

Identification, caractérisation et validation de biomarqueurs liés à l'immunothérapie allergénique

Noémie Caillot

▶ **To cite this version:**

Noémie Caillot. Identification, caractérisation et validation de biomarqueurs liés à l'immunothérapie allergénique. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. ⟨NNT : 2015PA114805⟩. ⟨tel-01249572⟩

HAL Id: tel-01249572

https://theses.hal.science/tel-01249572v1

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : Immunologie

ANNÉE 2014 - 2015 SÉRIE DOCTORAT N° 1321

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 16/01/2015

par

Noémie CAILLOT

Identification, caractérisation et validation de biomarqueurs liés à l'immunothérapie allergénique

Directrice de thèse :	Sylvie CHOLLET-MARTIN	PU-PH, Université Paris-Sud 11
Co-directeur de thèse :	Vincent LOMBARDI	Responsable Immunomonitoring, Stallergenes

Composition du jury :

Rapportrices :	Julia CHAMOT-ROOKE	DR-CNRS, Institut Pasteur, Paris
	Valérie VERHASSELT	DR-INSERM, Hôpital de l'Archet 1, Nice
Examinateurs :	Michel AUBIER	PU-PH, AP-HP Bichat, Paris
	Antoine MAGNAN	PU-PH, Institut du thorax, Nantes

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont adressés à Philippe Moingeon et Véronique Bodo, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du département de recherche et développement pharmaceutique de Stallergenes.

Philippe, je vous remercie de m'avoir accueillie au laboratoire, de m'avoir offert la possibilité d'approfondir mes connaissances en immunologie, et de m'avoir fait confiance pour présenter les résultats sur un projet si stimulant lors de congrès internationaux. Merci également pour vos conseils et votre investissement pour m'aider à constamment améliorer ma rédaction scientifique. Je remercie Véronique Bodo pour son attention particulière apportée à mes travaux, ses avis toujours constructifs et sa disponibilité pour répondre à mes questions liées au projet Biomarqueurs. Je tiens aussi à remercier Vincent Lombardi, pour son soutien permanent, ses conseils et encouragements tout au long du projet. Merci de m'avoir initiée à l'expérimentation animale, et également de m'avoir si bien coachée pour présenter mes résultats en congrès. Je suis également reconnaissante du temps et du travail consacré aux relectures de ma thèse.

Mes remerciements sont également adressés à Sylvie Chollet-Martin, pour avoir accepté de diriger mes travaux, pour son appui scientifique et ses conseils avisés, en particulier à la fin de ma thèse.

J'exprime toute ma gratitude envers les membres du jury, pour me faire l'honneur d'évaluer mes travaux. Je remercie ainsi Julia Chamot-Rooke et Valérie Verhasselt pour leur investissement en tant que rapportrices et Michel Aubier et Antoine Magnan pour avoir accepté d'être les examinateurs de mon travail.

Je suis sincèrement reconnaissante envers Julien Bouley, aux côtés duquel j'ai énormément appris et grâce à qui mon projet a si bien avancé. Les premiers résultats que nous avons obtenus m'ont permis d'explorer de nombreuses pistes, j'ai conscience de te devoir énormément. Ton expertise et ton aide m'ont été très précieuses tout au long de ma thèse. Je remercie aussi les membres de l'équipe Immunomonitoring, toujours prêts à m'aider dans les manips. « Cousin » Stéphane, merci beaucoup de m'avoir déchargée à de nombreuses reprises. Merci également à Hélène pour son aide à mes débuts dans le labo d'immuno, et à Sonia pour avoir pris en charge le « bébé fétuine-A » à la fin de ma thèse. Je salue également l'équipe de recherche UPRES de

l'Hôpital Foch pour leur intérêt et leur investissement dans le projet. En particulier, merci au professeur Philippe Devillier et à Marion Brollo.

J'exprime aussi mes remerciements à Emmanuel Nony, responsable de la plateforme de protéomique. Merci Emmanuel de m'avoir si bien intégrée à l'équipe à mes débuts, et pour tes nombreux conseils. J'ai aussi eu la chance de travailler aux côtés de Karine, Maxime, Sébastien, merci à eux pour leur soutien et leur aide inconditionnelle. Je tiens également à remercier Armelle et Jérôme, alliés précieux au cours de la rédaction de ma thèse. Mon projet m'a permis d'interagir avec de nombreuses personnes de la R&D de Stallergènes. Je remercie ainsi Sandrine Mariano, mais également Henri Chabre, Laurent Mascarell et Thierry Batard pour avoir partagé avec moi leur expérience et leurs conseils. Je salue également les personnes qui ont rendu agréable mon quotidien à Stallergenes. Plus spécialement, merci à Sabi, pour tout ce qui serait trop long à écrire ici. Merci à Laetitia, avec qui j'ai tellement partagé. Je remercie aussi particulièrement Nathalie, les « lionnes doctorantes » Claire, Rachel et Chloé, et les stagiaires avec qui nous avons passé de bons moments. Je remercie également les personnes impliquées dans la gestion du laboratoire pour leur aide, ainsi que l'équipe du service informatique pour avoir solutionné mes problèmes. Je suis aussi reconnaissante envers Florian Leverve de m'avoir impliquée dans le processus de dépôt de brevet.

Enfin, ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien de mes proches. Merci à mes amis toulousains, Anna, Candice, Guillaume, Romain, Céline…que j'ai eu la chance de rencontrer du collège à la prépa. Merci aussi à mes amis « 2010 », Marie, Ardem mon allié geek, Chmeuh, Laurent, PO, PA, Anne, Doris, Nicky, Pierre, Anne-Laure, Maxime, Thomas…Vous êtes précieux. Un merci particulier à mes AST préférées Fanny, Sandrine, et aux amies géniales de Paris.

La pensée de ma famille m'évoque plus que de la reconnaissance. Mes grands-parents maternels ont bâti une belle et grande famille dont je suis fière, merci à eux. Je remercie aussi mes oncles et tantes de m'avoir tirée vers le haut. Merci à mes cousins et cousines, pour tous ces souvenirs d'enfance heureuse et tous les beaux moments à venir. Je remercie chaleureusement mes grands-parents paternels pour leur soutien et leur affection. J'ai également une pensée pour les membres de ma famille paternelle.

Ma fratrie est toute mon énergie. Élise, Louis, je vous remercie d'être la source de mon courage et de ma volonté d'avancer. Je remercie du plus profond de mon cœur mes parents pour leur soutien infaillible, je leur dois tout. Maman, tu es mon modèle, merci.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 3

