primaire (182). Des infections fongiques provoquées par *Pneumocystis jirovecii* sont également associées à la formation de iBALTs chez la souris, et les cellules T CD4+ de ces structures assurent une protection de l'hôte en éliminant le pathogène (183). Ces informations montrent donc que les iBALTs induisent des réponses immunes efficaces capables de diminuer l'infection et donc de réduire le taux de morbidité associé à ces infections.

En revanche, les iBALTs sont aussi associés avec des dommages pulmonaires contribuant aux pathologies pulmonaires. Une infection par *Chlamydia pneumoniae* induit la formation de ces structures et le nombre de iBALTs corrèle avec l'intensité de l'inflammation (184). Dans le

cas de la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), il y a une corrélation entre les formes sévères et très sévères de la maladie et la présence de follicules de cellules B, ressemblant à des iBALTs (185) (186). Des modèles expérimentaux, montrent que des souris exposées à la fumée de cigarette forment des iBALTs dans leur poumon, et plus les souris sont exposées à la fumée, plus les aires de iBALTs sont grandes (187). Un deuxième type de pathologie inflammatoire, l'arthrite rhumatoïde, est caractérisée par la formation de ces structures lymphoïdes tertiaires dans le poumon. La présence de ces structures lymphoïdes est corrélée avec les dommages pulmonaires, comme le développement d'une fibrose et un dépôt de collagène (188).

Dans le cas de l'asthme, plusieurs modèles montrent l'importance des iBALTs dans le développement de la pathologie. *Blomia tropicalis*, allergène d'acarien des régions tropicales et sub-tropicales, induit un asthme sévère chez les souris avec un développement de iBALTs. Des anticorps anti-IL-4 et anti-IL-13 neutralisants réduisent la formation de ces structures lymphoïdes ainsi que les paramètres associés à l'asthme, comme la réponse humorale, l'inflammation et le remodelage bronchique (189). Un modèle expérimental d'asthme induit par les acariens, montre que seul un asthme chronique induit le développement de iBALTs, et que ce développement se fait de façon indépendante de l'éosinophilie pulmonaire observée dans certains phénotypes d'asthme (190). Chez des patients asthmatiques, des follicules lymphoïdes sont observés dans les biopsies bronchiques, constitués essentiellement de CD. Après provocation allergénique, la composition des follicules évolue avec un plus grand nombre de cellules T (191). Des provocations allergéniques favorisent la production d'Ig dans le poumon. En effet, ces follicules lymphoïdes tertiaires sont des lieux d'activation et de maturation des cellules B, favorisant ainsi la commutation isotypique avec une production d'IgE, d'IgA et d'IgG1 (192). Dans le cas de rhinosinusite chronique avec une polypose naso-sinusienne, une augmentation du tissu lymphoïde est observée avec la formation de centres germinatifs, où sont produits des IgA et des IgG. Lorsque ces polypes sont de nature éosinophilique, une production d'IgE vient compléter la synthèse des IgA et des IgG (193).

L'implication des cellules et des cytokines dans la formation des iBALTs n'est pas toujours bien définie. Les LT_i sont une sous-population d'ILCs retrouvée essentiellement lors de la vie fœtale et néonatale permettant la formation des OLS. Leur différenciation est assurée par leurs facteurs de transcription ROR γ t, et Id2. Les LT_i sont essentiels pour assurer la formation des OLS, et donc pourraient participer à la formation des OLT dont les iBALTs chez l'adulte. Il a été montré, dans un modèle induit par le LPS, que des souris déficientes en ROR γ t et en Id2 qui ne développent pas de LT_i, étaient capables de former des iBALTs (194). Les LT_i produisent diverses cytokines comme la lymphotoxine (LT)- α , le TNF, l'IL-17 et l'IL-22. La LT- α , en se liant à son récepteur, exprimé sur les cellules stromales, les macrophages et les CD,

est capable de maintenir l'expression des chimiokines nécessaires au recrutement et au maintien des cellules dans le iBALT (CXCL13, CCL19 et CCL21). Plusieurs études montrent que les souris déficientes en LT- α n'ont pas de LTi, mais forment des amas lymphoïdes augmentés en taille avec une accumulation de cellules B et T mais pas de FDC. Ces cellules s'accumulent mais ne forment pas des aires bien distinctes, au contraire, les cellules s'étendent dans le parenchyme pulmonaire comparées aux souris WT (182) (183) (194). Alors que dans un modèle mimant le syndrome de Sjögren (SS), des souris transgéniques qui expriment la LT- α et la LT- β au niveau des glandes salivaires, stimulent la formation d'OLT. En effet, ces souris ont significativement plus de foyers lymphoïdes que les souris contrôles, avec des zones de cellules B et T bien distinctes et des FDC (195). La voie de la LT est également impliquée dans les réponses liées à l'immunité des muqueuses. Des souris déficientes en LT- β sont incapables de produire des IgA en réponse au rotavirus (196). La LT- $\alpha\beta$ est exprimée par les ILC3, les LTi et les lymphocytes T et B activés, ainsi, en l'absence de LTi, ces cellules continuent d'exprimer la LT nécessaire à la formation des OLT.

L'IL-17, produite essentiellement par les Th17 semble impliquée dans la formation des structures lymphoïdes. Comme précédemment décrit, une diminution des Treg s'accompagne d'une augmentation de iBALT mais également d'une augmentation de la production d'IL-17 (178). De plus, chez des souris déficientes en IL-17, la formation de BALT induit par le LPS est altérée avec une diminution de leur taille et de leur nombre. L'IL-17 est capable d'induire la production de *Cxcl13* et de *Ccl19* de façon indépendante de la LT- α , suggérant que l'IL-17 est impliquée dans la formation mais pas dans le maintien des iBALTs (194). En revanche, lors d'une infection provoquée par *Chlamydia pneumoniae*, la formation de iBALT est observée mais le niveau d'IL-17 dans le poumon n'est pas augmenté (184). De même, dans un modèle de vaccin modifié du virus ankara, les souris déficientes en IL-17 forment le même nombre de iBALTs que les souris WT (197), suggérant des différences en fonction de l'agent infectieux.

Un rôle pour l'IL-22, a été montré dans la formation des OLT dans les glandes salivaires de souris, à partir d'un modèle induit par un adénovirus. L'IL-22 favorise la production de *Cxcl13* et de *Cxcl12* dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, respectivement, qui permettent le recrutement des cellules B. Chez des souris IL-22 déficientes, le niveau d'ARNm de *Cxcl13* et *Cxcl12* est significativement diminué, ainsi que l'accumulation et la maturation des cellules B dans les OLT des glandes salivaires. En l'absence d'IL-22, le niveau d'expression de l'IL-17 ne semble pas être impacté (198). La contribution des CD conventionnelles dans la formation des iBALTs a également été étudié lors d'infections virales. Le virus de la grippe est connu pour induire la formation des iBALTs, mais lorsque ce virus est administré à des souris déficientes en CD au niveau du poumon, le follicule se désintègre avec une réduction du nombre de iBALTs, de cellules B et d'IgA (199). De même, la maintenance du iBALT n'est plus

assurée lorsque le vaccin modifié du virus ankara est administré à des souris déficientes en CD au niveau du tissu pulmonaire, où la taille du follicule est fortement diminuée comparé aux souris contrôles (200).

Bien que le développement des iBALTs est provoqué par des stimuli inflammatoires et/ou infectieux, il est possible que ces tissus lymphoïdes puissent maintenir leur structure, même en l'absence de stimuli pendant plusieurs mois. En effet, les cellules B produisent la LT et du TNF qui aide à maintenir le réseau de cellules stromales comme les FDC, les cellules endothéliales et les veinules endothéliales. Ces cellules produisent de l'IL-7, CXCL12, CXCL13, CCL19 et CCL21 qui assurent le recrutement des lymphocytes aux aires appropriées, et assurent leur survie pour maintenir une nouvelle production de LT et de TNF (174).

Première partie

Objectifs de travail

L'asthme est en constante augmentation à la fois dans les pays industrialisés et émergents. Parmi les formes d'asthmes, l'asthme sévère est caractérisé par la nécessité des fortes doses de corticoïdes inhalés, et représente 5 à 10% des patients. Le remodelage des voies aériennes est actuellement considéré comme étant le paramètre principal de l'obstruction bronchique, quasi permanente observée chez les asthmatiques sévères. Parmi ceux-ci, on distingue les asthmatiques sévères appartenant à l'endotype T2 (T2 high), souvent allergiques, et ceux appartenant à l'endotype T2 low, qui, pourrait impliquer la voie Th17 comme inducteur de certains asthmes sévères à profil neutrophilique. L'IL-17 participe à la neutrophilie, et à la corticorésistance, alors que l'IL-22 favorise la transition épithélio- mésenchymateuse (TEM) et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML). Nous nous sommes intéressés à deux déterminants de la polarisation Th17, le récepteur NOD2 et le facteur de transcription Aryl hydrocarbon receptor (AhR). En effet, NOD2 est un adjuvant de la réponse Th17 et présente des polymorphismes associés à l'asthme. Quant à l'AhR, il a été impliqué dans la polarisation Th17 ainsi que dans la génération de cellules T régulatrices (Treg), mais son rôle dans l'asthme reste controversé.

L'objectif de ce projet de thèse a donc été de développer un modèle d'asthme chronique expérimental à l'allergène de chien d'endotype Th17, avec les caractéristiques du remodelage bronchique observé dans les formes sévères. A partir de ce modèle, nous avons ensuite évalué l'effet adjuvant du muramyl dipeptide (MDP) (motif bactérien présent dans les bactéries liant le récepteur NOD2) et l'effet d'un antagoniste de l'AhR sur les paramètres de l'asthme. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la formation de tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT) dans ce modèle d'asthme sévère.

Matériels et Méthodes

Souris et considérations éthiques :

Les souris (femelles C57BL/6J) âgées de 6 semaines, proviennent des Laboratoires Janvier (France) ou Charles Rivers (France). Elles sont maintenues en zone d'élevage Exempt de Pathogènes Spécifiques (SPF) de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, dans des cages ventilées et avec un cycle de lumière de jour de 12h. Les protocoles utilisés ont été approuvés par le comité d'éthique régional et autorisés par le ministère de la recherche et l'innovation (autorisation numéro : APAFIS#2016070417344442 v3).

Sensibilisation et provocations allergéniques :

L'allergène de chien a été fourni par Stallergenes et ALK (France). Les groupes positifs sont sensibilisés pendant cinq jours avec l'allergène de chien par voie intranasale (IN) contenant une dose d'allergène majeur de Can f 1 de 10µg/mL (indoors biotechnology), seul ou en combinaison avec le ligand de NOD2, le MDP (InvivoGen) à 10µg dans 30µL de Phosphate Buffer Saline (PBS). Les groupes contrôles reçoivent du PBS ou du MDP seul. Neufs jours plus tard, les souris reçoivent les provocations allergéniques par voie IN, avec la même quantité d'allergène de chien (groupes positifs) ou de PBS (groupes contrôles), à raison de cinq jours/semaine pendant trois semaines. 24h après la dernière IN, l'hyperréactivité des voies aériennes est mesurée (Fig S1A). Concernant l'étude de l'Ahr, les souris ont été nourries avec soit une alimentation contrôle (D12450K, Research Diet, New Brunswick, USA), ou avec cette même alimentation supplémentée avec un antagoniste de l'Ahr, le CH-223191 (TOCRIS). Cette alimentation a été donnée pendant la phase de provocation (Fig S1B). La quantité d'antagoniste administrée dans la nourriture a été calculée sur l'hypothèse qu'une souris de cinq à six semaines consomme en moyenne 3g de nourriture/jour (<http://www.researchdiets.com/>) et que la masse corporelle moyenne des femelles est de 20g (201). La quantité calculée de CH-223191 à consommer était d'environ 10mg/kg/jour, une quantité montrée efficace pour bloquer l'action de l'Ahr *in vivo* (202) (203).

Les souris sont euthanasiées par injection de pentobarbital (Euthasol, Centravet). Un LBA est collecté par injection d'1mL de PBS, les cellules sont cytocentrifugées (CYTOSPIN, Shandon, cytospin 4, Thermo Fisher Scientific Inc, Walltham Massachussets) sur des lames. Les cellules sont colorées au May-Grünwald-Giemsa (Microm Microtech (MM) France) et les leucocytes

sont comptés au microscope optique au grossissement X100 à immersion. Les échantillons sanguins sont prélevés pour récupérer le sérum et les lobes pulmonaires sont prélevés pour l'extraction de lysats protéiques, d'ARN et pour une analyse histologique ou une analyse par cytométrie en flux.

Mesure de l'hyperréactivité bronchique :

L'hyperréactivité des voies aériennes est évaluée par pléthysmographie invasive (Flexivent®, Scireq®, Montreal, Canada). Les souris sont tout d'abord anesthésiées par l'administration de médétomidine à 0,5mg/kg (Domitor®; Pfizer, NY) et de 5mg/kg de kétamine (Imalgene® 1000; Merial, France). Les souris sont trachéotomisées avec un cathéter de 18 Gauge calibré au poids de chaque souris. Les souris sont ensuite placées sous ventilation mécanique à une fréquence respiratoire de 150 insufflations par minute et sont exposées à du PBS puis à des concentrations croissantes (12, 25, 50 et 100mg/mL) de méthacholine (Sigma-Aldrich) en utilisant un nébuliseur ultrasonique (Aeroneb, Aerogen, Ireland). Pour chaque concentration de méthacholine, 10 cycles de nébulisation et mesures de résistance sont effectuées. La valeur de résistance la plus élevée, de chaque dose, est retenue.

Mesure des anticorps dans le sérum et le LBA :

Les concentrations sériques ont été mesurées par dosage ELISA dans des plaques P96 (Corning). Pour les IgE totales, les plaques sont coatées avec un anticorps anti-IgE de souris (2µg/mL dans du PBS, BD Pharmigen) toute la nuit à 4°C. La plaque est saturée avec du PBS-Bovine Serum Albumin (BSA) 1% pendant 1h avant de déposer les sérums ou les LBA et le standard Purified Mouse IgE κ , (500ng/mL, BD Pharmigen) qui incubent toute la nuit à 4°C. Un anticorps de détection biotinylé rat anti-IgE de souris (2µg/mL, BD Pharmigen) vient fixer les échantillons et le standard. La streptavidin-HRP (Sigma-Aldrich) a été incubée pendant 20min à température ambiante, révélation par l'ajout de puis le substrat TMB (Interchim) pendant un maximum de 10min. La réaction colorimétrique a été stoppée par l'ajout de l'H₂SO₄.

Pour les IgE spécifiques à l'allergène de chien, la plaque est coatée avec l'allergène de chien à une concentration correspondante à 10µg/mL de Can f 1 dans du PBS, saturée en PBS-Tween 0,05%-lait 5%. Les sérums sont incubés sur toute une nuit à 4°C avec le contrôle positif (sérum de souris immunisée avec l'allergène de chien). Un anticorps anti-souris IgE-HRP (1/2000, GENTAUR) est dilué dans un tampon CGS2 (Can Get Signal for secondary Antibody, Cosmo Bio, Japon) pour une incubation de 2h à température ambiante. Un mélange de

substrat TMB (Sigma-Aldrich) est incubé pendant quelques minutes, puis l'H₂SO₄ est utilisé pour arrêter la réaction. Pour les IgG1 spécifiques de l'allergène de chien, de nouveau, les plaques sont coatées avec l'allergène de chien, saturée en PBS-BSA 3 %. Les LBA sont incubés sur toute une nuit à 4°C avec le contrôle positif. Un anticorps anti-souris IgG1-HRP (1/20000, Southern Biotechnology) est dilué dans du PBS-BSA 0,5% pour une incubation d'1h30 à 37°C. Un mélange de substrat TMB est incubé pendant quelques minutes, puis l'H₂SO₄ est utilisé pour arrêter la réaction. Pour ces deux anticorps, les résultats sont exprimés en titres qui équivalent à l'inverse de la dilution correspondant à 50% de la densité optique maximale. Pour la concentration d'IgA totales dans le LBA, nous utilisons un kit ELISA de souris (eBioscience). Toutes les densités optiques (DO) sont obtenues après lecture au spectrophotomètre à 450nm.

Histologie et immunohistochimie :

Le poumon unilobé gauche est conservé dans de l'Antigenfix (MM France) pendant un maximum de 4h à température ambiante. Les poumons sont rincés dans deux bains de PBS puis déshydratés par la succession de deux bains d'alcools (30°C, 70°C, 95°C et alcool absolu) pendant 1h puis deux bains de Diasolv (MM France) de 30min. Ensuite les cassettes sont plongées dans un bain de paraffine (Histowax, MM France) à 56°C sur la nuit, et le lendemain, un deuxième bain d'une heure est effectué en paraffine. Les coupes de poumons, d'une épaisseur de 5µm, sont effectuées au microtome (Thermo Fisher), dépliées, puis déposées sur des lames extra adhésives dégraissées (Surgipath, MM France). Les lames sont ensuite séchées à 37°C dans une étuve ventilée. D'autres coupes, d'une épaisseur de 100µm sont également réalisées au microtome. Ces coupes sont montées dans du milieu de montage aqueux (Aqueous Mount, MM France) puis séchées à température ambiante 1 à 2h avant observation au microscope bi-photonique.

Pour toutes les colorations réalisées, l'ensemble des coupes sont d'abord déparaffinées par deux bains successifs d'Ottix (MM France) puis deux bains d'alcool absolu, de 96°C, de 70°C et de 50°C et un rinçage en eau distillée.

La coloration à l'Hématoxyline&Eosine (H&E) permet de visualiser l'inflammation péri-bronchique. Après le déparaffinage, les lames sont colorées à l'hématoxyline de Harris (MM France) pendant 2min, lavées puis plongées deux fois dans de l'eau ammoniacquée, et de nouveau, rincées en eau du robinet. Après un bain d'alcool à 95°C de 5min, les lames sont colorées à l'éosine (1% d'éosine et de phloxine B, éthanol à 95°C et de l'acide acétique glacial) pendant 15sec avant d'être déshydratées. L'infiltration péri-bronchique a été quantifiée avec le score suivant, 0 : absence d'infiltration cellulaire, 1 : présence de quelques cellules

mononuclées, 2 : de 1 à 5 couches de cellules autour des bronches et 3 : l'épaisseur est supérieure à 5 cellules inflammatoires, entourant complètement la bronche (204).

Pour l'étude du remodelage bronchique, la production de mucus, le dépôt de collagène et l'épaisseur de muscle lisse ont été évalués. Pour le mucus, un kit de coloration a été utilisé pour marquer les mucopolysaccharides en rose (Clinisciences). La production de mucus au niveau des cellules épithéliales a été quantifiée, 0 : absence de mucus, 1 : moins de 25% de marquage, 2 : entre 25 et 50% de marquage de l'épithélium, 3 : entre 50 et 75% de marquage et 4 : plus de 75% des cellules épithéliales sont marquées (205). Pour le dépôt de collagène, les coupes sont colorées au trichrome de Masson (Clinisciences) et au Rouge Sirius (Polyscience) à l'aide d'un kit de coloration et selon les recommandations des fournisseurs. La quantification péri-bronchique de collagène a été réalisée à l'aide d'un score, 1 : faible marquage péri-bronchique, 2 : légère augmentation du marquage péri-bronchique, 3 : augmentation de l'épaisseur du marquage péri-bronchique et 4 : augmentation importante de l'épaisseur du marquage péri-bronchique (206). Les résultats sont exprimés en score moyen par bronche. La coloration au Rouge Sirius a été quantifiée sous lumière polarisée à l'aide du logiciel Image J et d'une macro semi-automatisée, mesurant l'aire de collagène fibrillaire (μm^2) par périmètre de membrane basale (μm). Le collagène est aussi imagé par microscopie bi-photonique sur les coupes de 100 μm , utilisant le principe de la seconde harmonie donnant une représentation en 3D de la structure du poumon.

Les CML sont identifiées par immunohistochimie en utilisant un anticorps primaire de lapin anti- α -SMA de souris (abcam, clone: E184) et un kit Vectastain ABC-Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories). Après déparaffinage, les coupes sont perméabilisées au triton 0,3% durant 30min, puis elles sont saturées avec le sérum du kit, de nouveau pendant 30min, l'anticorps anti- α -SMA est dilué au 1/100 dans du Tris Buffer Saline (TBS) 1X (pH 7,6) et incube toute la nuit à 4°C. Le lendemain, l'anticorps secondaire biotinylé ainsi que la solution d'avidine/phosphatase alcaline biotinylé, du kit, sont déposés sur les coupes durant 30min, le marquage est révélé en utilisant le Fast Red (Sigma-Aldrich) et les coupes sont contres colorées à l'hématoxyline de Harris pendant quelques secondes. La quantification a été réalisée sur les petites bronches (périmètre inférieur à 1000 μm) en utilisant Image J et une macro semi-automatisée. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ de membrane basale.

Pour analyser les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT), le nombre et la surface des iBALTs ont été comptées microscopiquement, et seuls les follicules péri-bronchiques ont été comptabilisés. Les résultats sont exprimés en nombre de iBALT par bronche et par surface, grâce à une grille oculaire, en nombre de carrés (un carré= 0,056mm²). Ces follicules, situés à proximité des bronches, des veines ou artères, sont constitués d'agrégats de cellules B

mélangés à des FDC et entourés de cellules T (207) (208). L'ensemble de ces cellules ont été identifiées par immunomarquage. Les cellules B sont marquées à l'aide d'un anticorps primaire de rat anti-CD45R de souris (eBioscience, clone : RA3-6B2, 1/200) et les FDC par un anticorps primaire de lapin anti-CD21 de souris (Sigma-Aldrich, Merck, clone : EP3093, 1/200), selon le protocole décrit pour le marquage de l' α -SMA. Les cellules T ont été marquées par un anticorps primaire de lapin anti-CD3 de souris (abcam, clone : SP7, 1/100), avec une étape de démasquage antigénique en tampon citrate (10mM), 0,05% Tween 20 (pH 6) à 95°C, le reste du protocole est similaire à celui décrit précédemment. Les cellules Foxp3 positives ont également été observées dans ces follicules, en les marquant avec un anticorps primaire de rat anti-Foxp3 de souris (eBioscience, clone : FJK-16s, 1/25). Une perméabilisation en triton 0,3% et un démasquage antigénique en tampon citrate, 0,1% Tween 20 (pH 6) à 95°C ont été réalisés. Les immunomarquages ont été réalisés à l'aide des kits Vectastain ABC-Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories) adaptés à chaque espèce de l'anticorps primaire, et sont révélés au Fast Red (Sigma-Aldrich) et contre colorés à l'hématoxyline de Harris. Le nombre de cellules marquées ont été comptées à l'aide de la grille oculaire et les résultats sont exprimés en nombre de cellules marquées par iBALT et par surface de iBALT (nombre de carrés).

Pour l'ensemble des quantifications, entre trois et neuf sections pulmonaires ont été évaluées permettant d'obtenir une moyenne par souris.

Observations microscopiques :

L'ensemble des lames colorées et immunomarquées sont observées sur un microscope optique de type Axio Plan couleur (Zeiss). La coloration au Rouge Sirius est observée en lumière polarisée à la loupe binoculaire (Nikon, SMZ25). Quant à l'analyse des coupes de 100 μ m, elle est effectuée à l'aide d'un microscope bi-photonique (microscope confocal Multi photon, Leica Sp8). Pour l'ensemble des microscopes, plusieurs acquisitions sont effectuées puis analysées.

Analyse de l'expression des ARN :

Au moment du sacrifice, le plus petit lobe pulmonaire est placé dans 1mL de RNA-Later (Life Technologies) pendant 48h à 4°C. Les ARN sont ensuite extraits du poumon à l'aide du kit d'extraction (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel). Les ARN extraits sont rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'un kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems). Les Polymerase Chain Reactions (PCR) en temps réelles (Q-PCR) sont ensuite

réalisées avec du master mix et des amorces Prime time assay (IDT) (tableau 1) et détectés à l'aide du QuantStudio 3 (Applied Biosystems). Les analyses ont été effectuées via le cloud de Thermo Fisher. Une fois l'amplification PCR terminée, une analyse de la courbe de fusion a été effectuée, confirmant la présence d'un seul amplicon. *Rplp0* (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0) a été utilisé comme gène de référence pour normaliser le niveau de transcription. Les taux relatifs d'ARNm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ont été déterminés en comparant le seuil du cycle PCR (Ct) pour le gène d'intérêt et le gène de référence (ΔCt), et les valeurs ΔCt pour les groupes contrôles et positifs ($\Delta\Delta Ct$).

Gènes (Prime Time Assay)	Référence Assay
<i>Rplp0</i>	Mm.PT.58.43894205
<i>Il-13</i>	Mm.PT.58.31366752
<i>Il-17</i>	Mm.PT.58.6531092
<i>Tgf-β</i>	Mm.PT.58.11254750

Tableau 1: Référence des primers (IDT) utilisés pour les Q-PCR.

Quantification des niveaux de cytokines et de chimiokines :

Pour l'extraction protéique, un lobe pulmonaire a été congelé dans l'azote liquide puis homogénéisé mécaniquement dans un tampon de lyse : tampon T-PER (Tissue-Protein Extraction Reagents, Life Technologies) et une pastille d'anti-protéase (Sigma-Aldrich) pour 20mL de tampon T-per. Les échantillons ont été centrifugés pour éliminer les débris et le surnageant a été collecté. La quantité de protéines totales (Pierce BCA proteins Assay kit, Life Technologies) et les quantités de cytokines et de chimiokines ont été mesurées. Les niveaux d'IL-33 (eBioscience), d'IL-22 (Peprotech), d'IL-10, d'IFN-γ et de la chimiokine CCL17 (R&D Systems), ont été mesurés, en utilisant des kits ELISA, selon les recommandations fournis par les fournisseurs. Les résultats sont exprimés en pg par mg de protéines totales ou par mL de LBA.

Préparations cellulaires :

Pour l'analyse en cytométrie en flux, le poumon est perfusé en PBS-sérum de veau fœtal (SVF) 2%. Les cellules du poumon sont digérées à l'aide d'une solution de digestion : collagénase IV à 1mg/mL (Gibco, Life Technologies), DNase à 2UI/mL (Roche Diagnostics, France) et RPMI complet (Dutscher) pendant 30min à 37°C. Les cellules sont filtrées sur des

membranes de 70µm puis séparées sur un gradient de densité de Percoll (GE Healthcare) par une centrifugation (670g/15min). Puis les hématies sont lysées avec un tampon de lyse (1X, Biolegend) selon les recommandations du fournisseur. Après centrifugation, les cellules sont collectées, et énumérées au Bleu de Trypan.

Marquage des cellules pour l'analyse en cytométrie en flux :

Les cellules sont stimulées pendant 2h à 37°C, avec de la Brefeldine A (1X, eBioscience), du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (10ng/mL, InvivoGen) et de la Ionomycine (500ng/mL, InvivoGen). Après la stimulation, les cellules ont été co-incubées avec le marqueur de viabilité (Live Dead, Life Technologies) et l'anticorps Fc Block (anti-CD16/CD32, BD, Biosciences) pendant 20min à température ambiante puis avec les anticorps extracellulaires pendant 20min à température ambiante. Les cellules NK, NKT et γδT sont marquées avec les anticorps CD3-AF700 (17A2), NK1.1-BV786 (PK136), CD1d-tetramer-PE, TCRβ-BV605 (H57-597), TCRγδ-PE-Cy7 (GL3), et définis comme, CD3⁺NK1.1⁺, TCRβ⁺CD1d-tetramers⁺, CD3⁺TCRγδ⁺, respectivement. Les macrophages et les neutrophiles sont marqués avec les anticorps CD11c-PE-CF594 (N418), CD11b-PerCP-Cy5.5 (M1/70), F4/80-BV650 (BM8), Ly6G (GR1) -BV711 (1A8), et définis comme CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁺ et CD11c⁺CD11b⁺Ly6G⁺F4/80⁻, respectivement. Les mastocytes sont marqués avec les anticorps CD3-AF700 (17A2), CD117-BV650 (ACK2), CD19-PE-Cy5 (eBio1D3), FcεRI-PE-Cy7 (MAR-1), et définis comme CD3⁺CD19⁺CD117⁺FcεRI⁺. Pour les cellules T et les ILCs les populations Lineage (Lin-) sont exclues en utilisant les anticorps suivants marqués au FITC : CD11b (M1/70), CD19 (eBio1D3), FcεRI (MAR-1), TER-119 (TER-119), Ly6G (GR-1) (RB6-8C5), CD49b (DX5) (DX5), CD11c (HL3), F4/80 (BM8), TCRγδ (eBioGL3), précédé d'une sélection des cellules CD45⁺ avec le CD45 APC-Cy7 (30F11). Les populations lymphoïdes d'intérêt sont sélectionnées via les marqueurs NKp46 PerCP-eFluor710 (29A1-4), CD117 BV650 (ACK2), CD3-AF700 (17A2), CD127 BV786 (SB/199), CD4 BV605 (RM4-5). Les lymphocytes T sont définis comme Lin⁻CD3⁺CD4⁺, les ILCs du type 3, ILC3 NCR⁺: Lin⁻CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD117⁺NKP46⁺, les ILC3 NCR⁻: Lin⁻CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD117^{low}NKP46⁻, enfin les LTi: Lin⁻CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD117⁺NKP46⁻.

Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec du Cytofix/Cytoperm (BD, Biosciences) pendant 15min à température ambiante puis marquées avec les anticorps intracellulaires pendant 20min à température ambiante. Pour ce marquage, les anticorps sont dirigés contre l'IL-22-APC ou PE et l'IL-17-BV421 (TC11-18H10.1), avec l'isotype contrôle ou le contrôle FMO (Fluorescence Minus One). L'anticorps tétramère CD1d a été obtenu du NIAID (National Institutes of Health) Tetramer Facility (Emory University,

Atlanta, GA), l'anticorps de souris anti-IL-22 (3F11) et son isotype contrôle ont été donnés par le Dr. W. Ouyang (Genentech, San Francisco, CA) et ont été marqués en APC ou en PE à l'aide d'un kit (AbD Serotec, Colmar, France). L'intensité de fluorescence est analysée par un cytomètre de flux (LSR Fortessa®, BD Biosciences) et les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo (version 10.6.1). Les détails des anticorps sont fournis en Table E2 (annexes) et les stratégies de gating en Fig S2.

Système reporter des cellules AhR :

Les cellules humaines HepG2-Lucia™ AhR (InvivoGen) expriment l'AhR endogène et expriment de manière stable le gène rapporteur « *Lucia luciferase* » dont la sécrétion est contrôlée par le promoteur couplé au gène *CYP1A1* humain. Les cellules ont été manipulées conformément aux instructions du fabricant. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à 2×10^4 cellules par puits et stimulées avec du formylindolo [3,2-b] carbazole (FICZ) à $1 \mu\text{g/mL}$ comme contrôle positif, avec du LPS comme contrôle négatif, et avec l'allergène de chien ou d'acarien (HDM) (Stallergenes/Greer) pendant 48h. Les surnageants ont été recueillis et le QUANTI-Luc™ (InvivoGen) ajouté juste avant la mesure au luminomètre. Une deuxième lignée cellulaire reporter, l'hépatome de souris H1L7.5c3, aimablement fournie par Michael Denison (209) a également été évaluée. Les cellules ont étéensemencées à $7,5 \times 10^4$ cellules par puits pendant 24h puis stimulées avec les réactifs ci-dessus et avec le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) à $0,01 \mu\text{M}$, comme contrôle positif pendant 12h. Après lavage avec du PBS, les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse 1X (Promega) et le substrat de la luciférase (Luciférase Assay Substrat, Promega) est ajouté au lysat cellulaire. L'activité luciférase a été lue conformément aux recommandations du fournisseur. Les résultats sont exprimés en unités relatives de luciférase.

Analyses statistiques :

Les données normalement distribuées (test de Shapiro-Wilk) ont été analysées par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA), suivies d'un test de comparaison multiple post-hoc (test de Bonferroni). Les données non normalement distribuées ont été analysées par un test d'analyse de variance Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn's à comparaison multiple. Pour l'hyperréactivité des voies aériennes, un test ANOVA bidirectionnel a été utilisé. Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel Graphpad prism v8. Les résultats sont considérés comme significatifs quand $p < 0,05$.

Résultats

Aryl hydrocarbon receptor regulates airway remodeling and bronchus-associated lymphoid tissue in neutrophilic airway inflammation

Mélodie Bouté, Saliha Ait Yahia, Julie Nanou, Daniel Alvarez Simon, Camille Audousset, Han Vorng, Joanne Balsamelli, Fan Ying, Philippe Marquillies, Elisabeth Werkmeister, Patricia de Nadai, Cécile Chenivresse, and Anne Tsicopoulos

Article soumis

L'Aryl hydrocarbon receptor régule le remodelage bronchique et les tissus lymphoïdes associés aux bronches lors d'une inflammation neutrophilique des voies respiratoires

L'extrait allergénique de chien induit une inflammation neutrophilique des voies respiratoires, une hyperréactivité des voies aériennes et un remodelage bronchique sans effet adjuvant de l'agoniste NOD2

Pour étudier l'effet des différents déterminants de l'inflammation de type Th17 sur la gravité de l'inflammation allergique, un modèle murin d'asthme allergique chronique induit par l'allergène de chien a été mis au point (Fig E1A). Les souris ayant une allergie au chien présentent toutes les caractéristiques cardinales de l'asthme expérimental, comprenant une augmentation du nombre total de cellules dans le LBA, principalement en relation avec les neutrophiles, mais aussi des élévations des éosinophiles et des lymphocytes (Fig 1A). Une augmentation des IgE sériques totales et spécifiques de l'allergène de chien (Fig 1B) et une augmentation de l'hyperréactivité des voies aériennes (Fig 1C). L'analyse histologique des coupes de poumons de souris allergiques au chien montre une augmentation des infiltrats de cellules, colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) et du mucus, coloré par l'Acide Périodique de Schiff (PAS) par rapport aux souris PBS (Figs 1D, 1E). Les dépôts de collagène péri-bronchiques sont également augmentés dans les sections pulmonaires de souris présentant une allergie au chien, comme l'a montré la coloration au trichrome de Masson et la coloration au rouge Sirius (Figs 1F, 1G). Ce paramètre est également observé par microscopie bi-photonique mettant en évidence des fibres de collagène en triple hélice autour des bronches chez des souris sensibilisées à l'allergène de chien (Fig S3). Enfin, des cellules musculaires lisses (CML) bronchiques plus épaisses sont observées chez des souris allergiques au chien, par marquage de l'anti- α -SMA (Fig 1H). L'agoniste de NOD2, le MDP, a été administré pendant la phase de sensibilisation, soit seul, soit en association avec l'allergène de chien. Cependant, aucune

modification significative de l'un ou l'autre des paramètres ci-dessus n'a été observée, lorsque les souris ont été co-exposées au chien et au MDP par rapport au chien seul (Fig 1A à H). Ces données indiquent que ce modèle chronique induit par l'allergène de chien présente une inflammation des voies respiratoires avec des neutrophiles prédominants, associée à un fort remodelage bronchique non exacerbé par la co-stimulation du ligand de NOD2 pendant la phase de sensibilisation.

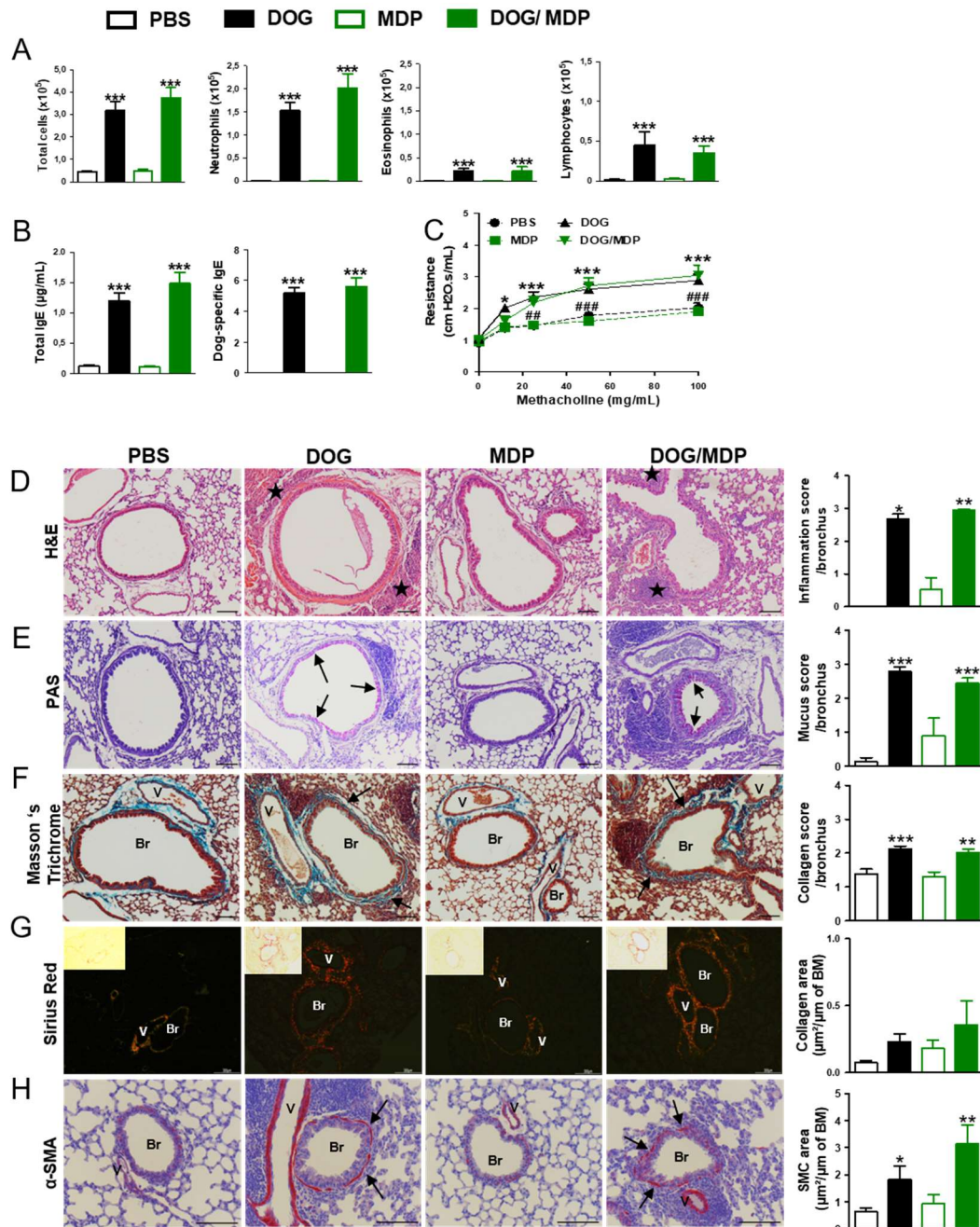


Figure 1. L'allergène de chien induit une inflammation neutrophilique des voies respiratoires, une hyperréactivité des voies aériennes et un remodelage bronchique sans effet adjuvant de l'agoniste NOD2. **A**, numération dans le LBA (nombre absolu de cellules). **B**, IgE totales et IgE spécifiques (titres) dans les sérums. **C**, hyperréactivité des voies aériennes. Photographies représentatives et quantifications des sections de poumons colorées pour **D**, l'inflammation en utilisant l'H&E (étoiles noires) **E**, le mucus en utilisant le PAS (couleur rose) **F**, le collagène en utilisant le trichrome de Masson (coloration bleue/verte) **G**, le collagène en utilisant le rouge Sirius (les encarts correspondent aux sections observées sous lumière non polarisée) **H**, CML en utilisant un anticorps anti- α -SMA (les cellules positives sont colorées en rouge). Barres d'échelle : 100 μ m. Les flèches noires indiquent la coloration d'intérêt (mucus, collagène et CML). V : vaisseau, Br : bronche, BM : membrane basale. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=14-32 souris par groupe, et n=4-7 souris par groupe pour l'histologie). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, DOG versus PBS ; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, DOG MDP versus PBS. Test de Kruskal Wallis pour tous sauf pour les figures 1E et 1F (ANOVA unidirectionnel), et ANOVA bidirectionnel pour la figure 1C.

L'inflammation allergique des voies respiratoires induite par l'allergène de chien est associée à un profil cytokinique de type Th2 et Th17

Ensuite, le profil cytokinique des extraits de poumons est évalué dans les différents groupes de souris. Bien que le nombre d'éosinophiles dans le LBA est faible dans ce modèle, les cytokines de type Th2 et les chimiokines, IL-13, IL-33 et CCL17 sont régulées à la hausse dans les poumons des souris allergiques au chien (Fig 2A). Pour les cytokines de type Th17, l'IL-17 pulmonaire est élevée, tout comme l'IL-22 dans les LBA (Fig 2A) de souris sensibilisées à l'allergène de chien. L'expression de *Tgf-β* n'est pas modifiée (données non présentées). Les cellules connues pour produire de l'IL-17 (cellules lymphoïdes, neutrophiles et mastocytes) (210) (211) et de l'IL-22 (cellules lymphoïdes, macrophages, neutrophiles et mastocytes) (81) ont été analysées par cytométrie de flux. Dans les groupes stimulés par l'allergène de chien, les cellules T CD4⁺, les cellules Tγδ et les cellules inductrices de tissu lymphoïde (LTi) semblent être les principales cellules exprimant à la fois l'IL-17 et l'IL-22, tandis que l'IL-22 est également exprimée par les cellules NK (Fig 2B). Les autres cellules analysées ne présentent pas de production significative de cytokines après provocation allergique où leur expression ne représentent qu'une infime partie du nombre total de cellules (comme les neutrophiles) (Fig S4). Les profils de type Th2- et Th17- ne sont pas modifiés par la co-stimulation de l'agoniste NOD2, mais la production de l'IFN-γ est diminuée (Fig 2A). Dans l'ensemble, ce modèle chronique est caractérisé par un modèle inflammatoire d'infiltration prédominante de type Th17 fournie par les cellules lymphoïdes, associé à un profil de cytokines de type Th2 moins important.

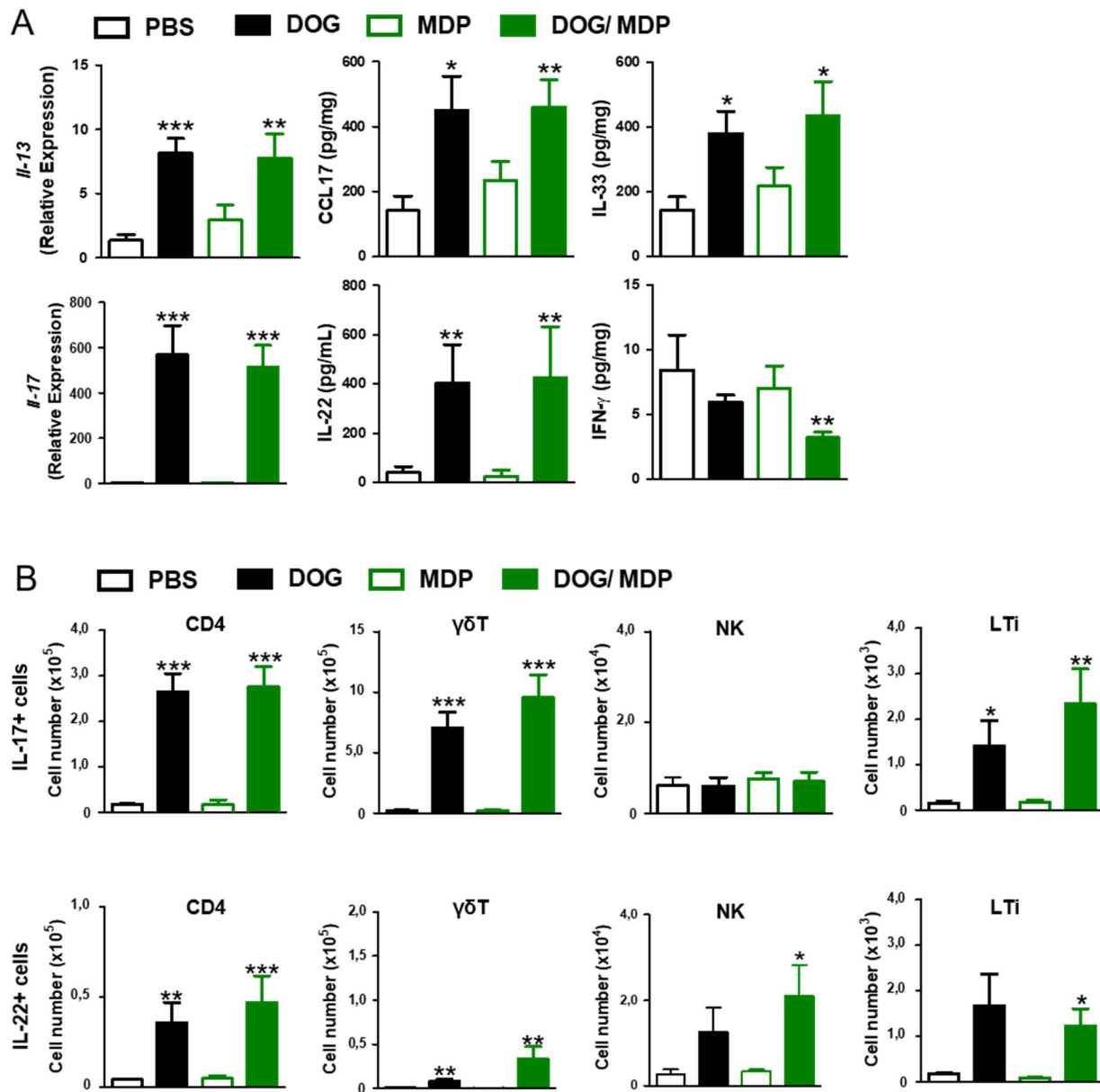


Figure 2. L'inflammation allergique des voies respiratoires induite par l'allergène de chien est associée à un profil cytokinique de type Th2 et Th17. **A**, niveaux de cytokines dans les extraits pulmonaires et dans le LBA. **B**, nombre de cellules IL-17+ et IL-22+ dans les poumons. Les données sont présentées en nombres moyens de cellules $\pm$ SEM ($n=8-20$ souris par groupe, $n=6-15$ souris par groupe pour l'analyse par cytométrie de flux). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, versus PBS. Test de Kruskal Wallis pour tous.

L'inflammation allergique des voies respiratoires induite par l'allergène de chien provoque la formation d'iBALT

Lors de l'analyse des coupes histologiques, nous avons été surpris de voir des follicules ectopiques dans des coupes de poumons de souris allergiques au chien, mais pas chez les souris contrôles (PBS, MDP) (Fig 3A). Les iBALT sont des organes lymphoïdes tertiaires (OLT) composés de cellules B, T, de centres germinaux avec des FDC, et des veinules endothéliales hautes permettant l'entrée des lymphocytes sanguins. Les cellules FDC CD21+, B B220+ et T CD3+ ont été évaluées par immunohistochimie et sont trouvées dans les follicules ectopiques péri-bronchiques chez les souris allergiques au chien (Figs 3B, 3C, 3D). Nous avons ensuite vérifié si ces iBALT pouvaient induire la production locale d'immunoglobulines dans les LBA. Les IgE totales du LBA évaluées par ELISA sont inférieures au seuil de détection du test (données non présentées), tandis que les IgA totales sont fortement augmentées dans les LBA provenant de groupes sensibilisés à l'allergène (Fig 3E). Les IgG1 spécifiques à l'allergène de chien dans les LBA ne sont pas détectées dans les groupes contrôles, mais sont augmentées dans les groupes stimulés par l'allergène de chien (Fig 3E). Une fois de plus, la co-stimulation par le MDP ne modifie pas la taille, la composition ou la fonctionnalité des iBALTs (Fig 3A à 3E). Ces données montrent que ce modèle chronique d'inflammation allergique des voies respiratoires favorise le développement d'iBALT fonctionnel.

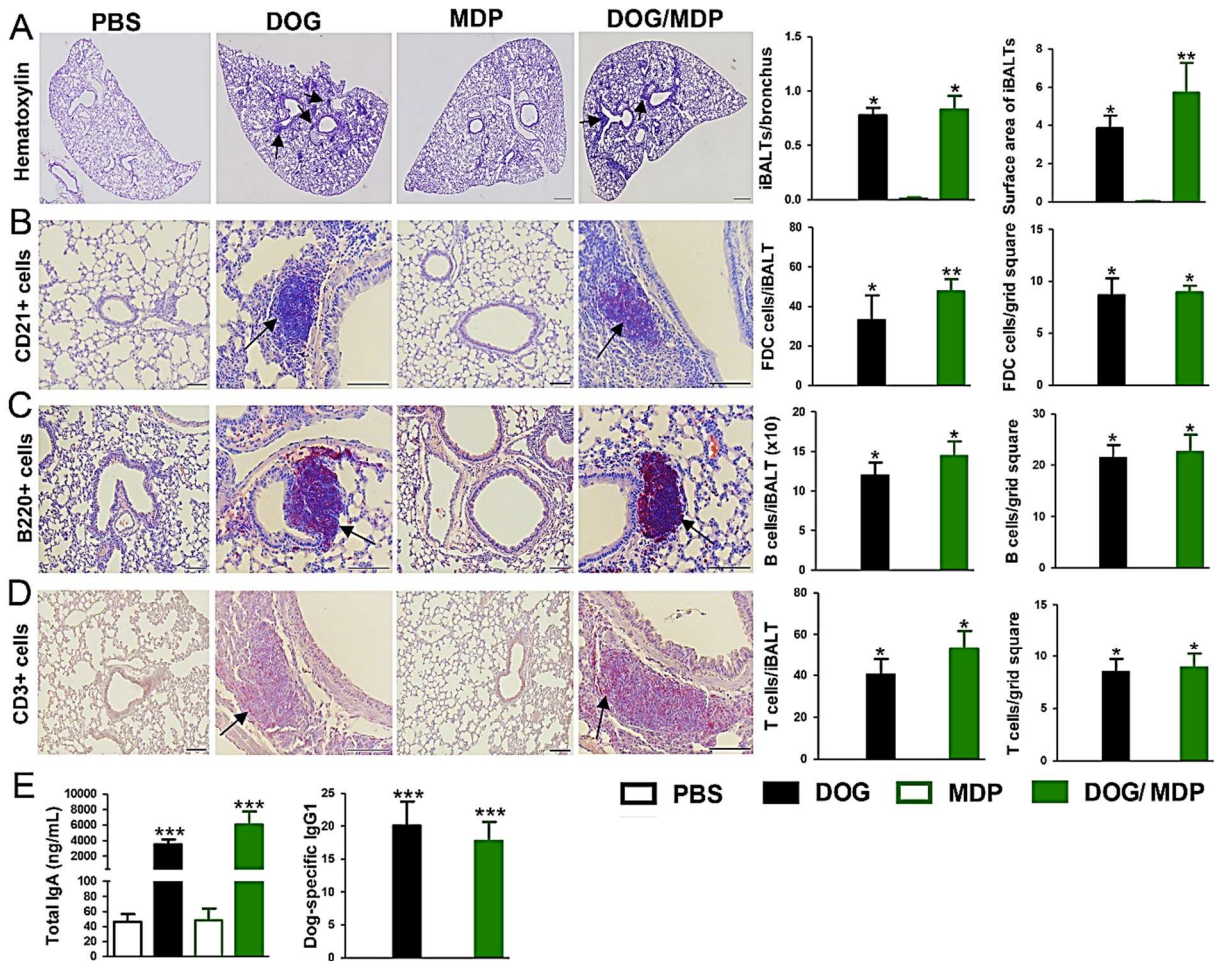


Figure 3. L'inflammation allergique des voies respiratoires induite par l'allergène de chien provoque la formation d'iBALT. Photographies représentatives et quantification des iBALTs. **A**, nombre et surface (nombre de carrés de la grille) du iBALT. Barres d'échelle : 500 μ m. Nombre par iBALT et par carré de la grille, **B**, des FDC, **C**, des cellules B et **D**, des cellules T. Barres d'échelle : 100 μ m. Les cellules positives sont colorées en rouge. Les flèches noires indiquent la coloration d'intérêt **E**, IgA totales et IgG1 spécifiques à l'allergène de chien (titres) dans les LBA. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=4-7 souris par groupe pour l'histologie, n=13-22 souris par groupe pour les LBA. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, versus PBS. Test de Kruskal Wallis pour tous.

L'antagoniste de l'Ahr atténue l'hyperréactivité des voies aériennes, l'infiltration de neutrophiles dans le LBA, l'hyperplasie du muscle lisse et la production d'IL-22 dans les poumons

Nous avons ensuite évalué le rôle de l'Ahr durant les phases de provocations allergéniques. Comme un certain nombre de ligands ont été décrits pour l'Ahr, nous nous sommes demandé si l'allergène de chien pouvait contenir un tel ligand. Nous avons utilisé deux lignées cellulaires rapportrices qui permettent d'étudier l'activation de l'Ahr humain et murin. Dans les deux lignées cellulaires, l'allergène de chien, mais pas les acariens (HDM) ni le LPS n'ont induit une activité rapportrice de la luciférase dépendante de la dose testée (Fig S5). L'effet du blocage de l'Ahr a ensuite été évalué en utilisant un antagoniste plutôt que des souris totalement déficientes, afin d'éviter les mécanismes de compensation. Les groupes MDP ont été écartés en raison de leur manque d'effet. L'antagoniste de l'Ahr, le CH-223191, a été administré par le biais du régime alimentaire, comme décrit précédemment (201) (203). Chez les souris allergiques, il réduit le recrutement cellulaire total dans le LBA par rapport aux souris non traitées, en relation avec une diminution du nombre de neutrophiles mais pas d'éosinophiles (Fig 4A). Bien que la réponse humorale ne soit pas modifiée (Fig 4B), l'hyperréactivité des voies aériennes est significativement réduite chez les souris allergiques traitées par rapport aux souris non traitées (Fig 4C). L'analyse histologique des coupes de poumons de souris allergiques traitées met en évidence, une diminution de la production de mucus mais pas de l'inflammation, ni du dépôt de collagène péri-bronchique, par coloration au trichrome de Masson ou par coloration au rouge Sirius (Fig 4D). Cependant, l'épaisseur des CML évaluée par marquage avec l'anti- α -SMA est diminuée par rapport aux souris allergiques non traitées (Fig 4E). En termes de profil de cytokinique, la production d'IL-22 induite par l'allergène de chien est diminuée après traitement par l'antagoniste de l'Ahr, tout comme la production d'IL-10 de base. Aucune modification n'est observée dans les niveaux d'IL-17, IL-33, CCL17 et CXCL1, une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles (Fig 4F).

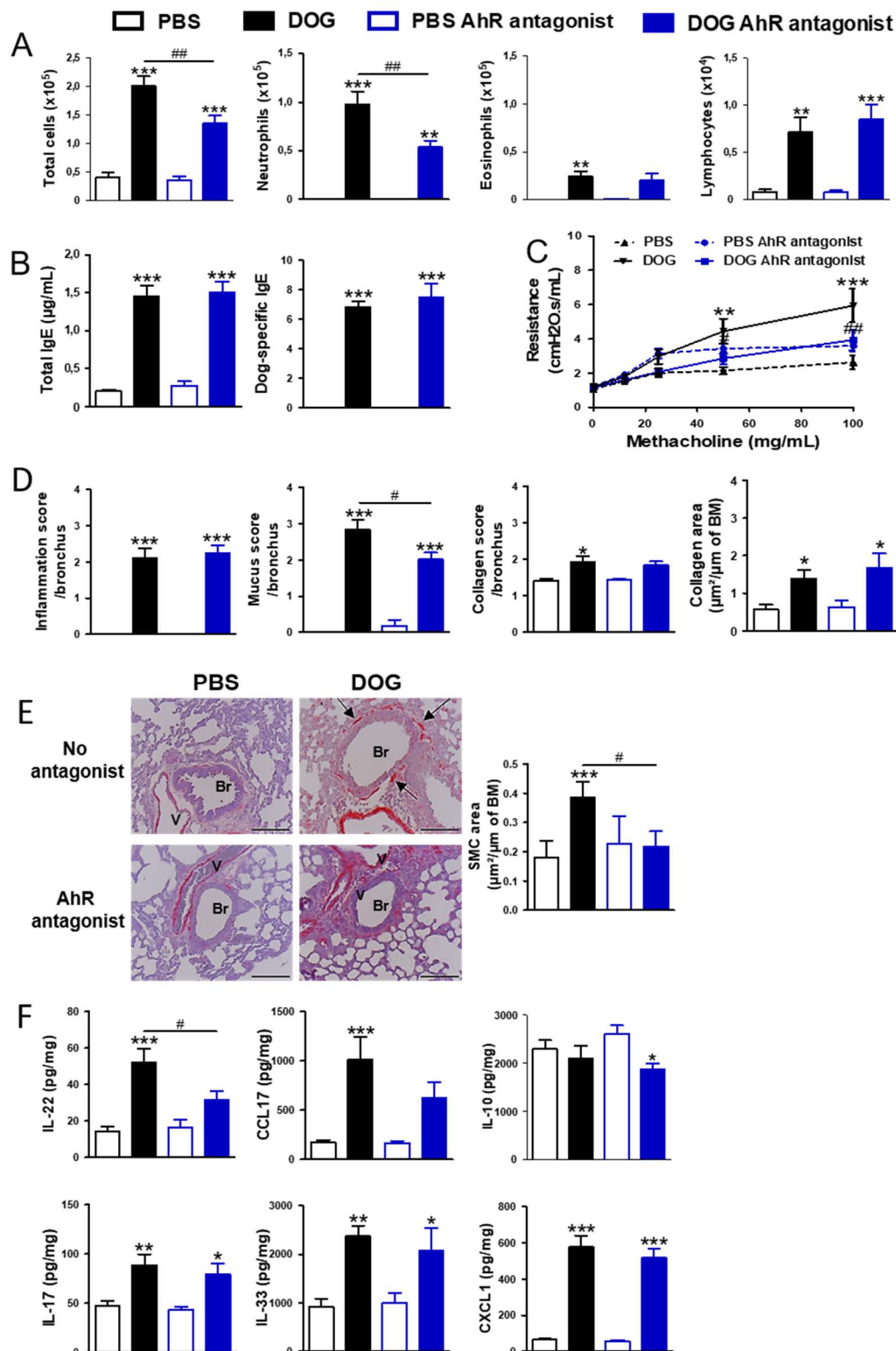


Figure 4. L'antagoniste de l'Ahr atténue l'hyperréactivité des voies aériennes, l'infiltration de neutrophiles dans le LBA, l'hyperplasie du muscle lisse et la production d'IL-22 dans les poumons. **A**, numération du LBA (nombre absolu de cellules). **B**, IgE totales et IgE spécifiques (titres) dans les sérums. **C**, hyperréactivité des voies aériennes. **D**, quantification des coupes de poumon pour le score inflammatoire en utilisant l'H&E, score de mucus en utilisant le PAS, score de collagène en utilisant le trichrome de Masson, surface de collagène/membrane basale en utilisant le rouge Sirius. **E**, photographies représentatives et quantification des coupes de poumon où les CML sont marquées en utilisant un anticorps anti-α-SMA (les cellules positives sont colorées en rouge, flèches noires). Barres d'échelle : 100 μm. V :

vaisseau, Br : bronche, BM : membrane basale. **F**, production de cytokines pulmonaires. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=6-14 souris par groupe ; n=4-6 souris par groupe pour l'histologie) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, versus contrôle, #p<0,05, ###p<0,01, versus DOG AhR antagoniste. ANOVA unidirectionnel pour tous, sauf pour les figures 1B et 1E (Kruskal Wallis), et ANOVA bidirectionnel pour la figure 4C.

L'antagoniste de l'AhR exacerbe la formation d'iBALT induite par l'allergène de chien.

Il est frappant de constater que le nombre et la taille des iBALTs est augmenté chez les souris allergiques traitées par l'antagoniste de l'AhR (Fig 5A), tout comme le nombre de cellules FDC et B (Figs 5B, 5C), alors que le nombre de cellules T CD3+ (Fig 5D) et de cellules T régulatrices (Treg) Foxp3+ n'est pas statistiquement modifié (Fig 5E). Le taux d'IgG1 spécifiques à l'allergène de chien, mais pas le niveau d'IgA totales dans les LBA, est augmenté chez les souris allergiques traitées par l'antagoniste de l'AhR (Fig 5F). Collectivement, ces résultats montrent que l'allergène de chien est capable d'induire une hyperréactivité des voies aériennes, une production de mucus, l'hyperplasie des CML, une infiltration neutrophilique dans le LBA et la production d'IL-22 dans un modèle d'inflammation chronique des voies respiratoires. Ces phénomènes sont en partie provoqués par l'activation de l'AhR, alors que la formation d'iBALT est inversement régulée par cette voie.

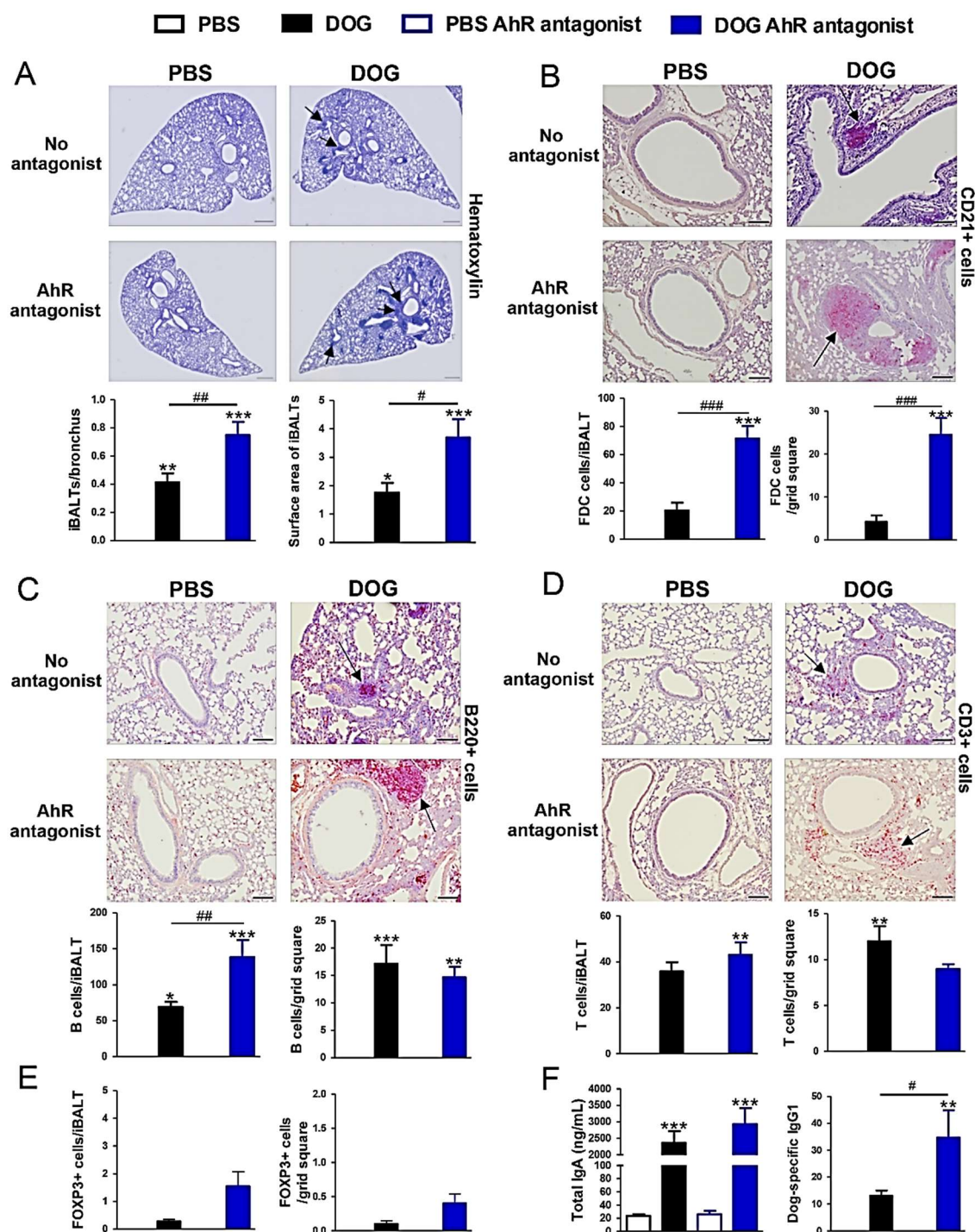


Figure 5. L'antagoniste de l'Ahr exacerbe la formation d'iBALT induite par l'allergène de chien. Photographies représentatives et/ou quantifications des iBALTs. **A**, nombre et surface (nombre de carrés de la grille) des iBALTs (barres d'échelle : 500 µm). Nombre par iBALT et par carré de la grille, **B**, des FDC, **C**, des cellules B, **D**, des cellules T et **E**, des cellules Foxp3+. Les cellules positives sont colorées en rouge, avec des barres d'échelle : 100 µm. Les flèches noires indiquent la coloration d'intérêt. **F**, niveaux d'IgA totales et d'IgG1 spécifiques à l'allergène de chien (titres). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n=4-6 souris par groupe pour l'histologie, n=6-8 souris par groupe pour le LBA) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, versus contrôle, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, versus DOG AhR antagoniste. ANOVA à sens unique pour tous, sauf pour la figure 5D (Kruskal Wallis).

Figures et légendes supplémentaires :

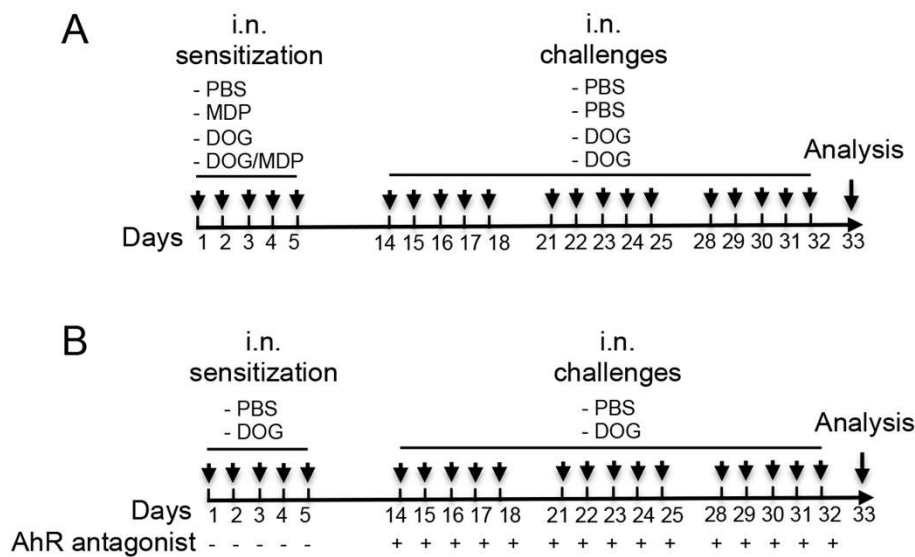


Figure S1. Protocole expérimental. **A**, Inflammation allergique induite par l'allergène de chien avec ou sans co-sensibilisation avec l'agoniste de NOD2, le MDP **B**, protocole expérimental utilisé avec l'antagoniste de l'AhR. i.n. : intranasal.

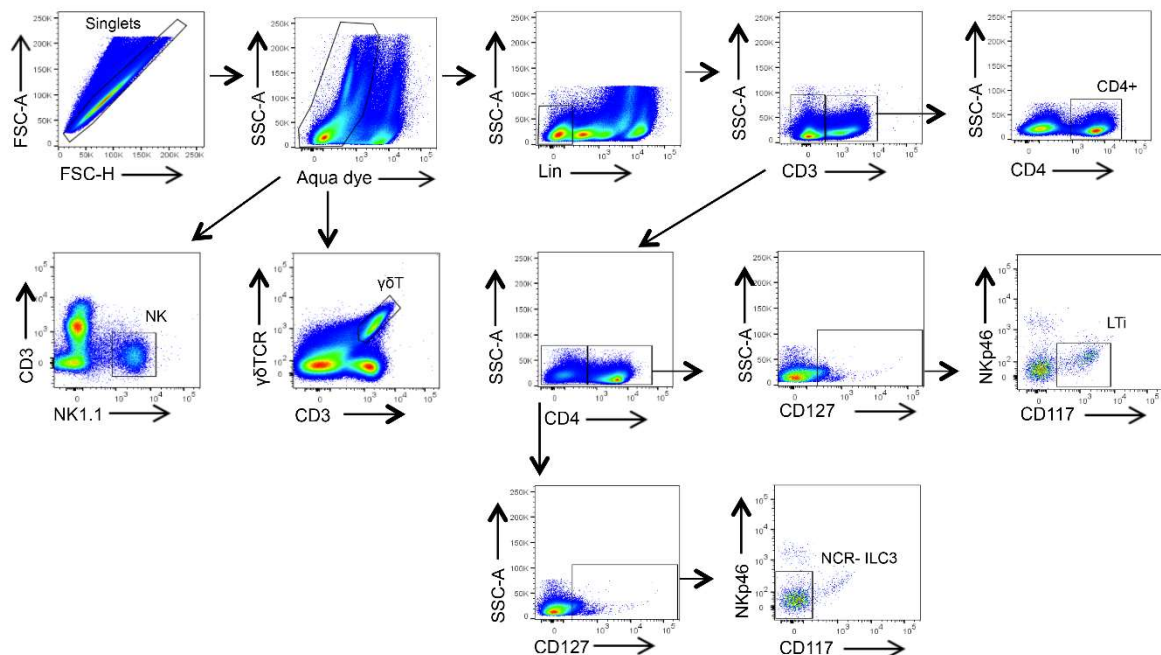


Figure S2. Stratégie de gating des sous-populations de cellules dans le poumon pour les NK, les cellules T $\gamma\delta$, les ILC et les cellules T CD4+. LTi : cellules inductrices du tissu lymphoïde ; NCR : récepteur cytotoxique naturel. La stratégie de gating comprend la taille (FSC) et la granularité (SSC) des cellules, l'exclusion des doublets, la sélection de cellules vivantes (Live Dead) et la sélection de sous-populations cellulaires en fonction des marqueurs de surface cellulaire indiqués.

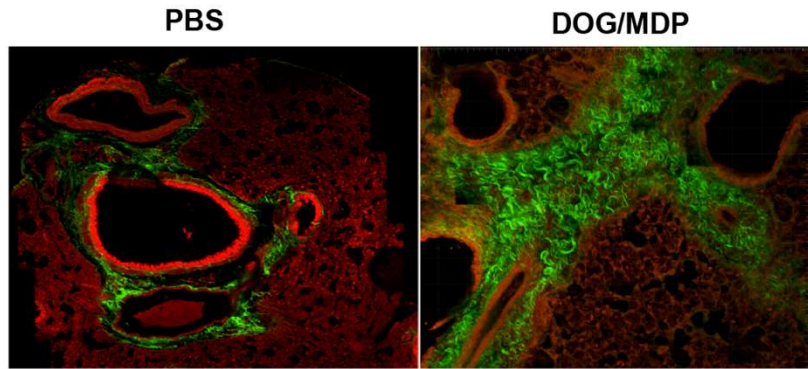


Figure S3. Analyse du remodelage bronchique. **A**, microscopie bi-photonique de coupes de poumons montrant le collagène en vert et le parenchyme en rouge.

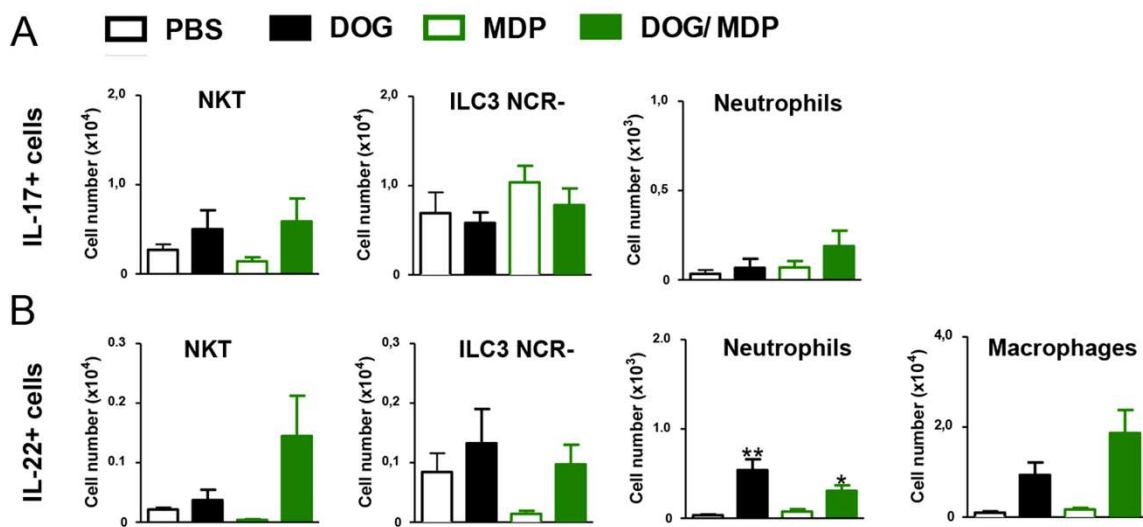


Figure S4. Analyse par cytométrie en flux. Nombre de cellules pulmonaires IL-17+ et IL-22+. Les données proviennent de n=6-15 souris par groupe et sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01, versus PBS. Test de Kruskal Wallis pour tous.

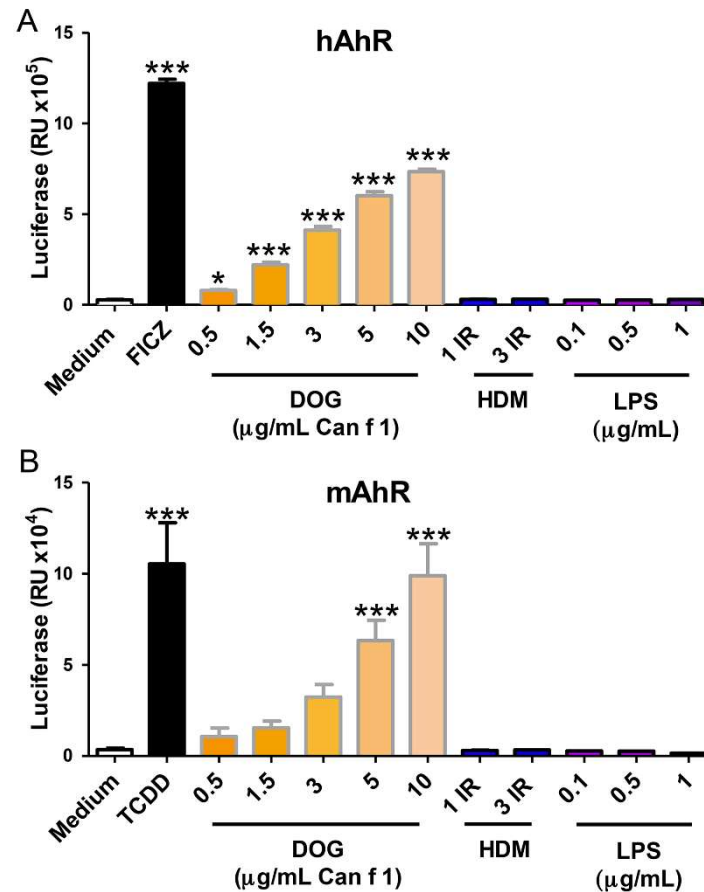


Figure S5. Activité reportrice de l'allergène de chien sur les lignées cellulaires AhR. **A**, lignée cellulaire humaine AhR rapportrice **B**, lignée cellulaire murine AhR rapportrice. Unité relative moyenne de luminescence de la luciférase en réponse aux témoins positifs (FICZ et TCDD), aux témoins négatifs (milieu et LPS) et aux allergènes de chien et d'HDM. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de 2 expériences séparées en quadruple répliques * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus PBS. ANOVA unidirectionnel pour des mesures répétées.

Deuxième partie

Objectifs de travail

Etant donné les propriétés de l'IL-22 et de son rôle dans la pathologie de l'asthme (65) (91) (68), un deuxième article est consacré à son rôle dans le modèle d'asthme expérimental induit par l'allergène de chien. Des souris déficientes pour le gène de l'IL-22 (Knock-Out (KO)) ont été comparées à des souris IL-22 Wild Type (WT) littermate. Ces souris peuvent être comparées ensemble car elles présentent la même flore, l'idée étant que l'IL-22 pourrait être impliquée dans le remodelage bronchique associé à notre modèle d'asthme sévère. Pour aller plus loin dans l'étude, le rôle des cellules cibles de l'IL-22 ont été évaluées dans ce modèle. Comme présenté précédemment, l'IL-22 agit via un récepteur dimérique, constitué de la chaîne de l'IL-10R β 2 et de la chaîne IL-22Ra1. Cette dernière chaîne est exprimée exclusivement sur les cellules non hématopoïétiques, comme les cellules épithéliales, cellules musculaires lisses (CML)/myofibroblastes. Pour cela, deux lignées murines déficientes au niveau du récepteur IL-22Ra1, ont été créées. Une première lignée appelée IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID est déficiente pour le récepteur IL-22Ra1 au niveau des cellules épithéliales. La deuxième lignée, IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2} a la particularité d'être déficiente pour le récepteur dans les CML et myofibroblastes, seulement après induction par le Tamoxifène.

Avec l'ensemble de ces quatre lignées, nous comptons montrer le rôle que peut jouer l'IL-22 dans le développement de l'asthme sévère (même protocole expérimental). Notamment sur le remodelage bronchique, paramètre pour lequel il n'y a pas de traitement médicamenteux disponible actuellement, hormis la thermoplastie, et également d'identifier quel type de cellules (épithéliales, et/ou musculaires lisses) est impliqué dans les effets qui dépendent de l'IL-22. L'intérêt d'étudier le récepteur de l'IL-22 réside dans son expression uniquement sur des cellules de structure, qui a l'avantage de permettre d'envisager des traitements ciblés administrés localement sans effets systémiques.

Matériels et Méthodes

Souris et considérations éthiques :

Des souris WT littermate ont été dérivées à partir d'un croisement entre souris IL-22 déficientes (KO) (J.C Renauld, Bruxelles) et WT. Deux autres lignées, IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID et IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2} ont été créés au laboratoire, pour déléter le récepteur IL-22Ra1 dans les cellules épithéliales et/ou dans les cellules musculaires/myofibroblastes, respectivement, via le système Cre-LoxP. Des souris IL-22Ra1^{tm1c(KOMP)Wtsi} (B.Ryffel, Orléans), qui expriment le récepteur IL-22Ra1 ainsi que deux séquences LoxP qui encadre le gène codant ce récepteur ont été croisées ensembles afin d'obtenir une lignée de souris homozygote, IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}.

L' α -SMA (ou ACTA2) est spécifiquement exprimée dans les CML et myofibroblastes, ainsi pour cibler ces cellules, des souris SMA-Cre-ER^{T2} (P.Chambon, Strasbourg) ont été croisées avec les souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}. Les souris SMA-Cre-ER^{T2} ont la recombinase Cre qui est fusionnée à un domaine de liaison des ligands du récepteur de l'œstrogène humain muté (ER^{T2}). Ce récepteur est incapable de se lier aux œstrogènes endogènes. Le Tamoxifène, qui est un agoniste du récepteur, est capable de se lier à ER^{T2} muté, le complexe Cre-ER^{T2} est alors transloqué dans le noyau des cellules pour effectuer l'excision du récepteur IL-22Ra1. En l'absence de Tamoxifène, le complexe Cre-ERT² reste dans le cytoplasme de la cellule (212) (213).

Concernant les cellules épithéliales, de nouveau, des souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c} ont été croisées avec des souris ACID (aussi appelé Aqp5-Cre-IRES-DsRed, B.Ryffel, Orléans). L'aquaporine 5 (Aqp5) est un canal ionique spécifiquement exprimé dans les cellules épithéliales pulmonaires et plus particulièrement dans les pneumocytes de type I chez l'homme (214).

Pour ces deux lignées, l'activité de la recombinase Cre dépend du promoteur, ainsi, dans les cellules musculaires lisses, la Cre dépend du promoteur du gène du *Sma* et dans les cellules épithéliales, elle dépend du promoteur du gène de l'*Aqp5*. Pour chaque lignée, des croisements de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération ont été réalisés. Pour obtenir les lignées IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID, seules les femelles, obtenues avec les croisements de 1^{ère} génération, peuvent être croisées car les mâles perdent la recombinase Cre au fil des générations. Après les croisements de 3^{ème} génération, des souris Cre⁺ ou Cre⁻ hétérozygotes IL-22Ra1^{tm1c/tm1c} homozygotes, sont obtenues pour les deux lignées. Cinquante pourcents des souris issues de ce dernier croisement sont déficientes en récepteur à l'IL-22 soit au niveau des cellules épithéliales, soit au niveau des CML/myofibroblastes. Les autres 50% sont non déficientes et

servent de contrôles. Seules, les femelles sont utilisées pour les manipulations. Elles sont maintenues en zone d'élevage Exempt de Pathogènes Spécifiques (SPF) de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, dans des cages ventilées et avec un cycle de lumière de jour de 12h. Les protocoles utilisés ont été approuvés par le comité d'éthique régional et autorisés par le ministère de la recherche et l'innovation (autorisation numéro : APAFIS#2016070417344442 v3).

Génotypage :

Toutes les souris issues de l'élevage sont génotypées. L'ADN est extrait à partir d'un prélèvement de peau au niveau de l'oreille et par l'utilisation d'un kit d'extraction (KAPA Express Extract, Sigma-Aldrich). Une PCR avec les amorces d'intérêt et l'ADN extrait est réalisée et les produits PCR migrent sur un gel d'agarose.

Pour les souris IL-22 WT et KO, seules les premières portées sont vérifiées. La DREAM Taq Hot Start Green PCR Master Mix (Life Technologies) est utilisée avec les amorces (30pmol/μL, Eurofins) correspondant au génotype WT ou KO (tableau 1). Pour les souris issues de la 3^{ème} génération de croisements, il est vérifié si les souris sont bien homozygotes pour l'IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}, pour les premières portées. Pour cela, l'enzyme KAPA 2G Fast HS Genotyping Mix 2X (Sigma-Aldrich) est mélangée avec les amorces (200pmol/μL, Eurofins) correspondantes (tableau 1). Pour vérifier si les souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID et IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2} sont positives ou négatives pour la recombinaison Cre, la Taq Ozyme HS Mix 2X (Ozyme) est utilisée avec les amorces (200pmol/μL, Eurofins) correspondantes pour chaque génotype (tableau 1). Chaque PCR est réalisée dans le thermocycleur Proflex (Thermo Fisher). Les produits PCR migrent sur un gel d'agarose à 1% dans des cuves d'électrophorèse pendant 2h.

Souris	Enzyme (Taq)	Amorces
IL-22 WT	DREAM Taq Hot Start Green PCR Master Mix	5'- GCTTACCTGTTTAGGTGTCTCTG -3' 5'-AATCTATGAAGTTGGTGGGA-3'
IL-22 KO		5'-AGCGCATGCTCCAGACTGCC-3 5'-AATCTATGAAGTTGGTGGGA-3'
IL-22Ra1 ^{tm1c}	KAPA 2G Fast HS Genotyping Mix 2X	IL22 F 5' TCTGATGCCCTCTTCTGCTG 3' IL22 R 5' TTGCTGGTCACAGTCCATCC 3'
ACID	Taq Ozyme HS mix 2x	Cre F 5' CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG 3' Cre R 5' CAGGGTGTTATAAGCAATCCC 3' Fabpi200F 5' TGGACAGGACTGGACCTCTGCTTTCCTAGA 3' FabpiR 5' TAGAGCTTTGCCACATCACAGGTCATTCAG 3'
SMA-Cre-ER ^{T2}		TK139 F 5' ATTTGCCTGCATTACCGGTC 3' TK141 R 5' ATCAACGTTTTCTTTTCGGA 3' ADV 28 F 5' TTACGTCCATCGTGGACAGC 3' ADV 30 R 5' TGGGCTGGGTGTTAGCCTTA 3'

Tableau 1 : Enzyme et séquences des primers utilisés pour les différents géotypages.

Délétion par le Tamoxifène :

La délétion du récepteur IL-22Ra1 chez les souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2} est inductible sous l'effet du Tamoxifène. Une solution de Tamoxifène (Sigma-Aldrich) à 5mg/mL est préparée en éthanol absolu et en huile de tournesol (commerce), dans un ratio 1 (éthanol) pour 10 (huile de tournesol). La poudre de Tamoxifène est dissoute dans l'éthanol absolu puis dilué en en huile. La solution est vortexée pendant 2min puis soniquée dans un bac à ultrasons (Dutscher) pendant 30min. La solution est conservée à 4°C le temps du protocole à l'abri de la lumière. Pour la délétion, 0,5mg de solution de Tamoxifène est injectée en intra-péritonéal (IP) aux souris pendant 5 jours à l'aide d'une seringue à insuline. Le protocole d'asthme allergique à l'allergène de chien débute 5 jours après la dernière IP.

Vérification de la délétion du récepteur IL-22Ra1 :

La délétion du récepteur IL-22Ra1 est vérifiée par cytométrie en flux. Après digestion et récupération, les cellules du poumon ont été co-incubées avec le marqueur de viabilité (Live Dead, Life Technologies) et l'anticorps FcBlock (CD16/CD32, BD, Biosciences) pendant 20min à température ambiante puis avec les anticorps extracellulaires pendant 20min à température

ambiante. Les cellules épithéliales (CD45- EpCAM+), les cellules musculaires lisses (CD45- α SMA+) et les cellules endothéliales (CD45- CD105+), des souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID et IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2} ont été marquées par l' α -SMA-AF488 (abcam, clone :1A4), CD45-APC-Cy7 (BD Biosciences, clone : 30F11), CD105-APC (Ozyme, clone : MJ7/18), F4/80-BV650 (Biolegend, clone : BM8), CD3-AF700 (eBioscience, clone : 17A2), EpCAM+-BV605 (Biolegend, clone : G8.8) et l'IL-22Ra1-PerCP,(LSBio). Un marquage a été réalisé avec l'anticorps l'IL-22Ra1-PerCP et un marquage sans cet anticorps (contrôle FMO).

Les poumons, cœurs et intestins ont été prélevés pour les deux lignées et des immunomarquages réalisés pour identifier le récepteur avec un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-IL-22Ra1 de souris (Clinisciences). Les immunomarquages sont réalisés comme décrits précédemment et à l'aide du kit Vectastain ABC-Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories), révélés par le Fast Red (Sigma-Aldrich), et contres colorés à l'hématoxyline de Harris (MM France).

Analyses statistiques :

Les données normalement distribuées (test de Kolmogorov-Smirnov) ont été analysées par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA), suivis d'un test de comparaison multiple post-hoc (test de Bonferroni). Les données non normalement distribuées ont été analysées par un test d'analyse de variance Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn's à comparaison multiple. Pour l'hyperréactivité des voies aériennes, un test ANOVA bidirectionnel a été utilisé. Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel Graphpad prism v5. Les résultats sont considérés comme significatifs quand $p < 0,05$.

Le protocole expérimental d'asthme est le même que celui décrit précédemment. L'ensemble des paramètres de l'asthme sont évalués ainsi que la formation des iBALTs, comme décrit dans le matériel et méthode du premier article. L'analyse statistique est faite comme pour la première partie.

Résultats

Rôle de l'IL-22 dans le modèle d'asthme à l'allergène de chien

Pour cette partie, les résultats obtenus à partir des souris IL-22 KO sont comparés aux souris IL-22 WT littermate. En effet, il a été montré que l'IL-22 influence le microbiote intestinal (215) et nous avons voulu écarter ce biais pour évaluer l'effet de l'IL-22 dans notre modèle expérimental. Ainsi, les résultats présentés ci-dessous, n'englobent pas la totalité des protocoles réalisés mais uniquement ceux analysés.

La déficience en IL-22 affecte le recrutement cellulaire au niveau du LBA et notamment le recrutement des neutrophiles et des macrophages, qui sont significativement diminués (Fig 1A). L'hyperréactivité des voies aériennes est également diminuée chez les IL-22 KO sensibilisées comparée aux IL-22 WT sensibilisées à l'allergène de chien (Fig 1B). Pour la réponse humorale, aucune différence n'est observée entre les groupes pour les IgE totales alors que les IgE spécifiques à l'allergène de chien ont tendance à augmenter chez les souris sensibilisées et déficientes pour l'IL-22, mais sans significativité statistique (Fig 1C). Des résultats préliminaires ont été obtenus concernant l'étude des iBALTs chez ces souris IL-22 WT littermate et IL-22 KO. Visuellement, la taille des follicules semble diminuer chez les KO par rapport aux WT, mais ceci reste à confirmer par quantification de toutes les coupes. Nous observons que la déficience en IL-22 n'affecte que très peu la production d'IgA totales dans les LBA mais semble diminuer la production d'IgG1 spécifiques à l'allergène de chien (Fig 1D). Ces résultats seront également à compléter avec les derniers protocoles réalisés.

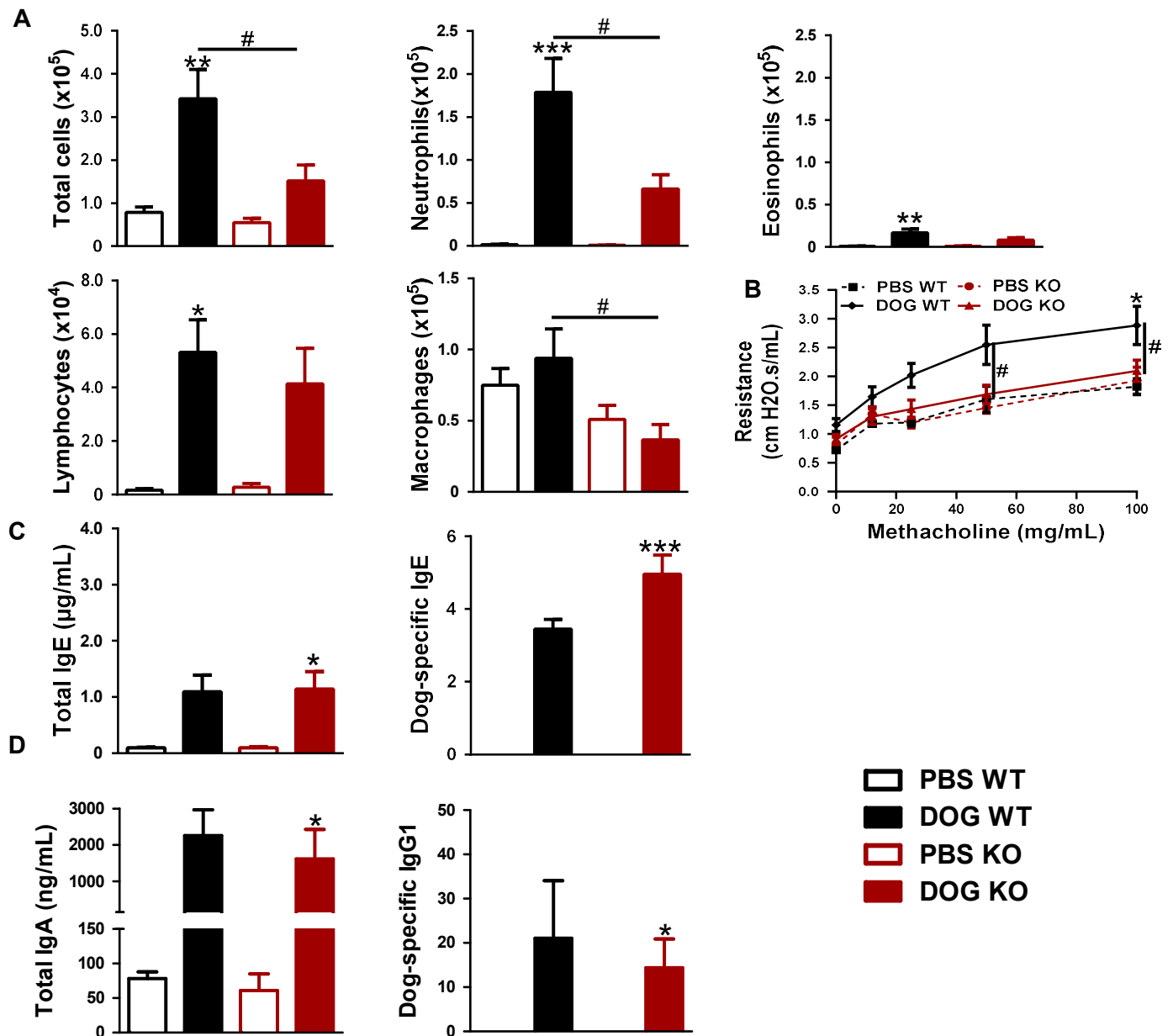


Figure 1 : Effet de la déficience en IL-22 sur les paramètres de l'asthme allergique. **A**, numération dans le LBA (nombre absolu de cellules), **B**, hyperréactivité des voies aériennes, **C**, IgE totales et IgE spécifiques à l'allergène de chien (titres) dans le sérum et **D**, IgA totales et IgG1 spécifiques (titres) dans le LBA. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=2-14 souris par groupe). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus PBS, #p<0.05, versus DOG WT. One way ANOVA pour tous sauf pour le nombre d'éosinophiles, les IgA totales et les IgG1 spécifiques (Kruskal-Wallis) et Two way ANOVA pour l'hyperréactivité.

Les cellules cibles de l'IL-22 dans le modèle d'asthme à l'allergène de chien

Cellules musculaires lisses

Les premiers résultats obtenus à partir des souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2} montrent que la perte du récepteur IL-22Ra1 au niveau des CML affecte le recrutement cellulaire avec notamment, le nombre de neutrophiles et de lymphocytes qui tend à diminuer dans le LBA (Fig 2A). Ces premiers résultats pourront être confirmés en augmentant le nombre de souris. L'hyperréactivité des voies aériennes est significativement diminuée chez les souris sensibilisées et déficientes pour le récepteur comparé aux souris qui expriment l'IL-22Ra1 (Fig 2B). De même, la réponse humorale est également affectée avec une diminution des IgE totales dans le sérum chez les souris sensibilisées et déficientes pour l'IL-22Ra1 (Fig 2C).

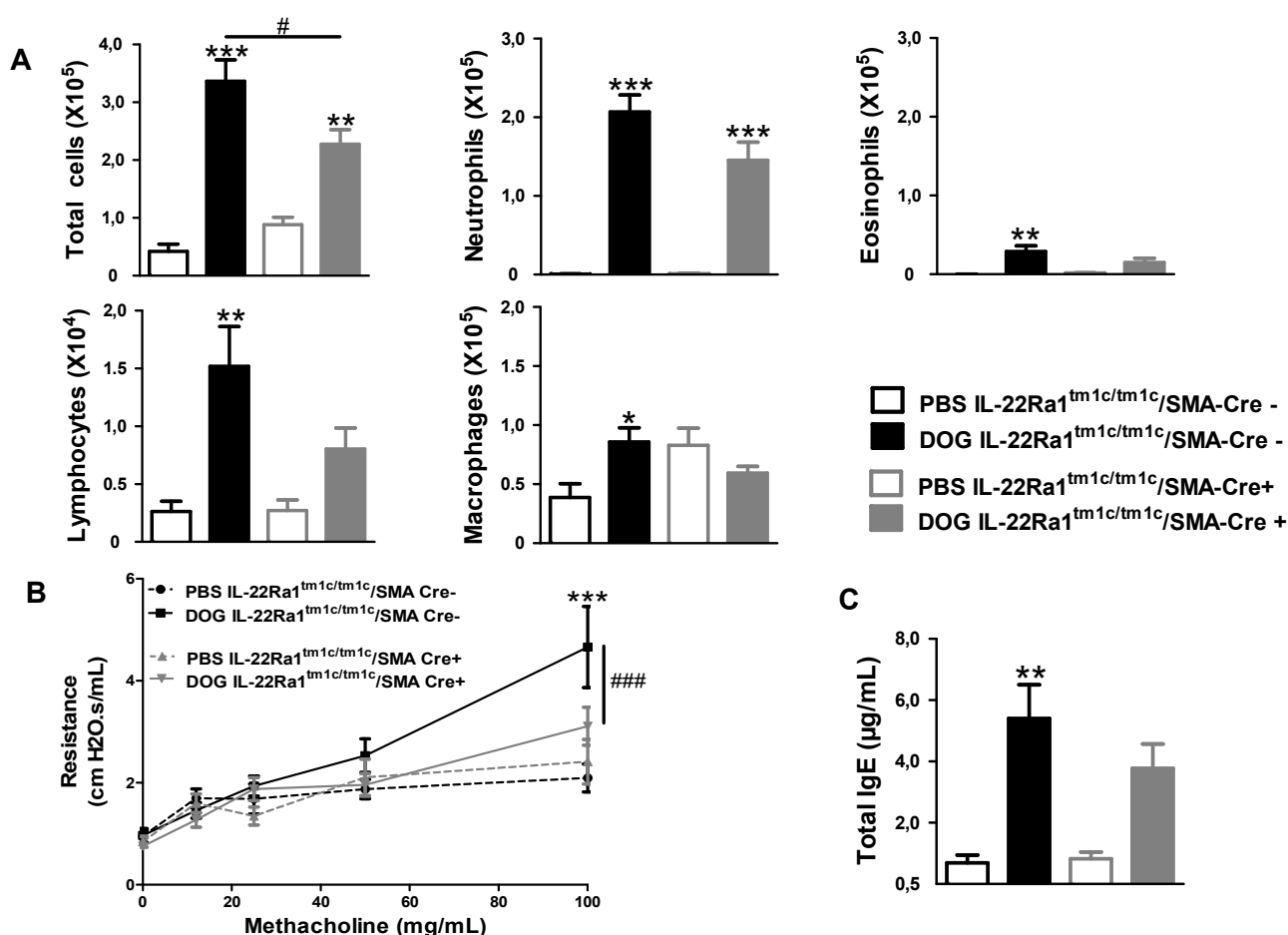


Figure 2 : Effet de la déficience du récepteur IL-22Ra1 dans les cellules musculaires lisses. **A**, numération dans le LBA (nombre absolu de cellules), **B**, hyperréactivité des voies aériennes et **C**, IgE totales dans le sérum. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=5-8 souris par groupe). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus PBS et #p<0.05, ###p<0.01, ###p<0.001, versus DOG IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-. One way ANOVA pour le LBA et la réponse humorale et Two way ANOVA pour l'hyperréactivité.