INDEX DES FIGURES 10

INDEX DES TABLES 12

ABREVIATIONS 13

INTRODUCTION 17

1. L'ALLERGIE 19

1.1 LES DIFFERENTS TYPES D'HYPERSENSIBILITE 19

1.2 L'HYPERSENSIBILITE DE TYPE I 21

1.2.1 Epidémiologie 21

1.2.2 Etiologie 21

1.2.3 Manifestations cliniques 23

1.2.3.1 Rhinite allergique 23

1.2.3.2 Asthme allergique 23

1.2.3.3 Allergies alimentaires 24

1.2.3.4 Dermatite atopique 25

1.2.3.5 Allergies aux venins 25

1.2.3.6 Anaphylaxie 25

1.2.4 Principaux allergènes 26

1.2.5 Diagnostic 28

1.2.6 Mécanisme de la réaction d'hypersensibilité de type I 30

1.2.6.1 Cellules de la réaction d'hypersensibilité 30

1.2.6.2 Propagation de la réponse allergique 31

1.2.6.3 Sensibilisation et interactions DCs - LTs 37

1.2.6.4 Orientation des réponses humorales en faveur des IgE 37

1.2.6.5 Phase effectrice 39

1.2.7 Traitements 46

1.2.7.1 Éviction 46

1.2.7.2 Traitements symptomatiques 46

1.2.7.3 Traitement curatif : immunothérapie allergénique 51

2. MECANISMES D'INDUCTION DE TOLERANCE ET IMMUNOTHERAPIE ALLERGENIQUE 54

2.1 LA TOLERANCE PERIPHERIQUE 54
2.1.1 L'ignorance 54
2.1.2 L'anergie 54
2.1.3 La délétion clonale 55
2.1.4 La régulation immune 55
2.2 MECANISMES DE L'IMMUNOTHERAPIE ALLERGENIQUE 56
2.2.1 Effets précoces de l'immunothérapie 57
2.2.2 Rôle des Bregs dans l'immunothérapie 58
2.2.3 Rôle des IgE et IgG dans l'immunothérapie 59
2.2.4 Rôle des DCs dans l'immunothérapie 60
2.2.4.1 Mécanismes moléculaires de génération de Tregs 60
2.2.4.2 Effets de l'ITA sur les DCs 60
2.2.5 Rôle des LTs dans l'immunothérapie 61
2.2.5.1 Rôle des LTregs 61
2.2.5.2 Effets sur les LTh 63
2.2.6 Rôle des CLIs dans l'immunothérapie 64
2.2.7 Effets de l'immunothérapie sur les réponses cellulaires en phase tardive 64

3. BIOMARQUEURS 68

3.1 DEFINITIONS DES BIOMARQUEURS 68
3.1.1 Biomarqueurs associés à une pathologie 68
3.1.2 Biomarqueurs associés à un traitement 69
3.1.2.1 Biomarqueurs prédictifs 69
3.1.2.2 Biomarqueurs d'efficacité 70
3.2 STRATEGIES THERAPEUTIQUES ASSOCIEES AUX BIOMARQUEURS 70
3.3 COMPLEXITE ET INTERETS DU DEVELOPPEMENT D'UN BIOMARQUEUR 72
3.3.1 Caractéristiques idéales d'un biomarqueur lié à une thérapie 72
3.3.2 Découverte et développement du test 72
3.3.2.1 Découverte du biomarqueur 72
3.3.2.2 Développement du test 72
3.3.3 Intérêts du développement de biomarqueurs prédictifs 73
3.4 BIOMARQUEURS DE L'ASTHME 74
3.4.1 Biomarqueurs des voies respiratoires inférieures 75
3.4.2 Biomarqueurs obtenus par des méthodes semi-invasives 75

3.4.2.1 Biomarqueurs provenant de l'air exhalé 75
3.4.2.2 Biomarqueurs provenant des expectorations 75
3.4.2.3 Biomarqueurs sanguins 76
3.4.3 Biomarqueurs obtenus par des méthodes non invasives 77
3.5 BIOMARQUEURS DE LA RHINITE ALLERGIQUE ET DE REPONSE A L'ITA 78
3.5.1 Biomarqueurs de la rhinite allergique 78
3.5.1.1 Marqueurs dérivés des mastocytes 78
3.5.1.2 Marqueurs dérivés des éosinophiles 79
3.5.1.3 Oxyde nitrique nasal 79
3.5.2 Biomarqueurs de réponse à l'ITA 80
3.5.2.1 Les immunoglobulines, marqueurs de suivi d'efficacité ? 80
3.5.2.2 Autres marqueurs émergeants 81

4. PROTEOMIQUE ET RECHERCHE DE BIOMARQUEURS 84

4.1 DEFINITION ET APPLICATIONS DE LA PROTEOMIQUE 84
4.1.1 Définition 84
4.1.2 L'étude d'un système dynamique 84
4.1.3 Historique et applications de la protéomique 86
4.2 LA SPECTROMETRIE DE MASSE, OUTIL DE CHOIX POUR LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PROTEIQUES 87
4.2.1 Définition et principe général 87
4.2.2 Éléments d'un spectromètre de masse 88
4.2.2.1 La source d'ionisation 88
4.2.2.2 L'analyseur 89
4.2.2.3 Le détecteur et l'analyse informatique 91
4.3 PREPARATION DES ECHANTILLONS 92
4.3.1 Choix de l'échantillon biologique 92
4.3.2 Premières étapes de préparation 93
4.3.3 Méthodes séparatives 93
4.3.3.1 Techniques chromatographiques de séparation 94
4.3.3.2 Déplétion et égalisation des protéines 95
4.3.3.3 Enrichissement d'analytes ciblés, exemple des glycoprotéines 96
4.4 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 98
4.4.1 Identification de protéines 98

4.4.1.1 Approche d'identification « bottom-up » 99
4.4.1.2 Approche d'identification « top-down » 103
4.4.2 Caractérisations de protéines 104
4.4.2.1 Caractérisations de protéines modifiées en MS 104
4.4.2.2 Stratégies des analyses de « glycoprotéomique » 105
4.5 DECOUVERTE DE BIOMARQUEURS CLINIQUES PAR ANALYSE PROTEOMIQUE DIFFERENTIELLE 106
4.5.1 Les stratégies d'analyse protéomique différentielle 107
4.5.1.1 Méthodes de quantification relative par gels 2D 107
4.5.1.2 Méthodes de quantification relative par LC-MS 110
4.5.1.3 Logiciels d'interprétation des analyses protéomiques différentielles 118
4.5.2 Sources de variabilité 119
4.6 VALIDATION DES DONNEES DE PROTEOMIQUE 120
4.6.1 Méthodes basées sur les anticorps 120
4.6.2 Quantification absolue par spectrométrie de masse 121

5. FÉTUINE-A 125

5.1 HISTORIQUE ET BIOSYNTHESE 125
5.2 CARACTERISTIQUES GENETIQUES ET STRUCTURALES DE LA FETUINE-A 126
5.2.1 Génétique et famille protéique 126
5.2.2 Séquence de la protéine et modifications post-traductionnelles 127
5.2.2.1 Structure protéique 127
5.2.2.2 Modifications post-traductionnelles 127
5.2.2.3 Homologies de séquences 128
5.3 FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA FETUINE-A 129
5.3.1 La fétuine-A, protéine de la phase aigüe 129
5.3.1.1 Régulateurs de l'expression hépatique de la fétuine-A 129
5.3.1.2 Rôle d'APP négative en cas d'infection 130
5.3.1.3 Rôle d'APP positive en cas de lésion 130
5.3.2 Fétuine-A et système osseux 131
5.3.3 Fétuine-A et métabolisme 132
5.3.4 Fétuine-A et système cardio-vasculaire 135
5.3.4.1 Propriétés athérogéniques 135
5.3.4.2 Propriétés d'inhibition de la calcification vasculaire 135

5.3.5 Fétuine-A et système nerveux central 137
5.4 FONCTIONS BIOLOGIQUES DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA FETUINE-A 139
5.4.1 Fonctions biologiques de modifications post-traductionnelles 139
5.4.2 Modifications post-traductionnelles de la fétuine-A et pathologies 139

OBJECTIFS 143

RESULTATS 145

1. ARTICLE : LA FETUINE-A EST UN CANDIDAT BIOMARQUEUR PREDICTIF DE L'EFFICACITE DE L'IMMUNOTHERAPIE AU POLLEN DE GRAMINEES 145
2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES : QUANTIFICATION DES O-GLYCOPEPTIDES DE FETUINE-A AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE AU POLLEN DE GRAMINEES DANS UNE ETUDE EN EXPOSITION NATURELLE 190
3. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES : ÉVALUATION DES O-GLYCOPEPTIDES DE FETUINE-A COMME MARQUEURS PREDICTIFS DE L'EFFICACITE DE L'IMMUNOTHERAPIE AUX ACARIENS 193