Cellules épithéliales

Quant aux souris IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID-Cre qui sont déficientes pour l'IL-22Ra1 au niveau des cellules épithéliales, nous observons également une diminution du recrutement de cellules totales dans le LBA. Cela s'accompagne d'une baisse significative du recrutement des lymphocytes et des macrophages, le recrutement des neutrophiles semble également impacté par la perte du récepteur IL-22Ra1 au niveau des cellules épithéliales (Fig 3A). En revanche, si le recrutement cellulaire est diminué, la réponse humorale totale ne semble pas être impactée par cette déficience (Fig 3C), tout comme la résistance des voies aériennes. En effet, le groupe DOG IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID-Cre⁺ induit une hyperréactivité similaire au groupe DOG IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID-Cre⁻ (Fig 3B), montrant que cibler le récepteur au niveau des cellules épithéliales n'affecte pas ce paramètre de l'asthme.

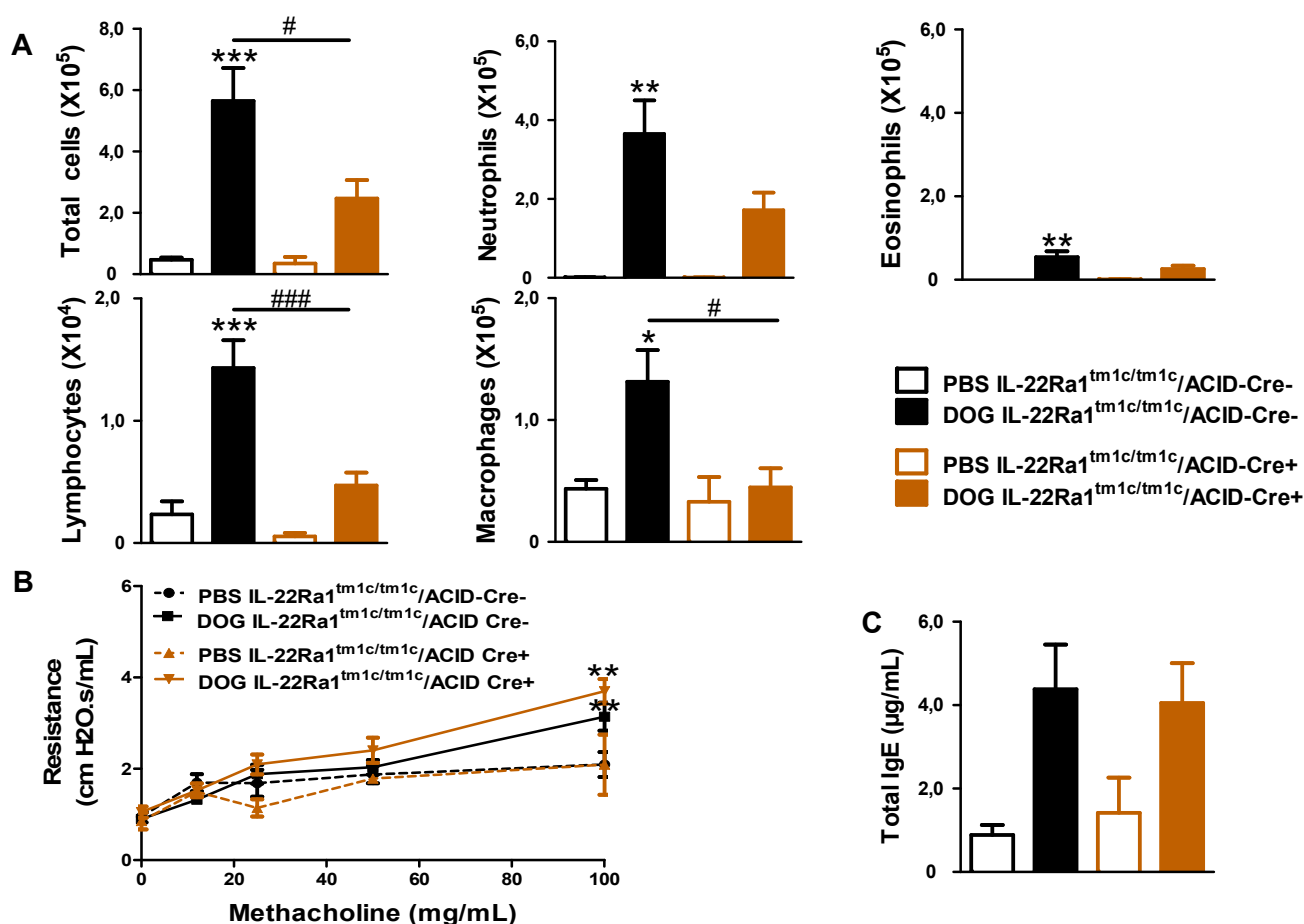


Figure 3 : Effet de la déficience du récepteur IL-22Ra1 dans les cellules épithéliales. **A**, numération dans le LBA (nombre absolu de cellules), **B**, hyperréactivité des voies aériennes et **C**, IgE totales dans le sérum. Les données sont présentées en moyenne ± SEM (n=2-8 souris par groupe). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus PBS et #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, versus DOG IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/ACID-Cre⁻. One way ANOVA pour le LBA et la réponse humorale et Two way ANOVA pour l'hyperréactivité.

L'ensemble de ces résultats, concernant les quatre lignées murines élevées au laboratoire, devront être complétées, à savoir, l'étude du profil Th2 et Th17, une étude complète sur la formation des iBALTs péri-bronchique et pour finir, étudier l'intégralité des paramètres liés au remodelage bronchique, afin de confirmer, ou non, si l'IL-22 peut devenir une cible thérapeutique.

Discussion Générale

Au cours de ce travail, nous avons pu développer un nouveau modèle d'asthme chronique induit par l'allergène de chien. Ce modèle présente les caractéristiques d'un asthme sévère d'endotype Th2/Th17 avec, notamment, un remodelage bronchique des voies aériennes. Nous avons souhaité étudier le pouvoir exacerbateur d'un motif bactérien, le MDP dans ce modèle, puis nous avons découvert la formation de follicules lymphoïdes associés aux bronches (BALT). Cette découverte, nous a poussé à évaluer le rôle que l'Aryl hydrocarbon receptor (AhR), facteur de transcription impliqué dans la voie Th17 et plus particulièrement dans le profil d'expression de l'IL-22, peut avoir dans les caractéristiques associées à l'asthme sévère. Nous souhaitons également évaluer le rôle de l'IL-22 dans l'asthme sévère et plus particulièrement dans le remodelage bronchique, par l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-22. Pour finir, nous souhaitons identifier par quelles cellules, l'IL-22 exerce son effet, en utilisant cette fois-ci des souris déficientes pour une sous-unité du récepteur de l'IL-22, l'IL-22Ra1.

Effets de l'allergène de chien sur le développement d'un modèle d'asthme sévère

Le nouveau modèle d'asthme expérimental chronique (cinq semaines) mimant un asthme sévère a été développé via l'utilisation de l'allergène de chien. Bien que les asthmes allergiques soient le plus fréquemment associés aux acariens, l'allergène de chien a été associé à des formes d'asthmes sévères observées chez l'homme. L'ensemble des asthmatiques sont distribués en cinq niveaux (d'après les directives du Global Initiative for Asthma (GINA)), où les niveaux quatre et cinq incluent les formes sévères de la maladie. Dans une cohorte nationale d'asthme (COBRA), les deux groupes GINA 4 et 5, sur 192 patients, présentaient pour 63 et 42 sujets respectivement, un test cutané positif pour l'allergène de chien. Ainsi, une moyenne de 47% d'asthmatiques sévères étaient exposés aux allergènes de chien (40). De plus, Perzanowski et al montrent qu'un titre élevé d'anticorps IgE spécifiques à l'allergène de chien est fortement associé avec un asthme sévère et persistant (216). Par ailleurs, des CD de patients asthmatiques co-stimulées avec l'allergène de chien sont capables d'induire la production de l'IL-17 et de l'IL-22 par des lymphocytes T naïfs (données du laboratoire non publiées). L'allergène de chien est composé, notamment, de lipocalines dont le rôle physiologique est d'assurer le transport de molécules hydrophobes (217) (44). Leurs fonctions immunologiques comprennent, notamment, une capacité à se lier aux récepteurs lectiniques de type C, incluant le récepteur du mannose ou à la lectine DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin). Can f 1, allergène majeur, est

glycosylé et peut se lier à ces deux récepteurs. Lorsqu'il est lié au récepteur du mannose, une polarisation Th2 est induite (218), à l'inverse, lorsqu'il se lie à la lectine DC-SIGN, une inhibition du profil Th2 est observée (219). Plusieurs récepteurs de la famille des lectines de type C sont capables de reconnaître des champignons responsables d'infections opportunistes, comme *Aspergillus spp*, *Candida spp* ou encore *Cryptococcus spp* et favoriser une réponse adaptative de type Th17 (220). Bien qu'aucune donnée ne soit reportée sur l'effet des composants de l'allergène de chien et une réponse Th17. Celles-ci suggèrent un lien entre, allergène de chien, récepteurs de l'immunité innée et réponses Th2/Th17.

Ce modèle expérimental induit des caractéristiques d'asthme allergique sévère avec notamment, un recrutement important de cellules dans le poumon avec un afflux de neutrophiles. Bien que le recrutement d'éosinophiles soit aussi associé aux formes d'asthme sévère (60% des asthmatiques sévères ont plus de 300 éosinophiles/mm³) (40), l'asthme neutrophilique est associé aux infections bactériennes et à une faible réponse face aux corticoïdes inhalés (221). Or, une particularité de l'asthme sévère est sa résistance face aux thérapeutiques actuelles. Green et al, identifient un groupe de patients asthmatiques ayant des neutrophiles dans leurs expectorations et présentant une faible réponse aux corticoïdes inhalés (222). Ce recrutement de neutrophiles pourrait être induit par la présence de LPS, puisque 100 ng suffisent à favoriser un recrutement de ces cellules (223). Seulement, de faibles niveaux de LPS ont été détectés dans l'allergène de chien (2,5 ng/IN) (donnée non montrée).

L'allergène de chien est également capable d'induire une réponse humorale, une hyperréactivité bronchique et un profil cytokinique Th2 avec la production d'IL-13, d'IL-33 ou encore de CCL17. Une fois de plus, une faible quantité de LPS (100ng) induit un profil de réponse Th2, et à l'inverse, une quantité élevée de LPS (100µg) induit une réponse de type Th1 (224). Notre faible quantité de LPS trouvé dans l'allergène n'explique donc pas le profil de réponse Th2, même faible (pas d'éosinophilie importante), ni le profil Th17 observé dans notre modèle. Différentes études ont montré l'implication de ces cytokines dans l'asthme. Le niveau d'ARNm de l'*IL-17* est augmenté chez les asthmatiques et cette augmentation corrèle avec la sévérité de la maladie (67). Quant à l'IL-22, son niveau est également augmenté dans le sérum de patients asthmatiques (93) mais aussi dans les PBMC d'enfants asthmatiques et l'IL-22 pourrait être un marqueur de la sévérité de la maladie (65). Malgré le double rôle de l'IL-22 reporté dans des modèles animaux, protecteur (93) (97) ou délétère (93) (94), il semblerait que dans notre modèle, et, au vu des résultats sur les IL-22 KO, la production de l'IL-22 soit associée à un profil délétère et ainsi contribuant au développement de l'asthme sévère. Nous nous sommes ensuite interrogés sur les types cellulaires susceptibles de produire ces deux cytokines dans notre modèle.

Nous trouvons que l'IL-17 et l'IL-22 proviennent principalement des LT CD4⁺, des LT $\gamma\delta$ et des LTi et l'IL-17 est également fortement produite par les LT $\gamma\delta$. Il a été montré que l'IL-22 peut être produite par les LT $\gamma\delta$ activés par la voie AhR (225). Cependant dans notre modèle, l'IL-22 n'est que faiblement produite par ces cellules, comparées à la production d'IL-17. Il est bien établi que les LTi, un sous-groupe des ILC3, sont des producteurs d'IL-17 et d'IL-22 (226) (227) avec une forte production d'IL-22 dépendante de l'AhR (228) (229) (230). Nous avons observé une production de ces deux cytokines dans notre modèle par ces LTi CD4⁺. Les neutrophiles sont aussi une source d'IL-22 et d'IL-17 décrite dans la littérature. Ainsi plusieurs études ont montré que ces cellules sont capables de produire l'IL-22 lors de dommages inflammatoires (231) ou de l'IL-17 lors de dommages pulmonaires (232) (233) ou même lors de dommages cutanés (211). Cependant dans notre modèle, très peu de ces cellules produisaient de l'IL-22 et aucune de l'IL-17, probablement lié à la faible quantité de cellules récupérées. Les ILC3 sont une autre source potentielle de cytokines de type Th17. Les ILC3 NCR- n'étaient pas prédominantes dans notre modèle, malgré le fait que ces cellules, chez l'homme, ont été associées avec la sévérité de la maladie (234). Les cellules NK NK1.1+ produisent essentiellement de l'IL-22, mais pas d'IL-17 dans notre modèle. Ceci a été décrit lors d'infections virales (235) (236) ou bactériennes (237) au niveau du poumon. Les cellules NK productrices d'IL-22 pourraient participer au recrutement des neutrophiles lors de l'infection (98). De même, après sensibilisation avec l'allergène de chien, les macrophages sont également capables d'induire une production d'IL-22, et Hansson et al, montrent que les macrophages alvéolaires chez la souris et chez l'homme sont des producteurs d'IL-22 lors de dommages pulmonaires (238).

Dans notre modèle, il est observé un remodelage bronchique, qui s'accompagne d'une inflammation dans le parenchyme pulmonaire. En particulier, une production de mucus par les cellules épithéliales, un dépôt de collagène péri-bronchique, observé par deux méthodes différentes. La coloration au trichrome de Masson visualise le collagène de façon générale, alors que la coloration au rouge Sirius est axée sur les collagènes fibrillaires. Une augmentation du marquage de l' α -SMA, au niveau des bronches distales, qui traduit l'épaississement des CML a aussi été observée dans notre modèle chronique. Ces observations microscopiques ont pu être confirmées par un ensemble de quantifications visuelles et semi-automatisées. Plusieurs études s'interrogent sur les médiateurs responsables de ce remodelage. Holgate et al montrent que l'asthme neutrophilique, qui est associé à la sévérité de la maladie, est lié à une destruction tissulaire et à un remodelage important des voies aériennes (239). Tout comme notre modèle expérimental qui induit majoritairement un recrutement de neutrophiles dans le poumon des souris sensibilisées à l'allergène de chien. De plus, en vue du profil Th17 développé dans notre modèle et des études

déjà réalisées, les cytokines Th17 pourraient être, en partie, responsables du développement du remodelage bronchique. Les cytokines Th17 sont connues pour induire la migration et la prolifération des CML en réduisant leur apoptose (68) (92). Dans un modèle d'allergie induit par l'ovalbumine, l'IL-22 favorise l'infiltration cellulaire ainsi que la production de mucus aboutissant à un score histologique élevé comparé aux souris déficientes en IL-22 (93). Dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, l'IL-22 favorise la TEM (91), un phénomène également impliqué dans le remodelage des voies aériennes.

Absence d'effet du MDP

Lors d'infection bactérienne, mais pas virale, le MDP programme les CD humaines pour favoriser la production de l'IL-17 par les cellules T mémoires, via la synthèse d'IL-23 et d'IL-1 α et β *in vitro* (130). De plus, des infections intestinales provoquées par *Clostridium rodentium* ou par *Salmonella typhimurium* induisent une réponse mucosale de type Th17, 4 jours et 24 heures après l'infection, respectivement (131). Certains pathogènes, comme *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, ou bien même le virus respiratoire syncytial (VRS), infectent le tractus respiratoire des nouveau-nés ayant pour conséquence des difficultés à respirer. Il est bien établi qu'à terme, ces infections de la petite enfance sont un réel risque de développer de l'asthme à l'âge adulte (99). *Streptococcus pneumoniae*, ainsi que le VRS sont reconnus par NOD2, via son ligand, le MDP. Nous avons supposé que ce peptidoglycane, le MDP pouvait avoir un effet adjuvant sur les paramètres de l'asthme sévère. Cependant, aucun des paramètres de l'asthme n'est augmenté lorsqu'il est co-administré avec l'allergène de chien, que ce soit au niveau inflammatoire, comme au niveau du remodelage bronchique. Dans notre modèle, le MDP est administré par voie IN, soit de façon locale. Un effet adjuvant a été remarqué lorsque le MDP ou ses analogues sont administrés en sous-cutané, soit par voie systémique (129) (240), pouvant expliquer l'absence d'effet adjuvant après notre co-administration. De plus, le transport du MDP, pour se lier à NOD2 en intra cellulaire, est assuré par un transporteur de peptide, nommé PEPT1. Ce transporteur assure l'absorption intestinale de médicaments et de nutriments alimentaires. PEPT1 est hautement exprimé au niveau des kératinocytes différenciés (241), des cellules du petit intestin (duodenum, jejunum et de l'iléon) et est plus faiblement exprimé au niveau du poumon (242). Ainsi, lorsque nous administrons le MDP par voie IN, nous ciblons directement les cellules épithéliales bronchiques où un faible niveau d'expression de PEPT1 est trouvé. Le MDP n'est alors pas complètement pris en charge, et pourrait également expliquer l'absence d'effet adjuvant obtenu dans notre modèle.

Effets de l'allergène de chien sur le développement de BALTs

De façon surprenante, nous avons observé microscopiquement, la présence de follicules lymphoïdes ayant les caractéristiques de iBALTs. En effet, les immunomarquages ont mis en évidence des zones de cellules B et T, et la présence de FDC dans les follicules de cellules B. L'ensemble de ces clusters cellulaires sont significativement augmentés lorsque les souris sont sensibilisées avec l'allergène de chien, que ce soit par follicule ou par surface de follicule. La présence d'IgA et d'IgG1 spécifiques à l'allergène de chien dans le LBA confirme le switch isotypique qui survient dans les zones de cellules B qui forment les iBALTs. L'IgA joue un rôle essentiel dans les défenses immunitaires des muqueuses et notamment au niveau de la muqueuse respiratoire. Elle est présente, sous sa forme polymérique, au niveau des sécrétions bronchiques des asthmatiques. Les IgG1 spécifiques reflètent eux, une réponse Th2, la présence d'IgG1 spécifiques dans les LBA montre que les iBALTs sont bien dépendants de notre modèle expérimental induit par l'allergène de chien.

Les iBALTs, se développent suite à deux processus différents, une inflammation chronique ou une infection pulmonaire. Ils peuvent être néfastes pour le tissu pulmonaire en favorisant une réponse immunitaire délétère pour l'individu (185). Ou à l'inverse, ils peuvent participer à l'élimination du pathogène et ainsi fournir un rôle bénéfique pour la réponse immunitaire de l'hôte (178) (182). Parmi les différents modèles chroniques utilisés au laboratoire, induits par l'ovalbumine ou l'allergène d'acarien, seul notre modèle induit la formation des iBALTs. Nous avons, dans un premier temps impliqué l'allergène de chien dans la formation de ces structures. Des études montrent que le LPS est capable d'induire la formation des iBALTs, mais à des doses élevées : de 1 à 10µg (194) ou bien 10µg/poids corporel (178). Or, la quantité de LPS dans notre extrait allergénique est bien en dessous de ces doses. De nos jours, aucune donnée n'a mis en lien les différents composants de l'allergène de chien (lipocalines, albumine...) et la formation des iBALTs. Chez l'homme, Tscherning et al, montrent que les patients asthmatiques ont des follicules lymphoïdes au niveau des bronches, et suite à une provocation allergénique, ces follicules sont plus grands et avec un recrutement de cellules supplémentaires (243). Cependant, Heier et al, montrent, à partir d'une cohorte d'enfants asthmatiques, que la fréquence de iBALTs ne corrèle pas avec les symptômes de l'asthme, ni avec la fonction respiratoire (244).

Plusieurs modèles d'asthme expérimental induit par l'allergène, montrent l'induction de ces structures lymphoïdes dans le poumon. Celles-ci sont associées à des modèles chroniques et non aigus (190) et induisent la production d'IgA et d'IgG (192), comme observé dans nos LBA. Des modèles de souris transgéniques mimant une réponse Th2 montrent également l'induction de BALTs. Les cellules endothéliales Thy 1+ des iBALTs sécrètent, notamment, de

l'IL-33 qui maintient les cellules Th2 mémoire localement (177). L'expression constitutive de l'IL-5 au niveau des cellules épithéliales bronchiques favorise le développement de ces structures lymphoïdes s'associant aux paramètres de l'asthme (245). Enfin, deux autres cytokines, l'IL-4 et l'IL-13, dépendantes du profil Th2, semblent impliquées dans la formation des iBALTs, puisque des anticorps dirigés contre ces deux cytokines suffisent à réduire la formation de ces structures (189). La voie Th2 est associée à un profil éosinophilique, et bien que peu d'éosinophiles sont recrutés dans notre modèle, une production d'IL-13 et IL-33 est observée chez les souris sensibilisées. Cela suggère une potentielle implication des réponses Th2 dans l'apparition des iBALTs. Les neutrophiles ont été étudiés dans le contexte des iBALTs, dans un modèle induit par le LPS. Une déplétion des neutrophiles avec un anti-Ly6G atténue la formation de ces structures et favorise la production d'IL-17 (178). Ainsi, en vue des réponses observées dans notre modèle, il n'est pas impossible que ces deux autres voies, neutrophiliques et Th2 soient impliquées dans la formation des iBALTs.

La participation de l'IL-17 dans la formation de ces structures lymphoïdes est assez controversée. Des souris déficientes en IL-17 développent des BALTs avec une taille et une structure similaire aux souris WT en réponse au vaccin modifié du virus ankara (197). Lors d'infection bactérienne pulmonaire, le nombre de iBALTs ainsi que les cellules qui le constitue augmentent alors que le niveau d'IL-17 n'augmente pas. Cela suggère que la formation de ces follicules est indépendante de l'IL-17 (184). A l'inverse, il a aussi été montré que l'IL-17 est nécessaire pour initier la formation du iBALT chez les souris, en réponse à un modèle induit par le LPS et le virus Influenzae. En l'absence de cette cytokine, la formation du iBALT est diminuée (194). En effet, l'IL-17 assure le recrutement de chimiokines comme CXCL12 qui participe au recrutement des cellules B lorsque les FDC sont absentes (207). Dans la voie Th17, la deuxième cytokine impliquée dans l'asthme et également produite dans notre modèle est l'IL-22. A ce jour, peu d'études ont évalué son implication dans la formation de ces structures. Barone et al, montrent qu'elle participe à la formation d'OLT au niveau des glandes salivaires de souris, notamment en favorisant la maturation des cellules B par la production de chimiokines comme CXCL13 et CXCL12 (198).

L'IL-22 est donc un autre candidat potentiellement impliqué dans le développement des iBALTs. Malgré le rôle controversé de l'IL-17, il n'est pas à exclure que dans notre modèle, celle-ci y participe également. ROR γ t est le facteur de transcription impliqué dans la différenciation des Th17, mais également impliqué dans la différenciation des LTi. Des souris déficientes pour ce facteur de transcription sont capables de former des iBALTs dans leurs tissu pulmonaire quel que soit le type d'infection, virus de la grippe (182) (246) ou LPS (194). Alors que certaines études soulignent que la déficience en IL-17 diminue la formation des iBALTs. Ces données nous ont incité à étudier dans notre modèle, l'implication de l'Ahr, un

autre facteur de transcription impliqué dans la différenciation des Th17, des LT α et essentiel à la production de l'IL-22. Aujourd'hui, aucune donnée ne montre le rôle de ces iBALTs (protecteur ou délétère) dans les modèles d'inflammation allergique des voies respiratoires.

L'implication de l'AhR dans le modèle d'asthme sévère

Pour évaluer l'implication de la voie de l'AhR dans notre modèle expérimental, nous avons utilisé un antagoniste de l'AhR (CH-223191), administré par la nourriture des souris au moment des provocations allergéniques. Nous avons pu observer une diminution du recrutement cellulaire, conséquence de la diminution du nombre de neutrophiles. En revanche, le recrutement des autres cellules reste similaire entre les souris ayant reçu l'antagoniste ou non. Une diminution de l'hyperréactivité est également observée lorsque la voie de l'AhR est bloquée. Il est bien démontré que des lignées de cellules épithéliales bronchiques humaines stimulées avec du TCDD (un des ligands de l'AhR) ont une expression augmentée d'IL-8, cytokine responsable du recrutement des neutrophiles (116). Cependant dans notre modèle, le niveau d'expression de CXCL1 était similaire entre les souris ayant reçu ou non l'antagoniste. Excluant ainsi son implication dans le recrutement des neutrophiles. Par contre, la diminution de l'IL-22 observée après traitement par l'antagoniste de l'AhR pourrait expliquer cet effet sur la neutrophilie, l'IL-22 étant capable de les recruter (98) (247). De même, l'IL-22 pourrait expliquer la diminution de l'hyperréactivité bronchique. Soit indirectement, lié à la baisse des neutrophiles, qui ont été impliqués dans le développement de l'hyperréactivité bronchique (248) (249) (250). Soit directement, l'IL-22 étant capable d'induire une hyperplasie des CML (68) (92). La réponse humorale (totale et spécifique) systémique ne semble pas impactée par l'antagoniste de l'AhR. Des souris déficientes en AhR et sensibilisées à l'ovalbumine, ont une réponse allergique augmentée avec, notamment, une plus grande production d'IgE totales et spécifiques comparé aux souris WT (119). Bien que ce modèle, démontre un rôle de l'AhR dans l'induction de la réponse humorale, dans notre modèle, l'antagoniste a été administré durant les trois semaines de provocation et non durant la phase de sensibilisation, n'impactant pas la mise en place de la réponse humorale systémique. Une conséquence de l'administration de l'antagoniste est une diminution de la production de mucus par les cellules caliciformes. Wong et al, montrent que des souris C57BL/6 et une lignée cellulaire humaine dérivée des cellules de Clara, ont une expression de *MUC5AC* augmentée après activation de l'AhR (124). De nouveau, l'expression de l'ARNm de *MUC5AC* est augmentée de façon dose-dépendante sous l'effet du benzo-a-pyrène et le traitement par le resveratrol (un antagoniste de l'AhR) diminue la synthèse de *MUC5AC* dans les cellules (251). En revanche, l'inflammation pulmonaire et le dépôt de collagène peri-bronchique induits par

l'allergène de chien restent identiques avec ou sans la présence de l'antagoniste. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire et de fibrose induit par les cristaux de silice, des souris déficientes en AhR ont une augmentation de l'inflammation et une discrète atténuation de la fibrose par rapport aux souris WT (252). De même, dans un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire chez le rat, l'antagoniste CH-223191 de l'AhR administré par la nourriture est capable de diminuer le remodelage artériel pulmonaire (203). En revanche, d'autres études montrent que les ligands de l'AhR comme le FICZ, notamment, limite le remodelage tissulaire. Dans un modèle expérimental de fibrose induit par la bléomycine, ce ligand endogène de l'AhR diminue le dépôt de collagène soluble et donc la fibrose pulmonaire (111). Dans le cas de pathologies auto-immunes comme l'ophtalmopathie de Graves, le FICZ bloque la formation des fibroblastes oculaires humains en myofibroblastes. Bloquant ainsi tous les paramètres liés au remodelage oculaire comme la production de collagène ou la formation de filament d' α -SMA. Mais lorsque ces fibroblastes oculaires humains sont déplétés en AhR, l'expression de l' α -SMA est augmentée (253). Dans notre modèle, si le dépôt de collagène péri-bronchique ne semble pas être impacté par l'administration de l'antagoniste de l'AhR, la prolifération des CML est atténuée sous l'effet du CH-223191 avec une diminution du marquage de l' α -SMA. *In vitro*, des cellules fibroblastiques bronchiques déficientes ou non en AhR (traitement par siRNA), stimulées pendant 48 heures avec l'allergène de cafard montrent une augmentation du marquage de l' α -SMA seulement lorsque les fibroblastes expriment l'AhR. De plus, l'expression de l' α -SMA dans les fibroblastes dépourvus de l'AhR est réduite, comparée aux fibroblastes qui l'expriment. Ces résultats suggèrent que l'AhR est capable de contrôler la différenciation des fibroblastes, et donc de contrôler le remodelage bronchique dans un modèle d'allergie (254). Cependant les nombreuses contradictions observées dans ces études pourraient être liées au modèle utilisé et/ou à l'espèce évaluée. Tout cela indique la nécessité d'autres études pour évaluer le rôle exact de l'AhR dans le remodelage tissulaire en général et bronchique en particulier.

Si dans la voie Th2, la production d'IL-33 et de CCL17 n'est pas significativement impactée par l'effet de l'antagoniste de l'AhR, dans la voie Th17, le niveau d'IL-22 est significativement diminué alors que celui de l'IL-17 est identique quel que soit la condition testée. Ce phénomène a déjà été observé chez des souris où la déficience de l'AhR provoque un effet compensatoire de réponse immunitaire via l'IL-17 (255). Avec les données connues du rôle de l'AhR dans la production de l'IL-22, il n'est pas surprenant que son niveau soit diminué par rapport au groupe n'ayant pas reçu l'antagoniste. En revanche, l'absence d'inhibition dans la production d'IL-17 après traitement par l'antagoniste, suggère que dans notre modèle l'induction de cette cytokine passe par d'autres voies.

Ainsi, le blocage de la voie de l'Ahr aboutit à une diminution partielle de la production d'IL-22 et cela s'accompagne d'une diminution des neutrophiles recrutés, de l'hyperréactivité bronchique, de la production de mucus, et de la prolifération des CML, mais le dépôt de collagène péri-bronchique semble ne pas être impacté. La quantité d'antagoniste a été ajoutée aux croquettes de façon à ce qu'une souris en mange 10mg/kg/jours (256). Mais la quantité réelle d'antagoniste ingéré pendant le protocole était en moyenne de 8.5mg/kg/jour, soit un peu moins qu'initialement prévu. Il est possible que l'inhibition partielle et non totale de l'IL-22 et l'absence d'effet sur le dépôt de collagène, soit associée à cette plus faible dose d'antagoniste ingéré. Cependant une étude montre que, l'ingestion de croquettes contenant 8mg/kg/jour d'antagoniste de l'Ahr suffit à diminuer le remodelage artériel dans le poumon (203). De plus, bien que l'Ahr soit le principal facteur de transcription impliqué dans l'induction de l'IL-22, il est possible qu'une autre voie contribue à la production d'IL-22 dans le groupe ayant reçu l'antagoniste de l'Ahr, comme celle du facteur de transcription ROR γ t.

De façon inattendue, nous avons observé que le nombre et la taille des iBALTs est augmentée sous l'effet de l'antagoniste de l'Ahr. Nous avons également vu que ce phénomène s'accompagne d'une augmentation du niveau des IgG1 spécifiques à l'allergène de chien, dans les LBA, et d'une faible diminution de la production d'IL-10 dans le poumon par rapport au niveau basal. L'étude microscopique des iBALTs révèle aussi une augmentation du nombre de FDC et de cellules B dans les follicules lymphoïdes, mais le nombre de cellules T reste quasiment identique après traitement par l'antagoniste. Des souris déficientes en LT α et donc déficientes en LTi, et dépourvues d'OLS, sont capables de former des iBALTs. Ceux-ci ont des zones de cellules B et de cellules T mal organisées, augmentés en taille et en nombre de cellules B mais dépourvues de FDC (182) (194). Les LTi expriment fortement l'Ahr, pour maintenir leur survie après la naissance (228) (229), et également l'IL-22. Dans notre modèle, la diminution partielle de l'IL-22 et la modification des iBALTs après traitement pourrait être reliée à une inhibition de ces LTi. Cependant si une augmentation des iBALTs et des cellules B est bien observée après traitement par l'antagoniste, les FDC n'étaient pas inhibées. Suggérant une absence ou une partielle implication des LTi dans l'augmentation des iBALTs.

L'activation de l'Ahr est également capable d'induire un profil Treg, du fait que ces cellules possèdent des motifs de liaison pour les ligands de l'Ahr (104) (103). Les Treg et les Th17 ont des effets opposés sur les iBALTs. Une déplétion des Treg augmente le recrutement de neutrophiles pulmonaires, la synthèse d'IL-17 et la formation de iBALTs. Le niveau d'expression de CCL19, qui assure le recrutement des cellules B au niveau des follicules, est également augmenté que ce soit en condition inflammatoire (178) ou non (179). De plus, dans un modèle d'allogreffe pulmonaire, la déplétion de cellules T Foxp3+ induit la formation de iBALTs avec la production d'IgG (257). Bien que le nombre et la taille des iBALTs soit

augmenté, le niveau d'IL-10 diminue légèrement mais le nombre de cellules T Foxp3+ n'est pas modifié après traitement par l'antagoniste. Ces résultats, suggèrent que ces cellules ne semblent pas impliquées dans le phénotype observé. Cependant, il n'est pas à exclure un rôle d'autres cellules régulatrices. Les cellules T régulatrices Tr1 ont la particularité de produire de l'IL-10 sans exprimer le facteur Foxp3. Apetoh et al, montrent que l'activation de l'Ahr par le TCDD ou bien même le FICZ favorise la différenciation des cellules Tr1 sans induire l'expression de Foxp3. L'ajout de l'antagoniste CH-223191, durant la différenciation de ces cellules diminue la production d'IL-10 (258). Les cellules B et les cellules Breg expriment également l'Ahr. Piper et al, montrent que l'activation de l'Ahr oriente la différenciation des cellules B vers un profil Breg anti-inflammatoire avec une production d'IL-10 (106). L'augmentation du nombre de cellules B dans les iBALTs, peut soit dépendre de l'effet anti-apoptotique de l'antagoniste de l'Ahr sur les cellules B (107). Soit dépendre de la perte de la différenciation des cellules Breg. De plus, récemment, Vaidyanthan et al, démontrent qu'une fois activé, l'Ahr est capable de bloquer la différenciation des plasmocytes chez la souris (105). Or, sous l'effet de notre antagoniste CH-223191, nous avons pu observer, dans les LBA, une augmentation des d'IgG totales (données non montrées), et des d'IgG1 spécifiques à l'allergène de chien. Or, les IgG1 murins peuvent se lier au récepteur inhibiteur FcγRIIB sur les CD, résultant dans l'induction d'une tolérance de l'inflammation allergique (259). Dans un modèle expérimental d'asthme allergique, l'invalidation du récepteur FcγRIIB augmente les paramètres de l'asthme (260). Ainsi, la production d'IgG1 spécifiques dans notre modèle, pourrait jouer un rôle bénéfique dans l'inflammation allergique. En revanche, la production d'anticorps dans le sérum, n'est pas impactée par l'antagoniste. Comme si l'Ahr favoriserait plutôt une réponse immunitaire locale, et donc diminuerait le nombre de plasmocytes et maintiendrait la taille et le nombre des iBALTs, ainsi que ses composants. D'autres part, un troisième type cellulaire pourrait être impliqué dans l'augmentation de follicules dans notre modèle, les CD. Ces cellules expriment l'Ahr, et permettent le maintien des iBALTs après une infection par le virus de la grippe (199) ou le MVA (200), car elles assurent la présentation antigénique aux cellules T dans les iBALTs, population cellulaire dont la proportion reste inchangée sous l'effet de l'antagoniste.

Au total, notre étude montre des effets opposés de l'inhibition de l'Ahr, avec des effets bénéfiques sur l'hyperréactivité bronchique, sur le recrutement neutrophilique, sur la production de mucus et l'hyperplasie des CML, potentiellement à travers la réduction d'IL-22, et l'absence d'effet sur l'inflammation pulmonaire et sur la production de collagène. La présence, bénéfique ou non de iBALTs dans les modèles d'inflammation allergique n'est pas bien élucidée. Il est difficile, dans notre modèle de leur adjoindre un potentiel effet protecteur

ou délétère. Ainsi, pour diminuer les paramètres structuraux, cibler les voies plus en aval de l'Ahr, pourrait être intéressant. Cette voie pourrait être l'IL-22, et plus particulièrement son récepteur exprimé sur les cellules de structure.

Rôle de l'IL-22 et ces cibles potentielles dans l'asthme sévère :

Les résultats préliminaires obtenus à partir des lignées IL-22 KO, montrent une diminution du recrutement cellulaire au niveau du LBA. Cela s'accompagne d'une diminution du nombre de neutrophiles et une baisse de l'hyperréactivité bronchique. Besnard et al, montrent, dans un modèle expérimental d'asthme à l'ovalbumine que la déficience en IL-22 s'accompagne, notamment d'une diminution des cellules du LBA mais aussi de l'hyperréactivité des voies aériennes (93). En revanche, il est aussi montré que la déficience en IL-22, de nouveau dans un modèle ovalbumine, favorise l'inflammation allergique et augmente l'hyperréactivité (261). Ces divergences observées dans ces études peuvent aussi s'expliquer par le mode de sensibilisation allergénique. En effet, une sensibilisation par voie intra-péritonéale chez des souris déficientes en IL-22 exacerbe l'inflammation allergique (261). Alors qu'une sensibilisation par voie sous-cutanée (93) ou épicutanée (75) chez ces mêmes souris diminue l'inflammation allergique. Dans notre modèle, les souris IL-22 KO sont sensibilisées par voie IN, et les premiers résultats montrent que cette voie procure le même effet qu'une sensibilisation par voie cutanée. La baisse du recrutement cellulaire, du nombre de neutrophiles et de l'hyperréactivité a été observée quelque soit la voie bloquée, Ahr ou IL-22. La quantification de l'inflammation pulmonaire et du remodelage devra être évaluée. Cependant les premiers résultats (données non montrées) semblent indiquer que, dans notre modèle expérimental, au niveau du poumon, la plupart des cytokines/chimiokines restent augmentées chez les souris IL-22 KO, alors que les paramètres du remodelage sont visuellement diminués. La déficience en IL-22 semble également impacter la production d'IgG1 spécifiques à l'allergène de chien dans les LBA, et donc intervenir dans la formation des iBALTs (visuellement moins importants). Tout comme notre étude avec l'antagoniste de l'Ahr, le niveau d'IgA se semble pas impacté chez les souris IL-22 déficientes. Peu d'études ont évalué le rôle de l'IL-22 dans la formation des iBALTs, mais Barone et al, montrent que l'IL-22 maintient ces structures (198). En effet, la déficience en IL-22 affecte l'accumulation de cellules B et la production d'auto-anticorps dans les agrégats lymphocytiques des glandes salivaires murines. Bien que ces résultats soient obtenus à partir d'un modèle infectieux, il n'est pas à exclure, qu'à partir de notre modèle, nous observions ces mêmes phénomènes. Ceci sera à évaluer après marquage immunohistochimique des iBALTs chez les souris IL-22 KO.

Ces premiers résultats suggèrent que l'IL-22 pourrait être impliquée dans l'asthme sévère, par son action au niveau des cellules de structure (hyperréactivité et remodelage des voies aériennes). C'est pourquoi, pour aller plus loin dans l'étude, nous nous intéressons à ses cibles potentielles. D'après les résultats préliminaires obtenus avec les souris Cre-LoxP, l'IL-22 semble agir à la fois par les cellules épithéliales ainsi que par les CML, au moins pour assurer le recrutement des cellules au niveau du LBA. Si le recrutement de neutrophiles semble impacté dans les deux lignées murines, cibler les CML semble avoir un meilleur impact. En effet, l'hyperréactivité des voies aériennes et la réponse humorale sont toutes les deux diminuées chez les souris sensibilisées et déficientes pour l'IL-22Ra1 au niveau des CML. Il sera essentiel de regarder la réponse Th2 dans ces deux lignées. La réponse humorale totale étant impactée dans la lignée IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2}, on pourrait s'attendre à avoir une diminution de l'IL-13, cytokine qui influence la production des IgE par les cellules B. De plus, les CML expriment le récepteur de l'IL-13 (262) et le nombre de cellules positives pour l'IL-13 dans les paquets de CML bronchiques humaines corrèle avec la sévérité de l'asthme (263). La formation des iBALTs dans ces deux lignées sera également étudiée, sachant que des souris IL-22Rα déficientes (IL-22Ra1) produisent moins de *Cxcl13* et *Cxcl12* (198), chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules B dans les follicules lymphoïdes. Un des paramètres clé à cibler en thérapeutique est le remodelage bronchique et il est bien établi que les IgE induisent la prolifération des CML humaines via la voie des MAPK (170) (264). Ainsi, on pourrait s'attendre à voir une diminution du remodelage bronchique, au moins dans la lignée IL-22Ra1^{tm1c/tm1c}/SMA-Cre-ER^{T2}. De plus une étude montre que des souris IL-22Ra1 KO développent moins de fibrose hépatique que les souris WT (265). Dans un modèle expérimental du virus de la grippe, l'IL-22Ra1 exprimé sur les cellules épithéliales est, 21 jours après l'infection, détecté également dans le parenchyme pulmonaire. Ces résultats suggèrent que l'IL-22Ra1 est sur-régulé dans le parenchyme lors de dommages pulmonaires. Cette étude révèle également que malgré la déficience en IL-22, le marquage de l'IL-22Ra1 reste augmenté comme chez les souris WT (266). L'ensemble de ces hypothèses seront donc à étudier et à confirmer.

Ainsi, si nous confirmons que l'IL-22 est impliquée dans le remodelage bronchique, cibler la sous-unité IL-22Ra1 serait à terme, une meilleure cible que l'IL-22 pour diminuer le remodelage bronchique, notamment. Par ailleurs, du fait que le récepteur de l'IL-22 n'est exprimé que sur des cellules de structure, le cibler permettrait d'avoir une action locale pulmonaire sans effets systémiques, et également d'envisager une administration locale par voie inhalée.

Bibliographie

1. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet L-P, Cruz AA, Drazen JM, et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. 2015 Sep;46(3):622–39.
2. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond Engl*. 2012 Dec 15;380(9859):2163–96.
3. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *The Lancet*. 2018 Feb 24;391(10122):783–800.
4. Delmas M-C, Fuhrman C. L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives. *Rev Mal Respir*. 2010 Feb 1;27(2):151–9.
5. Van Ganse E, Antonicelli L, Zhang Q, Laforest L, Yin DD, Nocea G, et al. Asthma-related resource use and cost by GINA classification of severity in three European countries. *Respir Med*. 2006 Jan;100(1):140–7.
6. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond Engl*. 2012 Dec 15;380(9859):2095–128.
7. Diagnosis and Management of Difficult-to-treat and Severe Asthma. Global Initiative for Asthma - GINA.
8. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):716–25.
9. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Oct;118(4):773–86; quiz 787–8.
10. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Sep 1;180(5):388–95.
11. Tabatabaian F, Ledford DK, Casale TB. Biologic and New Therapies in Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2017;37(2):329–43.
12. Samitas K, Zervas E, Gaga M. T2-low asthma: current approach to diagnosis and therapy. *Curr Opin Pulm Med*. 2017;23(1):48–55.
13. Desai D, Newby C, Symon FA, Haldar P, Shah S, Gupta S, et al. Elevated Sputum Interleukin-5 and Submucosal Eosinophilia in Obese Individuals with Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Sep 15;188(6):657–63.
14. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):673–83.

15. Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol*. 2018
16. Lechin F, van der Dijks B, Orozco B, Lechin M, Lechin AE. Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 1996 Sep;77(3):245–53.
17. Scarpelli MP, Keller S, Tran L, Palmiere C. Postmortem serum levels of IgE and mast cell tryptase in fatal asthma. *Forensic Sci Int*. 2016 Dec;269:113–8.
18. Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST. The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D2 in normal and asthmatic men. *N Engl J Med*. 1984 Jul 26;311(4):209–13.
19. Méndez-Enríquez E, Hallgren J. Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. *Front Immunol* . 2019 May 29
20. Robinson D, Humbert M, Buhl R, Cruz AA, Inoue H, Korom S, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2017 Feb;47(2):161–75.
21. Risse P-A, Jo T, Suarez F, Hirota N, Tolloczko B, Ferraro P, et al. Interleukin-13 inhibits proliferation and enhances contractility of human airway smooth muscle cells without change in contractile phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Jun;300(6):L958-966.
22. Leigh R, Ellis R, Wattie J, Donaldson DD, Inman MD. Is interleukin-13 critical in maintaining airway hyperresponsiveness in allergen-challenged mice? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Oct 15;170(8):851–6.
23. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(6):779–88.
24. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):45–56.
25. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):298–304.
26. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996 Jan 1;183(1):195–201.
27. Ohtomo T, Kaminuma O, Yamada J, Kitamura N, Abe A, Kobayashi N, et al. Eosinophils Are Required for the Induction of Bronchial Hyperresponsiveness in a Th Transfer Model of BALB/c Background. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(Suppl. 1):79–82.
28. Pégorier S, Wagner LA, Gleich GJ, Pretolani M. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Oct 1;177(7):4861–9.

29. ZAGAI U, SKÖLD CM, TRULSON A, VENGE P, LUNDAHL J. The effect of eosinophils on collagen gel contraction and implications for tissue remodelling. *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar;135(3):427–33.
30. Chang Y-J, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie ANJ, Smith DE, et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2011 May 29;12(7):631–8.
31. Klein Wolterink RGJ, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y, et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol*. 2012 May;42(5):1106–16.
32. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):549-556.e1-12.
33. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(1):123–33.
34. Kheradmand F, Kiss A, Xu J, Lee S-H, Kolattukudy PE, Corry DB. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Nov 15;169(10):5904–11.
35. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;119(2):414–20.
36. Takkouche B, González-Barcala F-J, Etminan M, Fitzgerald M. Exposure to furry pets and the risk of asthma and allergic rhinitis: a meta-analysis. *Allergy*. 2008 Jul;63(7):857–64.
37. Niemi MH, Rytönen-Nissinen M, Jänis J, Virtanen T, Rouvinen J. Structural aspects of dog allergies: The crystal structure of a dog dander allergen Can f 4. *Mol Immunol*. 2014 Sep 1;61(1):7–15.
38. Wintersand A, Asplund K, Binnmyr J, Holmgren E, Nilsson OB, Gafvelin G, et al. Allergens in dog extracts: Implication for diagnosis and treatment. *Allergy*. 2019;74(8):1472–9.
39. Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, et al. GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy*. 2009 Oct;64(10):1498–506.
40. Pretolani M, Soussan D, Poirier I, Thabut G, Aubier M, COBRA Study Group, et al. Clinical and biological characteristics of the French COBRA cohort of adult subjects with asthma. *Eur Respir J*. 2017 Aug;50(2).
41. Schou C, Svendsen UG, Løwenstein H. Purification and characterization of the major dog allergen, Can f I. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1991 May;21(3):321–8.
42. Polovic N, Wadén K, Binnmyr J, Hamsten C, Grönneberg R, Palmberg C, et al. Dog saliva - an important source of dog allergens. *Allergy*. 2013;68(5):585–92.

43. Vredegoor DW, Willemse T, Chapman MD, Heederik DJJ, Krop EJM. Can f 1 levels in hair and homes of different dog breeds: lack of evidence to describe any dog breed as hypoallergenic. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Oct;130(4):904-909.e7.
44. Akerstrom B, Flower DR, Salier JP. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 18;1482(1-2):1-8.
45. de Groot H, Goei KG, van Swieten P, Aalberse RC. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f I and of Can f I-depleted extract. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Jun;87(6):1056-65.
46. Zahradnik E, Raulf M. Animal Allergens and Their Presence in the Environment. *Front Immunol*. 2014 Mar 3
47. Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF, et al. The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology*. 1997 Dec;92(4):577-86.
48. Spitzauer S, Schweiger C, Anrather J, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, et al. Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;100(1):60-7.
49. Spitzauer S, Schweiger C, Sperr WR, Pandjaitan B, Valent P, Mühl S, et al. Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Mar;93(3):614-27.
50. Cabañas R, López-Serrano MC, Carreira J, Ventas P, Polo F, Caballero MT, et al. Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2000 Apr;10(2):71-7.
51. Mattsson L, Lundgren T, Olsson P, Sundberg M, Lidholm J. Molecular and immunological characterization of Can f 4: a dog dander allergen cross-reactive with a 23 kDa odorant-binding protein in cow dander. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;40(8):1276-87.
52. Mattsson L, Lundgren T, Everberg H, Larsson H, Lidholm J. Prostatic kallikrein: A new major dog allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Feb 1;123(2):362-368.e3.
53. Hilger C, Swiontek K, Arumugam K, Lehnert C, Hentges F. Identification of a new major dog allergen highly cross-reactive with Fel d 4 in a population of cat- and dog-sensitized patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Apr;129(4):1149-51.
54. Nilsson OB, Binnmyr J, Zoltowska A, Saarne T, van Hage M, Grönlund H. Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: the role in cross-reactivity with cat and horse. *Allergy*. 2012 Jun;67(6):751-7.
55. Khurana T, Newman-Lindsay S, Young PR, Slater JE. The NPC2 protein: A novel dog allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 2016;116(5):440-446.e2.
56. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec;19(6):652-7.
57. Gurczynski SJ, Moore BB. IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018 01;314(1):L6-16.

58. Miossec P. Interleukine 17 et l'inflammation chronique : de la découverte au ciblage thérapeutique. *Bull Académie Natl Médecine*. 2016 Apr;200(4–5):933–42.
59. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1004–11.
60. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*. 2008 Jun;9(6):650–7.
61. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):942–9.
62. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):108–19.
63. Wozniak KL, Hardison SE, Kolls JK, Wormley FL. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. *PloS One*. 2011 Feb 17;6(2):e17204.
64. Kim B-J, Lee S, Berg RE, Simecka JW, Jones HP. Interleukin-23 (IL-23) deficiency disrupts Th17 and Th1-related defenses against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Cytokine*. 2013 Oct;64(1):375–81.
65. Farfariello V, Amantini C, Nabissi M, Morelli MB, Aperio C, Caprodossi S, et al. IL-22 mRNA in peripheral blood mononuclear cells from allergic rhinitic and asthmatic pediatric patients. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 Jun 1;22(4):419–23.
66. Lindén A. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Nov;126(3):179–84.
67. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1185–7.
68. Chang Y, Al-Alwan L, Risse P-A, Halayko AJ, Martin JG, Baglole CJ, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J*. 2012 Jan 12;26(12):5152–60.
69. Xia W, Bai J, Wu X, Wei Y, Feng S, Li L, et al. Interleukin-17A promotes MUC5AC expression and goblet cell hyperplasia in nasal polyps via the Act1-mediated pathway. *PloS One*. 2014;9(6):e98915.
70. Yang J-Q, Kalim KW, Li Y, Zheng Y, Guo F. Ablation of RhoA impairs Th17 cell differentiation and alleviates house dust mite-triggered allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol*. 2019 Nov;106(5):1139–51.
71. Chenuet P, Fauconnier L, Madouri F, Marchiol T, Rouxel N, Ledru A, et al. Neutralization of either IL-17A or IL-17F is sufficient to inhibit house dust mite induced allergic asthma in mice. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2017 Oct 15;131(20):2533–48.
72. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2715–25.

73. Dos Santos TM, Righetti RF, Camargo L do N, Saraiva-Romanholo BM, Aristoteles LRCRB, de Souza FCR, et al. Effect of Anti-IL17 Antibody Treatment Alone and in Combination With Rho-Kinase Inhibitor in a Murine Model of Asthma. *Front Physiol.* 2018;9:1183.
74. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Sep 15;181(6):4089–97.
75. Leyva-Castillo JM, Yoon J, Geha RS. IL-22 promotes allergic airway inflammation in epicutaneously sensitized mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(2):619-630.e7.
76. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med.* 2012 Mar 4;18(4):547–54.
77. Zhao J, Lloyd CM, Noble A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. *Mucosal Immunol.* 2013 Mar;6(2):335–46.
78. Barczyk A, Pierzchala W, Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med.* 2003 Jun;97(6):726–33.
79. Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, et al. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Nov;134(5):1175-1186.e7.
80. Mashiko S, Bouguermouh S, Rubio M, Baba N, Bissonnette R, Sarfati M. Human mast cells are major IL-22 producers in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Aug;136(2):351-359.e1.
81. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MRM. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol.* 2015 Mar 21;33:747–85.
82. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31335–9.
83. Bleicher L, de Moura PR, Watanabe L, Colau D, Dumoutier L, Renauld J-C, et al. Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS Lett.* 2008 Sep 3;582(20):2985–92.
84. Yoon S-I, Jones BC, Logsdon NJ, Harris BD, Deshpande A, Radaeva S, et al. Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Struct Lond Engl* 1993. 2010 May 12;18(5):638–48.
85. Li J, Tomkinson KN, Tan X-Y, Wu P, Yan G, Spaulding V, et al. Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2. *Int Immunopharmacol.* 2004 May;4(5):693–708.
86. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld J-C. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):33676–82.

87. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):241–54.
88. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Jan;13(1):21–38.
89. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):282–9.
90. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke W-D, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2006 May;36(5):1309–23.
91. Johnson JR, Nishioka M, Chakir J, Risse P-A, Almaghlouth I, Bazarbashi AN, et al. IL-22 contributes to TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in asthmatic bronchial epithelial cells. *Respir Res*. 2013;14(1):118.
92. Chang Y, Al-Alwan L, Risse P-A, Roussel L, Rousseau S, Halayko AJ, et al. TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Apr;127(4):1046-1053.e1-2.
93. Besnard A-G, Sabat R, Dumoutier L, Renauld J-C, Willart M, Lambrecht B, et al. Dual Role of IL-22 in Allergic Airway Inflammation and its Cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 May 1;183(9):1153–63.
94. Lilly LM, Gessner MA, Dunaway CW, Metz AE, Schweibert L, Weaver CT, et al. The beta-glucan receptor Dectin-1 promotes lung immunopathology during fungal allergy via IL-22. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Oct 1;189(7):3653–60.
95. Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, Niwa Y, Wakashin H, Iwata A, et al. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Nov;128(5):1067-1076.e1-6.
96. Schnyder B, Lima C, Schnyder-Candrian S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine*. 2010 May 1;50(2):220–7.
97. Ito T, Hirose K, Saku A, Kono K, Takatori H, Tamachi T, et al. IL-22 induces Reg3 γ and inhibits allergic inflammation in house dust mite-induced asthma models. *J Exp Med*. 2017 Oct 2;214(10):3037–50.
98. Stacey MA, Marsden M, Pham N TA, Clare S, Dolton G, Stack G, et al. Neutrophils Recruited by IL-22 in Peripheral Tissues Function as TRAIL-Dependent Antiviral Effectors against MCMV. *Cell Host Microbe*. 2014 Apr 9;15(4):471–83.
99. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bønnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med*. 2007 Oct 11;357(15):1487–95.
100. Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJM, Culley FJ. Immunity to RSV in Early-Life. *Front Immunol*. 2014 Sep 29
101. Neavin DR, Liu D, Ray B, Weinshilboum RM. The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 3

102. Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2019 Mar;19(3):184–97.
103. Gandhi R, Kumar D, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):846–53.
104. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of T reg and T H 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008 May;453(7191):65–71.
105. Vaidyanathan B, Chaudhry A, Yewdell WT, Angeletti D, Yen W-F, Wheatley AK, et al. The aryl hydrocarbon receptor controls cell-fate decisions in B cells. *J Exp Med*. 2017;214(1):197–208.
106. Piper CJM, Rosser EC, Oleinika K, Nistala K, Krausgruber T, Rendeiro AF, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Rep*. 2019 Nov 12;29(7):1878-1892.e7.
107. Yamaguchi K, Matulka RA, Shneider AM, Toselli P, Trombino AF, Yang S, et al. Induction of PreB cell apoptosis by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in long-term primary murine bone marrow cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 Dec;147(2):190–203.
108. Allan LL, Mann KK, Matulka RA, Ryu H-Y, Schlezinger JJ, Sherr DH. Bone marrow stromal-B cell interactions in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced pro/pre-B cell apoptosis. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2003 Dec;76(2):357–65.
109. Li J, Phadnis-Moghe AS, Crawford RB, Kaminski NE. Aryl hydrocarbon receptor activation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs human B lymphopoiesis. *Toxicology*. 2017 01;378:17–24.
110. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld J-C, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 2008 May 1;453(7191):106–9.
111. Takei H, Yasuoka H, Yoshimoto K, Takeuchi T. Aryl hydrocarbon receptor signals attenuate lung fibrosis in the bleomycin-induced mouse model for pulmonary fibrosis through increase of regulatory T cells. *Arthritis Res Ther* . 2020.
112. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*. 2009 Aug;10(8):864–71.
113. Ramirez J-M, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes T, Dayer J-M, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *Eur J Immunol*. 2010 Sep;40(9):2450–9.
114. Michaudel C, Bataille F, Maillet I, Fauconnier L, Colas C, Sokol H, et al. Ozone-Induced Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Controls Lung Inflammation via Interleukin-22 Modulation. *Front Immunol*. 2020;11:144.
115. Plé C, Fan Y, Ait Yahia S, Vorng H, Everaere L, Chenivresse C, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons reciprocally regulate IL-22 and IL-17 cytokines in peripheral blood mononuclear cells from both healthy and asthmatic subjects. *PloS One*. 2015;10(4):e0122372.

116. Martinez JM, Afshari CA, Bushel PR, Masuda A, Takahashi T, Walker NJ. Differential toxicogenomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2002 Oct;69(2):409–23.
117. Jeong K-T, Hwang S-J, Oh G-S, Park J-H. FICZ, a tryptophan photoproduct, suppresses pulmonary eosinophilia and Th2-type cytokine production in a mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2012 Aug;13(4):377–85.
118. Lawrence BP, Denison MS, Novak H, Vorderstrasse BA, Harrer N, Neruda W, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1158–65.
119. Thatcher TH, Williams MA, Pollock SJ, McCarthy CE, Lacy SH, Phipps RP, et al. Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function. *Immunology*. 2016 Jan;147(1):41–54.
120. Xu T, Zhou Y, Qiu L, Do DC, Zhao Y, Cui Z, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Protects Lungs from Cockroach Allergen-Induced Inflammation by Modulating Mesenchymal Stem Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Dec 15;195(12):5539–50.
121. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1194-1204.e2.
122. Alvarez-Simón D, Muñoz X, Gómez-Ollés S, de Homdedeu M, Untoria M-D, Cruz M-J. Effects of diesel exhaust particle exposure on a murine model of asthma due to soybean. *PloS One*. 2017;12(6):e0179569.
123. Xia M, Viera-Hutchins L, Garcia-Lloret M, Noval Rivas M, Wise P, McGhee SA, et al. Vehicular exhaust particles promote allergic airway inflammation through an aryl hydrocarbon receptor-notch signaling cascade. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug;136(2):441–53.
124. Wong PS, Vogel CF, Kokosinski K, Matsumura F. Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Feb;42(2):210–7.
125. Chiba T, Uchi H, Tsuji G, Gondo H, Moroi Y, Furue M. Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011 Feb;24(1):133–40.
126. Collins LL, Lew BJ, Lawrence BP. TCDD exposure disrupts mammary epithelial cell differentiation and function. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2009 Jul;28(1):11–7.
127. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):9–23.
128. Ait Yahia S, Wallaert B, Tsicopoulos A. The role of NOD-like receptors in allergic disease. *Revue française d'allergologie*. 2013;411–8.
129. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):445–59.

130. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SAJ, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):660–9.
131. Geddes K, Rubino SJ, Magalhaes JG, Streutker C, Le Bourhis L, Cho JH, et al. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat Med*. 2011 Jun 12;17(7):837–44.
132. Weidinger S, Klopp N, Rümmler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A, et al. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy*. 2005 Jul 1;35(7):866–72.
133. Kabesch M, Peters W, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr;111(4):813–7.
134. Huber HL, Koessler KK. THE PATHOLOGY OF BRONCHIAL ASTHMA. *Arch Intern Med*. 1922 Dec 1;30(6):689–760.
135. Benayoun L, Pretolani M. le remodelage bronchique dans l'asthme: mécanismes et enjeux thérapeutiques. *Médecine Science*. 2003;319–26.
136. Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Crystal RG. Role of connective tissue proteases in the pathogenesis of chronic inflammatory lung disease. *Environ Health Perspect*. 1984 Apr;55:297–306.
137. Beck K, Brodsky B. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. *J Struct Biol*. 1998;122(1–2):17–29.
138. Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol*. 2005 Sep 1;53(7):430–42.
139. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater Deerfield Beach Fla*. 2019 Jan;31(1):e1801651.
140. Benayoun L, Druilhe A, Dombret M-C, Aubier M, Pretolani M. Airway Structural Alterations Selectively Associated with Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 May 15;167(10):1360–8.
141. Törmänen KR, Uller L, Persson CGA, Erjefält JS. Allergen Exposure of Mouse Airways Evokes Remodeling of both Bronchi and Large Pulmonary Vessels. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan 1;171(1):19–25.
142. Gueders MM, Bertholet P, Perin F, Rocks N, Maree R, Botta V, et al. A novel formulation of inhaled doxycycline reduces allergen-induced inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of asthma. *Biochem Pharmacol*. 2008 Jan 15;75(2):514–26.
143. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):193–204.

144. Sun Q, Fang L, Roth M, Tang X, Papakonstantinou E, Zhai W, et al. Bronchial thermoplasty decreases airway remodelling by blocking epithelium-derived heat shock protein-60 secretion and protein arginine methyltransferase-1 in fibroblasts. *Eur Respir J*. 2019 Dec;54(6).
145. Sun Q, Liu L, Wang H, Mandal J, Khan P, Hostettler KE, et al. Constitutive high expression of protein arginine methyltransferase 1 in asthmatic airway smooth muscle cells is caused by reduced microRNA-19a expression and leads to enhanced remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Aug;140(2):510-524.e3.
146. Chantrain C, DeClerck YA. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *médecine/sciences*. 2002 May 1;18(5):565–75.
147. Cataldo D, Munaut C, Noël A, Franken F, Bartsch P, Foidart JM, et al. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Nov;123(3):259–67.
148. Becky Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased Matrix Metalloproteinase-9 in the Airway after Allergen Challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep 1;162(3):1157–61.
149. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun*. 2009;1(2):123–35.
150. Rogers DF. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care*. 2007 Sep;52(9):1134–46; discussion 1146-1149.
151. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Feb 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17716382>
152. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992 Apr;101(4):916–21.
153. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, Dunican EM, Yu M, Carrington SD, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 15;194(10):1296–9.
154. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, et al. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. 2001 Dec;108(12):1817–24.
155. Lachowicz-Scroggins ME, Finkbeiner WE, Gordon ED, Yuan S, Zlock L, Bhakta NR, et al. Corticosteroid and long-acting β -agonist therapy reduces epithelial goblet cell metaplasia. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2017 Dec;47(12):1534–45.
156. Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb;163(2):511–6.
157. Kim S-H, Pei Q-M, Jiang P, Liu J, Sun R-F, Qian X-J, et al. Upregulation of MUC5AC by VEGF in human primary bronchial epithelial cells: implications for asthma. *Respir Res*. 2019 Dec 12;20(1):282.

158. Kim SJ, Kim CH, Ahn JH, Kim MS, Kim SC, Lee SY, et al. Time sequence of airway remodeling in a mouse model of chronic asthma: the relation with airway hyperresponsiveness. *J Korean Med Sci.* 2007 Apr;22(2):183–91.
159. Bonser LR, Erle DJ. Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *J Clin Med.* 2017 Nov 29;6(12).
160. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 Sep 10 [cited 2020 Feb 12];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768124/>
161. Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, et al. Role of capacitative Ca²⁺ entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2002 Apr;92(4):1594–602.
162. Chiba Y, Nakazawa S, Todoroki M, Shinozaki K, Sakai H, Misawa M. Interleukin-13 Augments Bronchial Smooth Muscle Contractility with an Up-Regulation of RhoA Protein. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Feb 1;40(2):159–67.
163. Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, et al. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Aug;156(2 Pt 1):642–7.
164. Lv X, Li Y, Gong Q, Jiang Z. TGF- β 1 induces airway smooth muscle cell proliferation and remodeling in asthmatic mice by up-regulating miR-181a and suppressing PTEN. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019 Jan 1;12(1):173–81.
165. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2005 May 1;174(9):5774–80.
166. Girodet P-O, Dournes G, Thumerel M, Begueret H, Dos Santos P, Ozier A, et al. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Apr 15;191(8):876–83.
167. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet P-O, Ghosh D, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med.* 2007 Dec 24;204(13):3173–81.
168. Saunders R, Siddiqui S, Kaur D, Doe C, Sutcliffe A, Hollins F, et al. Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Feb;123(2):376–84.
169. Trian T, Allard B, Dupin I, Carvalho G, Ousova O, Maurat E, et al. House dust mites induce proliferation of severe asthmatic smooth muscle cells via an epithelium-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Mar 1;191(5):538–46.
170. Redhu NS, Shan L, Al-Subait D, Ashdown HL, Movassagh H, Lamkhioued B, et al. IgE induces proliferation in human airway smooth muscle cells: role of MAPK and STAT3 pathways. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol.* 2013 Oct 17;9(1):41.
171. Jiang J-X, Guan Y, Shen H-J, Jia Y-L, Shen J, Zhang L-H, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates airway remodeling in a chronic asthma model. *Eur J Pharmacol.* 2020 Feb 5;868:172874.

172. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420–8.
173. Foo SY, Phipps S. Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology. *Mucosal Immunol.* 2010 Nov;3(6):537–44.
174. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Front Immunol.* 2016;7:258.
175. Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, et al. Sustained interleukin-6 signalling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung. *J Pathol.* 2003 May;200(1):82–7.
176. Woodland DL, Randall TD. Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract. *Semin Immunol.* 2004 Jun;16(3):163–70.
177. Shinoda K, Hirahara K, Iinuma T, Ichikawa T, Suzuki AS, Sugaya K, et al. Thy1+IL-7+ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 May 17;113(20):E2842–2851.
178. Foo SY, Zhang V, Lalwani A, Lynch JP, Zhuang A, Lam CE, et al. Regulatory T cells prevent inducible BALT formation by dampening neutrophilic inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015 May 1;194(9):4567–76.
179. Kocks JR, Davalos-Misslitz ACM, Hintzen G, Ohi L, Förster R. Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. *J Exp Med.* 2007 Apr 16;204(4):723–34.
180. Slight SR, Rangel-Moreno J, Gopal R, Lin Y, Fallert Junecko BA, Mehra S, et al. CXCR5+ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest.* 2013 Feb 1;123(2):712–26.
181. Wiley JA, Richert LE, Swain SD, Harmsen A, Barnard DL, Randall TD, et al. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue elicited by a protein cage nanoparticle enhances protection in mice against diverse respiratory viruses. *PloS One.* 2009 Sep 23;4(9):e7142.
182. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):927–34.
183. Eddens T, Elsegeiny W, Garcia-Hernandez M de la L, Castillo P, Trevejo-Nunez G, Serody K, et al. Pneumocystis-Driven Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation Requires Th2 and Th17 Immunity. *Cell Rep.* 2017 Mar 28;18(13):3078–90.
184. Jupelli M, Shimada K, Chiba N, Slepchenkin A, Alsabeh R, Jones HD, et al. Chlamydia pneumoniae Infection in Mice Induces Chronic Lung Inflammation, iBALT Formation, and Fibrosis. *PLoS ONE.* 2013 Oct 25
185. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24;350(26):2645–53.

186. Gosman MME, Willemse BWM, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, et al. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J*. 2006 Jan;27(1):60–4.
187. van der Strate BWA, Postma DS, Brandsma C-A, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):751–8.
188. Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2006 Dec;116(12):3183–94.
189. Chua YL, Liong KH, Huang C-H, Wong HS, Zhou Q, Ler SS, et al. Blomia tropicalis-Specific TCR Transgenic Th2 Cells Induce Inducible BALT and Severe Asthma in Mice by an IL-4/IL-13-Dependent Mechanism. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 15;197(10):3771–81.
190. Vroman H, Bergen IM, Li BWS, van Hulst J a. C, Lukkes M, van Uden D, et al. Development of eosinophilic inflammation is independent of B-T cell interaction in a chronic house dust mite-driven asthma model. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2017 Apr;47(4):551–64.
191. Tschernig T, Pabst R, Prenzler F, Rittinghausen S, Braun A, Hohlfeld JM. Isolated aggregates of lymphoid cells in the inner bronchial wall in asthma patients. *Cell Tissue Res*. 2018 Nov;374(2):423–5.
192. Chvatchko Y, Kosco-Vilbois MH, Herren S, Lefort J, Bonnefoy JY. Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge. *J Exp Med*. 1996 Dec 1;184(6):2353–60.
193. Song J, Wang H, Zhang Y-N, Cao P-P, Liao B, Wang Z-Z, et al. Ectopic lymphoid tissues support local immunoglobulin production in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(3):927–37.
194. Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, et al. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol*. 2011 Jun 12;12(7):639–46.
195. Truman LA, Bentley KL, Ruddle NH. Lymphotoxin targeted to salivary and lacrimal glands induces tertiary lymphoid organs and cervical lymphadenopathy and reduces tear production. *Eur J Immunol*. 2020 Mar;50(3):418–25.
196. Li C, Lam E, Perez-Shibayama C, Ward LA, Zhang J, Lee D, et al. Early-life programming of mesenteric lymph node stromal cell identity by the lymphotoxin pathway regulates adult mucosal immunity. *Sci Immunol*. 2019 Dec 20;4(42).
197. Fleige H, Haas JD, Stahl FR, Willenzon S, Prinz I, Förster R. Induction of BALT in the absence of IL-17. *Nat Immunol*. 2011 Dec 16;13(1):1; author reply 2.
198. Barone F, Nayar S, Campos J, Cloake T, Withers DR, Toellner K-M, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 1;112(35):11024–9.
199. GeurtsvanKessel CH, Willart MAM, Bergen IM, van Rijt LS, Muskens F, Elewaut D, et al. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med*. 2009 Oct 26;206(11):2339–49.

200. Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, et al. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med*. 2009 Nov 23;206(12):2593–601.
201. Moyer BJ, Rojas IY, Kerley-Hamilton JS, Hazlett HF, Nemani KV, Trask HW, et al. Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGF β , and IDO1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016 01;300:13–24.
202. Kim S-H, Henry EC, Kim D-K, Kim Y-H, Shin KJ, Han MS, et al. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*. 2006 Jun;69(6):1871–8.
203. Dean A, Gregorc T, Docherty CK, Harvey KY, Nilsen M, Morrell NW, et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Sugen 5416-induced Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58(3):320–30.
204. Paulissen G, Rocks N, Guéders MM, Bedoret D, Crahay C, Quesada-Calvo F, et al. ADAM-8, a metalloproteinase, drives acute allergen-induced airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011 Feb;41(2):380–91.
205. Myou S, Leff AR, Myo S, Boetticher E, Tong J, Meliton AY, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1573–82.
206. Le Saux O, Teeters K, Miyasato S, Choi J, Nakamatsu G, Richardson JA, et al. The role of caveolin-1 in pulmonary matrix remodeling and mechanical properties. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Dec;295(6):L1007–17.
207. Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, Bölter J, Willenzon S, Sutter G, et al. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J Exp Med*. 2014 Apr 7;211(4):643–51.
208. Randall TD. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol*. 2010;107:187–241.
209. He G, Tsutsumi T, Zhao B, Baston DS, Zhao J, Heath-Pagliuso S, et al. Third-generation Ah receptor-responsive luciferase reporter plasmids: amplification of dioxin-responsive elements dramatically increases CALUX bioassay sensitivity and responsiveness. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2011 Oct;123(2):511–22.
210. Dyring-Andersen B, Honoré TV, Madelung A, Bzorek M, Simonsen S, Clemmensen SN, et al. Interleukin (IL)-17A and IL-22-producing neutrophils in psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2017;177(6):e321–2.
211. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Jul 1;187(1):490–500.
212. Wendling O, Bornert J-M, Chambon P, Metzger D. Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genes N Y N* 2000. 2009 Jan;47(1):14–8.
213. Rawlins EL, Perl A-K. The a“MAZE”ing World of Lung-Specific Transgenic Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Mar;46(3):269–82.

214. Flodby P, Borok Z, Banfalvi A, Zhou B, Gao D, Minoo P, et al. Directed Expression of Cre in Alveolar Epithelial Type 1 Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Aug;43(2):173–8.
215. Zenewicz LA, Yin X, Wang G, Elinav E, Hao L, Zhao L, et al. IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 May 15;190(10):5306–12.
216. Perzanowski MS, Ronmark E, James HR, Hedman L, Schuyler AJ, Bjerg A, et al. Relevance of specific IgE antibody titer to the prevalence, severity, and persistence of asthma among 19-year-olds in northern Sweden. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec;138(6):1582–90.
217. Hilger C, Kuehn A, Hentges F. Animal lipocalin allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012 Oct;12(5):438–47.
218. Royer P-J, Emara M, Yang C, Al-Ghouleh A, Tighe P, Jones N, et al. The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Aug 1;185(3):1522–31.
219. Emara M, Royer P-J, Mahdavi J, Shakib F, Ghaemmaghami AM. Retagging identifies dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3)-grabbing non-integrin (DC-SIGN) protein as a novel receptor for a major allergen from house dust mite. *J Biol Chem*. 2012 Feb 17;287(8):5756–63.
220. Goyal S, Castrillón-Betancur JC, Klaile E, Slevogt H. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. *Front Immunol*. 2018 Jun 4
221. 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 Feb;43(2):343–73.
222. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002 Oct;57(10):875–9.
223. Radermecker C, Sabatel C, Vanwinge C, Ruscitti C, Maréchal P, Perin F, et al. Locally instructed CXCR4hi neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nat Immunol*. 2019;20(11):1444–55.
224. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1645–51.
225. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. 2009 Aug 21;31(2):321–30.
226. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov II, et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):35–41.
227. Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL, et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):66–74.

228. Lee J, Cella M, McDonald K, Garlanda C, Kennedy GD, Nukaya M, et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat Immunol*. 2011 Nov 20;13(2):144–51.
229. Qiu J, Heller JJ, Guo X, Chen ZE, Fish K, Fu Y-X, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity*. 2012 Jan 27;36(1):92–104.
230. Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, Hobeika E, Finke D, Esser C, et al. Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles. *Science*. 2011 Dec 16;334(6062):1561–5.
231. Zindl CL, Lai J-F, Lee YK, Maynard CL, Harbour SN, Ouyang W, et al. IL-22–producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 30;110(31):12768–73.
232. Hu S, He W, Du X, Yang J, Wen Q, Zhong X-P, et al. IL-17 Production of Neutrophils Enhances Antibacteria Ability but Promotes Arthritis Development During Mycobacterium tuberculosis Infection. *EBioMedicine*. 2017 Aug 9;23:88–99.
233. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Feb 15;170(4):2106–12.
234. Kim HY, Lee HJ, Chang Y-J, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):54–61.
235. Kumar P, Thakar MS, Ouyang W, Malarkannan S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol*. 2013 Jan;6(1):69–82.
236. Guo H, Topham DJ. Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection. *J Virol*. 2010 Aug;84(15):7750–9.
237. Xu X, Weiss ID, Zhang HH, Singh SP, Wynn TA, Wilson MS, et al. Conventional NK cells can produce IL-22 and promote host defense in *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Feb 15;192(4):1778–86.
238. Hansson M, Silverpil E, Lindén A, Glader P. Interleukin-22 produced by alveolar macrophages during activation of the innate immune response. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2013 Jun;62(6):561–9.
239. Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet Lond Engl*. 2006 Aug 26;368(9537):780–93.
240. Yoo YC, Yoshimatsu K, Koike Y, Hatsuse R, Yamanishi K, Tanishita O, et al. Adjuvant activity of muramyl dipeptide derivatives to enhance immunogenicity of a hantavirus-inactivated vaccine. *Vaccine*. 1998 Feb;16(2–3):216–24.
241. Kudo M, Kobayashi-Nakamura K, Kitajima N, Tsuji-Naito K. Alternate expression of PEPT1 and PEPT2 in epidermal differentiation is required for NOD2 immune responses

- by bacteria-derived muramyl dipeptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Jan 29;522(1):151–6.
242. Lu H, Klaassen C. Tissue distribution and thyroid hormone regulation of Pept1 and Pept2 mRNA in rodents. *Peptides*. 2006 Apr;27(4):850–7.
 243. Tschernig T, Pabst R, Prenzler F, Rittinghausen S, Braun A, Hohlfeld JM. Isolated aggregates of lymphoid cells in the inner bronchial wall in asthma patients. *Cell Tissue Res*. 2018 Nov;374(2):423–5.
 244. Heier I, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Kajosaari M, Turpeinen M, et al. Bronchial response pattern of antigen presenting cells and regulatory T cells in children less than 2 years of age. *Thorax*. 2008 Aug;63(8):703–9.
 245. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. 1997 Jun 16;185(12):2143–56.
 246. Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LT α i cells. *J Exp Med*. 2011 Jan 17;208(1):125–34.
 247. Bernshtein B, Curato C, Ioannou M, Thaïss CA, Gross-Vered M, Kolesnikov M, et al. IL-23-producing IL-10R α -deficient gut macrophages elicit an IL-22-driven proinflammatory epithelial cell response. *Sci Immunol*. 2019 14;4(36).
 248. Suzuki T, Wang W, Lin JT, Shirato K, Mitsuhashi H, Inoue H. Aerosolized human neutrophil elastase induces airway constriction and hyperresponsiveness with protection by intravenous pretreatment with half-length secretory leukoprotease inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Apr;153(4 Pt 1):1405–11.
 249. Ekstedt S, Säfholm J, Georén SK, Cardell LO. Dividing neutrophils in subsets reveals a significant role for activated neutrophils in the development of airway hyperreactivity. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2019;49(3):285–91.
 250. Koga H, Miyahara N, Fuchimoto Y, Ikeda G, Waseda K, Ono K, et al. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir Res*. 2013 Jan 24;14:8.
 251. Chiba T, Chihara J, Furue M. Role of the Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in the Pathology of Asthma and COPD. *J Allergy*. 2012
 252. Beamer CA, Seaver BP, Shepherd DM. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Regulates Silica-Induced Inflammation But Not Fibrosis. *Toxicol Sci*. 2012 Apr;126(2):554–68.
 253. Woeller CF, Roztocil E, Hammond CL, Feldon SE, Phipps RP. The Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Ligands Inhibit Myofibroblast Formation and Activation. *Am J Pathol*. 2016 Dec;186(12):3189–202.
 254. Zhou Y, Mirza S, Xu T, Tripathi P, Plunkett B, Myers A, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Modulates Cockroach Allergen-Induced Immune Responses through Active TGF β 1 Release. *Mediators Inflamm*. 2014

255. Qiu J, Guo X, Chen Z-ME, He L, Sonnenberg GF, Artis D, et al. Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):386–99.
256. Moyer BJ, Rojas IY, Kerley-Hamilton JS, Nemani KV, Trask HW, Ringelberg CS, et al. Obesity and fatty liver are prevented by inhibition of the aryl hydrocarbon receptor in both female and male mice. *Nutr Res N Y N*. 2017 Aug;44:38–50.
257. Li W, Gauthier JM, Higashikubo R, Hsiao H-M, Tanaka S, Vuong L, et al. Bronchus-associated lymphoid tissue-resident Foxp3⁺ T lymphocytes prevent antibody-mediated lung rejection. *J Clin Invest*. 2019 01;129(2):556–68.
258. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):854–61.
259. Samsom JN, van Berkel LA, van Helvoort JMLM, Unger WWJ, Jansen W, Thepen T, et al. Fc gamma RIIb regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 May 1;174(9):5279–87.
260. Dharajiya N, Vaidya SV, Murai H, Cardenas V, Kurosky A, Boldogh I, et al. Fc gamma RIIb inhibits allergic lung inflammation in a murine model of allergic asthma. *PloS One*. 2010 Feb 22;5(2):e9337.
261. Taube C, Tertilt C, Gyölvézi G, Dehzad N, Kreymborg K, Schneeweiss K, et al. IL-22 is produced by innate lymphoid cells and limits inflammation in allergic airway disease. *PloS One*. 2011;6(7):e21799.
262. Laporte JC, Moore PE, Baraldo S, Jouvin MH, Church TL, Schwartzman IN, et al. Direct effects of interleukin-13 on signaling pathways for physiological responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jul 1;164(1):141–8.
263. Saha SK, Berry MA, Parker D, Siddiqui S, Morgan A, May R, et al. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar;121(3):685–91.
264. Fang L, Wang X, Sun Q, Papakonstantinou E, S'ng C, Tamm M, et al. IgE Downregulates PTEN through MicroRNA-21-5p and Stimulates Airway Smooth Muscle Cell Remodeling. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 18;20(4).
265. Fabre T, Molina MF, Soucy G, Goulet J-P, Willems B, Villeneuve J-P, et al. Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β -dependent liver fibrosis. *Sci Immunol*. 2018 26;3(28).
266. Pociask DA, Scheller EV, Mandalapu S, McHugh KJ, Enelow RI, Fattman CL, et al. IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection. *Am J Pathol*. 2013 Apr;182(4):1286–96.

Annexes

Publications :

- **Mélodie Bouté**, Florence Carreras, Christelle Rossignol, Emilie Doz, Nathalie Winter and Mathieu Epardaud. The C3HeB/FeJ mouse model recapitulates the hallmark of bovine tuberculosis lung lesions following *Mycobacterium bovis* aerogenous infection. 2017. Vet Res. 2017 Nov 7;48(1):73.
- Laetitia Everaere, Saliha Ait Yahia, **Mélodie Bouté**, Camille Audousset, Cécile Chenivresse, and Anne Tsicopoulos. Innate lymphoid cells at the interface between obesity and asthma. 2017, Immunology. 2018 Jan;153(1):21-30.
- **Bouté Mélodie**, Ait Yahia Saliha, Nanou Julie, Chenivresse Cécile, Tsicopoulos Anne. Use of antagonists of Th17 cytokines for the treatment of airway remodeling in patients suffering from allergic asthma. EP 18 306 243.9. Patent filed on september 2018.
- **Mélodie Bouté**, Saliha Ait Yahia, Julie Nanou, Daniel Alvarez Simon, Camille Audousset, Han Vorng, Joanne Balsamelli, Fan Ying, Philippe Marquillies, Elisabeth Werkmeister, Patricia de Nadai, Cécile Chenivresse, and Anne Tsicopoulos. Aryl hydrocarbon receptor regulates airway remodeling and bronchus-associated lymphoid tissue in neutrophilic airway inflammation. Submitted, July 2020.
- Odile Poulain-Godefroy, **Mélodie Bouté**, Julie Carrard, Anne Tsicopoulos and Patricia de Nadai. The aryl hydrocarbon receptor in asthma: friend or foe? International Journal of Molecular Sciences. Invited review, September 2020

Communications :

- **M.Bouté**, S.Ait Yahia, J.Nanou, F.Ying, P.Marquillies, C.Chenivesse et A.Tsicopoulos. Effets de la co-stimulation allergène/récepteur de l'immunité innée NOD2, sur la production d'IL-22 et sur la sévérité de l'asthme. Journée de Recherche Respiratoire (J2R), Marseille, octobre 2018 (poster).
- **Mélodie Bouté**, Saliha Ait Yahia, Julie Nanou, Han Vorng, Ying Fan, Philippe Marquillies, Cécile Chenivesse, Anne Tsicopoulos. Experimental dog allergen-induced chronic airway allergic inflammation mimicks Th17-type severe asthma with neutrophilia, bronchial remodelling and BALT development, but is not modulated by NOD2 ligand co-sensitization. Keystone symposia, Origins of Allergic Disease: Microbial, Epithelial and Immune Interactions, Tahoe, Californie, march 24-27, 2019 (poster).
- **Mélodie Bouté**, Saliha Ait Yahia, Julie Nanou, Han Vorng, Fan Yang, Philippe Marquillies, Cécile Chenivesse, Anne Tsicopoulos. Experimental dog allergen-induced chronic airway allergic inflammation mimicks Th17-type severe asthma with neutrophilia, bronchial remodelling and BALT development, but is not modulated by NOD2 ligand co-sensitization. Journée de Recherche en Allergologie (JRA), Paris, april 2019 (poster/oral).
- **M.Bouté**, S.Ait Yahia, J.Nanou, H.Vorng, F.Ying, P.Marquillies, C.Chenivesse et A.Tsicopoulos. Experimental dog allergen-induced chronic airway allergic inflammation mimicks Th17-type severe asthma but is not modulated by NOD2 ligand co-sensitization. Journée de Recherche Respiratoire (J2R), Bruxelles, october 2019 (poster).

Prix :

- Lauréat « **Keystone Symposia Scholarship** », pour le congrès « Origins of Allergic Disease : Microbial, Epithelial and Immune Interactions », Tahoe, Californie, mars 2019.
- Lauréat 2019 du Fonds de dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire. Sous le haut parrainage de la Fondation du Souffle, juillet 2019.

Aryl hydrocarbon receptor regulates airway remodeling and bronchus-associated lymphoid tissue in neutrophilic airway inflammation

Mélodie Bouté¹, Saliha Ait Yahia¹, Julie Nanou¹, Daniel Alvarez Simon¹, Camille Audousset¹, Han Vorng¹, Joanne Balsamelli¹, Fan Ying¹, Philippe Marquillies¹, Elisabeth Werkmeister¹, Patricia de Nadai¹, Cécile Chenivresse^{1*}, and Anne Tsicopoulos^{1*}.

From ¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR9017-CIIL-Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Lille, France

* These authors equally contributed to the work.

Corresponding author:

A Tsicopoulos, MD

Center for Infection and Immunity of Lille, U1019 Pulmonary Immunity

Institut Pasteur de Lille,

1 rue du Professeur Calmette

59019 Lille Cedex, France

Tel: +33 320877221, Fax: +33 320877345

E-mail: anne.tsicopoulos@pasteur-lille.fr

Acknowledgements: We acknowledge the generous support from the NIAID (National Institutes of Health) Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA) for supplying CD1d tetramers and Dr. W. Ouyang (Genentech, San Francisco, CA) for the anti-IL-22 Ab (clone 3F11). The murine AhR reporter cell line (H1L7.5c3 mouse hepatoma) was kindly provided by

Michael Denison (Davis university,CA). This work was supported by a grant from Santelys, and by a fellowship to MB by Fonds de Recherche en Santé Respiratoire

Short title: Blockade of Ahr inhibits neutrophilic airway inflammation

Total word count: 3303

ABSTRACT

- **Background:** Severe asthma is a major therapeutic challenge with no targeted approach for the Th17 endotype. The NOD2 receptor and the Aryl hydrocarbon receptor transcription factor have been shown to favor Th17 type inflammation.
- **Methods:** A model of Th17-type dog-induced allergic airway inflammation was developed. The effect of a NOD2 agonist and of an antagonist of the aryl hydrocarbon receptor was assessed on airway hyperresponsiveness, airway remodeling, Th2/Th17 type inflammation, and bronchus associated lymphoid tissue induction.
- **Results:** Multiple administration of dog allergen elicited a predominant Th17-type lung inflammation, broncho-alveolar lavage neutrophilia, airway remodeling and hyperresponsiveness, and induction of bronchus associated lymphoid tissue. While there was no effect of NOD2 agonist co-stimulation, blocking aryl hydrocarbon receptor pathway during the challenge phase attenuated airway hyperresponsiveness, lung IL-22, mucus production, smooth muscle hyperplasia and broncho-alveolar lavage neutrophilia, but not IL-17 and Th2-type cytokines. Aryl hydrocarbon receptor blockade also increased induced bronchus associated lymphoid tissue B cell number together with increased broncho-alveolar lavage dog-specific IgG1 antibody production.
- **Conclusion:** These data show that aryl hydrocarbon receptor may provide a therapeutic target for Th17-type allergic airway inflammation.

Keywords

Aryl hydrocarbon receptor; Airway remodeling; Asthma; Th17; Bronchus associated lymphoid tissue.

INTRODUCTION

Asthma is a chronic disorder, characterized by airway hyperresponsiveness (AHR) and variable bronchial remodeling, and by an inflammatory process leading to fluctuating recruitment of eosinophils and neutrophils. Among asthma patients, up to 10% exhibit severe asthma requiring high doses of inhaled corticosteroids combined with a second controller¹ and display heterogeneous features including type 2 low and high phenotypes.² Clinical trials have shown the efficacy of drugs targeting molecular mechanisms in type 2 high severe asthma.^{3, 4} Besides the T2-type pathway, the Th17-type pathway also displays characteristics of an alternative driver of severe asthma pathophysiology. In particular, Th17-type cytokines participate to airway neutrophil infiltration,^{5, 6} AHR,^{6, 7} bronchial remodeling,⁸ and corticosteroid resistance⁵. Different drivers of Th17 inflammation have been identified. Among them, Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) enhances, through dendritic cells, IL-17 production by T cells⁹. NOD2 is a pattern recognition receptor sensing Gram-positive bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*¹⁰, as well as viruses such as the syncytial respiratory virus¹¹, two childhood infections increasing the risk to develop asthma in adulthood,^{12, 13} suggesting that NOD2 may behave as an adjuvant of asthma development. Furthermore, polymorphisms of this receptor are associated with asthma.¹⁴ Another determinant of Th17-type cytokine production is the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr). This receptor is activated by small molecules provided by the diet, microorganisms, metabolism and by pollutants¹⁵ and is expressed by a number of immune cells. In T cells, Ahr controls IL-17 and IL-22 production,^{16, 17} as well as induces CD4 T cells with a regulatory phenotype.^{16, 18} Depending on the Ahr ligand used, opposite results have been published in allergic airway inflammation (AAI) reporting anti-^{19, 20} and pro- inflammatory effects,^{21, 22} but to our knowledge, no study has evaluated the effect of Ahr blockade in Th17 chronic AAI. The aim of this study was to develop a murine model of asthma exhibiting Th17-type features with neutrophilic inflammation to evaluate the two above-mentioned drivers of Th17-type inflammation. We used a NOD2 agonist as a potential enhancer, and an antagonist of the aryl hydrocarbon receptor

as a putative inhibitor. We show, that the former had no effect on AAI, whereas the latter inhibited AHR, smooth muscle hyperplasia, mucus overproduction and bronchoalveolar lavage (BAL) neutrophil recruitment as well as IL-22 production, and increased the B cell component of induced bronchial associated lymphoid tissue (iBALT). These data suggest that Ahr may be a targetable pathway for the Th17^{high} endotype.

METHODS

Mice

C57BL/6J female mice (6 weeks of age) were purchased from Charles River or Janvier Lab (France). All animals were housed under specific pathogen-free conditions, in ventilated cages with absorbent bedding material, maintained on a 12-hours daylight cycle and with free access to commercial pelleted food and water *ad libitum*. All animal experiments were approved by the regional ethical committee and authorized by the ministry of research and innovation (APAFIS#7874-2016070417344442 v3).

Allergen sensitization and challenges

After having performed dose response experiments, positive groups were sensitized intranasally (i.n.) with dog allergen extract (kindly provided by Stallergenes and ALK France) at a dose corresponding to 10 µg/mL of the major allergen Can f 1, alone or in combination with the NOD2 agonist muramyl di peptide (MDP) (invivoGen) at 10 µg in 30 µL PBS, or for the control groups with PBS or MDP alone for 5 days. Nine days later, mice were challenged i.n. with the same quantity of dog allergen (positive groups) or PBS (control groups) 5 days a week for 3 weeks (Figure S1A). AHR was assessed 24 hours after the last challenge. For Ahr experiments, mice were fed during allergen challenges with either normal control diet alone (D12450K, Research Diet, New Brunswick, USA), or the same diet supplemented with the Ahr antagonist CH-223191 (Tocris, Noyal Châtillon sur Seiche, France) (Figure S1B). Mice were sacrificed by pentobarbital injection (Euthasol, Centravet). BAL fluid was collected and cells counted on cytospin preparations after May-Grünwald Giemsa (Diapath, Microm Microtech, Brignais, France) staining. Blood samples were collected to obtain serum. Lungs were collected for protein analysis, RNA isolation and histology or flow cytometry analysis. Details about the choice of the allergen and technical approaches are provided in the online supplement.

Measurement of serum and BAL antibodies

Total IgE serum level was measured by ELISA as previously described.²³ Dog allergen-specific IgE and IgG1 and total IgA antibodies in serum and BAL were assessed as described in the online supplement.

Measurement of airway responsiveness

AHR was assessed using Flexivent® (Scireq®, Montreal, Canada) as previously described.²⁴ Analysis was performed as described in the online supplement.

Lung histology and immunohistochemistry

Lung histology and immunohistochemistry were performed using conventional methods described in the online supplement.

Cell preparations

For flow cytometry, lungs were perfused through the pulmonary artery and digested in 1 mg/mL type IV collagenase (Gibco, Life Technologies) and 2 IU/mL DNase I (Roche Diagnostics, France) in RPMI 1640 (Dutscher, France) for 30 minutes at 37°C. Cells were collected, filtered on a 70 µm-pore membrane, and centrifuged at 670 x g during 15 minutes on a Percoll density gradient (GE Healthcare, Chicago, USA). Erythrocytes were lysed in Red Blood Cell Lysis Buffer (Biolegend, London, UK).

Gene expression analysis

mRNA levels were assessed by RT-qPCR as described in the online supplement. Primers used are reported in Table S1.

Quantification of chemokine and cytokine levels

Lung protein extracts were prepared and quantified by ELISA as described in the online supplement.

Flow cytometry analysis

Cell stimulation, surface and intracellular cytokine staining were performed as described in the online supplement, and antibodies used are presented in Table S2. The percentage of cytokine positive cells is shown after subtraction of the corresponding control isotype. The gating strategy is presented in Figure S2.

Ahr reporter assays

Dog allergen activity on human and murine Ahr reporter cell lines was assessed as described in the online supplement.

Statistical analysis

Normally distributed data (Shapiro-Wilk normality test) were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc multiple comparison test (Bonferroni test). Non-normally distributed data were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. For AHR a two-way ANOVA test was used. The Graphpad prism v8 software was used. p values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Dog allergen extract induces neutrophilic airway inflammation, AHR, and bronchial remodeling without adjuvant effect of NOD2 agonist

To investigate the effect of different drivers of Th17 type inflammation on the severity of AAI, a mouse model of dog allergen-induced AAI was developed (Figure S1A). Dog allergen-challenged mice exhibited all the cardinal features of AAI, including increase in total cell numbers in BAL, mainly in relation with a high number of neutrophils but also with eosinophil and lymphocyte elevations (Figure 1A), raised total and dog allergen-specific serum IgE (Figure 1B), and elevated AHR (Figure 1C). Histological analysis of lung sections from dog allergen-challenged mice showed an increase in Hematoxylin & Eosin (H&E) stained cell infiltrates and in Periodic Acid-Schiff (PAS) stained mucus compared with PBS mice (Figures 1D, 1E). Peri-bronchial collagen depots were also upregulated in lung sections from dog allergen-challenged mice, as assessed by Masson's trichrome staining and Picrosirius red staining (Figures 1F, 1G). This was also imaged by two-photon microscopy evidencing triple helical collagen molecules around bronchi in dog allergen-challenged mice (Figure S3). Finally, thicker bronchial smooth muscle cells (SMC) were observed in dog allergen-challenged mice by anti α -smooth muscle actin (SMA) staining (Figure 1H). The NOD2 agonist MDP was administered during the sensitization phase either alone or together with dog allergen. However, no significant modification in either of the above parameters was observed when mice were co-exposed to dog and MDP compared with dog alone (Figures 1A to H). Experiments comparing different doses of MDP led to the same absence of difference (data not shown). These results indicate that this dog allergen-induced airway inflammation model exhibits a predominant neutrophilic airway inflammation associated with a strong bronchial remodeling not exacerbated by NOD2 co-stimulation during the sensitization phase.

Dog allergen-induced AAI is associated with a Th2- and Th17- type cytokine profile

Next, the cytokine profile of lung extracts was assessed in the different groups of mice. Although BAL eosinophil counts were low in this model, Th2-type cytokines and chemokine IL-13, IL-33 and CCL17 were upregulated in the lungs of dog allergen-challenged mice (Figure 2A). For Th17-type cytokines, lung IL-17 was elevated as was IL-22 in BAL fluids (Figure 2A) from dog allergen-challenged mice. TGF β was not modified (data not shown). Cells known to produce IL-17 (lymphoid cells, neutrophils and mast cells)^{25, 26} and IL-22 (lymphoid cells, macrophages, neutrophils and mast cells)²⁷ were analyzed by flow cytometry. In dog allergen-stimulated groups, CD4⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells and lymphoid tissue inducer cells (LTi), a subset of ILC3, appeared to be the major cell subsets expressing both IL-17 and IL-22, while IL-22 was also expressed in NK cells (Figure 2B). Other analyzed cells did not exhibit significant cytokine production after allergen challenge or their expression represented only a tiny amount of the total number of cells (like neutrophils) (Figures S4A and S4B). The Th2- and Th17- type profiles were not modified by NOD2 agonist co-stimulation, however IFN- γ production was down-regulated (Figure 2A). Altogether, this model is characterized by an inflammatory pattern of predominant Th17 infiltration provided by lymphoid cells, associated with a lesser Th2-type inflammation.

Dog allergen-induced AAI elicits iBALT formation

When analyzing histological sections, we were surprised to see ectopic follicles in lung sections from dog allergen- but not PBS- challenged mice (Fig 3A). iBALT are tertiary lymphoid organs composed of B, T cells, germinal centers with follicular dendritic cells (FDC), and high endothelial venules allowing lymphocyte entry from the blood. CD21⁺FDC, B220⁺B cells, and CD3⁺T cells, were assessed by immunohistochemistry and found in the peri-bronchial ectopic follicles in dog allergen-challenged mice (Figures 3B, 3C, 3D). We next tested whether iBALT could support BAL local immunoglobulin production. BAL total IgE evaluated by ELISA were

below the detection threshold of the assay (data not shown), whereas total IgA were strongly increased in BAL from dog allergen-challenged groups (Figure 3E). BAL dog allergen-specific IgG1 were not detected in the control groups, but were increased in dog allergen-stimulated groups (Figure 3E). Once again, MDP co-stimulation did not modify the size, composition or functionality of iBALT (Figures 3A to 3E). These data show that this dog allergen-induced model of AAI favors the development of functional iBALT.