DISCUSSION & PERSPECTIVES 199

CONCLUSION 225

PUBLICATION – BREVET – COMMUNICATIONS ORALES 227

ANNEXES 229

BIBLIOGRAPHIE 253

RÉSUMÉ 297

ABSTRACT 298

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Les quatre types de réactions d'hypersensibilité. 20
Figure 2 : Phase de sensibilisation des voies aériennes et induction de l'asthme allergique 36
Figure 3 : Phase effectrice de la réponse allergique 38
Figure 4 : Représentation schématique des sous-groupes de LTs dans les maladies allergique 42
Figure 5 : Fonction des Tregs dans le contrôle de l'asthme allergique. 45
Figure 6 : Management par étapes des réactions allergiques 46
Figure 7 : Thérapies des réactions allergiques basées sur les cytokines. 49
Figure 8 : Mécanismes d'action des thérapies par des anticorps anti-IgE. 51
Figure 9 : Effets de l'immunothérapie allergénique sur les paramètres immunologiques et cliniques de l'allergie. 57
Figure 10 : Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie aux aéroallergènes 66
Figure 11 : Stratégies thérapeutiques traditionnelle et stratifiée. 71
Figure 12 : Biomarqueurs de l'asthme 78
Figure 13 : Le protéome, un système dynamique. 86
Figure 14 : Éléments constituant un spectromètre de masse. 88
Figure 15 : Détermination de la structure primaire des protéines par deux approches de MS : « bottom-up » et « top-down ». 99
Figure 16 : Workflow d'une expérience de protéomique en MS, dans une approche de type « bottom-up ». 103
Figure 17 : Diagramme représentatif des stratégies des analyses « glycoprotéomiques » s'appuyant sur la spectrométrie de masse. 106
Figure 18 : Principe d'une analyse DIGE avec l'exemple de la recherche de protéines différentielles dans des échantillons sériques. 109
Figure 19 : Les niveaux de marquage sont variables selon les échantillons considérés. 111
Figure 20 : Diagramme représentatif des deux principales approches de protéomique pour la quantification sans marquage. 116
Figure 21 : Représentation schématique de la stratégie « label free », basée sur l'intensité des courants ioniques. 118
Figure 22 : Séquence de la fétuine-A. 127
Figure 23 : Analyse radiographique de souris déficitaires en fétuine-A (DBA/2-*Ahsg*$^{-/-}$). 131

Figure 24 : La fétuine-A est une protéine adaptatrice entre les acides gras et la voie de signalisation du TLR4, dans l'inflammation induite par les lipides. 134
Figure 25 : La fétuine-A a un effet biphasique supposé dans le développement de l'athérosclérose. 136
Figure 26 : Fonctions biologiques de la fétuine-A. 138
Figure 27 : L'abondance sérique avant traitement des O-glycopeptides de fétuine-A n'est pas corrélée au score symptomatique après 2 années d'ITA aux pollens de graminées. 191
Figure 28 : L'abondance sérique avant traitement des O-glycopeptides de fétuine-A n'est pas corrélée à l'amélioration clinique après 6 mois d'ITA aux acariens. 195
Figure 29 : Dans le cas de l'ITA aux acariens, une concentration sérique élevée en O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A (O-G3) est associée à un écart de scores cliniques accru entre les groupes actif et placebo. 196
Figure 30 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les études fonctionnelles. 213
Figure 31 : La fétuine-A favoriserait l'activation du récepteur TLR4 par le LPS. 216
Figure 32 : Proposition d'un mécanisme protecteur de la fétuine-A au cours de la sensibilisation allergique chez la souris. 218
Figure 33 : L'abondance sérique avant traitement du O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A est corrélée à l'expression génique du marqueur d'efficacité C1Qa à l'issue de 4 mois d'ITA aux pollens de graminées. 221

INDEX DES TABLES

Tableau 1 : Classification des rhinites allergiques. 23
Tableau 2 : Classification de l'asthme. 24
Tableau 4 : Intérêts du développement de biomarqueurs « compagnons » dans le cycle de vie du médicament. 74
Tableau 5 : Méthodes courantes d'enrichissement des glycoprotéines ou glycopeptides. 98
Tableau 6 : Sites de glycosylations de la fétuine-A et motifs glycanniques potentiellement associés. 128
Tableau 7 : Comparaison des résultats statistiques obtenus par les méthodes de quantification de la fétuine-A, dans 82 sera issus de patients allergiques aux graminées. 206
Tableau 8 : Familles d'allergènes et exemples d'allergènes majeurs associés. 250
Tableau 9 : Classification générale des biomarqueurs. 251
Tableau 10 : Modifications post-traductionnelles typiques, détectées en spectrométrie de masse. 252

ABREVIATIONS

De nombreux termes demeureront en anglais et apparaîtront en italique, car ils sont couramment utilisés et difficiles à traduire sans dénaturer leur sens.

2D	Deux Dimensions
2D-DIGE	Électrophorèse différentielle bidimensionnelle
AASS	*Average Adjusted Symptom Score*
ABELLA	*Antibody-Based Enzyme-Linked Lectin Assay*
ADCC	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AICD	*Activation-Induced Cell Death*
APP	*Acute Phase Protein*
AQUA	*Absolute Quantification*
ARIA	*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ARTSS	*Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score*
ATP	Adénosine Triphosphate
AUC	*Area Under the Curve*
BMDC	*Bone Marrow-derived Dendritic Cell*
cAMP	*cyclic Adenosine Monophosphate*
CCL2	*Chemokine Ligand 2*
CD	Cluster de Différenciation
CID	*Collision Induced Dissociation*
CLI	Cellules Lymphoïdes Innées
CLR	*C-Type Lectin Receptor*
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CpG	Cytosine phosphodiester Guanine
CPP	*Calciprotein Particle*
CRTH2	*Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells*
CTL	*Cytotoxic T Lymphocyte*
CTLA-4	*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*
DAMP	*Damage-Associated Molecular Pattern*
DC	*Dendritic Cell*
mDC	*Myeloïd Dendritic Cell*
pDC	*Plasmacytoïd Dendritic Cell*
EAE	Encéphalomyélite Allergique Expérimentale
ECP	*Eosinophil Cationic Protein*
EDN	*Eosinophil-Derived Neurotoxin*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
EIC	*Extracted Ion Chromatogram*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EMEA	*European Medicines Evaluation Agency*

EPX	*Eosinophil Peroxidase*
FBS	*Fetal Bovine Serum*
FDA	*Food and Drug Administration*
FDR	*False Discovery Rate*
FMC	*Fetuin Mineral Complex*
Foxp3	*Forkhead Box p3*
FcεRI	Récepteur de haute affinité aux IgE
FcεRII	Récepteur de faible affinité aux IgE
FT-ICR	Résonance Ionique Cyclotronique par Transformée de Fourier
GITR	*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*
GC	Glucocorticoïde
GM-CSF	*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating-Factor*
HILIC	*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*
HM-GB1	*High Mobility-Group Box 1*
HPLC	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
HRP	*Horseradish peroxidase*
ICAM-1	*Intracellular adhesion molecule*
ICAT	*Isotope-Coded Affinity Tag*
ICOS-L	*Inducible Costimulator Ligand*
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interféron
IgE-FAB	*Immunoglobulin E-facilitated Allergen Binding*
IL	Interleukine
iNOS	*induced Nitric Oxide*
IR	Indice de Réactivité
ITA	Immunothérapie Allergénique
iTRAQ	*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*
ITSC	Immunothérapie Spécifique de l'allergène par voie Sous-Cutanée
ITSL	Immunothérapie Spécifique de l'allergène par voie Sublinguale
LAG-3	*Lymphocyte-Activation Gene 3*
LC	*Langerhans Cell*
LC-MS	*Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LPC	Ligature et Ponction du Coecum
LPS	Lipopolysaccharide
MD-2	*Myeloid Differentiation Protein 2*
NF-1	Facteur Nucléaire 1
NF-κB	Facteur Nucléaire κ-B
NIH	*National Institute of Health*
OX40	*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*
OX40L	*Ligand for the tumor necrosis receptor superfamily, member 4*
OVA	Ovalbumine
PA-1	Protéine Activatrice 1
PAF	*Platelet Activating Factor*
PAMP	*Pathogen Associated Molecular Pattern*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PGD2	Prostaglandine D2
pI	Point Isoélectrique
PLA	Phospholipase A2
PMF	*Peptide Mass Fingerprinting*