Ahr antagonist alleviates airway hyperresponsiveness, BAL neutrophil infiltration, smooth muscle hyperplasia and lung IL-22 production

We next assessed the role of Ahr in this model. As a number of ligands have been described for Ahr, we wondered if dog allergen may contain such a ligand. We used two reporter cell lines that allow the study of the activation of the human and murine Ahr. In both cell lines, dog allergen but neither house dust mite or LPS induced a dose dependent luciferase reporter activity (Figure S5). The effect of Ahr blockade was next evaluated using an antagonist rather than full deficient mice, in order to avoid compensatory mechanisms, and to test it as a curative treatment. MDP groups were discarded due to their lack of effect. The Ahr antagonist CH-223191 was administered through the diet, as previously described,^{28, 29} during the challenge phase. In allergic mice it reduced BAL total cell recruitment compared with non-treated mice, in relation with a decrease in the numbers of neutrophils but not eosinophils (Figure 4A). While the humoral response was not modified (Figure 4B), AHR was significantly lessened in treated versus non-treated allergic mice (Figure 4C). Histological analysis of lung sections from treated allergic mice evidenced a decreased in mucus production but not in the inflammation score, collagen deposition by trichrome staining or Picrosirius red staining (Figure 4D). However, thickness of SMC assessed by anti α -SMA staining was attenuated compared with allergic non-treated mice (Figure 4E). In terms of cytokine profile, dog allergen-induced IL-22 production was down regulated after Ahr antagonist treatment. No modification was observed

in the levels of IL-17, IL-33, CCL17 and CXCL1, a chemokine involved in neutrophil recruitment (Figure 4F).

Ahr antagonist increases dog allergen-induced iBALT formation.

Interestingly, the number and size of iBALT was increased in Ahr antagonist treated allergic mice (Figure 5A), as was the number of FDC and B cells (Figures 5BC), whereas the number of CD3⁺ (Figure 5D) was not modified. The number of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) was slightly increased but this was not statistically significant (Figure 5E). The BAL level of dog allergen-specific IgG1, but not total IgA antibodies, was increased in Ahr antagonist treated allergic mice (Figure 5F). Collectively, these results show that dog allergen induces AHR, mucus production, smooth muscle hyperplasia, BAL neutrophil infiltration and IL-22 production in chronic airway inflammation in part through Ahr activation, that is also able to regulate the number of FDC and B cells in iBALT.

DISCUSSION

Dog allergy has been associated with more severe asthma in humans,^{30, 31} and dog allergen elicited in our model of AAI Th17-type features also known to correlate with the severity of asthma. These pro Th17 effects may relate to its composition. Several allergenic lipocalins have been identified (Can f 1, Can f 2, Can f 4 and Can f 6).³² Among them, Can f 1 binds the innate Mannose and DC-SIGN receptors,^{33, 34} the first one leading to Th2 polarization and the second one to an inhibition of this profile, both receptors also promoting Th17 responses to fungal infections.³⁵ This suggests that Can f 1 may act as a co-stimulator and participate in the observed Th17 response in our model. Another component that may be involved in neutrophil infiltration is LPS. Although LPS was detected in our extracts (2.5 ng/in, i.e 50ng cumulative dose) this low level was below the minimal 100 ng one shot dose necessary to induce neutrophil recruitment in BAL³⁶. Finally, the capacity of dog allergen to directly activate Ahr, also participates in the parameters of AAI such as AHR, BAL neutrophil infiltration and IL-22 production, as suggested by Ahr antagonist experiments. Albeit NOD2 activation promotes Th17-type responses *in vivo* in response to intestinal bacterial pathogens,³⁷ MDP co-administration did not aggravate lung Th17-type responses in the dog model. This may relate to its i.n. administration, which targets primarily lung epithelial cells that express low levels of the MDP-transporter PEPT1, in contrast to intestinal epithelial cells.³⁸ Another explanation might be that as for Ahr, a NOD2 ligand may be already present in the dog extracts. In our model, IL-17 and IL-22 were expressed mainly by CD4⁺ T cells, LTi and $\gamma\delta$ T cells, and IL-22 by NK cells. These data are in agreement with other studies showing that in lung infection models with iBALT formation, $\gamma\delta$ T cells and T cells are the main producers of IL-17.^{39, 40} IL-22-producing NK cells have been previously described in infectious models of lung pathology,⁴¹ but not yet in AAI models. They may participate in neutrophil recruitment as previously described.⁴² Among ILC3, only the LTi population expressed significant amounts of IL-17 and IL-22, and to our knowledge, this is the first description of lung LTi in experimental models of asthma.

iBALTs have been associated with both maintenance of detrimental immune responses as well as with beneficial responses in lung diseases.^{43, 44} Pathogen-derived LPS is able to favor the induction of such iBALT, however, much higher doses (1 to 10 μ g)⁴⁰ than those present in our extracts (50 ng cumulative dose) are necessary, ruling out a role for this contaminant in dog allergen-induced iBALT formation. Although the presence of BALT has been observed in bronchial biopsies from asthmatic patients,⁴⁵ their relationship with the severity of asthma remains unclear. Indeed, in a cohort of asthmatic children, the frequency of iBALT did not correlate with either their symptoms or their lung function⁴⁶. Some animal models of AAI exhibit iBALT, in Th2 chronic⁴⁷ and Th2 transgenic mouse models.^{48, 49} In these models, iBALT, through their production of IL-33 by endothelial cells, can provide a survival niche for pathogenic memory Th2 cells,⁵⁰ and are strongly reduced by anti- IL-4/IL-13 antibodies.⁴⁸ This feature of iBALT may explain the maintenance of Th2 type cytokines in our model despite the beneficial effects of Ahr antagonism. Indeed, in our model, neutrophils were predominant, with an associated Th17 response. The role of IL-17 has been addressed in the formation of iBALT in lung infection models. It was shown that IL-17 deficiency may^{39, 40} or not⁵¹ alter iBALT development depending on the infectious agent used. Finally, IL-22 has been described to favor formation of tertiary lymphoid organs in virus-infected salivary glands in mice.⁵² Whether IL-17 and/or IL-22 initiate iBALT formation in our AAI model will need further investigations.

In order to target the Th17 pathway, we then tested the curative effect of an Ahr antagonist in already sensitized mice. In treated mice IL-22 was decreased but not IL-17, a feature previously observed in T cells from Ahr deficient mice.⁵³ This result suggests that in this AAI model, Ahr is dispensable for IL-17 production that may require other pathways such as ROR γ t. In humans, increases in IL-22 have been associated with more severe asthma,⁵⁴ however its role remains controversial in animal models, depending on the allergen used, the route of sensitization and the chronicity of the model.⁵⁵ In our model, attenuated IL-22 production following Ahr antagonism may explain the decreased neutrophil infiltration, through IL-22 capacity to recruit this cell type.⁴² It may also explain abolished AHR, either indirectly

through impairment of neutrophils that induce this functional parameter⁵⁶ or directly through decreased hyperplasia of airway SMC.⁵⁷ Finally, the decreased mucus production may be attributed either to IL-22⁵⁸ or to direct inhibition of Ahr that has been involved in mucin production.⁵⁹ Treatment by the Ahr antagonist in the dog allergen model led to increased numbers and size of iBALT. LTi cells are involved in the formation of secondary lymphoid organs, and express Ahr that drives their post-natal maintenance,⁵³ and their production of IL-22.⁶⁰ However, infection-induced BALT formation has been shown to be unaffected in different models of LTi deficiency such as *Rorc*^{-/-} and *Id2*^{-/-} mice.^{40, 44} Whether Ahr-dependent LTi have a role in iBALT formation in AAI, awaits the availability of LTi specific genetic or cell depletion. The increased size of iBALT was related to increases in FDC and B cells, but not CD4⁺ T cells. This finding is consistent with the function of FDC, located in the B cell area of follicles, that are able to increase B cell proliferation⁶¹ and to increase B cell antigen binding and activation⁶². Ahr has been recently shown to regulate B cell fate decisions by favoring memory B cells but repressing terminally differentiated antibody-secreting plasma cells *in vivo*.⁶³ While Ahr antagonism led to increased BAL dog allergen-specific IgG1 production, serum antibody production was not modified indicating that Ahr imprints only the local humoral immune response. No BAL production of IgE was found in our model whereas BAL dog-specific IgG1 were strongly induced, and further up-regulated by Ahr antagonism. Induction of mouse IgG1 can be neutralizing in models of asthma,⁶⁴ as IgG1 antibodies bind the inhibitory FcγRIIB receptor able to suppress AAI.⁶⁵ These data suggest that the increased dog-specific IgG1 production might be beneficial in our model. Ahr has also been involved in Treg development,^{16, 18} cells that are able to reduce iBALT formation in infectious models⁴³ and in tolerant pulmonary allografts.⁶⁶ In the dog allergen-induced AAI model, Ahr antagonism did not diminish the numbers of iBALT resident Foxp3⁺ T cells, suggesting that these cells were not involved in the observed phenotype. Altogether these data suggest that antagonizing Ahr in this Th17^{high}-type model, leads to decreased AHR, BAL neutrophil infiltration, mucus production, hyperplasia of airway SMC and to increased iBALT effector B cells. These results indicate that the Ahr pathway may provide a therapeutic approach for neutrophilic asthma, not targeted by currently

available biotherapies. This study also provides a novel preclinical model of asthma to assess new therapeutic strategies for the Th17-type endotype.

REFERENCES

1. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43:343-73.
2. Ray A, Raundhal M, Oriss TB, et al. Current concepts of severe asthma. *J Clin Invest*. 2016;126:2394-403.
3. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2009;360:973-84.
4. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med*. 2013;368:2455-66.
5. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*. 2008;181:4089-97.
6. Leyva-Castillo JM, Yoon J, Geha RS. IL-22 promotes allergic airway inflammation in epicutaneously sensitized mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143:619-30 e7.
7. Kudo M, Melton AC, Chen C, et al. IL-17A produced by alphabeta T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med*. 2012;18:547-54.
8. Zhao J, Lloyd CM, Noble A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. *Mucosal Immunol*. 2013;6:335-46.
9. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007;27:660-9.
10. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2004;279:36426-32.
11. Sabbah A, Chang TH, Harnack R, et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol*. 2009;10:1073-80.

12. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med*. 2007;357:1487-95.
13. Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJ, et al. Immunity to RSV in Early-Life. *Front Immunol*. 2014;5:466.
14. Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, et al. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:866-72.
15. Gutierrez-Vazquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*. 2018;48:19-33.
16. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453:65-71.
17. Veldhoen M, Hirota K, Westendorp AM, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 2008;453:106-9.
18. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol*. 2010;11:854-61.
19. Thatcher TH, Williams MA, Pollock SJ, et al. Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function. *Immunology*. 2016;147:41-54.
20. Xu T, Zhou Y, Qiu L, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Protects Lungs from Cockroach Allergen-Induced Inflammation by Modulating Mesenchymal Stem Cells. *J Immunol*. 2015;195:5539-50.
21. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:1194-204 e2.
22. Xia M, Viera-Hutchins L, Garcia-Lloret M, et al. Vehicular exhaust particles promote allergic airway inflammation through an aryl hydrocarbon receptor-notch signaling cascade. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:441-53.

23. Ait Yahia S, Azzaoui I, Everaere L, et al. CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:899-908.
24. Everaere L, Ait-Yahia S, Molendi-Coste O, et al. Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:1309-18 e11.
25. Dyring-Andersen B, Honore TV, Madelung A, et al. Interleukin (IL)-17A and IL-22-producing neutrophils in psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2017;177:e321-e22.
26. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol*. 2011;187:490-500.
27. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:747-85.
28. Dean A, Gregorc T, Docherty CK, et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Sugen 5416-induced Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58:320-30.
29. Moyer BJ, Rojas IY, Kerley-Hamilton JS, et al. Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGFbeta, and IDO1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;300:13-24.
30. Perzanowski MS, Ronmark E, James HR, et al. Relevance of specific IgE antibody titer to the prevalence, severity, and persistence of asthma among 19-year-olds in northern Sweden. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:1582-90.
31. Pretolani M, Soussan D, Poirier I, et al. Clinical and biological characteristics of the French COBRA cohort of adult subjects with asthma. *Eur Respir J*. 2017;50.
32. Hilger C, Kuehn A, Hentges F. Animal lipocalin allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12:438-47.
33. Emara M, Royer PJ, Mahdavi J, et al. Retagging identifies dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3)-grabbing non-integrin (DC-SIGN) protein as a novel receptor for a major allergen from house dust mite. *J Biol Chem*. 2012;287:5756-63.

34. Royer PJ, Emara M, Yang C, et al. The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J Immunol.* 2010;185:1522-31.
35. Goyal S, Castrillon-Betancur JC, Klaile E, et al. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. *Front Immunol.* 2018;9:1261.
36. Radermecker C, Sabatel C, Vanwinge C, et al. Locally instructed CXCR4(hi) neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nat Immunol.* 2019;20:1444-55.
37. Geddes K, Rubino SJ, Magalhaes JG, et al. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat Med.* 2011;17:837-44.
38. Lu H, Klaassen C. Tissue distribution and thyroid hormone regulation of Pept1 and Pept2 mRNA in rodents. *Peptides.* 2006;27:850-7.
39. Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, et al. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J Exp Med.* 2014;211:643-51.
40. Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, et al. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol.* 2011;12:639-46.
41. Kumar P, Thakar MS, Ouyang W, et al. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol.* 2013;6:69-82.
42. Stacey MA, Marsden M, Pham NT, et al. Neutrophils recruited by IL-22 in peripheral tissues function as TRAIL-dependent antiviral effectors against MCMV. *Cell Host Microbe.* 2014;15:471-83.
43. Foo SY, Zhang V, Lalwani A, et al. Regulatory T cells prevent inducible BALT formation by dampening neutrophilic inflammation. *J Immunol.* 2015;194:4567-76.
44. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med.* 2004;10:927-34.

45. Tschernig T, Pabst R, Prenzler F, et al. Isolated aggregates of lymphoid cells in the inner bronchial wall in asthma patients. *Cell Tissue Res.* 2018;374:423-25.
46. Heier I, Malmstrom K, Pelkonen AS, et al. Bronchial response pattern of antigen presenting cells and regulatory T cells in children less than 2 years of age. *Thorax.* 2008;63:703-9.
47. Vroman H, Bergen IM, Li BW, et al. Development of eosinophilic inflammation is independent of B-T cell interaction in a chronic house dust mite-driven asthma model. *Clin Exp Allergy.* 2017;47:551-64.
48. Chua YL, Liong KH, Huang CH, et al. Blomia tropicalis-Specific TCR Transgenic Th2 Cells Induce Inducible BALT and Severe Asthma in Mice by an IL-4/IL-13-Dependent Mechanism. *J Immunol.* 2016;197:3771-81.
49. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med.* 1997;185:2143-56.
50. Shinoda K, Hirahara K, Iinuma T, et al. Thy1+IL-7+ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E2842-51.
51. Fleige H, Haas JD, Stahl FR, et al. Induction of BALT in the absence of IL-17. *Nat Immunol.* 2011;13:1; author reply 2.
52. Barone F, Nayar S, Campos J, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:11024-9.
53. Qiu J, Heller JJ, Guo X, et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;36:92-104.
54. Farfariello V, Amantini C, Nabissi M, et al. IL-22 mRNA in peripheral blood mononuclear cells from allergic rhinitic and asthmatic pediatric patients. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011;22:419-23.
55. Ito T, Hirose K, Nakajima H. Bidirectional roles of IL-22 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Allergol Int.* 2019;68:4-8.

56. Ekstedt S, Safholm J, Georen SK, et al. Dividing neutrophils in subsets reveals a significant role for activated neutrophils in the development of airway hyperreactivity. *Clin Exp Allergy*. 2019;49:285-91.
57. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J*. 2012;26:5152-60.
58. Besnard AG, Sabat R, Dumoutier L, et al. Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:1153-63.
59. Wong PS, Vogel CF, Kokosinski K, et al. Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42:210-7.
60. Lee JS, Cella M, McDonald KG, et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat Immunol*. 2011;13:144-51.
61. Burton GF, Conrad DH, Szakal AK, et al. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol*. 1993;150:31-8.
62. Heesters BA, Chatterjee P, Kim YA, et al. Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity*. 2013;38:1164-75.
63. Vaidyanathan B, Chaudhry A, Yewdell WT, et al. The aryl hydrocarbon receptor controls cell-fate decisions in B cells. *J Exp Med*. 2017;214:197-208.
64. Hesse L, Brouwer U, Petersen AH, et al. Subcutaneous immunotherapy suppresses Th2 inflammation and induces neutralizing antibodies, but sublingual immunotherapy suppresses airway hyperresponsiveness in grass pollen mouse models for allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2018;48:1035-49.
65. Dharajiya N, Vaidya SV, Murai H, et al. FcγRIIb inhibits allergic lung inflammation in a murine model of allergic asthma. *PLoS One*. 2010;5:e9337.

66. Li W, Gauthier JM, Higashikubo R, et al. Bronchus-associated lymphoid tissue-resident Foxp3⁺ T lymphocytes prevent antibody-mediated lung rejection. *J Clin Invest*. 2019;129:556-68.

FIGURES AND LEGENDS

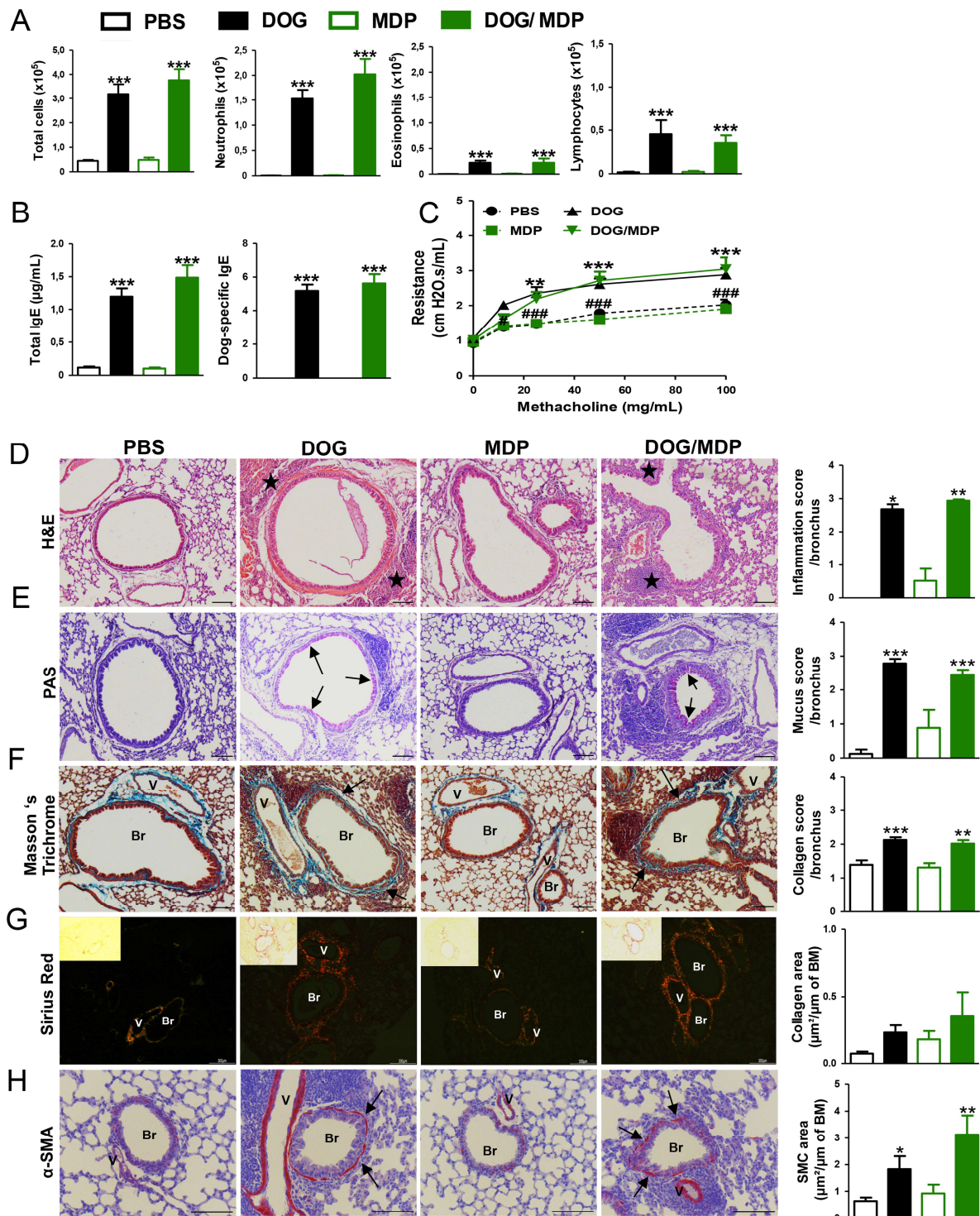


Figure 1. Dog allergen extract induces neutrophilic airway inflammation, AHR, and bronchial remodeling without adjuvant effect of NOD2 agonist

A, BAL cytology (absolute number of cells). **B**, Total IgE and specific IgE (as titers) in sera. **C**, Airway hyperresponsiveness. Representative photographs and quantification of stained lung sections for **D**, inflammation using H&E (black stars) **E**, mucus using PAS (pink color) **F**, collagen using Masson's trichrome (blue/green staining) **G**, collagen using Sirius red (insets correspond to sections under non polarized light) **H**, SMC using α -SMA antibody (positive cells are stained in red). Scale bars: 100 μ m. Black arrows show staining of interest (mucus, collagen and SMC). V: vessel, Br: bronchus, BM: basement membrane. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=14-32 mice per group, and n=4-7 mice per group for histology). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus PBS. Kruskal Wallis test for all except for Figs 1E and 1F (one-way ANOVA), and two-way ANOVA for Fig 1C.

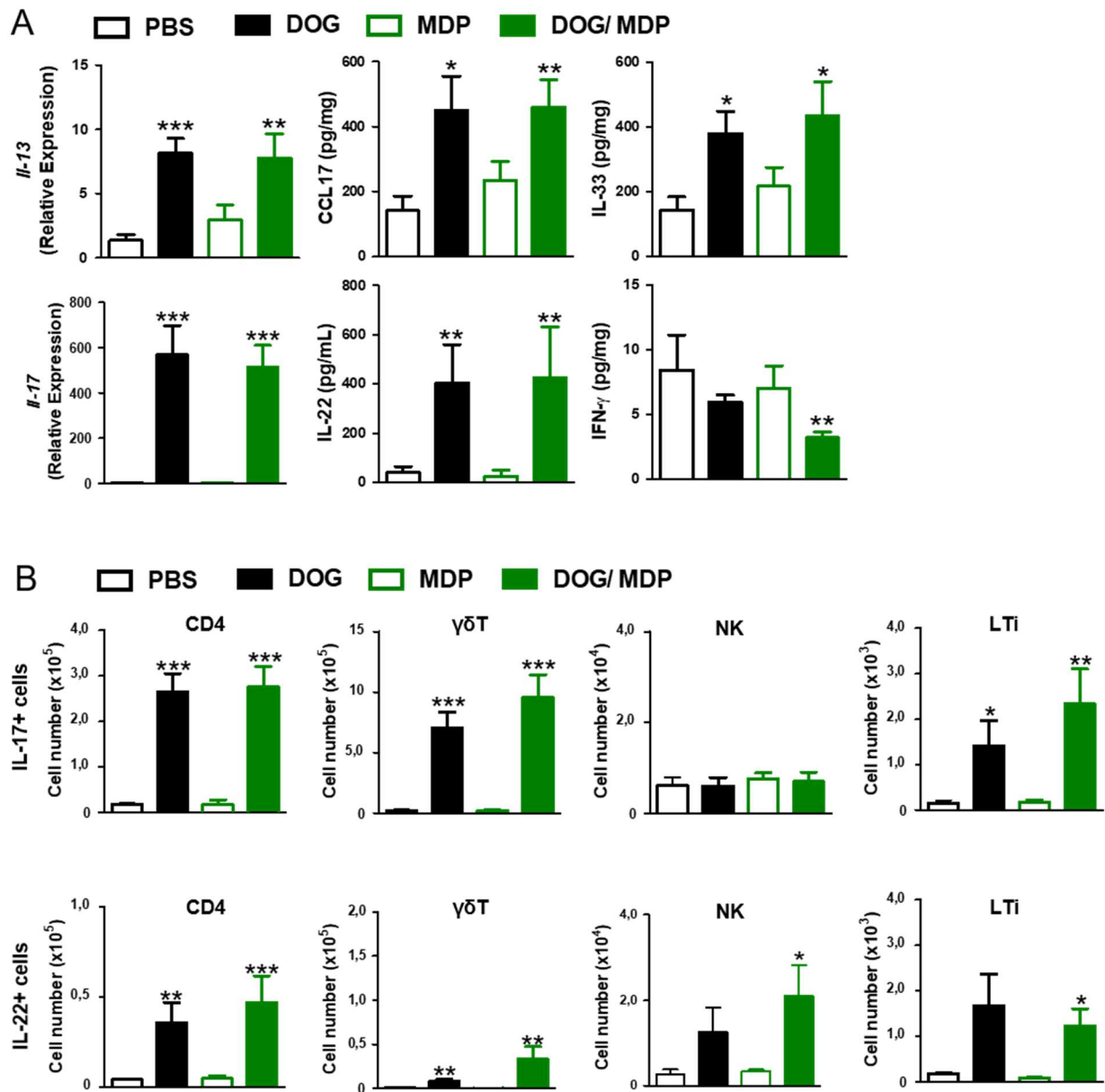


Figure 2. Dog allergen-induced AAI is associated with a Th2- and Th17- type cytokine profile not exacerbated by NOD2 agonist co-stimulation

A, Levels of cytokines in lung extracts and BAL. **B**, Numbers of IL-17⁺ and IL-22⁺ cells in the lungs. Data are presented as mean numbers of cells $\pm$ SEM (n=8-20 mice per group, n=6-15 mice per group for flow cytometry analysis). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus PBS. Kruskal Wallis test for all.

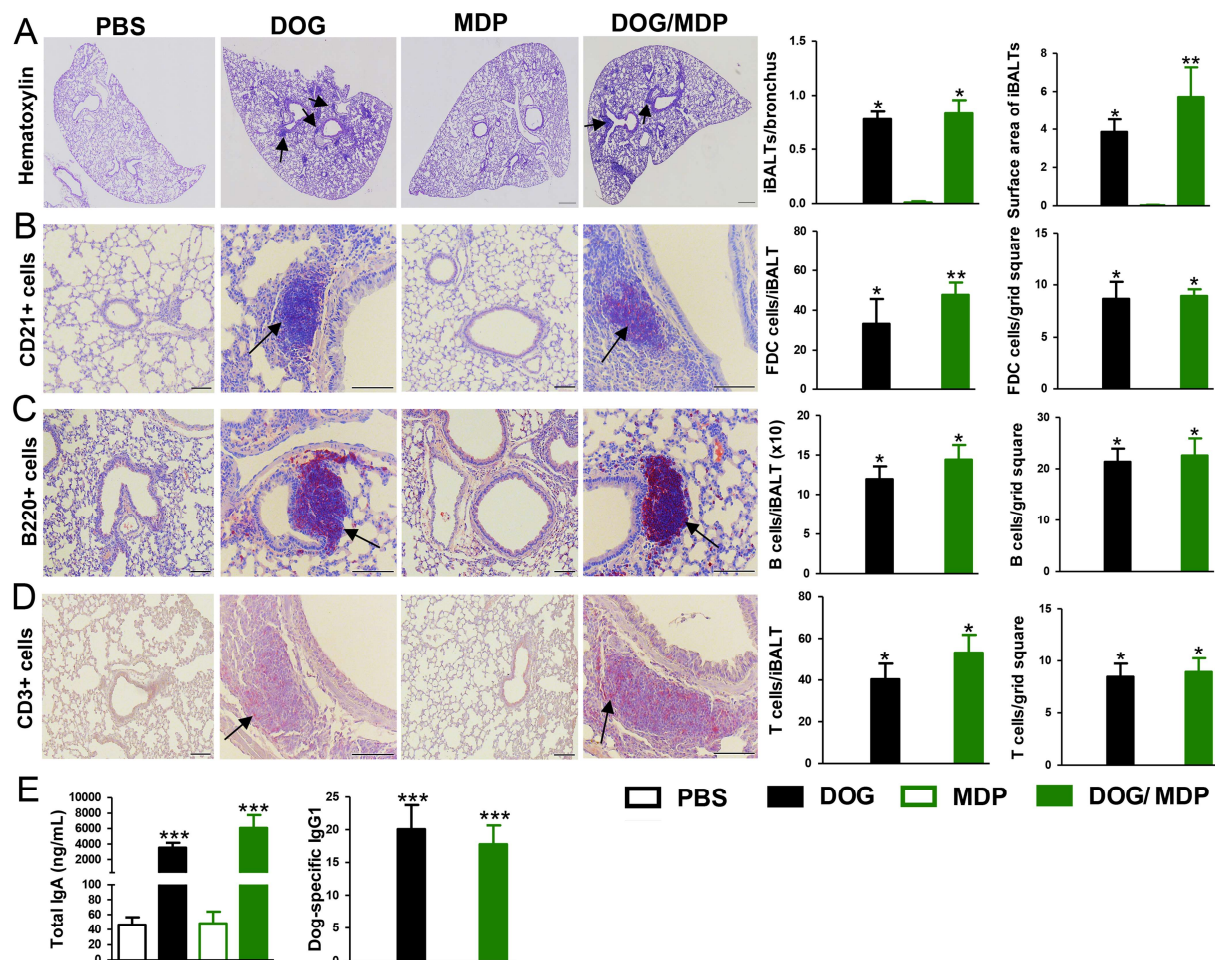


Figure 3. Dog allergen-induced AAI elicits iBALT formation not modified by NOD2 agonist co-stimulation

Representative photographs and quantification of iBALT **A**, Numbers and surface area (number of grid squares) of iBALT. Scale bars: 500 μ m. Numbers per iBALT and per iBALT grid square of **B**, FDC, **C**, B cells, **D**, T cells. Scale bars : 100 μ m. Positive cells are stained in red. Black arrows show staining of interest **E**, BAL total IgA and dog allergen-specific IgG1. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=4-7 mice per group for histology, n=13-22 mice per group for BAL *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus PBS. Kruskal Wallis test for all.

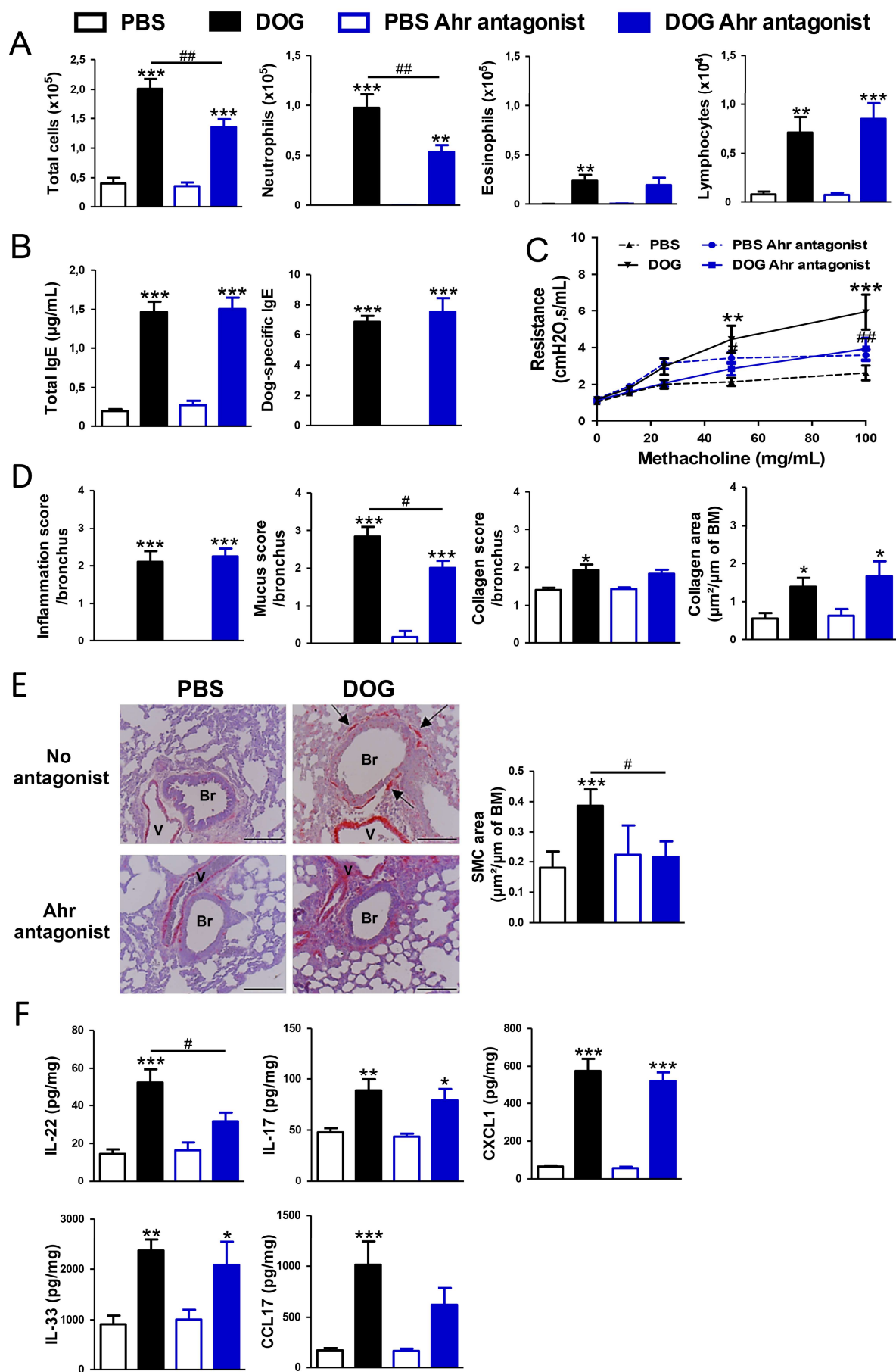


Figure 4. Ahr antagonist alleviates airway hyperresponsiveness, BAL neutrophil infiltration and lung IL-22 production

A, BAL cytology (absolute number of cells). **B**, Total IgE and specific IgE (as titers) in sera. **C**, Airway hyperresponsiveness. **D**, Quantification of lung sections for inflammation score using H&E, mucus score using PAS, collagen score using Masson's trichrome, collagen area using Sirius red (insets correspond to sections under non polarized light) **E**, Representative photographs and quantification of stained lung sections for SMC using α -SMA antibody (positive cells are stained in red, black arrows). Scale bars: 100 μ m.. V: vessel, Br: bronchus, BM: basement membrane **F**, Lung cytokine production. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=6-14 mice per group; n=4-6 mice per group for histology) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus control, #p<0.05, ##p<0.01. One-way ANOVA for all, except for Figs 1B and 1E (Kruskal Wallis), and two-way ANOVA for Fig 4C.

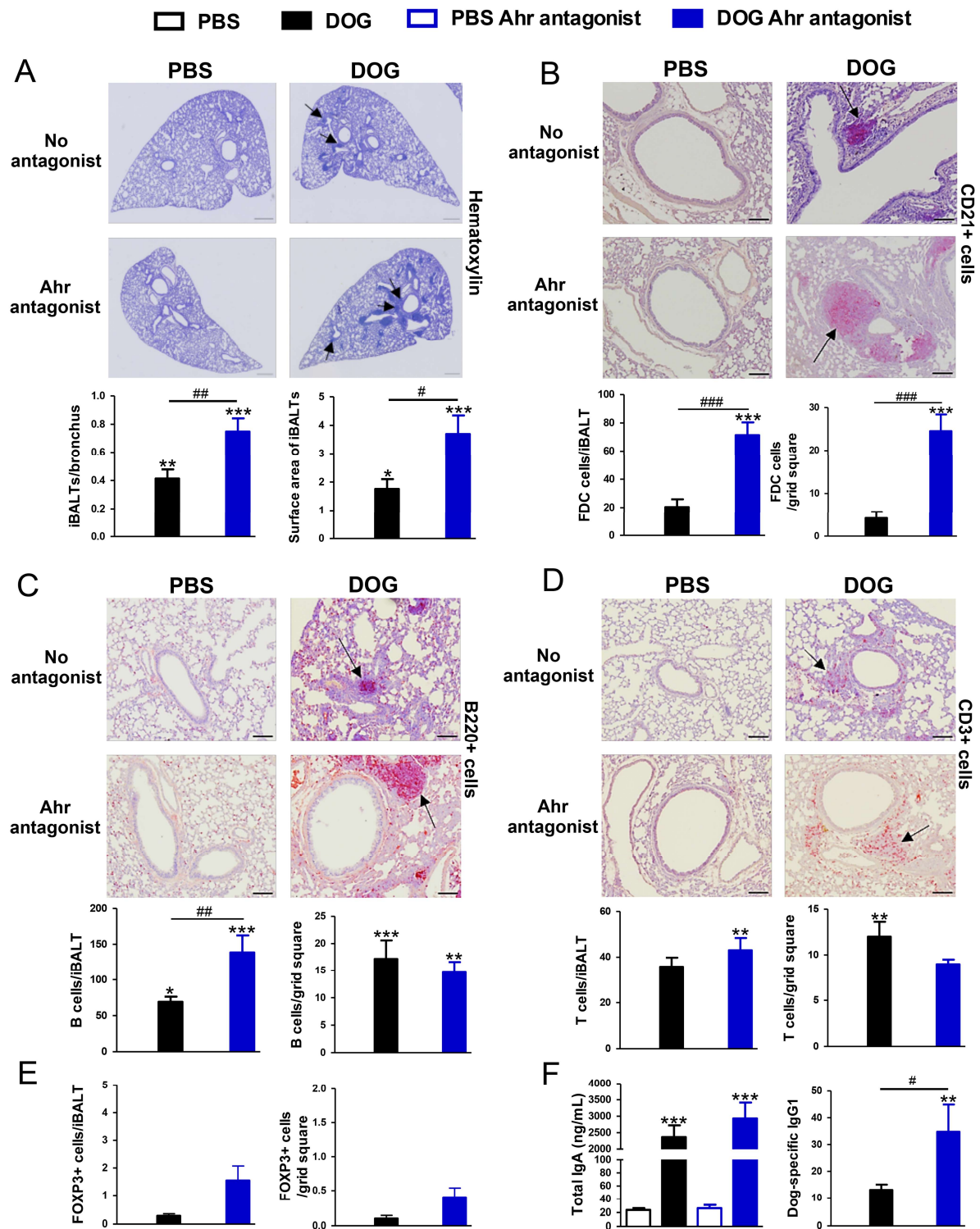


Figure 5. Ahr antagonist exacerbates dog allergen-induced iBALT formation

Representative photographs and/or quantification of iBALT **A**, Numbers and surface area (number of grid squares) of iBALT (scale bars: 500 μ m). Numbers per iBALT and per iBALT grid square of **B**, FDC, **C**, B cells, **D**, T cells, **E**, Foxp3⁺ cells. Positive cells are stained in red,

scale bars: 100 μ m. Black arrows show staining of interest. **F**, BAL total IgA and dog allergen-specific IgG1. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=4-6 mice per group for histology, n=6-8 mice per group for BAL) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, versus control, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001. One-way ANOVA for all, except for Fig 5D (Kruskal Wallis).

Supporting information

Bouté et al.: Aryl hydrocarbon receptor regulates airway remodeling and bronchus-associated lymphoid tissue in neutrophilic airway inflammation

Methods

Allergen sensitization and challenges

Dog allergen was chosen for the model of chronic asthma based on clinical data showing that 47% of severe asthma patients are exposed to dog allergen¹ and that dog-specific IgE antibodies are associated with asthma severity² as well as *in vitro* data showing that dog allergen-stimulated human dendritic cells are able to induce IL-17 and IL-22 production by T cells (data not shown). The concentration of the major dog allergen Can f 1 was evaluated by ELISA (Indoors biotechnology, Cardiff, UK). For Ahr experiments, the antagonist CH-223191 (Tocris, Noyal Châtillon sur Seiche, France) was administered only during the challenge phase. The calculated amount of Ahr antagonist added to the diet that was to be consumed by the mice³ was based on the assumption that 5-6 weeks old mice on average consume ~3.0 g of chow/day (<http://www.researchdiets.com/>) and that the average body mass for females is 20 g. The calculated amount of consumed CH-223191 was ~10mg/kg/day, an amount shown to be efficient in blocking Ahr *in vivo*.^{4,5} The protocol of administration is shown in figure E1B.

Measurement of serum and BAL antibodies

For dog-specific IgE antibodies, 96-well plates (Corning Incorporated, NY, USA) were coated with 10 µg/mL Can f 1-containing dog allergen in PBS. After blocking with 0.05% tween 5% milk in PBS, and serum or BAL samples addition, an anti-mouse IgE antibody coupled to HRP (GENTAUR, Paris, France) was added in CGS2 Buffer (Can Get Signal for secondary Antibody, Cosmo Bio, Japan), followed by addition of TMB substrate solution (Sigma Aldrich,

France). For dog-specific IgG1 antibodies, 96-well plates were coated with 10 µg/mL Can f 1-containing dog allergen in PBS. After blocking with 3% BSA, and serum or BAL samples addition, an anti-mouse IgG₁ antibody coupled to HRP (Fischer Scientific, Illkirch, France) was added with 0.5% BSA in PBS followed by addition of TMB substrate solution (Sigma Aldrich). The dog-specific antibody titers of the samples were determined with a pooled standard that was generated in the laboratory. Titers were expressed as the inverse of the dilution corresponding to 50% of the maximal optical density. Total IgA in BAL were assessed using IgA mouse ELISA kit according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, USA).

Measurement of airway responsiveness

Briefly mice were anesthetized with 0.5 mg/kg medetomidine (Domitor®; Pfizer, NY) and 5 mg/kg ketamine (Imalgene® 1000; Merial, Lyon, France), and immediately intubated with an 18-gauge catheter, followed by mechanical ventilation. Mice were exposed to nebulized PBS followed by increasing concentrations of nebulized methacholine (0-100 mg/mL) (Sigma-Aldrich) using an ultrasonic nebulizer (Aeroneb, Aerogen, Ireland). Return to baseline resistance was ensured prior to the administration of the next doses of methacholine. Only resistance values corresponding to coefficient of determination values > 0.95 were kept. The maximal values of measured resistances were calculated for each dose.

Lung histology and immunohistochemistry

The left unwashed lung from each mouse was fixed in Antigenfix (Microm Microtech, Brignais, France) and embedded in paraffin (Histowax, Microm Microtech) according to the manufacturer's indications. Lung sections of 5 µm were stained with a standard Hematoxylin & Eosin stain (Microm Microtech,) to evaluate peribronchial inflammation. Bronchial cell

infiltration was quantified using the following score:⁶ 0, no mononuclear cell infiltration; 1, few mononuclear cells; 2, from 1 to 5 layers of inflammatory cells around bronchi; 3, Thickness of inflammatory cells > 5 cells and surrounding the entire bronchus.

For airway remodeling, mucus production, collagen deposition and smooth muscle cell immunostaining were assessed. For mucus, Periodic Acid-Schiff staining kit (Clinisciences, Nanterre, France) was used for mucopolysaccharide staining. Mucus production in the airway epithelium was quantified based on a five-point system: 0, no mucus; 1, <25% of the epithelium; 2, 25–50% of the epithelium; 3, 50–75% of the epithelium; 4, >75% of the epithelium as previously described.⁷ For collagen deposition, sections were stained with Masson's trichrome (Clinisciences) and with Picrosirius Red Stain kit (PolyScience, Niles, USA). Quantification of peri-bronchial collagen deposition by Masson's trichrome was scored as:⁸ 1, marginal peri-bronchial trichrome stain; 2, slight increase in peri-bronchial trichrome stain; 3, increased peri-bronchial thickness in trichrome stain; 4, dramatically increased thickness of trichrome stain in all airways. Data were expressed as mean scores per bronchus. Picrosirius red staining was quantified under polarized light (Nikon, SMZ25) using image J software and expressed as surface area $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ of bronchus basement membrane. Collagen was also imaged by two-photon confocal microscopy (Leica Sp8). Thick lung sections (100 μm) were cut and imaged by second harmonic generation that captures triple helical collagen molecules. Smooth muscle cells were identified by immunohistochemistry using a primary rabbit anti mouse α -SMA antibody (clone E184, Abcam, Paris, France), the rabbit Vectastain ABC-Alkaline Phosphatase kit (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom), and developed using fast red (Sigma Aldrich). Quantification was performed in small bronchi using image J software and expressed as μm^2 surface area / μm of bronchus basal membrane.

For induced Bronchus Associated Lymphoid Tissue (iBALT) analysis, the number and surface area of iBALT follicles were counted. iBALT was defined as lymphoid aggregates, composed of B cell follicles interconnected with follicular dendritic cells and surrounded by T cells, situated adjacent to a bronchus and next to a vein and an artery.^{9, 10} Therefore, isolated

parenchymal or perivascular follicles were not counted. Data were expressed as number of iBALT per bronchus and surface area as number of squares (each 0.056 mm²) counted with an ocular grid per iBALT.

BALT B cells, T cells, Foxp3⁺ cells and follicular dendritic cells were identified by immunohistochemistry. Sections were incubated with a primary rabbit monoclonal antibody against murine CD21 follicular dendritic cells (Sigma Aldrich, clone EP3093), rat antibody against CD45R B cells (clone RA3-6B2, eBioscience), rabbit antibody against CD3-ε T cells (clone SP7, Abcam) and rat anti-mouse Foxp3 (clone FJK-16s, eBioscience) after a step of antigen retrieval. The corresponding Vectastain ABC-AP kit was then used and the color developed using Fast Red substrate kit (Sigma Aldrich). Numbers of positive cells were enumerated using an ocular grid and expressed as number of positive cells per iBALT and per iBALT surface area (number of grid squares).

For all data, measurements were performed in 3 to 9 different lung sections and averaged for each mouse. Quantification was performed blindly in whole lung sections.

Gene expression analysis

Lung tissue RNA samples were isolated using NucleoSpin RNA (Macherey Nagel, Hoerd, France). Extracted RNA was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was amplified using the IDT Prime Time Assay master mix. Real Time-PCR was performed with Prime Time Assay primers (IDT, Leuven, Belgium) (Table S1). They were detected on a QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Waltham, USA). Data were analysed via the Thermo Fisher cloud. *Rplp0* (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0) was used as internal reference gene to normalize the transcript levels. Relative mRNA level ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was determined by comparing the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and internal reference gene (ΔCt) and ΔCt values for treated and control groups ($\Delta\Delta Ct$).

Quantification of chemokine and cytokine levels

Lung protein extracts were prepared after mechanical dissociation of one lung lobe in 1 mL of lysis buffer (Tissue-Protein Extraction Reagents, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich) at +4°C. Supernatants were collected for further total protein (Pierce BCA proteins Assay kit, Life technologies) cytokine and chemokine measurements. The level of IL-33, IL-17, IL-22, IFN- γ cytokines, and CCL17, CXCL1 chemokines were assessed using commercial ELISA kits (detection limit 25, 15.6, 23, 31.2, 31.2 and 63 pg/mL respectively) according to instructions provided by the manufacturers (eBioscience, Peprotech (Neuilly-Sur-Seine, France) and R&D Systems (Abingdon, UK)). Data are expressed as pg per mg of total proteins, or per mL for BAL fluid measurements.

Flow cytometric analysis

Cell suspensions were stimulated for 2 hours at 37°C with 10 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Invivogen), 0.5 μ g/mL ionomycin (InvivoGen, Toulouse, France) and brefeldin (eBioscience). Cells were then blocked with Fc Block (anti-CD16/CD32 antibody, BD-Biosciences). For cell surface staining, specific antibodies or corresponding control isotypes were added for 20 minutes. NK, NKT, $\gamma\delta$ T cells were stained using CD3-AF700, NK1.1-BV786, CD1d-tetramer-PE, TCR β -BV605, $\gamma\delta$ TCR-PE-Cy7, and defined as CD3⁺NK1.1⁺, TCR β ⁺CD1d-tetramers⁺ and CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ respectively. Macrophages and neutrophils were stained with CD11c-PE-CF594, CD11b-PerCP-Cy5.5, F4/80-BV650, Ly6G-BV711, and defined as CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁺, and CD11c⁺CD11b⁺Ly6G⁺F4/80⁺ respectively. Mast cells were stained with CD3-AF700, CD117-BV650, CD1-PE-Cy5, Fc ϵ RI-PE-Cy7, and defined as CD3⁺CD19⁺CD117⁺Fc ϵ RI⁺. For T cells and Innate lymphoid cells (ILC) Lineage⁺ cells (Lin⁺) were gated out by the use of FITC- conjugated antibodies to CD11b, CD19, Fc ϵ RI, TER-119, Ly6G (GR-1), CD49b (DX5), CD11c, F4/80, TCR $\gamma\delta$, preceded by a CD45⁺ cell selection with a CD45 APC-Cy7. The lymphoid populations of interest were selected using NKp46 PerCP-eFluor710,

CD117 BV650, CD3 Alexa Fluor 700, CD127 BV786, CD4 BV605, and defined as CD4⁺: Lin⁻CD3⁺CD4⁺; ILC3NCR⁺: Lin⁻CD3⁻CD4⁻CD127⁺CD117⁺NKP46⁺; ILC3NCR⁻: Lin⁻CD3⁻CD4⁻CD127⁺CD117^{low}NKP46⁻; LTi: Lin⁻CD3⁻CD4⁺CD127⁺CD117⁺NKP46⁻. Cells were fixed and permeabilized using the BD Cytofix/Cytoperm kit and stained intra-cellularly with antibodies directed against IL-22-APC or -PE and IL-17-BV421 or the corresponding FMO or control isotypes. PBS-57-loaded CD1d tetramers were obtained from the NIAID (National Institutes of Health) Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). The monoclonal Ab against mouse IL-22 (clone 3F11) and its control isotype were a kind gift from Dr. W. Ouyang (Genentech, San Francisco, CA), and were labeled with the APC or PE conjugation kit from AbD Serotec (Colmar, France). Details about antibodies are provided in Table S2. Cell fluorescence was measured by flow cytometry (LSR FORTRESSA®, BD Biosciences) and analyzed using the Flow Jo v10.6.1. software.