PMO	Protéine Morphogénétique Osseuse
PRR	*Pattern Recognition Receptor*
PRM	*Parallel Reaction Monitoring*
PTM	*Post Translational Modification*
Q	Quadripôle
RAGE	*Receptor for Advanced Glycation End Products*
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
RP	*Reverse Phase*
SCX	*Strong Cation Exchange*
SHNA	Stéatose Hépatique Non Alcoolique
SILAC	*Stable-Isotope Labeling of Amino acids in Cell Culture*
SNA	*Sambucus Nigra*
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
SPR	*Surface Plasmon Resonance*
SRM	*Selected Reaction Monitoring*
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
TCR	*T Cell Receptor*
TGF-β	*Transforming Growth Factor-β*
TLR	*Toll-Like Receptor*
TMT	*Tandem Mass Tag*
TNF	*Tumour-Necrosis Factor*
ToF	*Time of Flight*
TRAIL	*TNF-related apoptosis-inducing ligand*
TSLP	*Thymic Stromal Lymphoprotein*
VCAM-1	*Vascular cell adhesion molecule-1*

INTRODUCTION

Le laboratoire pharmaceutique Stallergenes est spécialisé dans le traitement de l'allergie de type I, et notamment de la rhinite allergique sévère, par immunothérapie allergénique (ITA). Ces traitements développés depuis plus de 50 ans ont démontré une efficacité clinique avérée. Le laboratoire s'est ainsi appuyé sur de larges études cliniques d'immunothérapie allergénique par voie sublinguale, incluant plus de 10 000 patients, pour valider l'innocuité et l'efficacité des traitements. L'immunothérapie allergénique est actuellement le seul traitement de la cause de la maladie allergique et permet de prévenir le développement de nouvelles sensibilisations, ou l'apparition d'un asthme.

Des investissements importants sont réalisés en Recherche et Développement pour développer des solutions thérapeutiques innovantes afin de répondre aux besoins non satisfaits des patients. Un des axes de recherches porte sur le développement de traitements de nouvelle génération, en sélectionnant des voies d'administration moins invasives et favorisant l'accès à l'immunothérapie pour d'autres allergies telles que les allergies alimentaires. Ces travaux passent également par le développement d'allergènes recombinants, susceptible d'augmenter l'efficacité des traitements d'immunothérapie allergénique, tout en réduisant les doses d'extraits allergéniques nécessaires.

Stallergenes a également orienté l'un de ses axes de recherches vers la découverte de biomarqueurs spécifiques des allergies et des réponses immunitaires. En particulier, des biomarqueurs permettant de mesurer objectivement l'efficacité clinique de l'immunothérapie allergénique ont été identifiés récemment. Le laboratoire s'attache à identifier de nouveaux marqueurs de suivi de l'efficacité de la désensibilisation, ainsi que d'autres types de marqueurs comme les biomarqueurs prédictifs d'efficacité. L'identification et la validation de l'ensemble de ces marqueurs permettraient d'accompagner les allergologues dans leurs stratégies thérapeutiques, de cibler les patients « répondeurs cliniques » pour lesquels l'efficacité du traitement sera plus importante. Indirectement, la pénétrance du traitement sera accrue, et l'adaptation des protocoles selon l'évaluation de marqueurs de suivi permettra d'améliorer l'observance ainsi que l'efficacité clinique.

Le travail de thèse s'inscrit dans le cadre de ce dernier projet de recherche. L'objectif est d'identifier et de caractériser des biomarqueurs associés à l'efficacité de l'ITA.

La première partie du travail a consisté en la caractérisation moléculaire d'un candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'ITA, identifié à partir d'une analyse protéomique par 2D-DIGE (électrophorèse bidimensionnelle différentielle). L'analyse par spectrométrie de masse a permis une caractérisation complète des isoformes de la protéine identifiée, et notamment de ses modifications post-traductionnelles. Par une approche de quantification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) sans marquage, des glycopeptides de la protéine ont été identifiés dans les échantillons sériques provenant de patients traités par ITA aux pollens de graminées. Les modifications post-traductionnelles de la protéine, plus précisément les sialylations portées par la protéine candidat biomarqueur, sont différentiellement exprimées entre les groupes de patients traités. Il est primordial de valider les observations réalisées sur cette population de 82 patients, en s'appuyant sur des méthodes analytiques ciblant les modifications post-traductionnelles de la protéine candidat biomarqueur. Des échantillons cliniques provenant de patients inclus dans des études où l'exposition aux pollens est naturelle, ainsi que dans des études cliniques portant sur d'autres aéroallergènes que les pollens de graminées, représentent une source de matériel biologique pertinent pour la validation clinique du candidat biomarqueur.

Une deuxième partie du travail a été consacrée à la validation fonctionnelle de l'intérêt du candidat biomarqueur identifié. Des stratégies de déglycosylations spécifiques, couplées à la caractérisation approfondie par LC-MS, ont été mises en œuvre. L'étude de la protéine candidate dans l'établissement de la réponse allergique a été réalisée à partir de modèles cellulaires, notamment en examinant la réponse des cellules dendritiques (DCs). Celles-ci sont en effet à l'origine des réponses immunitaires, car elles prennent en charge l'allergène en périphérie, avant d'interagir avec les lymphocytes T (LTs), entraînant une réponse de nature tolérogène dans le cas de l'immunothérapie. La protéine candidate a montré des effets variables sur les DCs, dépendant de la présence d'acides sialiques à la terminaison des motifs de glycosylations. La capacité de capture et de présentation des allergènes des DCs serait en effet modulée par les acides sialiques terminaux de la protéine en présence. L'étude du lien entre la protéine candidat biomarqueur et l'établissement de la réponse allergique a par ailleurs été approfondie par la mise en œuvre de modèles expérimentaux d'asthme allergique, dans lesquels l'expression du candidat biomarqueur est réprimée. La répression de la protéine candidate résulte en une exacerbation de l'inflammation allergique, soulignant un lien probable entre le candidat biomarqueur prédictif identifié et la réponse allergique.

1. L'ALLERGIE

Les premières évocations de réactions allergiques remontent à plus de 4500 ans, avec la description du décès du pharaon Menes suite à une piqûre de frelon. À la fin du 19e siècle, le médecin britannique Charles Blackeley identifie le rhume des foins, et met en place ce qui deviendra le futur outil de diagnostic en provoquant les symptômes par friction de l'avant-bras avec un échantillon d'herbes en fleurs. Cependant, le terme Allergie (du grec *allos*, signifiant « autre », et *argos*, signifiant « réaction ») n'apparaît qu'au début du 20e siècle, dans un essai du pédiatre autrichien Von Pirquet. Aussi appelée hypersensibilité, elle correspond à une réponse immunitaire spécifique inappropriée ou exacerbée, contre un antigène normalement anodin. Cette réponse induit des dommages de sévérités variables pour l'organisme, allant de lésions tissulaires jusqu'au choc anaphylactique systémique [1].

1.1 Les différents types d'hypersensibilité

Gell et Coombs ont proposé en 1963 une classification des réactions d'hypersensibilité en 4 types, selon les mécanismes immunitaires les provoquant. Celles-ci sont synthétisées en figure 1.