Ahr reporter assay

The HepG2-Lucia™ Ahr cells (InvivoGen) express the endogenous Ahr and stably express the secreted Lucia luciferase reporter gene under the control of a promoter coupled with the human *Cyp1a1*. Cells were handled according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at 2x10⁴ cells per well and stimulated with formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) at 1 µg/mL or 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) at 0.01 µM as a positive control, with LPS as negative control, and with dog or House dust mite allergen (Stallergenes/Greer) for 48 hours. Supernatants were collected and QUANTI-Luc™ (InvivoGen) added just before luminometer measurement. A second reporter cell line, the H1L7.5c3 mouse hepatoma, kindly provided by Michael Denison¹¹ was also evaluated. Cells were seeded at 7.5x10⁴ cells per well for 24 hours and then stimulated with the above reagents for 12 hours. After washing with 100 µL of PBS, cells were lysed with passive lysis buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The luciferase (Luciferase assay substrate,

Promega) activity was read according to the supplier's recommendations. The results are expressed as relative luciferase units.

References

1. Pretolani M, Soussan D, Poirier I, Thabut G, Aubier M, Group CS, et al. Clinical and biological characteristics of the French COBRA cohort of adult subjects with asthma. *Eur Respir J*. 2017;50.
2. Perzanowski MS, Ronmark E, James HR, Hedman L, Schuyler AJ, Bjerg A, et al. Relevance of specific IgE antibody titer to the prevalence, severity, and persistence of asthma among 19-year-olds in northern Sweden. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:1582-90.
3. Moyer BJ, Rojas IY, Kerley-Hamilton JS, Hazlett HF, Nemani KV, Trask HW, et al. Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGFbeta, and IDO1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;300:13-24.
4. Dean A, Gregorc T, Docherty CK, Harvey KY, Nilsen M, Morrell NW, et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Sugan 5416-induced Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58:320-30.
5. Kim SH, Henry EC, Kim DK, Kim YH, Shin KJ, Han MS, et al. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*. 2006;69:1871-8.
6. Paulissen G, Rocks N, Gueders MM, Bedoret D, Crahay C, Quesada-Calvo F, et al. ADAM-8, a metalloproteinase, drives acute allergen-induced airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41:380-91.
7. Myou S, Leff AR, Myo S, Boetticher E, Tong J, Meliton AY, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT. *J Exp Med*. 2003;198:1573-82.

8. Le Saux O, Teeters K, Miyasato S, Choi J, Nakamatsu G, Richardson JA, et al. The role of caveolin-1 in pulmonary matrix remodeling and mechanical properties. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:L1007-17.
9. Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, Bolter J, Willenzon S, Sutter G, et al. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J Exp Med*. 2014;211:643-51.
10. Randall TD. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol*. 2010;107:187-241.
11. He G, Tsutsumi T, Zhao B, Baston DS, Zhao J, Heath-Pagliuso S, et al. Third-generation Ah receptor-responsive luciferase reporter plasmids: amplification of dioxin-responsive elements dramatically increases CALUX bioassay sensitivity and responsiveness. *Toxicol Sci*. 2011;123:511-22.

Tables

Table S1. Primer sequences used in qPCR studies.

mRNA	Oligonucleotide sequences
<i>Il-17a</i>	Mm.PT.58.6531092 (Prime Time Assay reference)
<i>Rplp0</i>	Mm.PT.58.43894205 (Prime Time Assay reference)
<i>Il-13</i>	Mm.PT.58.31366752 (Prime Time Assay reference)
<i>Tgf-β</i>	Mm.PT.58.11254750 (Prime Time Assay reference)

Table S2. Antibodies used for flow cytometry assays.

Antibody	Catalog number	Provider	Dilution (µg)
CD11b FITC	11-0112-85/82	eBioscience	0.25
TCRγδ FITC	11-5711-85	eBioscience	0.5
CD19 FITC	11-0193-85	eBioscience	0.2
FcεRI FITC	11-5898-85	eBioscience	0.1
TER-119 FITC	11-5921-85	eBioscience	0.375
Ly-6G (GR-1) FITC	11-5931-85	eBioscience	0.25
CD49b (DX5) FITC	553857	BD	0.5
CD11c FITC	553801	BD	0.25
F4/80 Antigen FITC	11-4801-85	eBioscience	0.5
FcεRI PE-Cy7	25-5898-80	eBioscience	0.1
CD19 PE-Cy5	15-0193-82/81	eBioscience	0.5
CD3 Alexa Fluor 700	561388	BD	0.3
CD4 Brilliant Violet 605	100547	Biolegend	0.25
CD127 Brilliant Violet 786	563748	BD	0.2
NKp46 PerCP-eFluor 710	46-3351-82	eBioscience	0.2
CD117 (c-Kit) Brilliant Violet 650	135125	Biolegend	0.3
CD45 APC Cy7	557659	BD	0.3
IL-17A Brilliant Violet 421	506925	Biolegend	0.25
IL-22 PE or APC	/	Genentech	0,116
TCR β Brilliant Violet 605	109241	Biolegend	0.3

CD1d-tetramers PE	/	NIH tetramer facility	0,65
CD11c PE-CF 594	117348	Biolegend	0.2
F4/80 Brilliant Violet 650	123149	Biolegend	1
TCR $\gamma\delta$ PE-Cy7	25-5711-82	Invitrogen	0.3
NK1.1 Brilliant Violet 786	108749	Biolegend	0.2
Ly-6G Brilliant Violet 711	127643	Biolegend	0.5
CD11b PercP-Cy5	101227	Biolegend	0.3
Live Dead V500	L34957	Life Technologies	
CD16/CD32	553142	BD Biosciences	0.5

Supplementary figures and legends

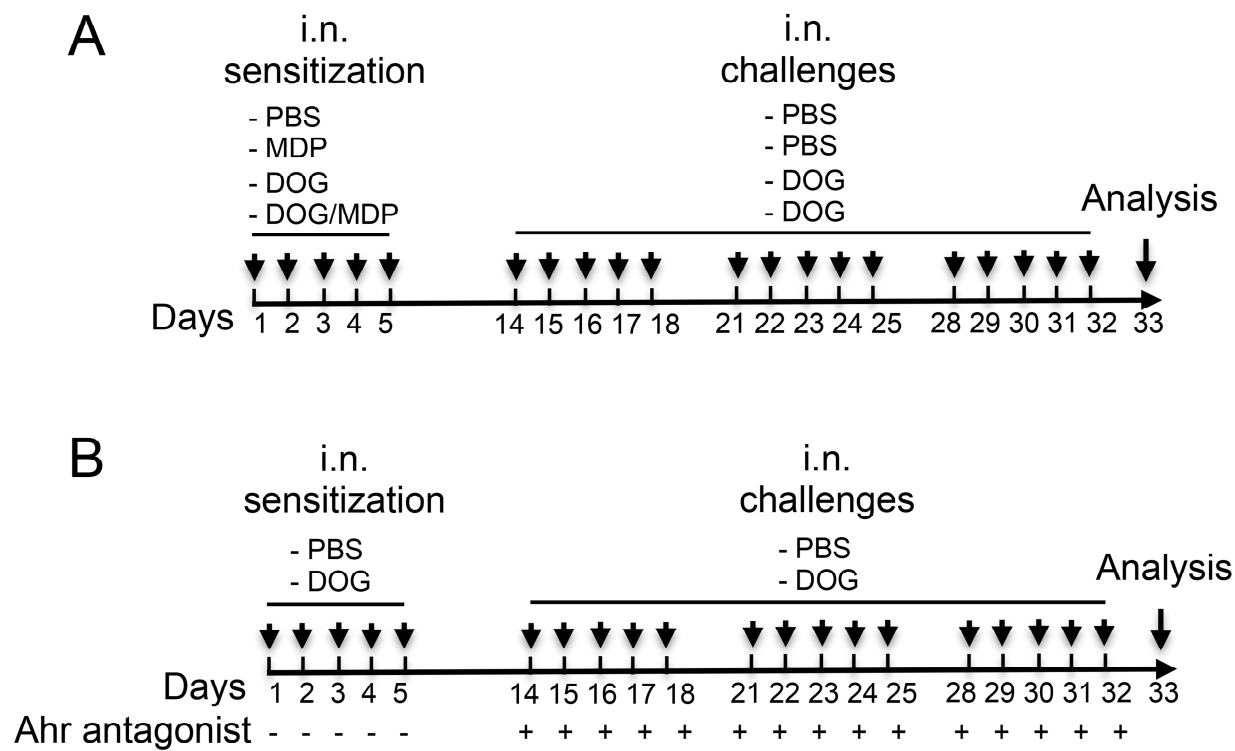


Figure S1. Experimental design. **A**, dog-induced AAI with or without NOD2 agonist co-sensitization **B**, Ahr antagonist protocol. i.n.: intranasal.

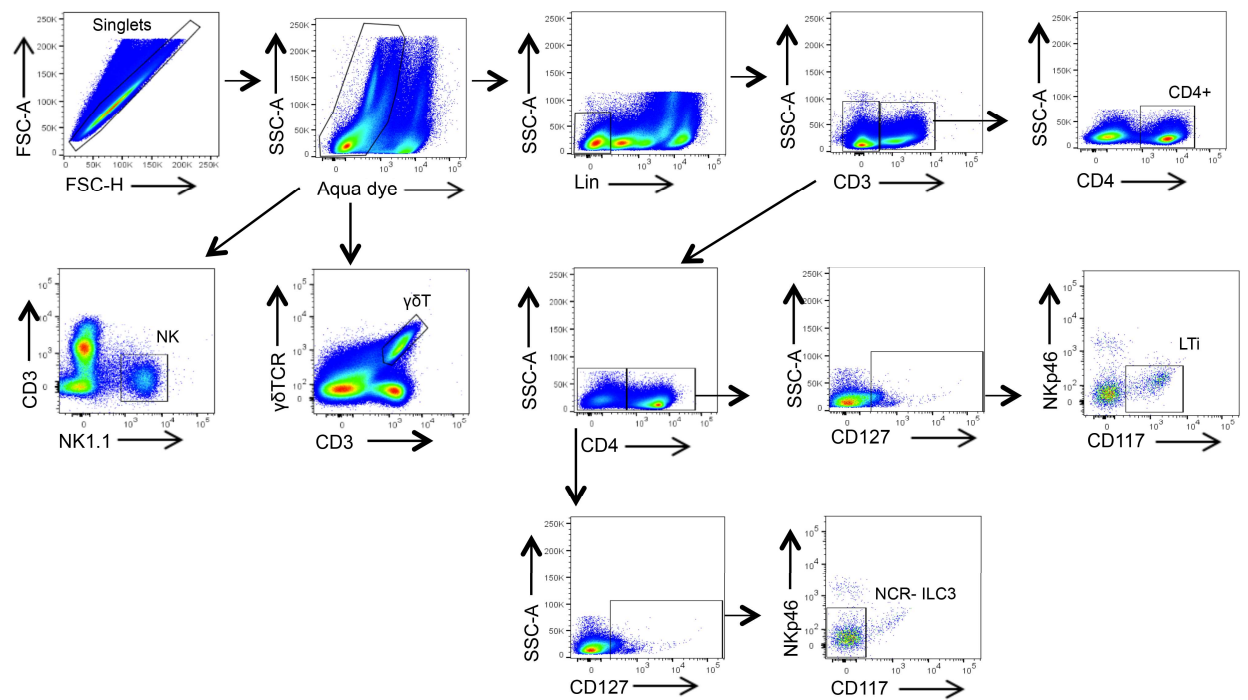


Figure S2. Gating strategy of cell subsets in the lung for NK, $\gamma\delta$ T, ILC and CD4⁺ cells. LTi: lymphoid tissue inducer cells; NCR: Natural cytotoxic receptor. Gating strategy included forward and side scatter gating, exclusion of multiplets, selection of living cells with live aqua dead, and selection of cell subsets according to the indicated cell surface markers.

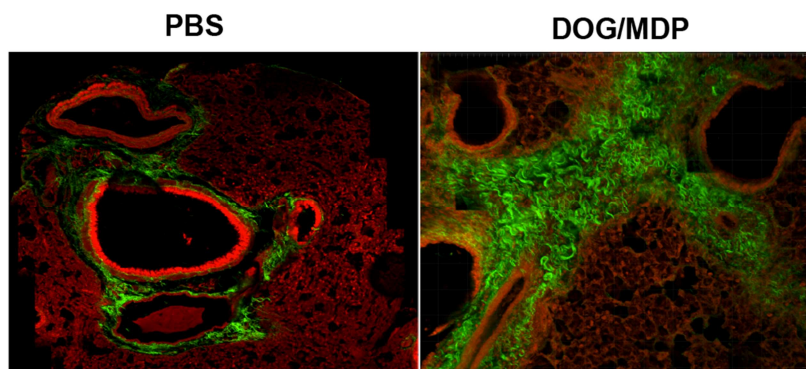


Figure S3. Analysis of bronchial remodeling. **A**, two photon microscopy of lung sections showing collagen in green.

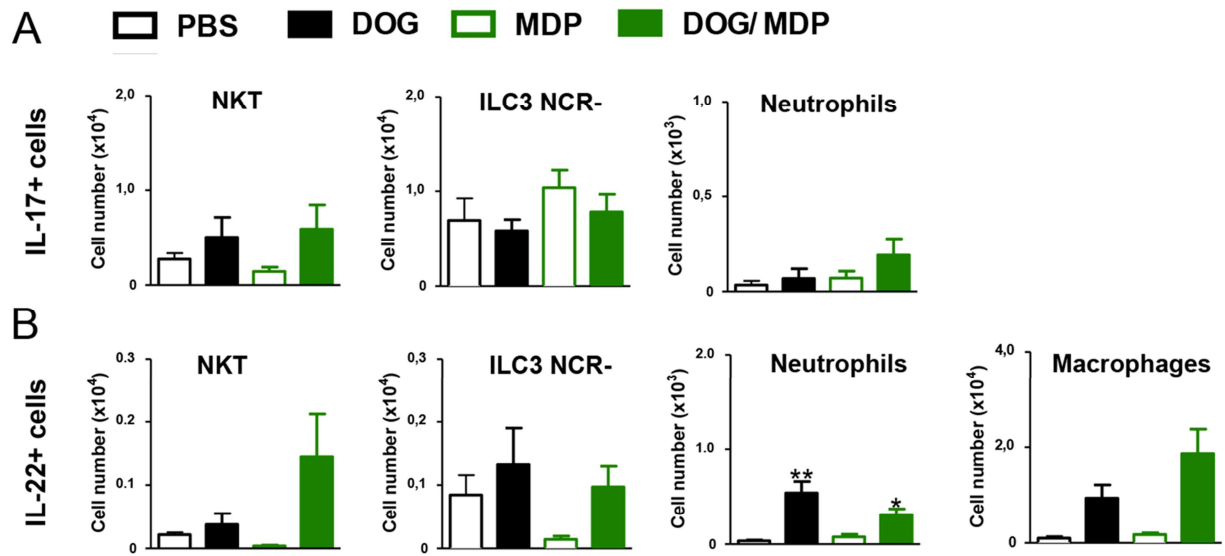


Figure S4. Flow cytometry analysis. Number of IL-17+ and IL-22+ lung cell subsets. Data are from n=6-15 mice per group and are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus PBS. Kruskal Wallis test for all.

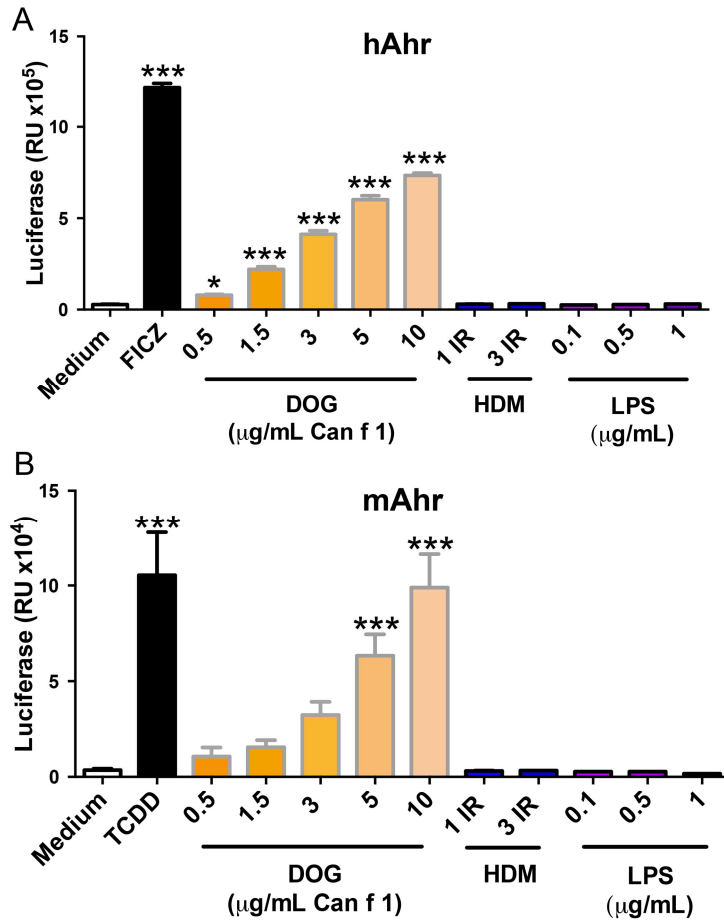


Figure S5. Ahr reporter activity of dog allergen. **A**, Human Ahr reporter cell line **B**, murine Ahr reporter cell line. Mean relative luciferase luminescent unit in response to positive controls (FICZ and TCDD), negative control (medium and LPS) and to dog and HDM allergens. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of 2 separate experiments in quadruplicate * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus PBS. One way ANOVA for repeated measures.

Innate lymphoid cells at the interface between obesity and asthma

Laetitia Everaere,^{1,2,3,4} Saliha
Ait Yahia,^{1,2,3,4} Mélodie Bouté,^{1,2,3,4}
Camille Audousset,^{1,2,3,4,5} Cécile
Chenivessé,^{1,2,3,4,5} and Anne
Tsicopoulos^{1,2,3,4,5} 

¹Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale, Lille, ²CNRS, UMR
8204, Centre for Infection and Immunity of
Lille, Lille, ³Institut Pasteur de Lille, Lille,
⁴Université de Lille, Lille, and ⁵Clinique des
Maladies Respiratoires et Centre Hospitalier
Régional et Universitaire de Lille, Lille,
France

doi:10.1111/imm.12832

Received 20 July 2017; revised 24 August
2017; accepted 31 August 2017.

Correspondence: Dr Anne Tsicopoulos,
Institut Pasteur de Lille, CHIL, Team
Pulmonary Immunity, 1 avenue du Pr
Calmette, 59019 Lille cedex, France.

Email: anne.tsicopoulos@pasteur-lille.fr

Senior author: Dr Anne Tsicopoulos

Summary

Obesity and asthma prevalence has dramatically and concomitantly increased over the last 25 years, and many epidemiological studies have highlighted obesity as an important risk factor for asthma. Although many studies have been performed, the underlying mechanisms remain poorly understood. Innate mechanisms have been involved in both diseases, in particular through the recently described innate lymphoid cells (ILCs). ILCs are subdivided into three groups that are defined by their cytokine production and by their master transcription factor expression, in sharp correlation with their T helper counterparts. However, unlike T helper cells, ILCs do not express antigen-specific receptors, but respond to damage-induced signals. ILCs have been found in target tissues of both diseases, and data have implicated these cells in the pathogenesis of both diseases. In particular group 2 ILCs (ILC2) are activated in both the adipose and lung tissues under the effect of interleukin-33 and interleukin-25 expression. However, counter-intuitively to the well-known association between obesity and asthma, ILC2 are beneficial for obesity but deleterious for asthma. This review will examine the roles of ILCs in each disease and recent data highlighting ILCs as a putative link between obesity and asthma.

Keywords: asthma; innate lymphoid cells; obesity.

Obesity and asthma

Obesity and asthma prevalence has dramatically and concomitantly increased over the last 25 years,^{1,2} and a significant proportion of patients with severe or difficult-to-control asthma are obese. Although pre-existing asthma may be complicated by obesity, many epidemiological studies have highlighted obesity as an important risk factor for asthma development^{3,4} with a 92% increased risk of asthma when body mass index exceeds 30 kg/m².⁵ Moreover, bariatric surgery and dietary restriction improve, respectively, bronchial hyper-responsiveness,⁶ and airway inflammation and clinical outcomes in obese patients with asthma,⁷ pointing towards a functional link between obesity and asthma. Although asthma in adult obese patients is often non-atopic, associated with corticosteroid-resistance

and with a neutrophilic profile in sputum,^{8,9} it has been recently shown that eosinophils are nonetheless predominant in the tissue but not the lumen of obese patients with severe asthma,¹⁰ raising the possibility that obese asthmatic patients may be misclassified based on their sputum eosinophils.¹¹ Moreover, increased risks of atopy^{12–14} and T helper type 2 (Th2) responses^{10,15,16} are also observed in obese patients. Foremost, obesity contributes to asthma exacerbation in children¹⁷ in whom the disease is mostly allergic. However, the underlying mechanisms remain poorly understood.^{18,19} Mechanical effects linked to overweight and adipose tissue (AT) accumulation, as well as obesity-associated inflammation, have been implicated. For example, It has been shown that breathing at low lung volumes²⁰ as well as augmented airway wall thickness,²¹ increases airway reactivity. On the inflammatory side,

Abbreviations: AHR, airway hyper-responsiveness; AT, adipose tissue; CHILP, common helper ILC progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; DC, dendritic cell; EILP, early ILC progenitor; Id2, inhibitor of DNA-binding protein 2; IFN, interferon; ILC, innate lymphoid cell; ILCP, ILC progenitor; LTi, lymphoid tissue inducer; LTip, LTi precursor; MHC-II, major histocompatibility complex class II; NCR, natural cytotoxic receptor; NK, natural killer; NKp, natural killer cell precursor; Th2, T helper type 2; TSLP, thymic stromal lymphopoietin

increased oxidative stress and modification of nitric oxide metabolism in exhaled breath condensates have been observed in obese patients with asthma.²² Moreover, leptin, a pro-inflammatory adipokine, increases airway hyper-responsiveness (AHR) and IgE production in a model of ovalbumin-sensitized mice,²³ whereas administration of the anti-inflammatory adiponectin almost totally suppresses AHR and Th2 cytokine production in the same model.²⁴ However, reciprocal changes of these adipokines are not always found in obese patients with asthma.^{25–27} Some common metabolic pathways may contribute to both diseases such as chitinase 3-like 1, first described as associated with asthma susceptibility and with allergic airway inflammation,²⁸ and more recently found to be also involved in the development of visceral obesity, through its effect on the Sirtuin1 pathway. This pathway is up-regulated in both the AT and lung tissue in response to allergen challenge.²⁹ Among other mechanisms, consumption of a high-fat diet during pregnancy may contribute to the development of asthma in offspring. Indeed, structural changes, higher level of cytokines and increased airway resistance have been observed in rats born from mothers fed a high-fat diet during gestation.³⁰ Similar structural changes have been observed in lung epithelial cells in adult mice fed with a high-fat diet.³¹ Diets low in fibre or high in fat that lead to obesity³² modify the gut microbiota,^{33,34} which may be involved in the development of allergic airway disease. Accordingly, increasing fibre consumption in mouse models of asthma modifies the gut microbiota and reduces allergic airway inflammation through mechanisms involving dendritic cells.³⁵ Furthermore, high-fat diet-induced dysbiosis results in epigenetic modifications of the Forkhead box P3 (FoxP3) promoter, leading to suppression of regulatory T cells and increased allergic airway inflammation.³⁶

The contribution of adaptive responses triggered by metabolic alterations on the subsequent development of experimental asthma remains controversial. A Th17 response is observed in both diseases,^{37–39} whereas the Th2 response is^{40–42} or is not^{43,44} found in allergen-induced asthma exacerbated by diet-induced obesity. Nonetheless, interleukin-33 (IL-33) and IL-25, two pro-Th2 cytokines produced by both the AT^{45,46} and lung epithelial cells^{47,48} can activate group 2 innate lymphoid cells (ILC2).⁴⁹

Innate lymphoid cells

Innate lymphoid cells have been the focus of intense investigation over the last 5 years and have emerged as key players in the immune responses in various tissues, including the visceral AT and the lung.^{50–52} ILCs are currently subdivided into three groups that are defined by their cytokine production and by their master transcription factor expression, in sharp correlation with their T helper counterparts⁴⁹ (Fig. 1). However, unlike T helper

cells, ILCs do not express antigen-specific receptors and lack common cell lineage markers, but respond to damage-induced signals such as alarmins and cytokines and can shape the adaptive immune response.

Group 1 ILCs (ILC1), include a subgroup of natural killer (NK) cells and of non-NK ILC1 cells distinguished by a combination of markers including lack of expression of CD127 and expression of eomes for mature NK cells.⁵³ They produce the cytokines interferon- γ (IFN- γ) and tumour necrosis factor- α , express the transcription factor T-bet and mediate immune responses to pathogens and tumours in response to IL-12, IL-15 and IL-18.⁵⁴

Group 2 ILCs (ILC2) produce IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 and amphiregulin, express the transcription factors GATA3 and RAR-related orphan receptor α and mediate responses against parasites and allergens in response to IL-33, IL-25 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP).⁵²

Group 3 ILCs (ILC3) encompass different subgroups of cells including in mice, the CCR6⁺ fetal lymphoid tissue inducers (LTi) and adult LTi-like cells, and the CCR6[−] natural cytotoxic receptor (NCR)⁺ or NCR[−] ILC3. In humans, CCR6⁺ ILC3 are subdivided according to their expression of NKp44. They produce the cytokines IL-17 and/or IL-22, express the transcription factor Retinoid-related orphan receptor γ t and aryl hydrocarbon receptor and mediate mucosal immunity against bacterial and fungal infections, in particular at the intestinal level, in response to IL-1 β and IL-23.⁵⁵

All ILC subsets are dependent upon the common γ -chain receptor signalling and develop from a common lymphoid progenitor found in fetal liver and in bone marrow that will give rise to an early ILC progenitor able to differentiate in either NK cells, or through the up-regulation of the transcription factor inhibitor of DNA-binding protein 2 (Id2), into a common helper ILC progenitor (CHILP) (Fig. 1). Downstream commitment to the different ILC lineages is achieved through a wide range of transcription factors including T-cell factor-1 (TCF-1), nuclear factor IL-3 (NFIL-3), thymocyte selection associated HMG boxprotein (TOX), GATA-3^{56–60} giving rise to either pro-myelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) expressing ILC progenitor (ILCP),⁶¹ or to an LTi precursor. ILCP will generate all ILC subgroups except LTi-like ILC3 (Fig. 1). Interestingly, ILCP able to give rise to all ILC subsets except IL-17⁺ ILC3 have recently been described in the peripheral blood in humans, supporting a model of tissue differentiation in response to local environmental cues.⁶²

Recent transcriptomic studies have revealed that ILC subsets exhibit a certain degree of heterogeneity^{63–65} and plasticity allowing switching between subsets depending mainly on the local cytokine milieu. For example, ILC1 can evolve towards ILC3 in the presence of IL-2, IL-23 and IL-1 β , and CD14⁺ dendritic cells (DCs) can differentiate ILC3 into ILC1.⁶⁶ ILC2 have also been shown to rise to ILC1-like IFN- γ producer in the presence of IL-1,

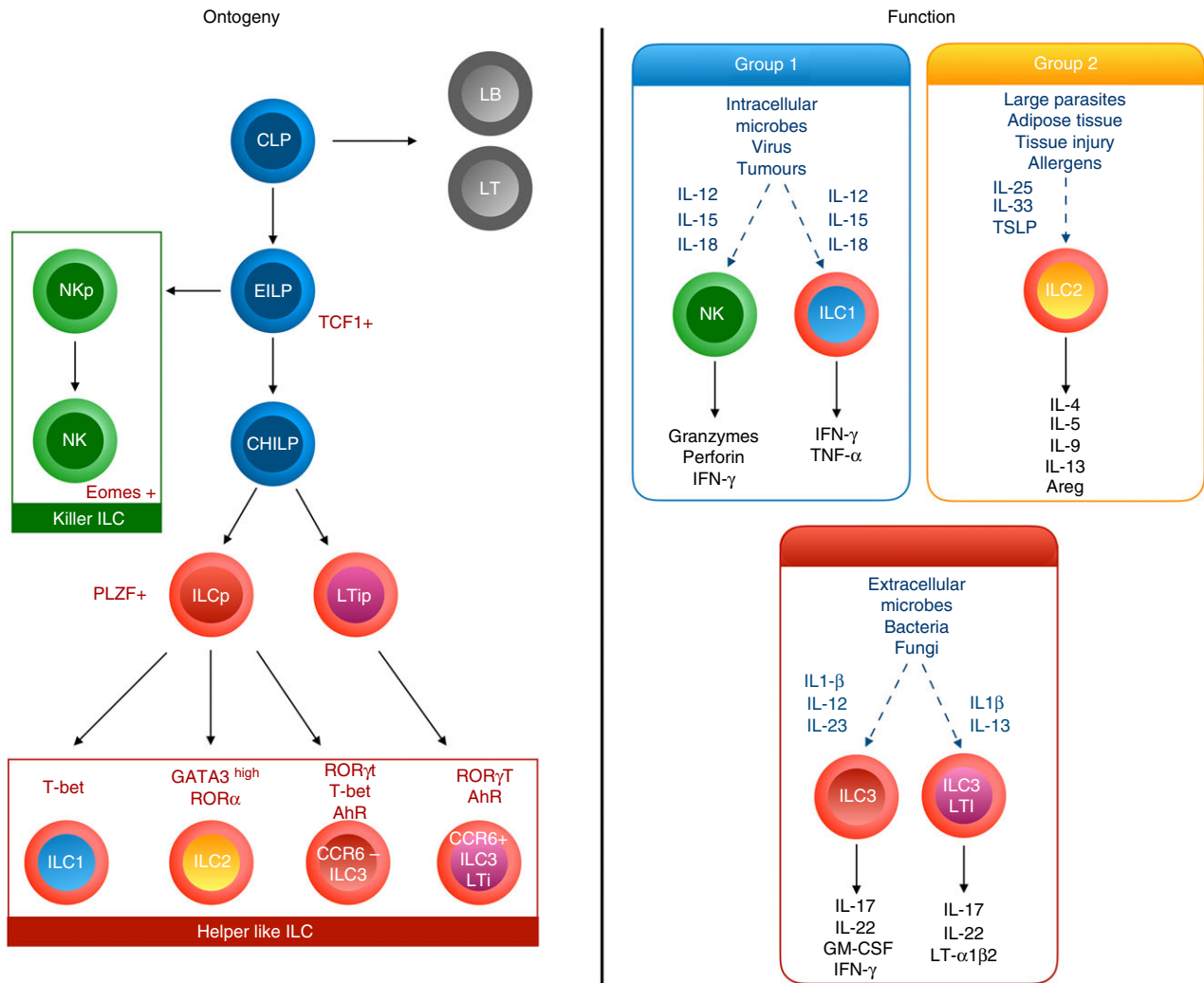


Figure 1. Ontogeny and function of lymphoid lineages. Downstream of the common lymphoid progenitor (CLP), the early innate lymphoid cell (ILC) Progenitor (EILP) initiates TCF1 expression and can differentiate into either natural killer (NK) cells or into an Id2^{high} common helper-like ILC progenitor (CHILP). According to the expression or not of PLZF, it will give rise to either all helper-like ILC subsets including CCR6⁺ ILC3, or to ILC1, ILC2 and CCR6[−] ILC3. Environmental cytokines as well as ILC differential transcriptional factors programme their cytokine production and function.

IL-12 and IL-18,^{67–69} and ILC1 can revert to ILC2 in the presence of IL-4.⁷⁰ Moreover a potential IL-25-induced ILC2 precursor has been reported to give rise to IL-17-producing ILC3-like cells.⁷¹

Regulatory pathways also play a role in the control of ILC2 activation. Type I and II IFN, as well as IL-27, are able to block ILC2 activation in response to IL-2, IL-25 and IL-33 through a signal transducer and activation of transcription 1 (STAT1) -dependent pathway,^{72,73} opening new avenues for specific targeted therapies.

Lymphoid cells in obesity

Adipose tissue expands with obesity, and initially retains relatively normal metabolic function. In chronic obesity,

inflammatory immune cells accumulate in the AT and promote insulin resistance leading to type 2 diabetes. Strikingly, ILC2 have been initially identified in gut mucosa and fat-associated lymphoid clusters⁷⁴ and play a key role in metabolic homeostasis of lean healthy AT. Three types of AT are recognized, the most abundant white type is involved in excess energy storage, and the brown and beige types dissipate energy through the production of heat. Type 2 responses promote energy expenditure by inducing beige adipocytes that protect against insulin resistance and type 2 diabetes.⁷⁵ Interleukin-5 provided by ILC2 is required for eosinophil activation and their migration to the visceral AT, whereas ILC2-derived IL-13 promotes alternately activated macrophages. Altogether, resident visceral AT ILC2 sustain tissue eosinophil

and anti-inflammatory alternately activated macrophage homeostasis as well as beige fat biogenesis,⁷⁶ all involved in protection against obesity-induced metabolic dysfunction. In contrast, the absence of ILC2 promotes adiposity and insulin resistance in animals fed a high-fat diet.^{46,77,78} Residency and activation of ILC2 in AT are promoted by different signals including IL-33 and IL-25. Resting AT expresses IL-33 in particular through endothelial cells, and IL-33-deficient mice fed a high-fat diet exhibit increased whole body adiposity and decreased insulin secretion.⁷⁹ However, mice lacking IL-33 signalling still exhibit resident AT ILC2, suggesting that other factors are also involved. Among them, IL-2⁸⁰ and IL-25⁴⁶ may be involved. The importance of IL-33 and IL-25 in the activation of ILC2 and visceral AT homeostasis has been confirmed by performing gain and loss of function studies.^{46,76,77,81} Two mechanisms have been demonstrated. One of them links IL-5 production by ILC2 to production of IL-4 by eosinophils and subsequent beiging of adipocytes through their expression of the IL-4 receptor.⁸¹ The second one involves the production of methionine-enkephalin by ILC2 that up-regulates the uncoupling protein UCP-1, inducing the beiging of adipocytes.⁷⁶ Finally, IL-4 and IL-13 production by eosinophils, ILC2 and NKT cells, allows the recruitment of alternately activated macrophages that can regulate energy expenditure by adipocytes.^{82–84} It is noteworthy that IL-33 as well as IL-2 have been shown to be crucial for T regulatory cell recruitment and expansion within the AT.^{85–87} This similar regulation of T regulatory cells and ILC2 suggests that these cell types may cooperate to maintain AT homeostasis. ILC3 have also been observed in visceral AT from lean mice with a slight decrease in diet-induced obesity,⁴² but their functionality regarding metabolic homeostasis has still to be established. During chronic obesity, ILC2 within the AT decline. However, little is known about the precise signals allowing ILC2 trafficking to or from the AT. Along the same lines, mechanisms that may restrict AT ILC2 are still unclear. One possible mechanism may involve NK cells, well represented in AT, that have been shown to participate in obesity-induced adipose tissue inflammation,⁸⁸ and that highly produce IFN- γ , a cytokine that can inhibit ILC2 activation and proliferation.⁸⁹ Moreover, in contrast to adipose-associated ILC2 that limit inflammation and participate in metabolic homeostasis, it has been recently shown that adipose-resident ILC1 contribute to disease progression. Experiments in parabiotic mice have shown that both ILC1 and ILC2 maintain long-term residency. Diet-induced obesity leads to production of IL-12 in AT able to drive the local proliferation of ILC1 through the expression of the IL-12 receptor and of STAT4. Through the production of IFN- γ , ILC1 induce pro-inflammatory macrophage polarization and promote obesity-associated insulin resistance.⁹⁰ These data may provide mechanistic

hypotheses about the diversification of AT ILC infiltration from homeostasis to obesity, such as either an antagonistic balance between ILC1 and ILC2, as IFN- γ can inhibit ILC2,⁹⁸ or a potential conversion of ILC2 towards ILC1 during diet-induced obesity, as such transdifferentiation has been described in response to IL-12.⁶⁷ Altogether, AT ILC2, appear to be beneficial in protecting against obesity and insulin resistance, whereas ILC1 appear deleterious (Fig. 2).

Lymphoid cells in asthma

In agreement with the role of ILC2 in type 2 responses,^{74,91,92} ILC2 contribute to experimental asthma to allergens such as papain, alternaria or house dust mite, by inducing lung eosinophilia, mucus production and AHR, through their rapid production of IL-13 and IL-5, upon stimulation by IL-33, IL-25 or TSLP mainly derived from epithelial cells.^{93–96} In models of persistence of chronic asthma (for more than 6 months), only depletion of ILC2 but not of CD4 T cells abrogates sustained AHR.⁹⁷ Moreover, in a model of cortico-resistant airway inflammation, corticosteroids could suppress Th2 cells but not ILC2, the corticoid resistance of ILC2 being induced by TSLP.⁹⁸

These observations have been confirmed in asthma in humans. ILC2 are increased in peripheral blood from patients with asthma,^{99–102} as well as in sputum,¹⁰² and bronchoalveolar lavages,^{97,103} compared with control subjects. Furthermore, the frequency of ILC2 in blood¹⁰⁰ from asthmatic patients was inversely correlated with lung function tests, suggesting a functional link between ILC2 and severity of asthma. ILC2 are also involved in steroid-resistant asthma. The number of ILC2, and type 2 cytokine-producing ILC2 is significantly increased in peripheral blood and sputum of systemic steroid-dependent patients with severe asthma compared with those with mild asthma.¹⁰² In contrast, the number of type 2 cytokine-producing CD4 is similar between the two groups, suggesting that ILC2 rather than CD4 T cells play a significant role in steroid-resistant asthma.

Remarkably, *rag*^{-/-} (no T and B cells) but not *rag*^{-/-} IL2rg^{-/-} (no T, B and ILC) or *rag*^{-/-} depleted in ILCs, exhibit papain-induced asthma-like symptoms,⁹⁵ suggesting that adaptive immunity is not essential for allergic inflammation development.

It is possible that ILCs act as an early source of cytokines allowing for the development of adaptive immunity as suggested by studies showing decreased sensitization and differentiation of Th2 cells in the absence of ILC2 in models of airway allergic inflammation.¹⁰⁴ Major effects of ILC2 depletion might also result from their identified MHC-II-restricted antigen presentation properties and to the subsequent IL-2 production by T cells leading to a mutual increase in type 2 cytokine production.^{105,106} In line with

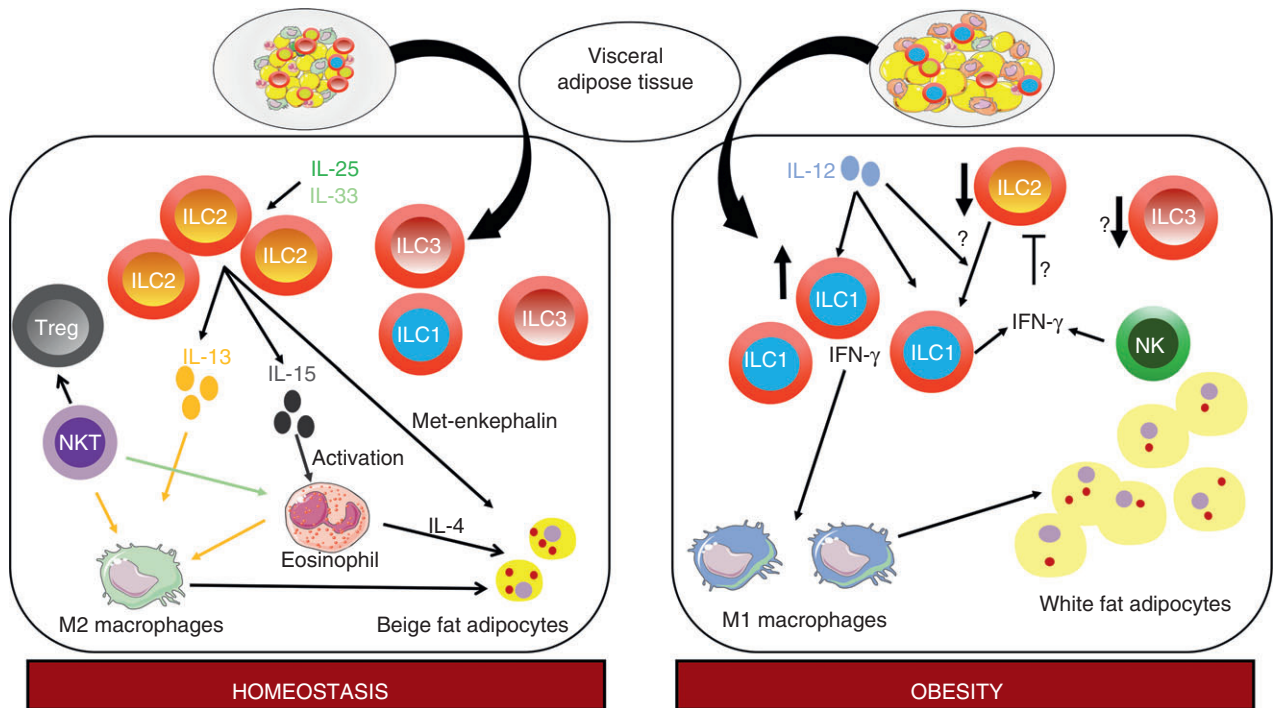


Figure 2. Innate lymphoid cells (ILCs) in the visceral adipose tissue. In homeostasis conditions, the visceral adipose tissue is infiltrated by ILC2 in response to locally produced interleukin-33 (IL-33) and IL-25. Through their production of IL-5 and IL-13, they activate on the one hand eosinophils and on the other hand alternately activated M2-type macrophages, leading to the beiging of adipocytes. Natural killer T cells are also involved in homeostasis through their activation of eosinophils and T regulatory cells. ILC1 and ILC3 are also present although their function at baseline is unclear. In obesity, ILC2 and potentially ILC3 are decreased, whereas ILC1 are increased in response to locally produced IL-12. ILC1 activate classically activated M1-type macrophages that promote obesity-associated insulin resistance. Putatively, decreased ILC2 number may originate from a conversion of ILC2 in ILC1, or from inhibition of ILC2 by ILC1 and natural killer cells through their production of interferon- γ .

this, upon airway allergic inflammation induction, the absence of ILC2 in *Ror α ^{sg/sg}* bone marrow chimeric mice results in a strong decrease in bronchoalveolar lavage eosinophil numbers, IL-13 lung expression, as well as in IgE levels.¹⁰⁷ Adoptive transfer of both ILC2 and CD4⁺ T cells, but not of each individual population, into *Il7ra*^{-/-} mice, which lack both T cells and ILC2, results in a robust antigen-specific Th2 cytokine response and airway inflammation.¹⁰⁸ Furthermore, IL-13 production by ILC2 during a recall response induces interferon-regulatory-factor-4-expressing DCs in the lung able to drive accumulation of memory Th2 cells.¹⁰⁹

The ILC2 can be regulated during lung allergic inflammation in a positive or negative way. For example, basophil-derived IL-4 activates lung ILC2,¹¹⁰ whereas IL-33-activated mast cells expand T regulatory cells that suppress ILC2 activation.¹¹¹ In *alternaria*-induced lung inflammation, IL-27 can inhibit tissue-resident ILC2 but not Th2 cells.⁷³ Finally, lipid mediators such as cysteinyl leukotrienes, prostaglandins and lipoxins, can also, respectively, activate or inhibit ILC2.^{112–114}

Besides ILC2, a recent work has demonstrated that NCR⁺ ILC3 are also induced in the lungs of mice with

house dust mite-induced airway inflammation.⁴² In humans, IL-17-producing ILC3 have been identified in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma.¹¹⁵ For ILC1, no work has yet evaluated their potential role in asthma, except for NK cells, whose main purpose is still unclear.

Altogether, lung ILC2, and putatively ILC3, play a pivotal role in the initiation, exacerbation and chronicity of asthma (Fig. 3), in contrast to obesity where AT ILC2 are beneficial for metabolic homeostasis. However, obesity is associated with increased asthma risk and severity.

Lymphoid cell: a link between obesity and asthma?

Some findings suggest that ILCs are also involved in obesity-associated allergic airway inflammation. Increased numbers of ILC3 have been found in the lungs of obese mice fed a high-fat diet, in comparison with lean mice.¹¹⁹ These obese mice exhibited AHR in the absence of allergen challenge, which was independent of adaptive immunity, but in relation with ILC3-derived IL-17. Indeed, obesity-induced AHR was decreased in *IL-17*^{-/-} mice or

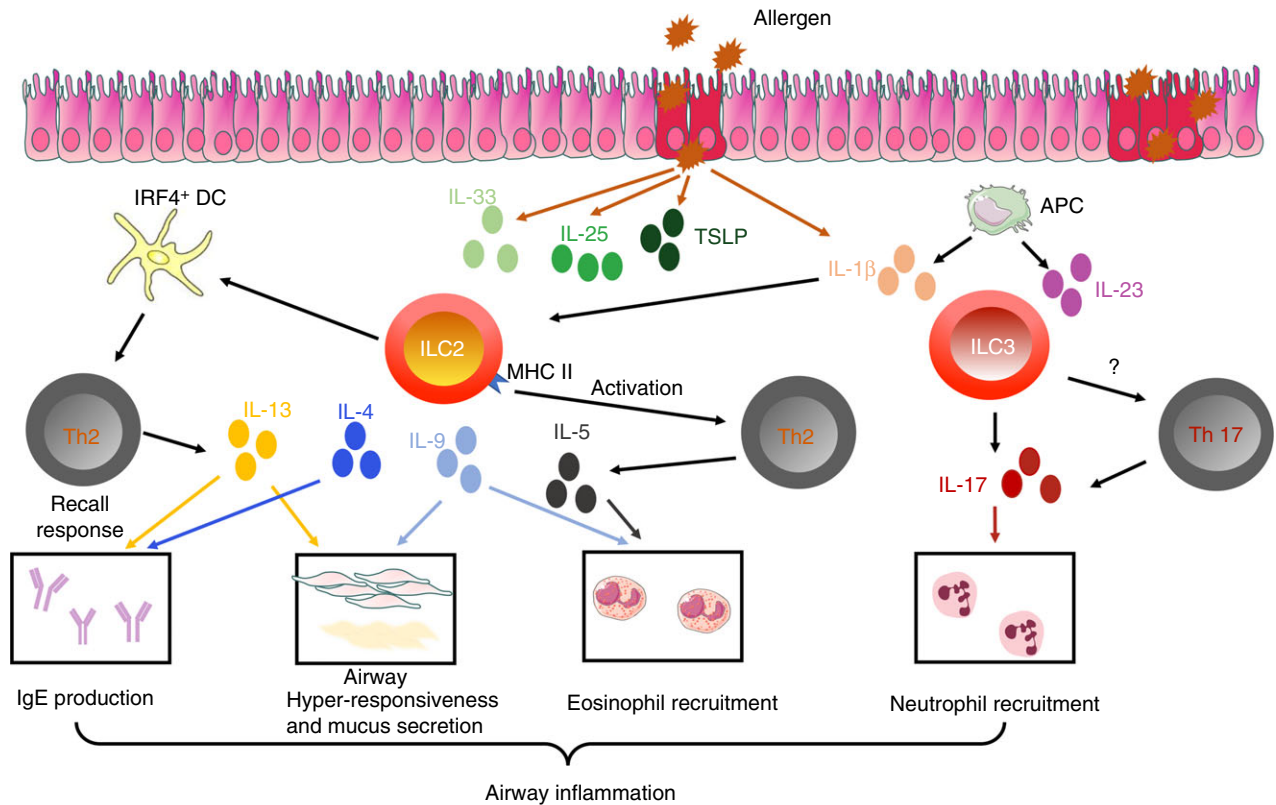


Figure 3. Innate lymphoid cells (ILCs) in allergic airway inflammation. In response to protease-type allergens, airway epithelial cells release cytokines such as interleukin-25 (IL-25), IL33, thymic stromal lymphopietin (TSLP) and IL-1 β , which all activate ILC2. Activated ILC2 produce type 2 cytokines, such as IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13. Then they activate T helper type 2 (Th2) cells either directly, through MHCII expression, or through dendritic cells. Altogether, the released cytokines promote the different features of asthma, including airway hyper-responsiveness, eosinophil accumulation and IgE production. IL-1 β produced by epithelial cells or alveolar macrophages can also activate ILC3, leading to the production of IL-17, promoting the recruitment of neutrophils. ILC3 may also potentially activate Th17 cells.