L'hypersensibilité de type I ou immédiate est caractérisée par le déclenchement d'une réponse humorale à Immunoglobuline de type E (IgE) lors de l'exposition répétée à un allergène, c'est-à-dire un antigène normalement inoffensif, issu de l'environnement. Les signes cliniques incluent la rhinite allergique (rhume des foins), l'asthme, la dermatite atopique, ou des réactions anaphylactiques systémiques potentiellement mortelles.

L'hypersensibilité de type II est une hypersensibilité induite par les IgM et essentiellement les IgG. La fixation des anticorps aux antigènes présents à la surface des cellules peut entraîner la destruction cellulaire en activant le système du complément, ou par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Les manifestations cliniques comprennent les réactions transfusionnelles, l'anémie hémolytique fœtale ou médicamenteuse.

L'hypersensibilité de type III est dépendante de complexes immuns. Ceux-ci activent les molécules effectrices immunitaires du système du complément, provoquant ensuite une infiltration des neutrophiles et la dégranulation des mastocytes. Cliniquement, ce type

d'hypersensibilité inclut la réaction d'Arthus, la maladie sérique, la polyarthrite rhumatoïde ou encore le lupus érythémateux disséminé.

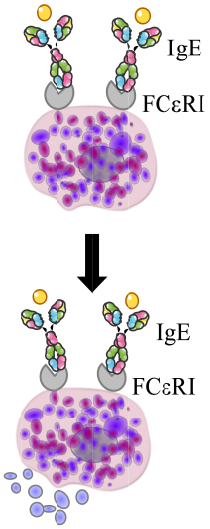
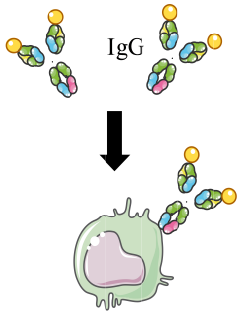
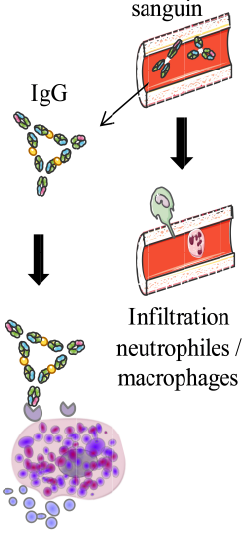
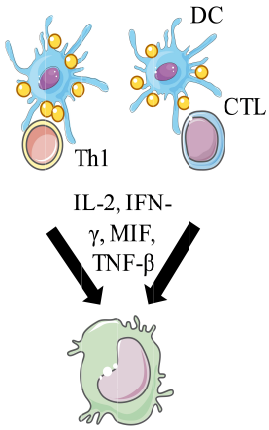
	Type I	Type II	Type III	Type IV
Facteur immunitaire en cause	IgE	IgG	IgG	Th / CTL
Type d'antigène	Soluble	Cellulaire	Soluble	Soluble / Cellulaire
Exemple de manifestations cliniques	Rhinite, Asthme, Urticaire, Œdème de Quincke, Anaphylaxie	Réactions transfusionnelles, Réactions médicamenteuses	Réaction d'Arthus, Polyarthrite rhumatoïde, Lupus érythémateux disséminé	Dermatite de contact, Lésions tuberculeuses, Rejet de greffe
Mécanisme effecteur	Activation des mastocytes  Dégranulation	Cellules FcR+ (Macrophages)  - Activation du complément - ADCC	Vaisseau sanguin  Dégranulation	Activation des LTs_{DTH} sensibilisés (Th1 ou CTL)  Phagocytose & enzymes lytiques → destruction tissulaire localisée

Figure 1 : Les quatre types de réactions d'hypersensibilité.

Les hypersensibilités de type I, II et III sont dépendantes des anticorps et se différencient selon le type d'antigène reconnu et les classes d'anticorps impliqués. Les réactions de type I sont contrôlées par les IgE et entraînent l'activation des mastocytes *via* leur récepteur FcεRI, et leur dégranulation. Les réactions de type II et III sont contrôlées par les IgG, qui peuvent se lier aux récepteurs Fc. Les réactions de type II sont dirigées contre des antigènes à la surface cellulaire ou des antigènes médicamenteux, alors que les réactions de type III sont dirigées contre des complexes immuns solubles. Les réactions de type III entraînent la dégranulation des mastocytes via leur récepteur FcγRIII, ainsi qu'à l'infiltration des macrophages et neutrophiles. Les réactions de type I sont induites par les LTs_{DTH} spécifiques de l'antigène (Th1 / CTL). Ceux-ci sécrètent diverses cytokines permettant l'attraction et l'activation des macrophages. Il en résulte une activité phagocytaire accrue ainsi que la libération d'enzymes lytiques, à l'origine d'une destruction tissulaire localisée et retardée (quelques jours après la rencontre avec l'antigène).

L'hypersensibilité de type IV, aussi dite retardée ou cellulaire, est dépendante des lymphocytes T. La présentation de l'antigène aux lymphocytes T induit la sécrétion de diverses cytokines, provoquant l'activation des macrophages. En résulte une libération d'enzymes lytiques à l'origine des lésions tissulaires. Les manifestations cliniques sont les dermatites de contact, ou des lésions tuberculeuses.

L'objet de cette thèse porte sur les hypersensibilités de type I, sur lesquelles Stallergènes cible ses traitements. En particulier, les études menées sont relatives à des traitements contre les allergies respiratoires.

1.2 L'hypersensibilité de type I

1.2.1 Epidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe l'hypersensibilité de type I au 4^{e} rang des maladies chroniques dans le monde. La forte augmentation de la prévalence des maladies allergiques depuis la fin du XX^{e} siècle justifie l'expression d' « épidémie allergique » Actuellement, la prévalence est estimée entre 10% et 20% aux Etats-Unis et en Europe [2]. En France, 1 personne sur 3 née après 1980 est atteinte d'une forme d'allergie, tandis que 10% des enfants et 6% de la population adulte souffre d'asthme. D'ici à 2050, l'OMS estime qu'une personne sur deux sera atteinte d'une maladie allergique. Les allergies respiratoires sont apparues au XIX^{e} siècle, d'abord dans les classes aisées, puis se sont étendues aux classes moyennes avant de concerner également les classes défavorisées. De façon similaire, les allergies respiratoires et l'eczema atopique sont aujourd'hui en expansion dans les pays en développement, spécialement dans les zones urbaines [3].

1.2.2 Etiologie

L'étiologie des réactions d'hypersensibilité de type I est complexe, de par l'hétérogénéité et la complexité des réactions allergiques, qui résultent de l'interaction entre de nombreux facteurs génétiques et environnementaux.

De nombreuses études se sont ainsi portées sur des polymorphismes génétiques liés aux phénotypes allergiques et asthmatiques [4]. Cependant les progrès techniques en génomique, notamment par le biais du développement des puces à ADN pour la recherche de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), ont permis l'émergence de nouvelles approches de

recherche sans hypothèses préalables, portant sur l'ensemble du génome [5, 6]. Par ailleurs, l'étude des interactions gènes-environnement apporte une plus grande compréhension de la mise en place de la réaction allergique, ou du lien avec la sévérité des symptômes[7]. Malgré la grande hétérogénéité des gènes impliqués dans la réaction allergique, ceux-ci peuvent être classés dans 5 groupes : i) les gènes modulant directement les réponses aux stimuli environnementaux, ii) les gènes liés à la susceptibilité des organes, comme ceux impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, iii) les gènes régulant la réponse immune, qui démontrent l'association entre atopie et sensibilisation allergique ainsi que réaction allergique. Ce groupe inclut *IL13*, *IL4RA*, *STAT6*, *TBX21*, ou *HLAG* et *GATA3* qui régulent la différenciation Th1/Th2 et la fonction effectrice [8-10], iv) les gènes liés à la réponse des tissus à l'inflammation, par exemple le remodelage bronchique ou du muscle lisse des voies respiratoires, ou v) les gènes impliqués au cours du développement fœtal [11].