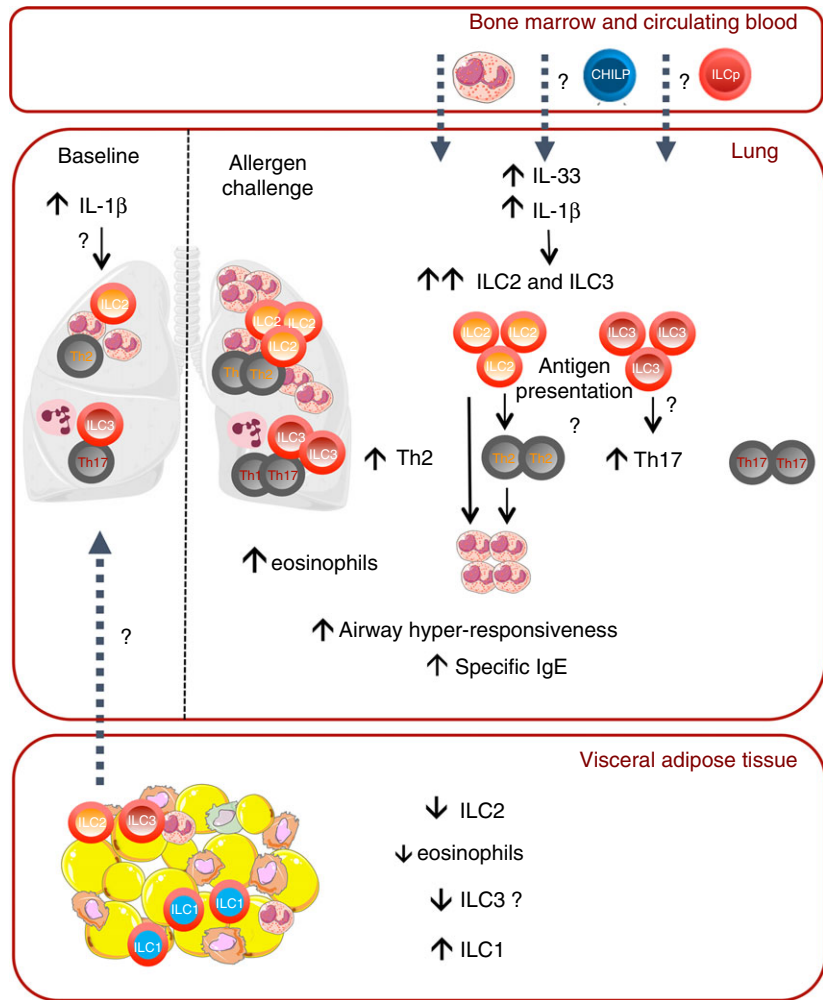
rag^{-/-} mice depleted in ILCs, and restored by ILC3 transfer. Interleukin-17 production by ILC3 was dependent upon the Nlrp3 inflammasome stimulated by macrophage-derived IL-1 β .¹¹⁵ Ozone exposure has also been shown to result in increased AHR in obese mice compared with lean mice. This effect was induced through increased IL-33, and induction of IL-13-producing ILC2.¹¹⁶

Finally, another paper recently showed in a model of high-fat diet-induced obesity followed by house dust mite-induced airway allergic inflammation that both ILC2 and ILC3 contribute to asthma aggravation by obesity.⁴² Notably, non-sensitized obese mice already exhibited increased lung ILC2, ILC3 and tissue (but not airway) eosinophil infiltration compared with lean mice. This contrasts with decreased numbers of ILC2 and eosinophils observed in AT of insulin-resistant obese animals in previous studies.^{46,77,78} To explain the differential abundance of eosinophils between lung tissue and AT, redistribution of eosinophils from the AT to the lung tissue has been previously suggested.^{117,118} This hypothesis may also apply to ILCs, in relation to obesity-induced systemic

inflammation, which might favour ILC migration from the adipose tissue towards the lung, and through their production of Th2 cytokines the recruitment of eosinophils (Fig. 4). Among systemic inflammatory mediators involved in obesity,¹¹⁹ IL-1 β has been involved in the induction of IL-17 production by ILC3 cells¹²⁰ and recently in the induction of type 2 cytokines by ILC2.^{68,70} Its induction in the lung of non-sensitized obese mice^{42,115} may represent a starting point for the activation of both ILC2 and ILC3 in this context, although this remains to be experimentally evaluated (Fig. 4).

In conditions of allergen challenge, HFD feeding aggravated allergic airway disease features including airway and tissue eosinophilia, AHR, Th2 and Th17 pulmonary profiles, as well as the number of total and cytokine-expressing lung ILC2 and ILC3 compared to house dust mite-challenged lean mice.⁴² These modifications were accompanied by high levels of lung IL-33 and IL-1 β and decreased ILC markers in visceral AT. Furthermore, depletion of ILCs with an anti-CD90 antibody, followed by T-cell reconstitution, led to a profound decrease of allergic airway inflammatory features in obese mice,

Figure 4. Redistribution of innate lymphoid cells (ILCs) in obesity: a link with asthma? A hypothetical mechanism. At baseline ILC2 and ILC3 are decreased in adipose tissue (AT) but present in lung tissue from obese mice, potentially through redistribution of ILCs from the AT to the lung under the effect of interleukin-1 β (IL-1 β). This leads to a small infiltration of eosinophils in the lung tissue of obese mice. In the context of allergic airway inflammation, there is a further increase in ILC2 and ILC3 at the lung level, that might originate partly from the adipose tissue but also putatively from the bone marrow and from circulating progenitors attracted by the production of IL-33 and IL-1 β induced by allergen challenge. This increase drives further accumulation of eosinophils, activation of Th2 and Th17 cells potentially through antigen presentation, and aggravation of the features of asthma.



including Th2 and Th17 infiltration.⁴² It is of note that ILCs can regulate T cells, and both ILC2 and ILC3 express MHC-II, and therefore were suggested to directly interact with T cells like antigen-presenting cells. ILC2 induce expansion of T cells *in vitro*,¹⁰⁶ and are critical for the induction of Th2 responses^{104–107} in particular through activation of DCs.¹⁰⁹ ILC3 also promote adaptive CD4 responses through MHC-II expression in the gut,¹²¹ and by triggering peripheral IL-1 β production.¹²² ILC3 are also able to directly induce the death of commensal bacteria-specific CD4 T cells.¹²³ Lastly, ILC3 can activate DCs through lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$, which leads to Th17 cell differentiation.¹²⁴ Therefore, ILCs may play a predominant role in the activation of Th2 and Th17 cells in obesity associated with asthma.

In other experimental studies of obesity followed by allergen challenge, increased bone marrow eosinophilia, and changes in the trafficking of eosinophils to the airways in high-fat diet and genetic models of obesity^{40,125} have been observed, suggesting that such altered trafficking may participate in asthma development. In conditions of allergen stimulation, which triggers IL-33 production

in the lung, additional sources of ILCs may be recruited to the lung, such as circulating ILC progenitors, recently described in humans,⁶² or bone marrow progenitors (Fig. 4). Altogether, basal infiltration of ILC2 and ILC3 in the lung of obese mice would provide the framework for the aggravation of asthma under allergen challenge.

Although the migration hypothesis awaits further investigations, it may foster novel therapeutic strategies such as redirecting ILC2 to AT. Indeed, the hallmark of ILC is quick and antigen-independent activation settling them as putative orchestrators of adaptive responses, and as such are interesting therapeutic targets.

Disclosures

The authors declare having no competing interests.

References

- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C *et al*. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; **384**:766–81.

- 2 Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK *et al.* World-wide 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. *Lancet* 2006; **368**:733–43.
- 3 Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **115**:897–909.
- 4 Sutherland ER. Linking obesity and asthma. *Ann N Y Acad Sci* 2014; **1311**:31–41.
- 5 Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**:661–6.
- 6 Dixon AE, Pratley RE, Forgione PM, Kaminsky DA, Whittaker-Leclair LA, Griffes LA *et al.* Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **128**:508–15.
- 7 Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Pretto JJ, Morgan PJ, Callister R *et al.* Dietary restriction and exercise improve airway inflammation and clinical outcomes in overweight and obese asthma: a randomized trial. *Clin Exp Allergy* 2013; **43**:36–49.
- 8 Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Wood LG. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. *Eur Respir J* 2011; **38**:594–602.
- 9 Telenga ED, Tideman SW, Kerstjens HA, Hacken NH, Timens W, Postma DS *et al.* Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. *J Allergy* 2012; **67**:1060–8.
- 10 Desai D, Newby C, Symon FA, Haldar P, Shah S, Gupta S *et al.* Elevated sputum interleukin-5 and submucosal eosinophilia in obese individuals with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **188**:657–63.
- 11 Peters MC, Fahy JV. Type 2 immune responses in obese individuals with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **188**:633–4.
- 12 Forno E, Acosta-Perez E, Brehm JM, Han YY, Alvarez M, Colon-Semidey A *et al.* Obesity and adiposity indicators, asthma, and atopy in Puerto Rican children. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**:1308–14.
- 13 Hancox RJ, Milne BJ, Poulton R, Taylor DR, Greene JM, McLachlan CR *et al.* Sex differences in the relation between body mass index and asthma and atopy in a birth cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**:440–5.
- 14 Ma J, Xiao L, Knowles SB. Obesity, insulin resistance and the prevalence of atopy and asthma in US adults. *Allergy* 2010; **65**:1455–63.
- 15 Marijse GS, Seys SF, Schelpe AS, Dilissen E, Goeminne P, Dupont LJ *et al.* Obese individuals with asthma preferentially have a high IL-5/IL-17A/IL-25 sputum inflammatory pattern. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; **189**:1284–5.
- 16 Sutherland TJ, Cowan JO, Young S, Goulding A, Grant AM, Williamson A *et al.* The association between obesity and asthma: interactions between systemic and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; **178**:469–75.
- 17 Quinto KB, Zuraw BL, Poon KY, Chen W, Schatz M, Christiansen SC. The association of obesity and asthma severity and control in children. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **128**:964–9.
- 18 Dixon AE, Poynter ME. Mechanisms of asthma in obesity. Pleiotropic aspects of obesity produce distinct asthma phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; **54**:601–8.
- 19 Rasmussen F, Hancox RJ. Mechanisms of obesity in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014; **14**:35–43.
- 20 Skloot G, Permutt S, Togias A. Airway hyperresponsiveness in asthma: a problem of limited smooth muscle relaxation with inspiration. *J Clin Invest* 1995; **96**:2393–403.
- 21 Bates JH, Dixon AE. Potential role of the airway wall in the asthma of obesity. *J Appl Physiol* 1985; **2015**:36–41.
- 22 Holguin F, Fitzpatrick A. Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol* 1985; **2010**:754–9.
- 23 Shore SA, Schwartzman IN, Mellema MS, Flynt L, Imrich A, Johnston RA. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **115**:103–9.
- 24 Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A, Hug C. Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **118**:389–95.
- 25 Jartti T, Saarikoski L, Jartti L, Lisinen I, Jula A, Huupponen R *et al.* Obesity, adipokines and asthma. *Allergy* 2009; **64**:770–7.
- 26 Sood A. Obesity, adipokines, and lung disease. *J Appl Physiol* 1985; **2010**:744–53.
- 27 Sutherland TJ, Sears MR, McLachlan CR, Poulton R, Hancox RJ. Leptin, adiponectin, and asthma: findings from a population-based cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; **103**:101–7.
- 28 Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in Th₂ inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **116**:497–500.
- 29 Ahangari F, Sood A, Ma B, Takyar S, Schuyler M, Qualls C *et al.* Chitinase 3-like-1 regulates both visceral fat accumulation and asthma-like Th₂ inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; **191**:746–57.
- 30 Griffiths PS, Walton C, Samsell L, Perez MK, Piedimonte G. Maternal high-fat hypercaloric diet during pregnancy results in persistent metabolic and respiratory abnormalities in offspring. *Pediatr Res* 2016; **79**:278–86.
- 31 Leishangthem GD, Mabalirajan U, Singh VP, Agrawal A, Ghosh B, Dinda AK. Ultrastructural changes of airway in murine models of allergy and diet-induced metabolic syndrome. *ISRN Allergy* 2013; **2013**:261297.
- 32 Wood LG, Gibson PG. Dietary factors lead to innate immune activation in asthma. *Pharmacol Ther* 2009; **123**:37–53.
- 33 Sonnenburg JL, Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; **535**:56–64.
- 34 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; **444**:1027–31.
- 35 Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 2014; **20**:159–66.
- 36 Thorburn AN, McKenzie CL, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ *et al.* Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun* 2015; **6**:7320.
- 37 Mathews JA, Wurmbrand AP, Ribeiro L, Neto FL, Shore SA. Induction of IL-17A precedes development of airway hyperresponsiveness during diet-induced obesity and correlates with complement factor D. *Front Immunol* 2014; **5**:440.
- 38 Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; **11**:388–94.
- 39 Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D *et al.* Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 2009; **39**:2629–35.
- 40 Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol* 2010; **159**:617–25.
- 41 Dietze J, Bocking C, Heverhagen JT, Voelker MN, Renz H. Obesity lowers the threshold of allergic sensitization and augments airway eosinophilia in a mouse model of asthma. *Allergy* 2012; **67**:1519–29.
- 42 Everaere L, Ait-Yahia S, Molendi-Coste O, Vorng H, Quemener S, LeVu P *et al.* Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**:1309–18.
- 43 de Vries A, Hazlewood L, Fitch PM, Seckl JR, Foster P, Howie SE. High-fat feeding redirects cytokine responses and decreases allergic airway eosinophilia. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**:731–9.
- 44 Ge XN, Greenberg Y, Hosseinkhani MR, Long EK, Bahaie NS, Rao A *et al.* High-fat diet promotes lung fibrosis and attenuates airway eosinophilia after exposure to cockroach allergen in mice. *Exp Lung Res* 2013; **39**:365–78.
- 45 Wood IS, Wang B, Trayhurn P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **384**:105–9.
- 46 Hams E, Locksley RM, McKenzie AN, Fallon PG. Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *J Immunol* 2013; **191**:5349–53.
- 47 Prefontaine D, Nadigel J, Chouiali F, Audusseau S, Semlali A, Chakir J *et al.* Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**:752–4.
- 48 Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, Fang C, Eid G, Caballero MR *et al.* Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **128**:116–24.
- 49 Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G *et al.* Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**:145–9.
- 50 Bando JK, Colonna M. Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2016; **17**:783–9.
- 51 Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science* 2015; **348**:aaa6566.
- 52 Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* 2016; **17**:765–74.
- 53 Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol* 2016; **17**:758–64.
- 54 Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD *et al.* Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 2013; **38**:769–81.
- 55 Tait Wojno ED, Artis D. Emerging concepts and future challenges in innate lymphoid cell biology. *J Exp Med* 2016; **213**:2229–48.
- 56 Aliahmad P, de la Torre B, Kaye J. Shared dependence on the DNA-binding factor TOX for the development of lymphoid tissue-inducer cell and NK cell lineages. *Nat Immunol* 2010; **11**:945–52.
- 57 Klose CS, Flach M, Mohle L, Rogell L, Hoyle T, Ebert K *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 2014; **157**:340–56.

- 58 Seillet C, Rankin LC, Groom JR, Mielke LA, Tellier J, Chopin M *et al*. Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. *J Exp Med* 2014; **211**:1733–40.
- 59 Serafini N, Klein Wolterink RG, Satoh-Takayama N, Xu W, Vossenrich CA, Hendriks RW *et al*. Gata3 drives development of ROR γ t+ group 3 innate lymphoid cells. *J Exp Med* 2014; **211**:199–208.
- 60 Yang Q, Monticelli LA, Saenz SA, Chi AW, Sonnenberg GF, Tang J *et al*. T cell factor 1 is required for group 2 innate lymphoid cell generation. *Immunity* 2013; **38**:694–704.
- 61 Constantinides MG, McDonald BD, Verhoef PA, Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 2014; **508**:397–401.
- 62 Lim AI, Li Y, Lopez-Lastra S, Stadhouders R, Paul F, Casrouge A *et al*. Systemic human ILC precursors provide a substrate for tissue ILC differentiation. *Cell* 2017; **168**:e10.
- 63 Bjorklund AK, Forkel M, Picelli S, Konya V, Theorell J, Friberg D *et al*. The heterogeneity of human CD127 $^{+}$ innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol* 2016; **17**:451–60.
- 64 Koues OI, Collins PL, Cella M, Robinette ML, Porter SI, Pyfrom SC *et al*. Distinct gene regulatory pathways for human innate versus adaptive lymphoid cells. *Cell* 2016; **165**:1134–46.
- 65 Robinette ML, Fuchs A, Cortez VS, Lee JS, Wang Y, Durum SK *et al*. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol* 2015; **16**:306–17.
- 66 Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, de Jong E, Gronke K, Kofoed-Nielsen M *et al*. Interleukin-12 and -23 control plasticity of CD127 $^{+}$ group 1 and group 3 innate lymphoid cells in the intestinal lamina propria. *Immunity* 2015; **43**:146–60.
- 67 Lim AI, Menegatti S, Bustamante J, Le Bourhis L, Allez M, Rogge L *et al*. IL-12 drives functional plasticity of human group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med* 2016; **213**:569–83.
- 68 Ohne Y, Silver JS, Thompson-Snipes L, Collet MA, Blanck JP, Cantarel BL *et al*. IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nat Immunol* 2016; **17**:646–55.
- 69 Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, Sanden C, Mori M, Yu L *et al*. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol* 2016; **17**:626–35.
- 70 Bal SM, Bernink JH, Nagasawa M, Groot J, Shikhaie MM, Golebski K *et al*. IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol* 2016; **17**:636–45.
- 71 Huang Y, Guo L, Qiu J, Chen X, Hu-Li J, Siebenlist U *et al*. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1 hi cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2015; **16**:161–9.
- 72 Duerr CU, McCarthy CD, Mindt BC, Rubio M, Meli AP, Pothlichet J *et al*. Type 1 interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2016; **17**:65–75.
- 73 Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M *et al*. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol* 2016; **17**:76–86.
- 74 Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H *et al*. Innate production of T $_{H}2$ cytokines by adipose tissue-associated c-Kit $^{+}$ Sca-1 $^{+}$ lymphoid cells. *Nature* 2010; **463**:540–4.
- 75 Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH *et al*. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; **150**:366–76.
- 76 Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, Stine RR, Monticelli LA, Sonnenberg GF *et al*. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 2015; **519**:242–6.
- 77 Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A *et al*. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* 2013; **210**:535–49.
- 78 Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB *et al*. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 2013; **502**:245–8.
- 79 Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN *et al*. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res* 2010; **107**:650–8.
- 80 Van Gool F, Molofsky AB, Morar MM, Rosenzweig M, Liang HE, Klatzmann D *et al*. Interleukin-5-producing group 2 innate lymphoid cells control eosinophilia induced by interleukin-2 therapy. *Blood* 2014; **124**:3572–6.
- 81 Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC *et al*. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 2015; **160**:74–87.
- 82 Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V *et al*. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 2012; **37**:574–87.
- 83 Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM *et al*. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* 2014; **157**:1292–308.
- 84 Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK *et al*. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 2011; **332**:243–7.
- 85 Hu ZQ, Zhao WH. The IL-33/ST2 axis is specifically required for development of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2015; **12**:521–4.
- 86 Lynch L, Michelet X, Zhang S, Brennan PJ, Moseman A, Lester C *et al*. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol* 2015; **16**:85–95.
- 87 Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S *et al*. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol* 2015; **16**:276–85.
- 88 Wensveen FM, Jelencic V, Valentic S, Sestan M, Wensveen TT, Theurich S *et al*. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* 2015; **16**:376–85.
- 89 Molofsky AB, Van Gool F, Liang HE, Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J *et al*. Interleukin-33 and interferon- γ counter-regulate group 2 innate lymphoid cell activation during immune perturbation. *Immunity* 2015; **43**:161–74.
- 90 O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, Weizman OE, Bhardwaj P, Adams NM *et al*. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity* 2016; **45**:428–41.
- 91 Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK *et al*. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010; **464**:1367–70.
- 92 Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Easley CJ, Erle DJ *et al*. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:11489–94.
- 93 Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, Drynan LF, Wong SH, Cruickshank JP *et al*. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**:191–8.
- 94 Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25 $^{+}$ CD4 hi lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol* 2012; **188**:1503–13.
- 95 Halim TY, Krauss RH, Sun AC, Takei F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 2012; **36**:451–63.
- 96 Klein Wolterink RG, Kleijman A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y *et al*. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 2012; **42**:1106–16.
- 97 Christianson CA, Goplen NP, Zafar I, Irvin C, Good JT Jr, Rollins DR *et al*. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**:59–68.
- 98 Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K *et al*. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun* 2013; **4**:2675.
- 99 Bartemes KR, Kephart GM, Fox SJ, Kita H. Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**:671–8.
- 100 Liu T, Wu J, Zhao J, Wang J, Zhang Y, Liu L *et al*. Type 2 innate lymphoid cells: a novel biomarker of eosinophilic airway inflammation in patients with mild to moderate asthma. *Respir Med* 2015; **109**:1391–6.
- 101 Lombardi V, Beuraud C, Neukirch C, Moussu H, Morizur L, Horiot S *et al*. Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**:305–8.
- 102 Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria JP, O'Byrne PM *et al*. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**:75–86.
- 103 Nagakumar P, Denney L, Fleming L, Bush A, Lloyd CM, Saglani S. Type 2 innate lymphoid cells in induced sputum from children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**:624–6.
- 104 Halim TY, Steer CA, Matha 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**:425–35.
- 105 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**:2442–8.
- 106 Oliphant CJ, Hwang YY, Walker JA, Salimi M, Wong SH, Brewer JM *et al*. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4 $^{+}$ T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* 2014; **41**:283–95.
- 107 Gold MJ, Antignano F, Halim TY, Hirota JA, Blanchet MR, Zaph C *et al*. Group 2 innate lymphoid cells facilitate sensitization to local, but not systemic, TH2-inducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**:1142–8.

- 108 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**:1300–7.
- 109 Halim TY, Hwang YY, Scanlon ST, Zaghoulani H, Garbi N, Fallon PG *et al.* Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat Immunol* 2016; **17**:57–64.
- 110 Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA *et al.* Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity* 2014; **40**:758–71.
- 111 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**:175–86.
- 112 Barnig C, Cernadas M, Dutilleul S, Liu X, Perrella MA, Kazani S *et al.* Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med* 2013; **5**:174ra26.
- 113 Doherty TA, Khorram N, Lund S, Mehta AK, Croft M, Broide DH. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **132**:205–13.
- 114 Xue L, Salimi M, Panse I, Mjosberg JM, McKenzie AN, Spits H *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**:1184–94.
- 115 Kim HY, Lee HJ, Chang YJ, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA *et al.* Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med* 2014; **20**:54–61.
- 116 Mathews JA, Krishnamoorthy N, Kasahara DI, Cho Y, Wurmbrand AP, Ribeiro L *et al.* IL-33 drives augmented responses to ozone in obese mice. *Environ Health Perspect* 2017; **125**:246–53.
- 117 Kim SH, Sutherland ER, Gelfand EW. Is there a link between obesity and asthma? *Allergy Asthma Immunol Res* 2014; **6**:189–95.
- 118 Lloyd CM, Saglani S. Eosinophils in the spotlight: finding the link between obesity and asthma. *Nat Med* 2013; **19**:976–7.
- 119 Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; **2013**:139239.
- 120 Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F *et al.* IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4⁺ Th17 cells. *J Exp Med* 2012; **209**:1595–609.
- 121 Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 2013; **498**:113–7.
- 122 von Burg N, Chappaz S, Baerenwaldt A, Horvath E, Bose Dasgupta S, Ashok D *et al.* Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**:12835–40.
- 123 Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J *et al.* Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* 2015; **348**:1031–5.
- 124 Tumanov AV, Koroleva EP, Guo X, Wang Y, Nedospasov S *et al.* Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe* 2011; **10**:44–53.
- 125 Lintomen L, Calixto MC, Schenka A, Antunes E. Allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis and airways eosinophilic inflammation in leptin-deficient ob/ob mice. *Obesity (Silver Spring)* 2012; **20**:1959–65.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The C3HeB/FeJ mouse model recapitulates the hallmark of bovine tuberculosis lung lesions following *Mycobacterium bovis* aerogenous infection

Mélodie Bouté^{1,2}, Florence Carreras^{1†}, Christelle Rossignol^{1†}, Emilie Doz¹, Nathalie Winter^{1‡} and Mathieu Epardaud^{1*‡} 

Abstract

Achieving the control of bovine tuberculosis (bTB) would require the discovery of an efficient combined immunodiagnostic and vaccine strategy. Since in vivo experiments on cattle are not ethically and economically acceptable there is a need for a cost-effective animal model capable of reproducing, as closely as possible, the physiopathology of bTB to (i) better characterize the cellular and molecular features of bTB immunopathogenesis and (ii) screen preclinical vaccine candidates. To develop such a model, we focused on the C3HeB/FeJ Kramnik's mouse forming hypoxic, encapsulated granulomas with a caseous necrotic center following *Mycobacterium tuberculosis* infection. Our work represents the first investigation on C3HeB/FeJ interaction with *M. bovis*, the main agent of bTB. Detailed histopathological analysis of C3HeB/FeJ lung lesions development following aerogenous *M. bovis* infection unraveled a bimodal evolution of the pathology. The C3HeB/FeJ recapitulated all the hallmarks of classical bovine lung granulomas but also developed, to some extent, lethal necrotic large lesions characterized by high mycobacterial and neutrophil load, and an inefficient collagen-driven lesion encapsulation. Interestingly these rapidly invasive pneumonia lesions, occurring in a constant percentage of the mice, shared all features with some exacerbated lung lesions that we and others have observed in lungs of cattle naturally or experimentally infected with *M. bovis*. Together, our findings demonstrate the relevance of the C3HeB/FeJ mouse as a comprehensive model to study bTB immunopathology that could be used for further vaccine therapies in the future.

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), a chronic disease of cattle caused by *Mycobacterium bovis*, is a zoonosis that represents a significant economic animal health problem with a worldwide estimated prevalence of infection of 9% and an annual cost of 3 billions \$ [1–3].

French national control programs rely on fast and cost-effective diagnostic methods and mandatory slaughter of positive herds to control and eradicate the disease (WHO report, 2011) [4]. Thanks to such costly programs—highest budget line of the Department of Agriculture estimated around 30 millions €/year [5, 6]—maintaining a national prevalence below 0.1% is now achieved which identifies France as an Officially bTB Free country.

The eradication of the disease is complicated by the fact that *M. bovis* can infect a wide range of mammals and thus can establish reservoirs in wildlife, including badger in the UK, wild boar and deer in France and Spain

*Correspondence: mathieu.epardaud@inra.fr

†Florence Carreras and Christelle Rossignol contributed equally to this work

‡Nathalie Winter and Mathieu Epardaud contributed equally to this work

¹ INRA, Université de Tours, UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France

Full list of author information is available at the end of the article

and White-tailed deer in the US. All these species are involved in the spreading of infection to cattle [7]. Furthermore, recent results suggest that *M. bovis* is also able to persist within environmental samples in areas where infected cattle or wildlife were detected and eliminated [8]. These bTB features render eradication solely based on diagnosis and slaughter highly challenging.

Taken together these data point out the necessity to develop an effective vaccine with vaccine-compatible diagnosis tests to distinguish vaccinated from infected animals (DIVA) [9].

To fulfill this objective there is a need, first, to better characterize the cellular and molecular processes involved in bTB immune-pathogenesis and thus to focus on its hallmark: the granuloma. This organized and dynamic structure is known to be a key element in the transmission process as well as the host resistance to the disease [10, 11].

Granulomas are shaped by the structured aggregation of immune cells in cascade and are classically composed, at their mature stage, by macrophages, foamy and epithelioid, scattered multinucleated Langhans giant cells (MGCs) and neutrophils surrounded by a ring of lymphocytes coated by a collagen dense fibrotic capsule [10]. These structures have been largely documented in human TB (TB) and more scarcely in naturally or experimentally infected cattle and calves [12, 13]. The presence in bTB infected cattle granulomas of specific cell populations such as foamy macrophages, epithelioid cells, MGCs and neutrophils suggest that, similarly to the situation in humans, these cells drive the outcome of cattle immune response to *M. bovis* infection.

One additional critical step to consider in TB resistance relies on the granuloma encapsulation process. This mechanism involves the production of fibrotic, collagen rich, connective tissues around the granuloma, essential for controlling growth and spreading of mycobacteria.

Consequently, careful study of the composition and dynamics of the lesions could highlight fundamental host defenses mechanisms on which to base an efficient vaccine strategy. However conducting such analysis directly in cattle, the target species, would be ethically and economically unacceptable. By contrast, the use of small animal models represent a cost-effective means to evaluate the immunopathology process to further design vaccination strategies. To reach this goal, the C3HeB/FeJ mouse (Ipr1 deficient, also known as the Kramnik's mouse, [14, 15]) represents an attractive model because it recapitulates the essential hallmark of TB histopathology. The C3HeB/FeJ mice share a common origin with the C3H/HeJ mice, commonly called C3H, but don't carry their spontaneous TLR4 mutation (TLR4^{lps-d}) [16]. Following

infection with *M. tuberculosis*, C3HeB/FeJ develop typical granuloma i.e.: hypoxic, collagen encapsulated, caseous necrotic pulmonary lesions loaded with intracellular bacilli in the periphery and extracellular bacilli in the central necrotic core [17, 18]. On the contrary, classical TB resistant mouse models such as BALB/c or C57Bl/6 show limited features of TB physiopathology [19, 20]. The high susceptibility of C3HeB/FeJ mice to TB infection was associated with the identification of the “super-susceptibility to tuberculosis-1” (sst1) locus on chromosome 1. The sst1 allele was linked to the weak capacity to control TB multiplication and the occurrence of caseous necrotic lesions in the lung (reviewed in [21]). Further genetics investigations allowed the identification of the “intracellular pathogen resistance 1” (Ipr1), an isoform of the “interferon-inducible-75” gene (Ifi75), responsible for most of these features [21, 22].

To our knowledge, the outcome of *M. bovis* infection in the C3HeB/FeJ mouse strain has not been tested. Based on the description of its sensitivity to human TB, caused by *M. tuberculosis* strains, we made the hypothesis that the C3HeB/FeJ mouse strain could represent a relevant model for further in vivo studies of the bTB disease in cattle. However, this first required that we established that these mice could reproduce the main histopathological features of bTB development in cattle.

In the present study we showed that, following *M. bovis* intranasal infection, the C3HeB/FeJ mouse model recapitulated the classical granuloma found in the lung of cattle following aerogenous, natural or experimental, infection with *M. bovis*. Furthermore, we pointed out its capacity to alternatively develop early extended granulomatous lesions, with multicentric caseous necrotic core rich in neutrophils highly loaded with bacilli but inefficiently encapsulated, akin to the invasive necrotizing granuloma lesions described in the lung of cattle naturally and experimentally infected [23, 24]. Furthermore, using histopathology, these lesions could also be compared to some exacerbated lung lesions, recently described in naturally infected cattle [25]. Thus, the presence of these different types of lesions in the C3HeB/FeJ mouse model, following aerogenous infection with *M. bovis*, was clearly relevant to bovine TB physiopathology attesting the significance of this model.

Materials and methods

Bovine lung histology

Slides from PFA fixed and paraffin-embedded lung nodules from cattle naturally infected (Charolais breed, Côte d'Or, France) with *Mycobacterium bovis* were provided by Dorothée Virieux-Watrelet (VetAgroSup, Lyon, France) and subsequently processed in our laboratory for

haematoxylin and eosin (H&E) staining or Masson-Goldner's Trichrome (Goldner's Trichrome) staining following the same protocols as used for C3HeB/FeJ mice tissues (see below).

Ethics statement and mouse treatments

Experimental protocols complied with French law and EEC regulations for the care and use of laboratory animals and were carried out under Authorization for Experimentation on Laboratory Animals Number B-37-201. Our animal protocol (#2012-06-14) was approved by the "Val de Loire" Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA VdL) and was registered with the French National Committee for Animal Experimentation. C3HeB/FeJ mice, originally purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA), and C57BL/6 mice, originally purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France), were raised in our animal facility. Male and Female mice aged 6–8 weeks were housed in a bio-safety level III animal facility (PlateForme d'Infectiologie Experimentale: PFIE UE-1277 INRA Centre Val de Loire Nouzilly, France) and maintained with sterile bedding, water and mouse chow. Specific pathogen-free status was verified by testing sentinel mice housed within the colony.

Terminal end-point was determined by a weight loss of 15% or more of their pre-experimental body weight detected over a 2 day period and accompanied by other clinical signs comprising isolation, inactivity, hunched posture, very greasy and ruffled fur.

Bacteria

Mycobacterium bovis AF2122/97, a fully virulent strain isolated from lung caseous lesions of a tuberculin test reactor cow in Great Britain in 1997, has been entirely sequenced and its genome annotation recently updated and is the reference model for *M. bovis* for bovine TB investigation [26, 27]. Thus, the benchmark AF2122/97 strain was used for our intranasal infections of mice as previously described [28]. The bacteria were originally grown in 7H9 medium supplemented with 4.16 g/L pyruvic acid (Sigma), 10% v/v ADC (Becton–Dickinson) and 0.05% v/v Tween 80 (Sigma). Bacteria were harvested at mid-exponential growth phase and frozen at -80°C until use. CFU were counted after plating dilutions on Middlebrook 7H11 agar (Becton–Dickinson) supplemented with 4.16 g/L pyruvic acid (Sigma) and with OADC (ADC supplemented with 0.05% oleic acid, Becton–Dickinson).

Intranasal infection

C3HeB/FeJ mice were infected with *M. bovis* strain AF2122/97 following a protocol already settled on Balb/C mice by Logan et al. [28] and routinely used with *M.*

tuberculosis in our laboratory. Mice were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine/xylazine cocktail and received 200 CFU of *M. bovis* under 20 μL in each nostril. Five mice sacrificed the following day allow the evaluation of the number of CFU implanted in the lungs with an average of 134 bacteria on day one post-inoculation.

Enumeration of bacterial load of lungs and other tissues

At the time of sacrifice, whole lung, mediastinal lymph node, spleen and liver were aseptically removed and used for bacterial enumeration. The number of viable organisms was determined by plating serial dilutions of whole tissues disrupted with ceramic beads (Lysing Matrix D, MP Biomedicals Europe, Illkirch, France) in phosphate buffered saline (PBS), in a Ribolyser apparatus (Fastprep-24, MP Biomedicals), in accordance with the manufacturer's instructions. Appropriate dilutions were plated on 7H11 plates supplemented with 4.16 g/L pyruvic acid (Sigma) and with OADC (Becton–Dickinson). Colonies were counted after at least 21 days of incubation at 37°C .

Histopathology

At necropsy, whole lungs and mediastinal lymph node were transferred for fixation in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 48 h then dehydrated and kept in 70% ethanol before embedment in paraffin wax until being processed for histopathological assessment. Whole tissue representative series of 5 μm -thick tissue sections were mounted on glass slides, deparaffinized and stained either with: haematoxylin and eosin, Ziehl–Neelsen (ZN) for the detection of acid-fast bacilli (AFB) or Masson–Goldner's Trichrome for the detection of collagen.

Sections stained with H&E, ZN or Masson–Goldner's Trichrome were visualized using a Nikon Eclipse 80i microscope with DS-Ri2 camera controlled by the NIS-Elements D software package (Nikon, Instruments Inc., Tokyo, Japan).

Masson–Goldner's trichrome staining

Collagen was stained in mouse lung tissue sections using a Goldner's Trichrome with light green Kit (DiaPath, MM France, France) following the manufacturer's recommendations. Briefly, tissue sections were dewaxed with histosol and rehydrated through a graded alcohol series. Sections are briefly rinsed in water and slides are stained with Weigert's iron hematoxylin mix and washed in tap water and incubated with alcoholic picric acid. After washing in distilled water, sections are stained with Ponceau acid fuchsin and without washing the sections were covered by a phosphomolybdic acid solution and without washing the slides are drained and light green is added. Finally without washing the sections a quick dehydration in

ethanol and clearing in histosol (thermo electron, USA), the slides are mounted in Eukitt quick mounting medium (ORSATEC GNBH, Germany).

Immunohistochemical staining

Tissue sections were processed for immunohistochemical staining of neutrophils. Ag retrieval step was performed by autoclaving tissue sections in 10 mM citrate buffer pH 6.1 for 20 min at 121 °C. Endogenous peroxidase was inhibited using a 1:100 dilution of 30% hydrogen peroxide (Sigma) in methyl alcohol for 30 min at room temperature. Washing steps were performed with tap water. Nonspecific binding sites were blocked with a 20-min incubation in 20% normal goat serum and 30% FCS (GIBCO). Immunohistochemical (IHC) detection of neutrophils was performed using a purified rat anti-mouse Ly-6G Ab (Clone 1A8, IgG2a, #551459; BD Biosciences) at a final concentration of 1.25 µg/mL. Immunolabeling the sections by incubation with this primary Ab for 60 min at room temperature was followed by a 30-min incubation with the universal immunoperoxidase polymer, anti-mouse N-Histofine (N-Histophine Simple Stain MAX PO (M), Nichirei Biosciences, Microm Microtech France). Enzymatic activity was revealed using diaminobenzidine (LabVision). Each step was followed by washes with 1% BSA and 0.05% Tween 20 in PBS. Sections were counterstained with a Harris hematoxylin solution. Control staining was performed with the use of purified rat IgG2a isotype control Ab (#553927, BD Biosciences) in place of the primary Ab.

To visualize hypoxic regions in lung tissues, the pimonidazole immunohistochemical staining technique was used. Mice were injected i.p. with 60 mg/kg pimonidazole hydrochloride 1.5 h before sacrifice, and lungs and kidney were harvested, fixed, and stained with the Hypoxyprobe staining kit (Chemicon, Burlington, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. C3HeB/FeJ uninfected lung served as negative control while kidney sections containing hypoxic renal tubular cells served as positive control.

Histological lesion-type determination, morphometric analysis of the lesions and quantification of the Ziehl⁺ areas

For each individual animal ($n = 5$ to 8 per time point), a total of 8 H&E-stained slides representative of the whole lung were scanned on a 3DHISTECH scanner (Sis-mex). Representative slides for each mice were examined blindly by trained pathologists to determinate the type of lesions presents within the tissues.

H&E-stained slides (8 per animal) of all five lung lobes from individual animals were further quantified with Fiji software using an image J Macro that we developed [29].

The data were expressed as a ratio of lesion area to the total lung area (mean $\pm$ s.e.m.).

Ziehl-stained slides representatives of the total lung of each individual were quantified with Fiji software using an Image J Macro that we developed based on the high contrast of the mycobacteria staining. The data were expressed as a ratio of Ziehl⁺ area to the total lesion area (mean $\pm$ s.e.m.).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Correlation between bacterial load and percentage of total body weight loss was assessed by non-parametrical analysis applying the Spearman rank correlation (Spearman's correlation indexes: r and p value are provided).

Comparison analysis of the percentage of total body weight loss or percentage of total Ziehl⁺ area for groups of mice carrying different lesion-types were performed using the Mann–Whitney test.

Results

Histopathology of tuberculous lesions from bovine naturally infected with *Mycobacterium bovis*

In several reports of natural or experimental aerogenous *M. bovis* infection in cattle, histopathological analysis of lung lesions was carefully recorded. We decided to compile all these data in Table 1 (adapted from [23, 24]) to reveal the presence, in the target species, of different lesions types with heterogeneous characteristics.

In order to reinforce this bibliographic analysis, we also conducted an histopathological analysis in lungs sections from naturally infected cattle collected from *M. bovis* positive biopsies (Charolais breed, Côte d'Or, France) by H&E and Ziehl-staining (see representative sections of granuloma in Figure 1). Histopathological examination of the lung microscopic lesions revealed typical caseo-necrotic granulomas with central mineralization and peripheral fibrosis with nearby satellite smaller lesions (Figures 1A and B). This typical lesion represented a fully encapsulated tuberculous granuloma, as previously described (Table 1), characterized by a central necrotic core, caseous and mineralized (Figures 1A and B) surrounded by epithelioid and foamy macrophages and neutrophil clustering nearby the peripheral fibrotic capsule (Figures 1C and D).

Histological observations also revealed the presence of large and irregular lesions with multiple centers of caseous necrosis and sometimes mineralization (Figure 1E). These lesions displayed numerous islands of karyorrhectic debris with caseous necrosis and minimal mineralization surrounded by epithelioid macrophages and some multinucleated giant cells (Figures 1E, H and

Table 1 Histopathology of cattle lung lesions following aerogenous infection with *M. bovis*. Adapted from Rhyan and Saari [32]; Cassidy et al. [13, 14]; Menin et al. [33]

Histopathology of cattle lung lesions following aerogenous infection with <i>M. bovis</i>	Classical granuloma	Invasive necrotizing granuloma	Chronic lymphocytic « cuffing » pneumonia
Core			
Central caseous necrosis of neutrophil origin	+	++ Multifocal/invasive	Inflammatory cells infiltrate perivascular or close to the bronchioles
Extra-cellular bacilli within necrotic core	++	+++	
Mineralization	±	±	
Mantle			
Intact and degenerated neutrophils	++	+++	–
Macrophages (activated & foamy)	++	++	+
Epithelioid macrophages	++	++	+
Multinucleated giant cells (MGC)	++	+	–
Lymphocytes	+	+	+++
Cellular bacilli within macrophages and neutrophils	++	+++	ND
Periphery			
Fibrous encapsulation (Collagenous connective tissue)	+++	±	–
Time of first appearance (post-infection day) [13]	28 (Circumscribing fibrosis)	14 (Large, multifocal, numerous bacilli)	7
Bacterial load (CFU)	+	+++	±
Satellite aggregations: neutrophils intact or degenerated	+	++	–

I). Moreover, these lesions presented a limited degree of circumscribing fibrosis and only few scattered lymphocytes (Figures 1F and G). On the other hand they contained many neutrophils intact (scattered) or degenerated (small aggregates) (Figure 1H) and Ziehl staining of the karyorrhectic areas showed the numerous extra-cellular bacilli within the necrotic debris (Figure 1J). Moreover, careful examination of the necrotic areas indicated the neutrophil origin of the karyorrhectic debris. Thus these lesions displayed many similarities with those observed in the lung of *M. bovis* infected cattle after natural infections as reported by Menin et al. or experimental exposure as reported by Cassidy et al. [23, 25]. They were also similar to invasive necrotizing granulomas described by Rhyan and Saari [30] (Table 1). In agreement with these previous reports, we also propose that during bTB development in cattle, large multifocal caseous lesions are formed by aggregation of neutrophils around mycobacteria and their subsequent degeneration into necrotic cores, and that they are poorly encapsulated (Figures 1E–J).

Bacterial replication and associated morbidity in C3HeB/FeJ mice following intranasal infection with *M. bovis*

C3HeB/FeJ mice were intranasally infected with 200 colony-forming units (CFU) of *M. bovis* AF 2122/97 and followed for weight loss and morbidity symptoms until terminal endpoints. A regular window of mortality was observed between 4 and 5 weeks post-infection where

40 to 60% of total mice, depending on the experiments, had to be sacrificed due to extensive and rapid weight loss (>15% in 3 days) associated with morbidity symptoms (e.g. lethargy, ruffled fur) (Figure 2A). Mice that got through this critical period constantly survived at least 9 weeks (end point of our study) with no obvious or minimal clinical signs (Figure 2A). These observations of incidence of a group of early-mortality mice are consistent with previous results by Irwin and al. in C3HeB/FeJ mice infected with the *M. tuberculosis* Erdman strain [31]. As a comparison, C57BL/6 mice intranasally infected with 200 CFU of *M. bovis* AF 2122/97 didn't show any weight loss or any morbidity symptoms during the 9 weeks period (data not shown).

The survival curve of the C3HeB/FeJ mice following infection with its windows of early mortality coincides with the fast bacterial replication in the lung reaching a plateau of 8 log₁₀ CFU by 30 days post-inoculation (Figure 2B).

In order to investigate the critical early phase leading to morbidity in a number of mice, we compared pulmonary bacterial load with the percentage of total body weight loss of individual mice at the time of euthanasia between 3 and 5 weeks (Figure 2C). Total body weight loss significantly correlated with pulmonary bacterial load, thus providing a reliable parameter, in addition to morbidity symptoms to predict early disease severity (Spearman's correlation indexes: $r = 0.72$ and $p < 0.003$).

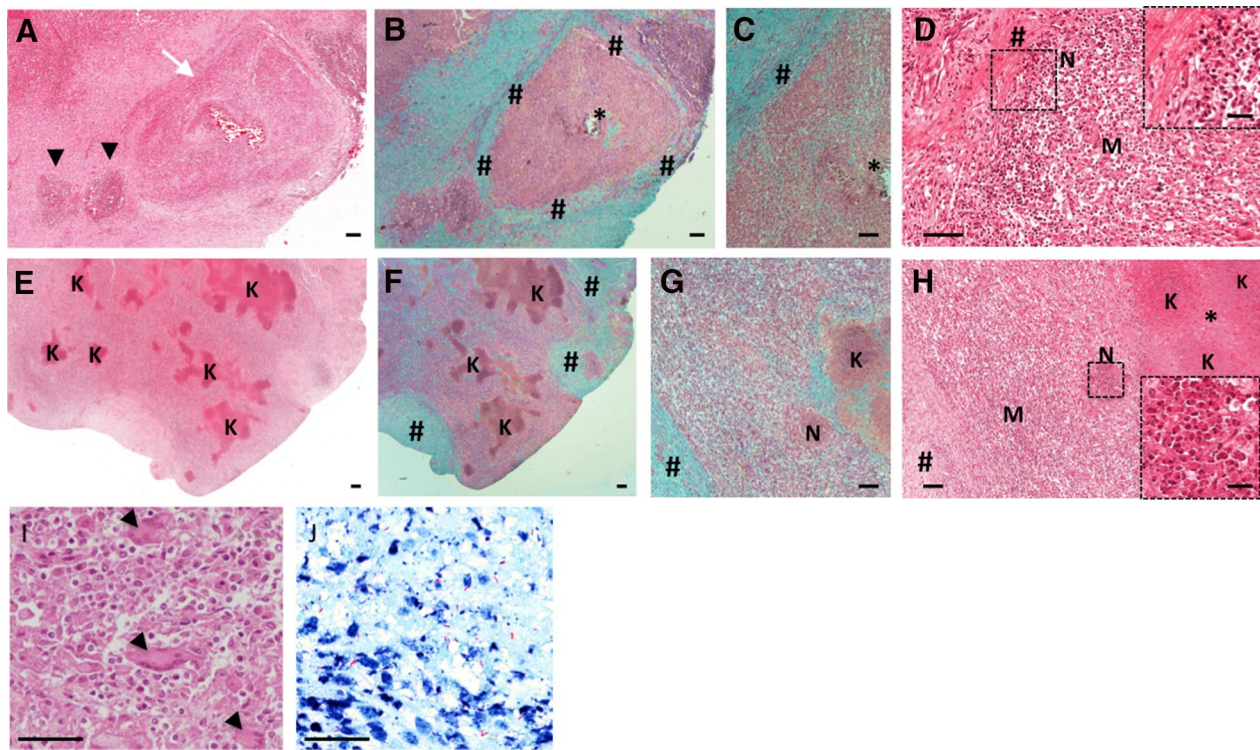


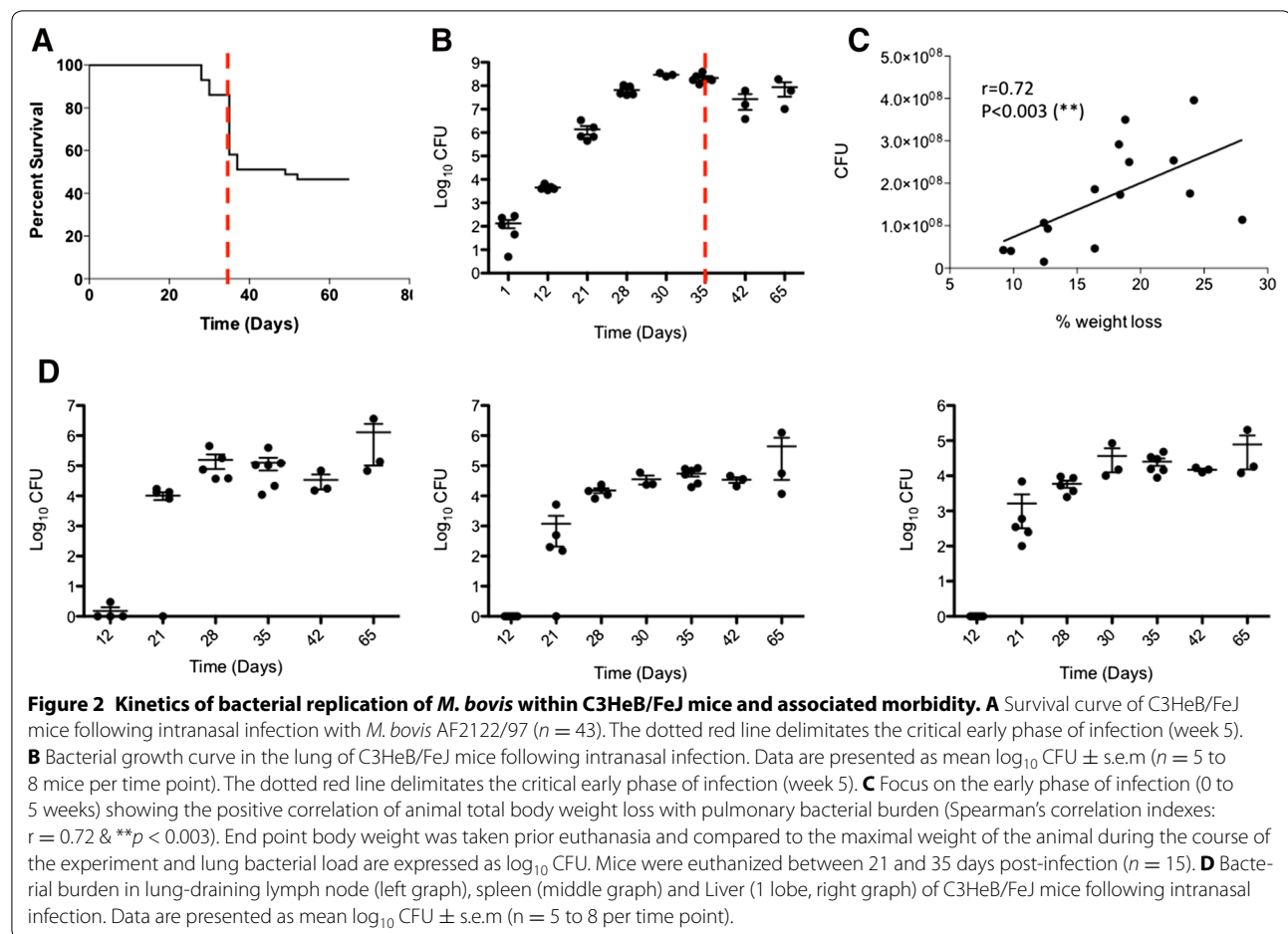
Figure 1 Lung lesion from cattle naturally infected with *M. bovis*. (A–B) H&E (A) and Masson-Goldner's Trichrome (B) staining of a typical tuberculous classical granuloma lesion (white arrow) with central mineralization and peripheral fibrous capsule surrounded by satellites smaller lesions (black arrows). *: caseous necrosis, #: fibrous capsule. C, D Higher magnification of A and B showing an intact neutrophil area ("N" & Zoom) below the fibrous capsule (#) interspersed by foamy and epithelioid macrophages ("M"). E, F H&E (E) and Masson-Goldner's Trichrome (F) staining of extended lesion with abundant caseous necrosis and karyorrhectic debris areas ("K") but low discontinuous fibrous capsule (#), representative of an invasive necrotizing granuloma. G, H Higher magnification of E&F showing an example of a satellite aggregate of necrotic neutrophil ("N", zoomed in (H)) next to the karyorrhectic debris ("K") and caseous necrotic rich area (*). I High magnification of a foamy macrophages and epithelioid cell dense area containing multinucleated Langhans giant cells (black arrows). J Ziehl staining, high magnification of a central necrotic area showing extracellular bacilli within cellular debris. Scale bars: 25 μ m (D-Zoom & H-Zoom); 50 μ m (I and J); 100 μ m (C, G, D, H); 200 μ m (A, B, E).