Des facteurs environnementaux sont aussi impliqués dans l'augmentation de la prévalence des hypersensibilités de type I. On peut ainsi mentionner les polluants externes, comme les particules d'échappement diesel, l'ozone ou le dioxyde d'azote [12, 13], ou internes comme les composés organiques volatils ou les fumées de cigarettes [14, 15]. Par ailleurs, l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques va de pair avec l'augmentation de la sédentarité et du temps passé dans des espaces intérieurs aseptisés, ou dans lesquels la croissance de certains allergènes (acariens) est favorisée : la théorie hygiéniste formulée en 1989 [16] selon laquelle une raréfaction des infections au cours de la petite enfance (due à une hygiène importante, à la vaccination, à l'utilisation d'antibiotiques) favoriserait le développement d'hypersensibilités est étayée par de nombreuses études [17-19]. Cependant il apparaît surtout que si le logement individuel représente le premier lieu d'exposition aux allergènes domestiques, l'exposition dans d'autres habitations ou dans les écoles joue un rôle important dans la sensibilisation et le développement des symptômes. La comparaison des sensibilisations d'enfants asthmatiques dans différentes communautés souligne que la présence d'un allergène particulier et prédominant dans l'environnement de l'enfant est un critère aussi déterminant que les niveaux spécifiques dans son habitation [20]. L'augmentation de la prévalence de l'asthme infantile est le plus probablement due à la combinaison d'une exposition accrue à des allergènes domestiques et d'un mode de vie sédentaire.

Des études épidémiologiques ont montré des manifestations typiques de l'atopie et des maladies allergiques, liées à l'âge. Au cours de cette « marche atopique », l'eczéma infantile et

l'allergie alimentaire précèdent le déclenchement des maladies allergiques respiratoires (rhinite et asthme). Certains enfants présentant un eczéma ne développeront pas de sensibilisation à des allergènes alimentaires, ni à des allergènes inhalés [21]. Une sensibilisation persistante autour des trois premières années de la vie de l'enfant représente cependant un facteur de risque important de déclarer une maladie allergique respiratoire au cours de la scolarisation [22, 23].

1.2.3 Manifestations cliniques

1.2.3.1 Rhinite allergique

La rhinite allergique est une inflammation symptomatique de la muqueuse nasale. Elle est due à une liaison entre les allergènes et les IgE spécifiques présents à la surface des mastocytes, conduisant à la libération rapide de médiateurs inflammatoires. Ceux-ci comprennent l'histamine, mais aussi le TNF-α ou des médiateurs lipidiques comme les leucotriènes et prostaglandines. Il en résulte une réponse nasale précoce, dont les symptômes sont des éternuements, une rhinorrhée, des démangeaisons nasales et oculaires. L'influx de cellules inflammatoires comme les éosinophiles, les lymphocytes T CD4+ et les basophiles provoque une réponse allergique tardive, dont le symptôme principal est l'obstruction nasale [24]. Par ailleurs, les rhinites ont été classées par le groupe d'experts à l'initiative d'ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*), selon leur chronicité (intermittentes ou persistantes) et l'intensité des symptômes associés (légères, modérées ou sévères) [25], comme présenté dans le tableau 1.

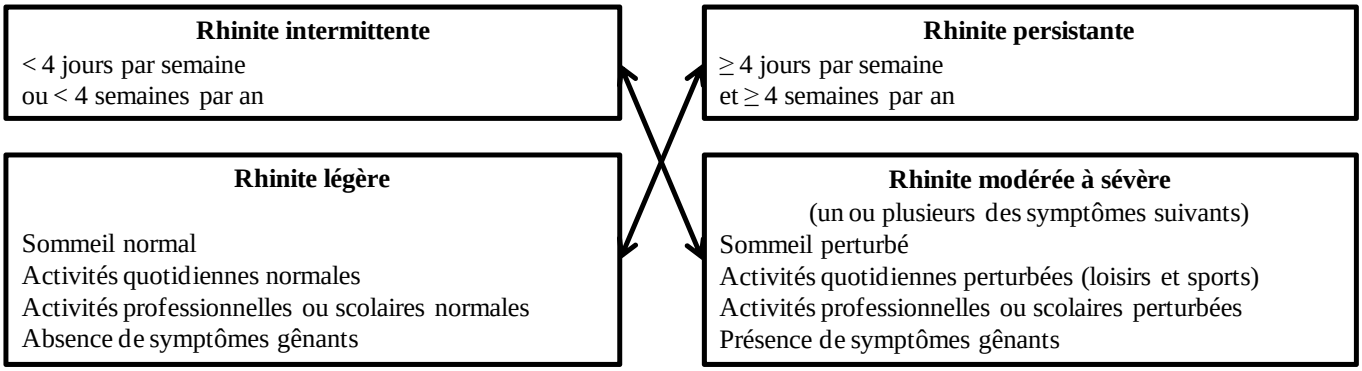


Tableau 1 : Classification des rhinites allergiques.

1.2.3.2 Asthme allergique

Initialement considéré comme une pathologie bronchospastique, l'asthme est maintenant caractérisé par la multitude des réponses inflammatoires associées, de l'ensemble

des voies respiratoires. Les patients souffrent de gêne et d'oppression respiratoire, de toux nocturnes et à l'effort, ainsi que de bronchites sifflantes. Cliniquement, les symptômes de l'inflammation se traduisent par un œdème des voies aériennes, une sécrétion accrue de mucus, ainsi qu'une bronchoconstriction, résultant en une obstruction des voies respiratoires. Le terme « asthme » inclut ainsi actuellement une variété de sous-groupes, ou phénotypes [26]. Ceux-ci dépendent notamment de la gravité des crises et de la sévérité des symptômes en dehors des crises. Des paramètres fonctionnels respiratoires tels que le VEMS (Volume Expiratoire Maximum par Seconde) ou des caractéristiques cellulaires telles que l'inflammation Th2 sont également pris en compte. La ligne directive GINA (*Global Initiative for Asthma*) a permis de classer l'asthme selon 4 stades de sévérité, en fonction de l'intensité des symptômes, de la fréquence des crises, ainsi que l'altération des fonctions pulmonaires [27], comme présenté dans le tableau 2.

Asthme	Symptômes	VEMS	Variabilité du VEMS
Intermittent (I)	Présents moins d'une fois / semaine Exacerbations brèves Symptômes nocturnes pas plus d'une fois / mois	≥ 80%	< 20%
Léger persistant (II)	Symptômes plus d'une fois / semaine mais moins d'une fois / jour Exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil Symptômes nocturnes plus de 2 fois / mois	≥ 80%	< 20-30%
Modéré persistant (III)	Symptômes quotidiens Exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil Symptômes nocturnes plus d'une fois / semaine Utilisation quotidienne de traitements symptomatiques (action à court-terme)	60-80%	> 30%
Sévère persistant (IV)	Symptômes quotidiens Exacerbations fréquentes Symptômes d'asthme nocturne fréquents Limitation des activités physiques	≤ 60%	> 30%

Tableau 2 : Classification de l'asthme.

Si les symptômes diffèrent entre rhinite allergique et asthme atopique, les mécanismes à leur origine sont semblables. De plus, la rhinite allergique représente un facteur de risque de l'asthme.

1.2.3.3 Allergies alimentaires

L'allergie alimentaire se réfère à un ensemble de réactions d'hypersensibilité, pour lesquelles les mécanismes immunologiques ont été démontrés, qu'ils soient dépendants ou non

des IgE. Dans le cas de réactions dépendantes des IgE, les allergènes se fixent aux mastocytes le long du tractus gastro-intestinal. Il en résulte une contraction localisée des muscles lisses et une vasodilatation. Les symptômes cliniques sont larges et déclenchés par l'ingestion de l'aliment incriminé parfois en très faibles quantités, ou même par simple inhalation ou contact. Ils incluent des réactions cutanées (urticaire, angio-œdème), gastro-intestinales (douleurs, nausées, vomissements, oesophagite à éosinophiles) ou respiratoires (crises d'asthme) [28].

1.2.3.4 Dermatite atopique

La dermatite atopique (DA) est la plus courante des maladies inflammatoires chroniques de la peau, et représenterait la phase initiatrice de la marche atopique. La dermatite atopique se caractérise par une physiopathologie complexe, découlant de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux, incluant par exemple le microbiome. Les patients développent des éruptions cutanées érythémateuses et purulentes. Les lésions cutanées de la dermatite atopique sont dues à des cellules Th2 et un nombre accru d'éosinophiles [29].

1.2.3.5 Allergies aux venins

Les piqûres d'hyménoptères sont responsables de réactions allergiques comprenant de fortes réactions localisées, voire des réactions systémiques très sévères, pouvant entraîner l'anaphylaxie. Des études épidémiologiques mondiales ont rapporté une prévalence des réactions systémiques comprise entre 0.3% et 8.9%, et des cas d'anaphylaxie rapportés pour 0.3% à 42.8% des cas. La prévalence des réactions systémiques est moins élevée chez les enfants. À ce jour, il n'existe pas de paramètres permettant aux cliniciens de prédire quels patients peuvent développer une réaction allergique, et si celle-ci sera locale ou généralisée. Certains facteurs ont cependant une influence sur la sévérité de la réaction aux venins d'hyménoptères, comme i) la réaction antérieure éventuellement sévère à des piqûres, ii) la nature de l'insecte (abeille, frelon), iii) l'âge du patient, iv) la présence d'une concentration sérique élevée en tryptase, ainsi que iv) l'existence d'autres pathologies (respiratoires et cadiovasculaires).

1.2.3.6 Anaphylaxie

Il s'agit d'une réaction allergique grave, pouvant être mortelle. Sa mise en place est rapide (allant de quelques minutes à quelques heures), et implique de nombreuses fonctions

biologiques. L'anaphylaxie se manifeste principalement par des mécanismes induits par les IgE, mais peut aussi se mettre en place *via* des mécanismes indépendants des IgE ou par stimulation directe des mastocytes. Les agents déclencheurs incluent des aliments, les piqûres d'hyménoptères, certains médicaments ou le latex. Les signes cliniques sont des manifestations dermatologiques (urticaire généralisé, démangeaisons ou rougeurs) ou mettent en jeu certaines muqueuses (œdème des lèvres, de la langue ou laryngé), qui s'accompagnent de symptômes respiratoires aigus pouvant entraîner une asphyxie. Le traitement d'urgence est l'injection d'adrénaline. Celle-ci agit en se liant aux récepteurs β des muscles lisses bronchiques et des mastocytes, augmentant alors le taux du composé messager cAMP (pour *cyclic Adenosine Monophosphate*) dans ces cellules. Il en résulte une relaxation des muscles lisses et une diminution de la dégranulation des mastocytes [30].

1.2.4 Principaux allergènes

Les allergènes sont pour la plupart des petites protéines (10 à 40 kDa), très hydrosolubles, ce qui facilite leur diffusion au travers des muqueuses. Une molécule ne peut être désignée sous le nom d'allergène que si elle est capable de se lier aux IgE spécifiques. Cependant toutes les protéines remplissant cette condition ne sont pas capables de conduire le système immunitaire vers la production de ces IgE, donc de constituer des allergènes sensibilisants primaires. Les facteurs déterminant la faculté d'une protéine à constituer un agent sensibilisant primaire sont complexes. En effet, les propriétés potentiellement pro-allergéniques endogènes d'une protéine ne peuvent être considérées indépendamment de l'individu exposé et du contexte d'exposition : la période, la dose d'exposition, ainsi que la présence de co-facteurs peuvent représenter des adjuvants pro-allergéniques ou anti-allergéniques. Les facteurs intrinsèques favorisant le caractère allergisant de certaines protéines sont présentés dans une section ultérieure.

La nomenclature des allergènes est basée sur les trois premières lettres du genre et la première lettre de l'espèce du nom latin qui les produit, suivie d'un numéro. Les allergènes sont par ailleurs classés selon leur mode d'entrée dans l'organisme, comme détaillé dans le tableau 8 (en annexe) :

- les pneumallergènes ou aéroallergènes sont les allergènes pénétrant dans l'organisme par les voies respiratoires. Ils peuvent être subdivisés en deux groupes, selon si l'exposition est continuelle au cours de l'année – on parle alors d'allergènes perannuels (par exemple les

acariens) – ou si elle n'a lieu qu'au cours de certaines périodes de l'année (les pollens sont ainsi des allergènes saisonniers).

- les trophallergènes pénètrent dans l'organisme par voie orale (aliments, médicaments).

- les allergènes injectés, comme les venins d'hyménoptères ou les médicaments.

- les allergènes transcutanés, provoquant une réaction allergique par contact, comme le latex.

Alors que les pneumallergènes ou les allergènes transcutanés engendrent généralement des réactions locales, les trophallergènes et les allergènes injectés provoquent des réponses allergiques systémiques pouvant aboutir au décès par choc anaphylactique.

Les allergènes sont dits majeurs lorsqu'au moins 50% des individus allergiques à une espèce donnée y sont sensibilisés, mineurs sinon. Par exemple, parmi les allergènes issus des pollens de graminées, le groupe 1 est constitué de l'allergène Phl p 1 et provoque une reconnaissance des IgE chez plus de 90% des patients, tandis que le groupe 5, représenté par l'allergène Phl p 5, est reconnu par des IgE chez 65 à 85% des patients.

Les allergènes sont inclus dans un nombre restreint de familles protéiques, selon leurs caractéristiques intrinsèques, comme leurs séquences en acides aminés ou leurs structures tridimensionnelles [31]. Les membres d'une famille protéique partagent par exemple des épitopes d'IgE ou de cellules T, qui peuvent entraîner chez certains patients des réactions allergiques par réactivité croisée. L'allergie alimentaire à la pomme est par exemple reliée au pollen de bouleau. Il s'agit d'un exemple bien documenté : cette forme d'allergie alimentaire est l'une des allergies les plus fréquentes chez l'adulte, et affecte plus de 70% des patients allergiques au pollen de bouleau [32].

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons en particulier aux allergies respiratoires, aux pollens de graminées ou aux acariens :

- les acariens représentent la source la plus ubiquitaire d'allergènes intérieurs, présents dans presque toutes les régions du monde, à l'exception de zones arides, très froides ou aux altitudes très élevées [33]. Ils appartiennent à l'ordre des arachnides et peuvent être différenciés en deux groupes : les acariens domestiques et les acariens de stockage. Les acariens sont microscopiques (de 0,2 à 0,5 mm) et se logent dans la literie, les peluches, les rideaux, les meubles capitonnés, les tapis et tentures. Les acariens domestiques sont qualifiés de

phanérophages (du grec : *phanèros* signifiant « apparent » et *phagein*, signifiant « manger ») car ils se nourrissent surtout de débris de peau morte, de poils ou d'ongles. Ce sont les plus allergisants, et les espèces responsables de plus 90% des allergies aux acariens sont *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae* [34]. Leurs allergènes majeurs sont Der p 1, Der p 2 et Der f 1, Der f 2 respectivement. Ces allergènes sont présents dans les déjections des acariens et les poussières de leurs cadavres [35]. L'allergie aux acariens se manifeste tout au long de l'année, avec un rebond à l'automne où l'humidité est accrue et l'aération des habitations diminue.