Next we studied the kinetics of disease progression and detected bacilli as early as 12 days post-infection within the tracheobronchial draining lymph nodes reaching around 6 log₁₀ CFU by 65 days post-inoculation (Figure 2D, left panel). By 21 days post-infection the bacilli started to spread to extra-pulmonary tissues such as spleen and liver reaching a plateau just below 5 log₁₀ CFU by day 35 (Figure 2D, middle panel) and 30 (Figure 2D, right panel), respectively. Similarly to the lung, the bacterial numbers in these tissues increased until 30–35 days post-inoculation tended to reach a plateau and then slightly increased by 65 days (Figure 2D).

Development of Type I, II and III pulmonary lesions by C3HeB/FeJ mice over the course of *M. bovis* infection

Systematic histopathological analysis of the whole lung of C3HeB/FeJ mice revealed lesions in various stages of development occurring simultaneously. Three distinct lesion types were clearly apparent by 5 weeks

post-infection in accordance with Irwin et al. classification [31]. Type I lesions (Figures 3A–C) corresponded to the classical encapsulated TB granulomas with a caseous necrotic core. Type I lesions resulted from the occlusion of alveolar spaces by a cellular infiltrate that evolved into an organized granuloma visible 5 weeks post-infection with a central accumulation of foamy macrophages and neutrophils surrounded by epithelioid macrophages interspersed by few lymphocytes while, in periphery, the fibrotic rim was not yet fully established (Figure 3A and Additional file 1A). After 6 weeks the neutrophil core increased with adjacent clusters of neutrophils, foamy and epithelioid macrophages while the periphery was composed of a rim of diffuse foamy macrophages underneath a rising fibrous capsule (Figure 3B and Additional file 1B). After 7–9 weeks Type I granulomas continued to extend without significant evolution of cellular composition but increased associated fibrosis from small collagen fibers to form a thick fibroblast-rich ring while the



neutrophilic core continued to degenerate into karyorrhectic debris and further caseous necrosis (Figure 3C). Later on, we observed cavitory lesions as described following *M. tuberculosis* infection [32].

Type II lesions appeared earlier than Type I, being clearly distinguishable 3 weeks post-inoculation, with a fast progression reaching a climax 5 weeks post-infection (Figures 3D–G). These rapidly progressive lesions started as a granulocytic pneumonia mostly composed of neutrophils emerging 3 weeks post-infection (Figure 3D and Additional file 1C). Type II lesions further quickly derived into invasive caseous necrotic pneumonia between 3 and 4 weeks post-inoculation (Figures 3E–F). At this point the lesion evolved with the emergence of very large multicentric caseous necrotic areas composed of cellular necrosis and karyorrhectic debris (mostly of neutrophil origin), but earlier and faster than Type I lesions (Figure 3G and Additional file 1D). Furthermore, as opposed to Type I lesions, Type II lesions did not include organized encapsulating fibrotic rim (Figure 3G).

Type III lesions were clearly visible from week 3 post-infection proximally to large blood vessels and bronchioles and were mostly composed of activated macrophages and lymphocytes with only few detectable neutrophils (Figure 3H and Additional file 1E). Between 4 and 5 weeks post-infection large numbers of epithelioid and foamy macrophages were visible interspersed with lymphocytes (Figures 3I and J, and Additional file 1F). Further, most of the macrophages observed in those pneumocytic lesions transformed into foamy macrophages, displaying numerous lipid vesicles and forming small cavities containing karyorrhectic debris (Figure 3K). Type III lesions corresponded to the cellular inflammatory “cuffy” pneumonia infiltrate typically observed in TB resistant mouse models, such as BALB/c and C57BL/6 following *M. tuberculosis* infection [19, 20]. In a similar way, C57BL/6 mice that were included in some of our experiments developed only Type III lesions during the course of infection following intranasal inoculation with 200 CFU of *M. bovis* AF 2122/97 (Additional file 2).

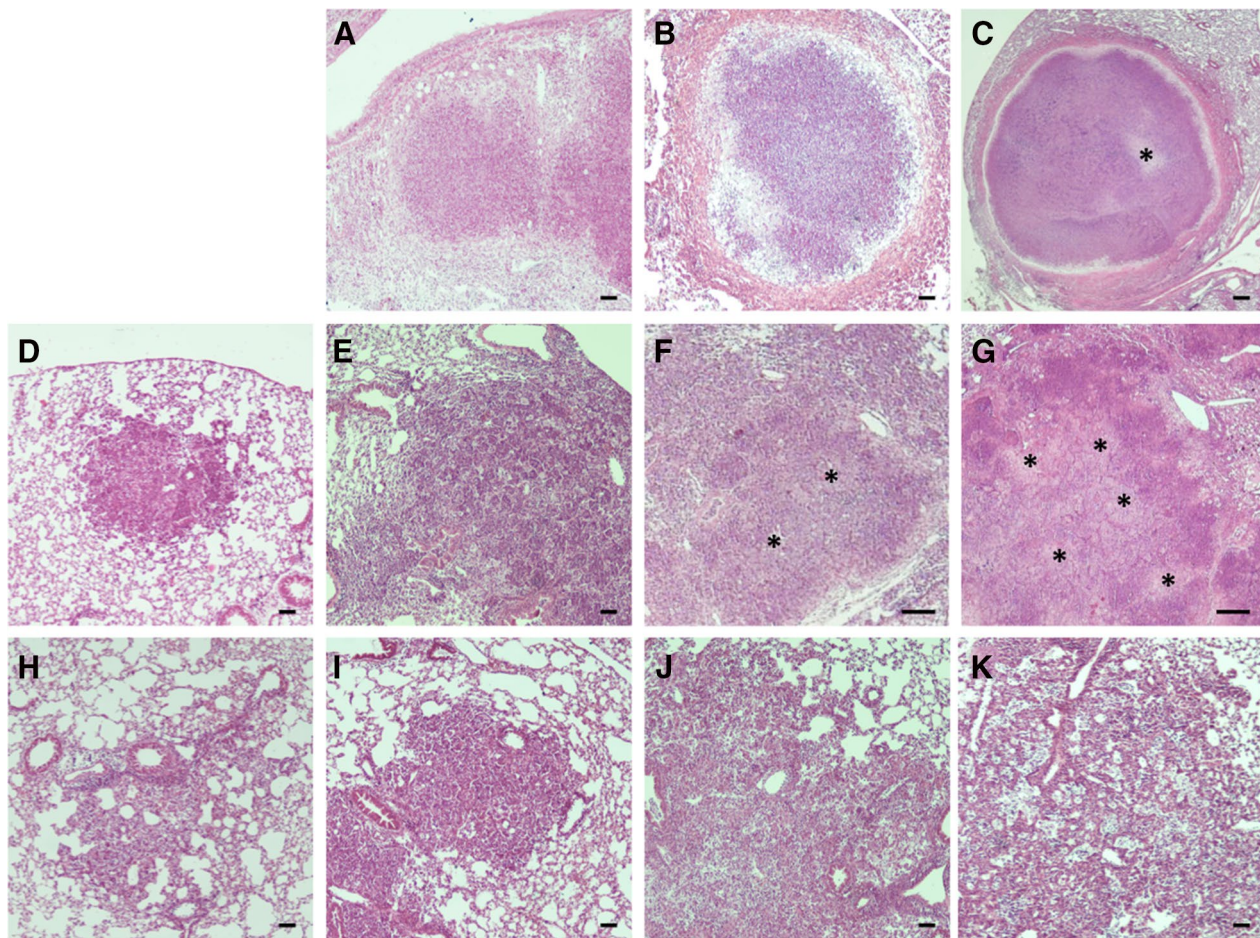


Figure 3 Development of Type I, II and III lesions in lung of C3HeB/FeJ mice over *M. bovis* course of infection. Each panel represents a lesion (H&E) obtained from individual representative C3HeB/FeJ mice euthanized at different time-points following *M. bovis* AF2122/97 intra-nasal infection. **A–C** Progression of Type I lesions from animals at day 35 (**A**), 42 (**B**) and 65 (**C**, “*”: caseous necrosis). **D–G** Progression of Type II lesions from animals at day 21 (**D**), 23 (**E**), 28 (**F**) and 37 (**G**, “*”: caseous necrosis). **H–K** Progression of Type III lesions from animals at day 21 (**H**), 28 (**I**), 42 (**J**) and 65 (**K**). Scale bars: 100 μ m (**A**, **B**; **D–K**); 200 μ m (**C**).

C3HeB/FeJ Type I pulmonary lesions recapitulate the features of cattle lung granuloma

Detailed examination of Type I pulmonary lesions in C3HeB/FeJ (Figure 4) highlighted their close resemblance to the classical lung granuloma observed in aerogenous, experimentally or naturally infected cattle (Figures 1A–D, Table 1). They were composed of a central acellular caseum, interspersed with karyorrhectic debris derived from necrotic neutrophils, surrounded by scattered intact neutrophils close to a rim of foamy macrophages underneath the fibrous capsule (Figures 4A–D). Mycobacteria staining confirmed the presence of numerous acellular bacilli within the necrotic central areas and intra-cellular bacilli mostly within foamy macrophages at the periphery (Figure 4E). Masson-Goldner’s Trichrome staining for collagen clearly highlighted the circumscribing fibrotic

rim while pimonidazole staining confirmed the presence of a characteristic hypoxic environment around and within these necrotic granulomas (Figures 4F–H), as previously described [21]. Furthermore, high magnification observation of the pulmonary lesions allowed the detection of typical multinucleated Langhans giant cells scattered within foamy macrophages dense areas as observed within cattle lesions (Figure 4I vs. Figure 1I).

Relevance of Type II and III C3HeB/FeJ lesions compared to cattle lesions

Type II lesions displayed multiple karyorrhectic areas of degenerating neutrophils in caseous necrotic ranges (Figures 5A–D) interspersed with foamy macrophages (Figure 5B). Besides a higher density of intact and degenerated neutrophils as compared to Type I lesions, Type

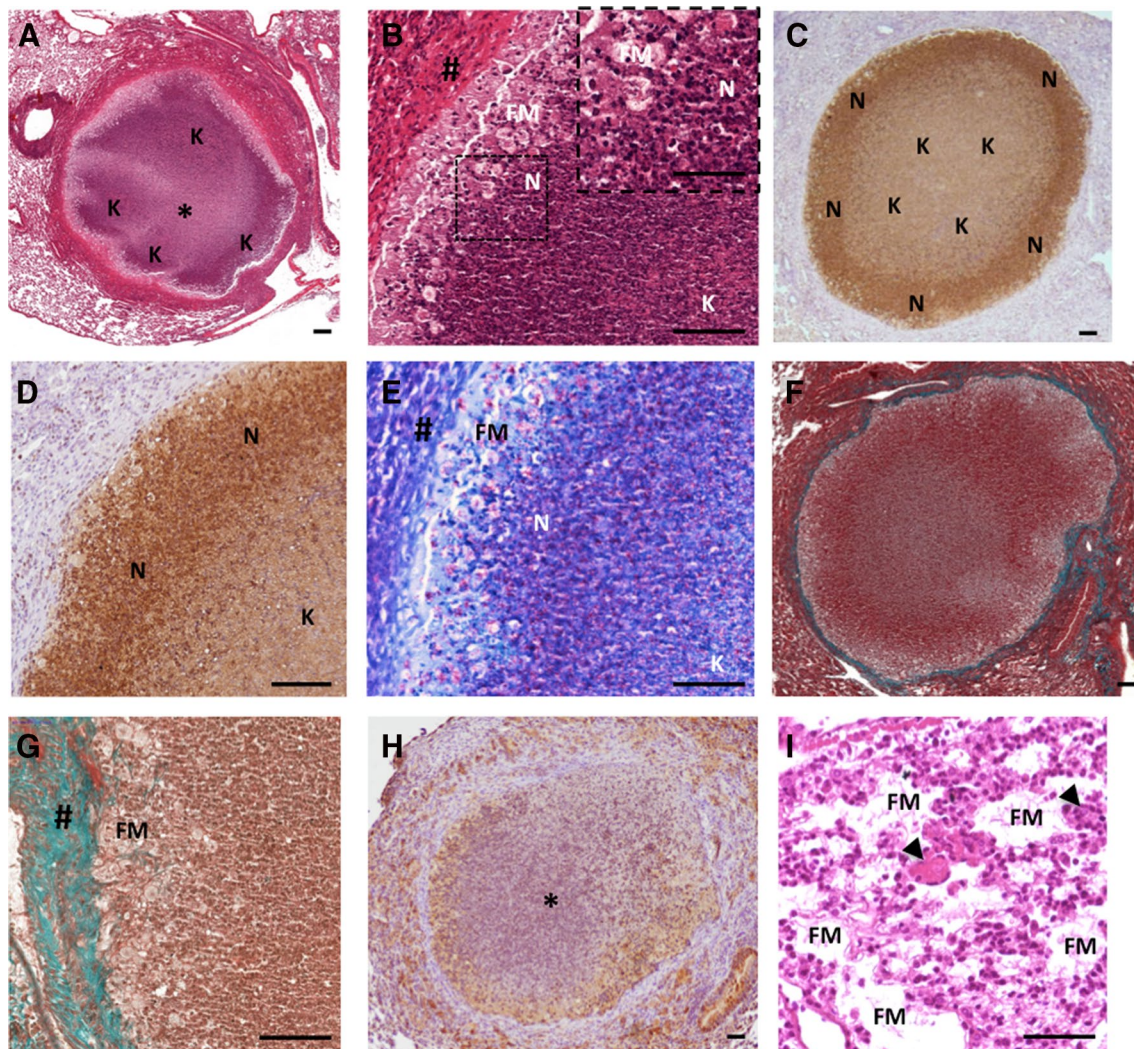


Figure 4 The C3HeB/FeJ Type I lesions recapitulates the features of the stage III/IV cattle granuloma lesions. **A** H&E staining of a Type I granuloma showing acellular caseum (*) surrounded by typical neutrophil-derived karyorrhetic debris areas ("K"). **B** Higher magnification of A showing a characteristic dark stained neutrophil dense area ("N" & Zoom) next to the foamy macrophages ring (FM) below the fibrous capsule (#). **C**, **D** Immunohistochemical staining with Ab against Ly-6G (clone 1A8) showing the high density of neutrophil within the subcapsular area ("N") and neutrophil-derived karyorrhetic debris within the core of the lesion area ("K"). **E** Ziehl staining of the same area as B showing peripheral cellular bacilli within foamy macrophages ("FM") and neutrophil ("N") and central acellular bacilli within the karyorrhetic debris ("K"). **F**, **G** Masson-Goldner's Trichrome staining showing the collagen capsule all around a Type I lesions (**F**). **G** Higher magnification of F showing the collagen staining among the fibroblast in top of a rime of foamy macrophages. # fibrous capsule, FM foamy macrophages. **H** Pimonidazole staining showing characteristic hypoxia within central necrotic granuloma (*) and its periphery. **I** H&E staining, high magnification of foamy macrophages ("FM") and epithelioid cell dense area containing multinucleated Langhans giant cells (black arrows). Scale bars: 50 µm (B-Zoom, I); 100 µm (A-H).

II lesions also exhibited low discontinuous fibrotic structure as shown by Masson-Goldner's Trichrome staining (Figure 5E). Strikingly, Ziehl staining within Type II lesions reveal an extensive bacterial load within the neutrophil multiple necrotic and caseous areas (Figure 5F), in accordance with the exacerbated lung lesions observed in asymptomatic cattle naturally or experimentally infected with *M. bovis* [23, 25]. Thus the rapidly growing Type II

lesions observed within lungs of C3HeB/FeJ following *M. bovis* infection shared all the features of the large multi-centric caseous lesions, described as invasive necrotizing granuloma [30], observed in cattle (Figures 1E–H, Table 1).

The Type III lesions, characterized by large perivascular and peribronchial areas of foamy macrophages and lymphocytes (scattered or in clusters) and few scattered

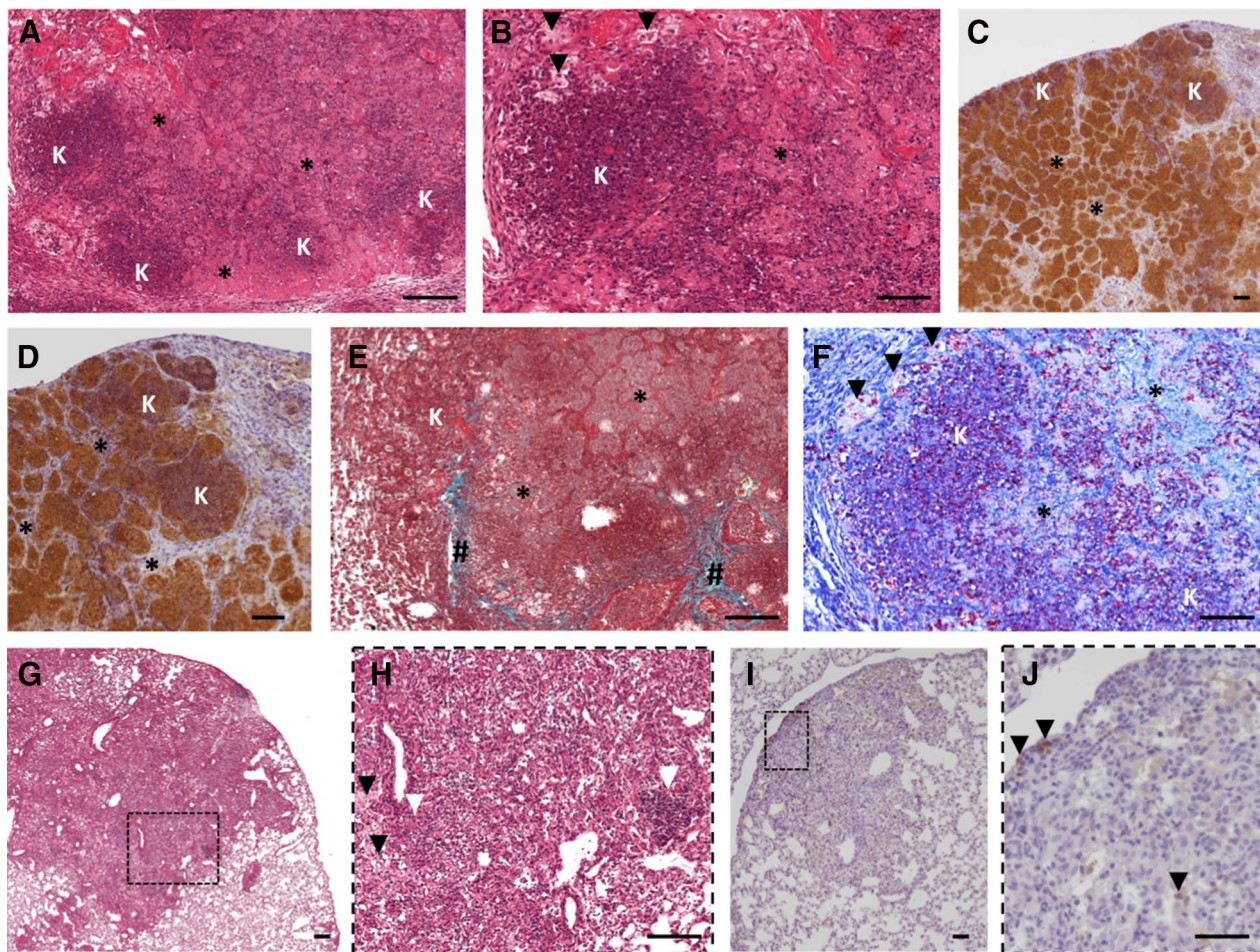


Figure 5 Characterization of Type II and Type III lesions. (A–F) Type II lesions. **A** H&E staining of a typical multicentric bubble shaped Type II lesion showing pulmonary acini totally occluded with neutrophils and karyorrhectic debris. “K”: karyorrhectic debris, “*” necrosis area. **B** Higher magnification of A showing necrosis areas (*) surrounded by neutrophilic karyorrhectic debris (“K”) interspersed by foamy macrophages (black arrows). **C, D** Immunohistochemical staining with Ab against Ly-6G (clone 1A8) showing the dense neutrophilic composition of the multicentric bubble shaped Type II lesion with aggregates of neutrophil-derived karyorrhectic debris (“K”). **E** Masson-Goldner’s Trichrome staining of the same area as A showing few scattered discontinuous fibrous capsule areas (#). **F** Ziehl staining of the same area as B showing dense acellular bacilli concentration within the karyorrhectic debris (“K”) and the necrotic areas (*) surrounded by bacilli-rich foamy macrophages (black arrows). **G–I** Type III lesions. **G, H** H&E staining of Type III lesions showing a characteristic perivascular and peribronchial inflammatory infiltrate, typical of a lymphocytic “cuffing” pneumonia, composed of foamy macrophages (black arrows) interspersed with epithelioid cells and a large number of lymphocytes scattered or in cluster (white arrow). **I, J** Immunohistochemical staining with Ab against Ly-6G (clone 1A8) showing the low representation of neutrophils within Type III lesion infiltrate (black arrows: neutrophils). Scale bars: 50 μ m (**B, F, G, J**); 100 μ m (**A, C, D, E, H, I**).

neutrophils (Figures 5G–J) were clearly reminding of chronic lymphocytic “cuffing” pneumonia, with low mycobacterial load, described within early pulmonary lesions in infected calves ([23, 24], Table 1).

Pulmonary lesion burden and heterogeneity following *M. bovis* infection in C3HeB/FeJ mice

Morphometric analysis of the total lung area occupied by lesions was performed using an Image-J macro on H&E-stained histological extensive sections of the total lung from individual C3HeB/FeJ collected between

week 1 and 9 ($n = 3–8$ mice per collecting time). First evidence of tuberculous lesions occurred 2 weeks after infection and rapidly increased between week 3 and 5 where it reached a peak with about 63% of the lung area affected before stabilizing with no significant increase further measured (Figure 6A). These data agreed with the bacterial load progression that we observed in the lung reaching a plateau between 4 and 5 weeks post-infection (Figure 2B) and the survival curve depicting only minor mortality occurring between week 5 and 9 (Figure 2A).

These combined data highlighted two orientations for the pathology in the lung of C3HeB/FeJ, as well represented by the survival curve (Figure 2A), with a critical early phase between weeks 4 and 5 where 40 to 60% mice (depending on the experiment) developed acute lethal pneumopathy while others followed a more progressive pathology with no obvious clinical signs until 9 weeks, the end-point of our study.

To complete this global lung lesion measurement we performed a systematic pathological analysis on scanned histological slides to quantify the global occurrence of each lesion type during the course of infection (see examples in Figure 6B). It is important to note that this histological analysis was influenced by the increased occurrence of mice reaching terminal endpoints between week 4 and 5. Nevertheless, the normalization of each lesion type percentage among total lung burden recapitulated the global histological development of the

pathology depicting again bimodal evolution with the rapid increase of the early Type II lesions followed by a stabilized pathology with more balanced between Type I and III lesions (Figure 6C).

Type II lesions are associated with a higher pulmonary bacterial load and body weight loss responsible for early mortality

Systematic histological observation of intra-mouse lung lesions heterogeneity throughout infection pointed out different patterns of lesion types repartition. Indeed development of Type II lesions, that rapidly spread within all the lung lobes, was quite exclusive in affected mice that rapidly succumbed, (Figure 6B middle panel and Figure 7B), while in surviving animals either a majority of Type III lesions (Figure 6B, down panel) or Type I lesions (Figure 6B, upper panel) or a mix of Type I and III lesions was observed (Figures 7A and C). These first

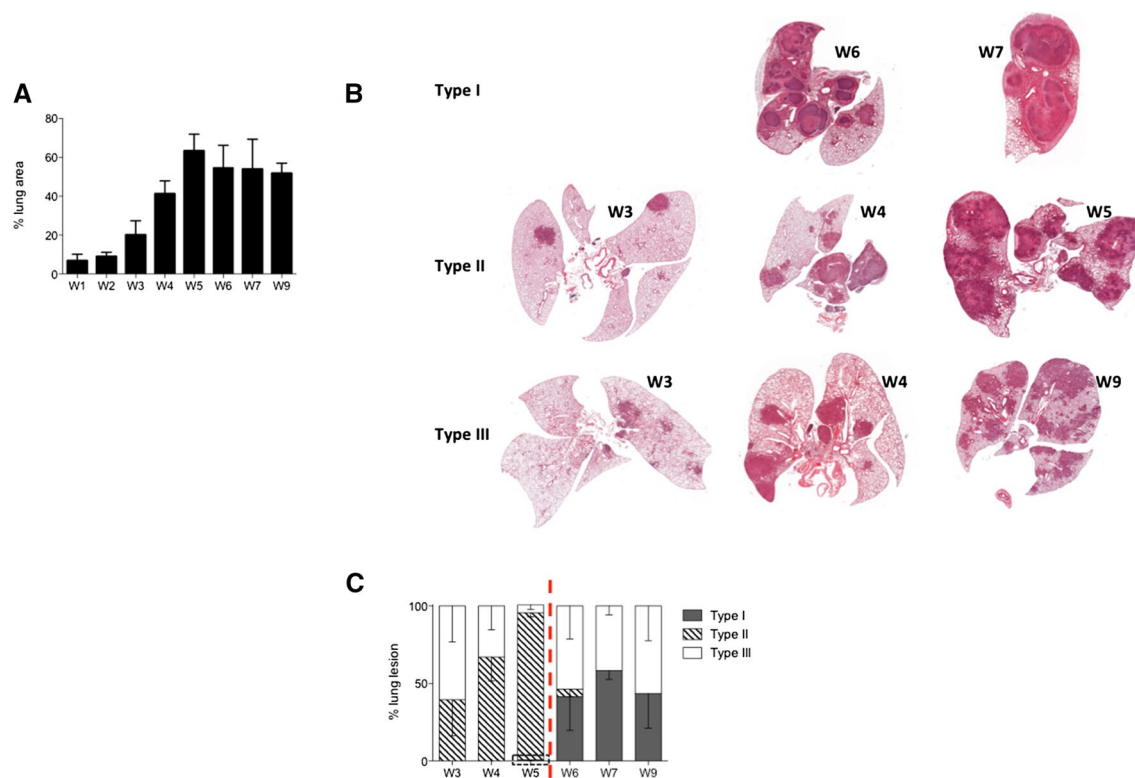


Figure 6 Progression of total lung lesion burden and Type heterogeneity following the course of *M. bovis* infection. **A** Morphometric analysis of the total lesion area performed on H&E-stained sections of the global lung (5 lobes) of mice following intranasal infection with *M. bovis*. Histograms represent the mean percentage of lesion area within the total lung $\pm$ s.e.m at 1 to 9 weeks post-infection ($n = 5$ to 8 mice per time point). **B** High resolution scanned slides of H&E stained lung from representative C3HeB/FeJ mice at different weeks post-infection (W3 to W9) showing the characteristic evolution of Type I (top images), Type II (middle images) and Type III (down images) lesions over the course of infection. **C** Histometric analysis of the relative percentage of each Type of lesion within the total lesion area performed on H&E-stained sections of the global lung (5 lobes) of mice following intranasal infection with *M. bovis*. Histograms represent the mean percentage of each lesion Type over the total percentage (100%) of lesion area $\pm$ s.e.m at 1 to 9 weeks post-infection ($n = 5$ to 8 mice per time point). The dotted rectangle indicate the presence, at a low rate (0.7%), of emerging Type I lesions as soon as 5 weeks post-infection. The dotted red line delimitates the critical early phase of infection (week 5).

observations were confirmed by the quantification by histometrical analysis of the percentage of each Type of lesions within the total lesion area during the course of infection (Figure 6C). Therefore, these data reinforced the concept of a dichotomy in the pathology with some mice exclusively drawn into the fast and deleterious Type II pathway while others followed a more progressive evolution with Type I and Type III lesions. In addition, this result was supported by combining, for each individual mice, the full-body weight loss data with the lesion types. This showed a statistically significant positive correlation between weight loss and the presence of Type II lesions (Figure 7D). Detailed and quantified analysis of the Ziehl-stained histological lung sections highlighted the higher density of bacilli present within Type II lesions (illustrated in Figure 7E) and further confirmed the positive correlation between pulmonary bacterial load and the occurrence of Type II lesions (Figure 7F).

By linking those data with the CFU vs weight loss significant correlation observed during the early phase (Figure 2C) we could clearly state that Type II lesions development was responsible for the early mortality,

occurring between Weeks 4 and 5 following infection, in a significant percentage of the infected mice (Figure 2A).

Discussion

This study, which represents the first characterization of the response of the C3HeB/FeJ mouse model to *M. bovis* infection, clearly establish the potential of the Kramnik's mouse model to closely replicate the specific hallmarks of bTB in the natural target species: the cow [22]. Indeed our results show that, following intranasal infection with *M. bovis*, C3HeB/FeJ mice reproduce the histopathology that we and others observed in the lungs of naturally or experimentally infected cattle (Figure 1, Table 1 [23–25]).

Moreover, we clearly distinguished three different types of lesions developing in the lungs of C3HeB/FeJ following *M. bovis* (AF2122/97) infection, in accordance with the recent work from Irwin et al. with *M. tuberculosis* (Erdman) [31].

Type I lesions are clearly share all the features of the classical granuloma reported in the lungs of naturally and experimentally infected cattle (Table 1).

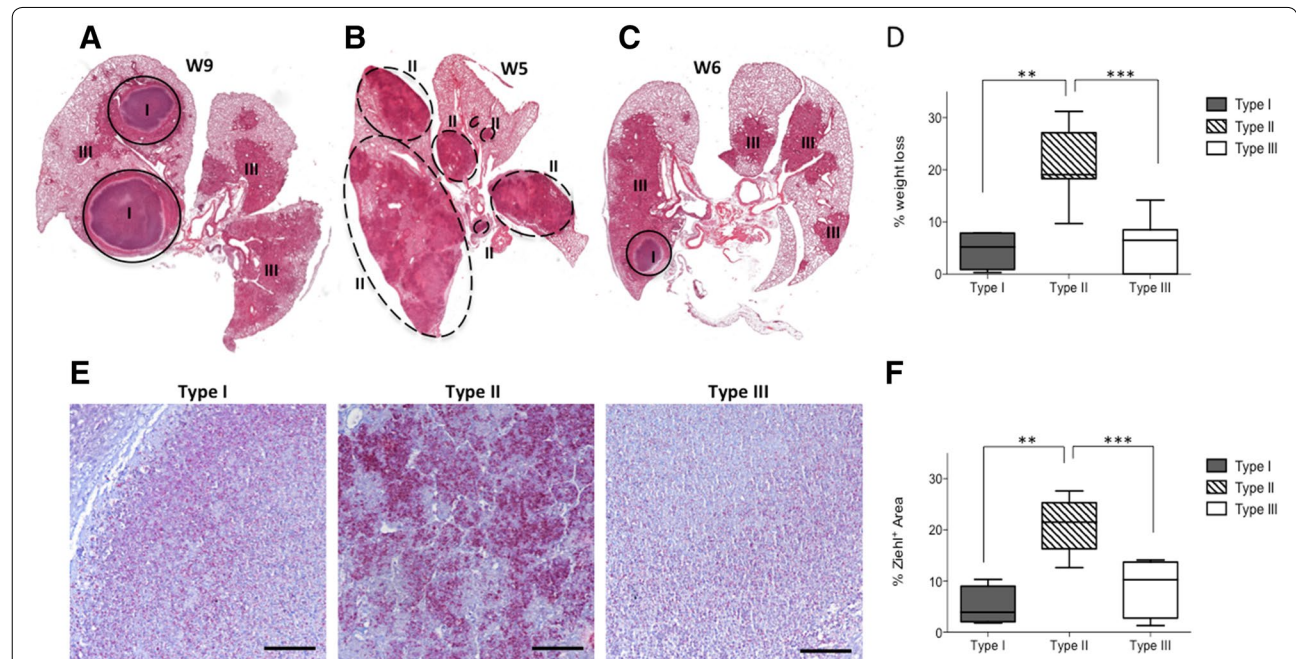


Figure 7 Type II lesions are associated with a higher pulmonary bacterial load inducing body weight loss and early mortality. A–C

High resolution scanned slides of H&E stained lung from representative individual C3HeB/FeJ mice showing the intra-mouse lung lesions heterogeneity following infection. **A** Total lung showing typical Type I and Type III lesions at 9 weeks post-infection. **B** Total lung lobes showing only Type II lesions at 5 weeks post-infection. **C** Total lung lobes showing the presence of Type III and Type I lesions at 6 weeks post-infection. **D** Link between total body weight loss and Type of lesions present in the lung of the mice following infection. Analysis was conducted all over the course of infection (Between weeks 3 and 9) considering the most represented Type of lesion within the total lung of each individual ($n = 26$). Statistical comparison performed using Mann–Whitney's test. ** $p = 0.005$, *** $p = 0.0001$ **E** Representative Ziehl staining of advanced Type I, II & III lung lesions showing the bacterial density and repartition. Scale bars: 100 µm. **F** Link between bacterial density (% of Ziehl positive area) and Type of lesions present in the lung of the mice following infection. Analysis was conducted all over the course of infection (Between weeks 3 and 9) considering representative lesions from individual mice ($n = 23$). Statistical comparison was performed using Mann–Whitney's test. ** $p = 0.005$, *** $p = 0.0001$.

Type II lesions represent rapidly progressive granulocytic pneumonia compromising the survival of the mice. Even though these lesions share features with Type I lesions, they quickly evolve in multicentric necrotic lesions composed of degenerated neutrophils. More importantly, Type II lesions do not develop an efficient granuloma encapsulation process with only rare and scattered fibrotic areas. Moreover, Type II lesions are characterized by a cellular composition strongly oriented towards neutrophils and display the highest bacilli loads. All these histopathological features are reminiscent of the invasive necrotizing granulomas also reported in the lung of cattle naturally and experimentally infected (Table 1). However these type of lesions were found in the lung of asymptomatic cattle following natural infection with *M. bovis*, without any report of impact on weight loss or survival [25], which differs from the mouse model.

Type III lesions represent typical inflammatory “cuffing” pneumonia infiltrates similar to the one observed following *M. tuberculosis* inoculation in TB resistant mouse models such as BALB/c and C57BL/6 [19, 20]. Neutrophils are extremely rare and the amount of bacteria detected in Type III lesions is low. All these features are in accordance with the chronic lymphocytic “cuffing” pneumonia reported in the lung of cattle naturally and experimentally infected (Table 1).

The rapid arising of Types II lesions occurring in 40 to 60% of the C3HeB/FeJ, is responsible of a striking phenomenon of early mortality. This terminal endpoint was also reported by Irwin et al. after *M. tuberculosis* infection, but in lower percentage of mice (20 to 40%) [31]. This notable difference is in accordance with several reports pointing out the higher “virulence” (i.e. bacterial burden and/or mortality) of *M. bovis* vs *M. tuberculosis* following experimental infection in several mouse models or rabbits ([33, 34]).

One critical aspect of the histopathology of *M. bovis* infection in C3HeB/FeJ mice resides in the key role of neutrophils in the orientation, organization and dynamics of the lesions. Indeed the severity of the lesions correlates with the amount of neutrophils as already described by Major et al. in CBA/J mice following *M. tuberculosis* infection. This similar bimodal evolution of the pathology was reported in CBA/J mice before it was spotted by Irwin et al. in C3HeB/FeJ mice, and Niazi et al. in Diversity Outbred mice, all in the context of *M. tuberculosis* infection [31, 35, 36]. Moreover Marzo et al. realized a detailed demonstration of the damaging role of the neutrophil infiltration within the C3HeB/FeJ mouse model following high dose of *M. tuberculosis* infection [37]. Therefore, it clearly appears that mice susceptible to TB, as reported by others, and also to bTB, as our data illustrate, develop highly neutrophil-oriented lesions.

Strikingly, the localization pattern of neutrophils and mycobacteria, as observed by staining of the lesions, seems really similar with a high density of neutrophils and mycobacteria in the periphery of Type I lesions (Figures 4D and E) and a global higher density with numerous patch rich in neutrophil and mycobacteria within Type II lesions (Figures 5D and F). Moreover the positive correlation between neutrophil counts in lung lesions and bacterial load was also reported in cattle naturally infected with *M. bovis* by the aerogenous way, with a higher abundance of those cells within lesions similar to Type II ([25], Table 1). Our observations on naturally infected cattle also supported these reports, even though we did not quantify neutrophils, either intact or degenerated. Taken together those data clearly reinforce the concept of a detrimental role of neutrophils in the course of TB infection in cattle. Actually this concept, also reported in the human pathology, is now even considered as a potential leverage for human TB therapy [16]. Moreover they strongly support the biological relevance of the Type II lesions occurring following early events at the host-bacteria interface and not related to some experimental bias of the C3HeB/FeJ model as previously hypothesized [31].

It is likely that the role of neutrophils during bTB has been underestimated. The stage of evolution of bovine granuloma, as settled by Wangoo et al. depicts a minimal representation of neutrophils within the dynamic organization of lymph nodes lesions [38]. Interestingly, other reports examining lung lesions from (i) experimentally intranasally infected [23], (ii) infected by experimental contact with reactors [24], or (iii) naturally infected cattle herds [30, 25], all highlight the importance of the neutrophil infiltrate and degeneration in the lung compartment participating in the formation of the necrotic core [23], as we observed in the C3HeB/FeJ mouse model. Furthermore, Menin et al. in their study of 247 naturally *M. bovis*-infected cattle also established a strong positive correlate between lung bacterial load, lesion severity score and neutrophil abundance, while the level of encapsulation negatively correlated with the severity score [25]. These data in cattle fully agree with our results in the C3HeB/FeJ model with the same parameters distinguishing Type I from Type II lesions. Moreover, several reports from lung lesions collected on free-ranging wildlife support the importance of neutrophils in the pulmonary pathology with their abundance within necrotic lesions in elk/red deer and fallow deer while they remain more sparse in lymph nodes [30]. Likewise, a study on naturally infected badgers also reported the presence of lung lesions strikingly remaining of the invasive necrotizing granulomas within cattle (Table 1) and the Type II lesions that we observed in the C3HeB/FeJ [39].

All these elements are clearly in favor of a potential specificity of the lung environment compared to the lymph nodes regarding the role of the neutrophils in the development of the tuberculous lesions.

To conclude, we report here that the C3HeB/FeJ mouse model recapitulates the histopathological features of bTB following aerogenous *M. bovis* infection. Assuming the biological relevance of this type of lesions resembling those observed in cattle and wildlife, we suggest placing Irwin et al. classification, especially regarding the dichotomy between Type I and type II lesions, in the dynamics context of the lung lesions development. In this manner, early events within the alveolar compartment that control the level of neutrophil recruitment, the level of fibrotic encapsulation and the bacterial burden might further lead to either invasive or controlled lesions. In this context the C3HeB/FeJ mouse represents a relevant model for bTB pathophysiology and also shows promises for the preclinical development of vaccine strategies for cattle, which are in deep need if we want to efficiently control this worldwide zoonosis.

Additional files

Additional file 1. Immunohistochemical staining of neutrophils using Ab against Ly-6G (clone 1A8) on C3HeB/FeJ lung lesions.

(A–B) Type I lesions. (C–D) Type II lesions. (E–F) Type III lesions, black arrow indicates scattered neutrophils. Scale bars: 50 µm (C, E); 100 µm (A, B, D, F).

Additional file 2. H&E staining of lesions within lungs of C57BL/6 mice: 5 weeks (A) and 7 weeks (B) following intranasal infection with 200 CFU of *M. bovis* AF 2122/97.

Lesions are typical of Type III with a characteristic perivascular and peribronchial inflammatory infiltrate mostly composed of lymphocytes interspersed with foamy macrophages. Scale bars: 100 µm.

Abbreviations

bTB: bovine tuberculosis; DIVA: distinguish vaccinated from infected animals; TB: tuberculosis; MGC: multinucleated Langhans giant cell; H&E: haematoxylin and eosin; AFB: acid-fast bacilli; ZN: Ziehl–Neelsen; CFU: colony forming units.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NW and ME conceived the study. NW helped with the revision of the manuscript. ME conceived and designed the experiments, performed most experiments, analyzed the data and wrote the article. MB performed experiments and analyzed some data. FC and CR perform experiments and helped analyzing some data. ED helped performing some experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr Patricia Berthon for providing her precious expertise in histopathology. We thank Dr Phil Hogarth for the gift of the *M. bovis* strain AF2122/97. We thank Dr Maria Laura Boschioli from ANSES Maison Alfort and Dr Dorothee Virieux-Waterlot from VetAgro Sup Lyon for providing us with the cattle tuberculous lesion slides. We warmly thank the PlateForme d'Infectiologie Experimentale mouse facility: Corinne Beauge, Lorine Branger, Marine Chahnamian and Emilie Lortscher from the INRA Val de Loire Center for their expertise and kindness. We thank Abdelhak Boukadiri and his colleagues

from the Plateforme @BRIDGE, UMR GABI, INRA de Jouy-en-Josas, for the slides scans. We would like to express our gratitude to Dr Franck Biet for critical discussions and advices.

Funding

This work was partially funded by the Department of Agriculture and Food (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, DGAL): "RFSA project: *M. Bovis*" #2017-325 (04-09-2017).

Author details

¹ INRA, Université de Tours, UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France. ² Present Address: U1019, UMR8204, Université Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 21 July 2017 Accepted: 13 October 2017

Published online: 07 November 2017

References

- Muller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, Parsons SD, van Helden PD, Zinsstag J (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 19:899–908
- Waters WR, Palmer MV, Buddle BM, Vordermeier HM (2012) Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30:2611–2622
- Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B (2016) Bovine tuberculosis in cattle: vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. *Annu Rev Anim Biosci* 4:87–109
- World Health Organization (2011) Global tuberculosis control: WHO report 2011. World Health Organization, Geneva
- Fediaevsky A, Dufour B, Boschioli ML, Moutou F (2009) Bilan de la surveillance de la tuberculose bovine en 2009: une prévalence globalement faible mais un renforcement de la lutte dans certaines zones. *ANSES Bull Epidemiol* 40:1–9 (in French)
- Fediaevsky A, Bénet JJ, Boschioli ML, Rivière J, Hars J (2011) La tuberculose bovine en France en 2011, poursuite de la réduction du nombre de foyers. *ANSES Bull Epidemiol* 54:4–12 (in French)
- de Lisle GW, Bengis RG, Schmitt SM, O'Brien DJ (2002) Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev Sci Tech* 21:317–334
- Barbier E, Boschioli ML, Gueneau E, Rochelet M, Payne A, de Cruz K, Bliuex AL, Fossot C, Hartmann A (2016) First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis. *J Appl Microbiol* 120:1193–1207
- Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG (2016) Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 181:10–14
- Ramakrishnan L (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Rev Immunol* 12:352–366
- Matty MA, Roca FJ, Cronan MR, Tobin DM (2015) Adventures within the speckled band: heterogeneity, angiogenesis, and balanced inflammation in the tuberculous granuloma. *Immunol Rev* 264:276–287
- Canetti G (1955) The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man; histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis. Springer, New York
- Palmer MV, Waters WR, Thacker TC (2007) Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol* 44:863–874
- Kramnik I, Demant P, Bloom BB (1998) Susceptibility to tuberculosis as a complex genetic trait: analysis using recombinant congenic strains of mice. *Novartis Found Symp* 217:120–131 (discussion 132–127)
- Kramnik I, Dietrich WF, Demant P, Bloom BR (2000) Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8560–8565

16. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615–625
17. Harper J, Skerry C, Davis SL, Tasneen R, Weir M, Kramnik I, Bishai WR, Pomper MG, Nuermberger EL, Jain SK (2012) Mouse model of necrotic tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions. *J Infect Dis* 205:595–602
18. Lanoix JP, Lenaerts AJ, Nuermberger EL (2015) Heterogeneous disease progression and treatment response in a C3HeB/FeJ mouse model of tuberculosis. *Dis Models Mech* 8:603–610
19. Hoff DR, Ryan GJ, Driver ER, Ssemakulu CC, De Groote MA, Basaraba RJ, Lenaerts AJ (2011) Location of intra- and extracellular *M. tuberculosis* populations in lungs of mice and guinea pigs during disease progression and after drug treatment. *PLoS One* 6:e17550
20. Rhoades ER, Frank AA, Orme IM (1997) Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 78:57–66
21. Kramnik I (2008) Genetic dissection of host resistance to *Mycobacterium tuberculosis*: the sst1 locus and the lpr1 gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 321:123–148
22. Kramnik I, Beamer G (2016) Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. *Semin Immunopathol* 38:221–237
23. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD (1998) Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol* 119:27–44
24. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD (1999) Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *J Comp Pathol* 121:321–337
25. Menin A, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, Pilati C, Bafica A (2013) Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS One* 8:e53884
26. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7877–7882
27. Malone KM, Farrell D, Stuber TP, Schubert OT, Aebersold R, Robbe-Austerman S, Gordon SV (2017) Updated reference genome sequence and annotation of *Mycobacterium bovis* AF2122/97. *Genome Announc* 5:e00157–e00617
28. Logan KE, Gavner-Widen D, Hewinson RG, Hogarth PJ (2008) Development of a *Mycobacterium bovis* intranasal challenge model in mice. *Tuberculosis* 88:437–443
29. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
30. Rhyan JC, Saari DA (1995) A comparative study of the histopathologic features of bovine tuberculosis in cattle, fallow deer (*Dama dama*), sika deer (*Cervus nippon*), and red deer and elk (*Cervus elaphus*). *Vet Pathol* 32:215–220
31. Irwin SM, Driver E, Lyon E, Schrupp C, Ryan G, Gonzalez-Juarrero M, Basaraba RJ, Nuermberger EL, Lenaerts AJ (2015) Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Dis Model Mech* 8:591–602
32. Ordóñez AA, Tasneen R, Pokkali S, Xu Z, Converse PJ, Klunk MH, Mollura DJ, Nuermberger EL, Jain SK (2016) Mouse model of pulmonary cavity tuberculosis and expression of matrix metalloproteinase-9. *Dis Model Mech* 9:779–788
33. Dunn PL, North RJ (1995) Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect Immun* 63:3428–3437
34. Nedeltchev GG, Raghunand TR, Jassal MS, Lun S, Cheng QJ, Bishai WR (2009) Extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* but not *Mycobacterium tuberculosis* in a bronchoscopic rabbit model of cavity tuberculosis. *Infect Immun* 77:598–603
35. Major S, Turner J, Beamer G (2013) Tuberculosis in CBA/J mice. *Vet Pathol* 50:1016–1021
36. Niazi MK, Dhulekar N, Schmidt D, Major S, Cooper R, Abeijon C, Gatti DM, Kramnik I, Yener B, Gurcan M, Beamer G (2015) Lung necrosis and neutrophils reflect common pathways of susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in genetically diverse, immune-competent mice. *Dis Model Mech* 8:1141–1153
37. Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona PJ (2014) Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis* 94:55–64
38. Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackbar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M (2005) Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J Comp Pathol* 133:223–234
39. Canfield PJ, Day MJ, Gavner-Widen D, Hewinson RG, Chambers MA (2002) Immunohistochemical characterization of tuberculous and non-tuberculous lesions in naturally infected European badgers (*Meles meles*). *J Comp Pathol* 126:254–264

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