- les graminées appartiennent à la famille des *Poacées*. Celle-ci inclut plus de 600 genres, qui comprennent plus de 11 000 espèces reconnues. Les graminées croissent sur tous les continents et représentent 25% à 35% de la végétation mondiale. La sous-famille des *Pooideae* comprend le dactyle (*Dactylis glomerata*), la phléole des prés (*Phleum pratense*), la flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*), l'ivraie vivace (*Lolium perenne*) et le pâturin des prés (*Poa pratensis*), aux propriétés allergisantes importantes. La période de pollinisation s'étend de juin à septembre, avec des pics en mai et juin. Les espèces possèdent chacune plusieurs allergènes, classés en 13 groupes selon leur nature et leurs fonctions biologiques. Cependant, ce sont les allergènes des groupes 1 et 5 qui sont les plus allergisants : ensemble, ils représentent plus de 80% de l'allergénicité des pollens de graminées [36].

Les mécanismes de sensibilisation allergique seront présentés dans une section plus détaillée.

1.2.5 Diagnostic

Le diagnostic des allergies repose sur quatre éléments : l'interrogatoire du patient, l'examen clinique, la pratique de tests cutanés et de tests sériques.

L'interrogatoire du patient est une étape clé dans le diagnostic de réactions allergiques. Il permet en effet de mettre en évidence : i) les symptômes, leur intensité et leur chronologie, ii) les expositions éventuelles à des sources allergéniques, iii) les antécédents familiaux et personnels, iv) les éléments déclenchant (lieux, temps, activités). Les éléments obtenus au cours de l'examen et de l'interrogatoire clinique permettront à l'allergologue de formuler une hypothèse sur l'origine allergique des troubles. Cette suspicion de diagnostic est ensuite généralement soumise à des méthodes complémentaires visant à détecter des réponses

immunitaires spécifiques. Le Prick-test est le test cutané le plus couramment utilisé pour le diagnostic des hypersensibilités de type I : sa facilité de mise en œuvre permettant de cribler un grand nombre d'allergènes, son coût peu élevé et son résultat rapide (dans les 30 min) en font une méthode de choix. Le principe du test repose sur une provocation allergénique au niveau de l'avant-bras du patient, mimant à petite échelle une réaction allergique de type « hypersensibilité immédiate », en piquant le derme au travers d'une goutte d'allergène déposé. Si un patient est sensibilisé à un allergène considéré, les mastocytes locaux dégranulent, libérant de l'histamine et d'autres médiateurs qui provoquent la formation d'une papule avec œdème et érythème. Le test est considéré positif si la papule présente un diamètre supérieur à 3 mm, par rapport à un tampon glycéro-salin qui constitue le contrôle négatif. Le contrôle positif contient de l'histamine induisant une réaction chez tous les patients. Le test est contrindiqué en cas de grossesse, ou selon certaines prises médicamenteuses. Par exemple, en cas de traitement symptomatique par des anti-histaminiques, les patients doivent interrompre celui-ci quelques jours avant le test, pour ne pas bloquer l'effet de l'histamine et ainsi éviter un faux-négatif. À l'inverse, un urticaire ou un dermographisme peuvent induire de faux-positifs [37].

En parallèle des tests cutanés, le dosage sérique des IgE spécifiques de l'allergène peut être mis en œuvre : des taux élevés d'IgE spécifiques reflètent le statut atopique d'un patient. Actuellement, le système ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suède) est le plus couramment utilisé pour la quantification des IgE spécifiques des allergènes, en particulier grâce à la disponibilité d'allergènes recombinants comme réactifs dans le système. Plus récemment, de nouveaux outils diagnostiques basés sur des micropuces d'allergènes ont été introduits à la fois en recherche et en pratique clinique [38]. Cependant, certains problèmes liés au diagnostic de l'allergie à partir de méthodes *in vitro* demeurent. En effet, si les IgE sériques spécifiques d'allergènes sont des marqueurs de sensibilisation, représentant un pré requis pour le développement d'une réaction allergique dépendante des IgE, elles ne sont toutefois pas suffisantes pour engendrer des symptômes : 20% des individus pour lesquels des IgE sériques spécifiques d'allergènes sont détectés sont asymptomatiques [39].

D'autres méthodes peuvent par ailleurs être mises en œuvre, comme le test d'histaminolibération, le test de dégranulation des basophiles, basé sur des techniques de cytométrie en flux, le dosage de la tryptase sérique et de l'ECP, ou la quantification des éosinophiles [40]. Il est à noter qu'actuellement, aucun biomarqueur identifié ne permet à lui seul de diagnostiquer les réactions d'hypersensibilié.

1.2.6 Mécanisme de la réaction d'hypersensibilité de type I

Le mécanisme général de la réaction allergique ainsi que les cellules impliquées sont présentées dans cette section, avec une focalisation sur l'asthme allergique.

1.2.6.1 Cellules de la réaction d'hypersensibilité

La réaction d'hypersensibilité de type I fait intervenir des cellules variées du système immunitaire. L'activation de certaines cellules effectrices comme les mastocytes ou les éosinophiles conduit au développement des symptômes cliniques. Les cellules impliquées dans la réaction d'hypersensibilité sont synthétisées dans le tableau 3.

Type cellulaire	Cytokines ou médiateurs libérés	Effets biologiques
Cellule exacerbant l'inflammation allergique et l'asthme		
Éosinophiles, neutrophiles	Radicaux oxygénés et médiateurs lipidiques Cytokines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α, GM-CSF) Chimiokines (IL-8, RANTES, MIP-1α) Cytokines fibrogéniques (TGF-β, IL-11, IL-17, IL-25)	Bronchoconstriction prolongée, épithélium endommagé, remodelage des voies aériennes
Basophiles, mastocytes	Histamine, Protéines basiques majeures	Augmentation de la sécrétion de mucus dans les voies aériennes, augmentation de l'adhésion des cellules endothéliales
Lymphocytes Th2	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Production d'IgE par les lymphocytes B, chimiotaxie, survie des éosinophiles, activation et contraction des cellules du muscle lisse
Lymphocytes Th17	IL-6, IL-8, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26	Neutrophilie, hyperréactivité bronchique, remodelage des voies aériennes
Cellules dendritiques	IL-4, IL-12, GM-CSF	Induction de cellules Th2, suppression de cellules Th1
Lymphocytes T CD8+	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Hyperréactivité bronchique, éosinophilie
Cellules lymphoïdes innées de type 2 (CLI2)	Amphiréguline, IL-5, IL-9, IL-13	Augmentation de la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales, recrutement et activation des mastocytes et éosinophiles
Cellule limitant l'inflammation allergique et la réponse asthmatique		
Lymphocytes Treg	IL-10, TGF-β	Prévention de l'expansion des lymphocytes T
Lymphocytes Th17	IL-2, IFN-γ, lymphotoxine (TNF-β)	Augmentation de la réponse cellulaire, répression des lymphocytes Th2
Cellules dendritiques plasmacytoïdes	IL-10, TGF-β	Suppression des lymphocytes T
Cellules dendritiques régulatrices	IL-12 (LPS, fragments CpG d'ADN bactérien)	Induction de lymphocytes Th1

Tableau 3 : Populations cellulaires impliquées dans l'inflammation allergique.

1.2.6.2 Propagation de la réponse allergique

La réaction allergique est classiquement décrite en deux phases : la sensibilisation qui induit une réponse IgE, et la phase effectrice suite à une réexposition à l'allergène. Cependant, cette description ne prend pas en compte les mécanismes du système immunitaire inné impliqués lors de la première confrontation de l'allergène avec le système immunitaire. Plusieurs facteurs contribuent à renforcer la sensibilisation et ainsi la propagation de la réaction allergique, comme schématisé en figure 2.

1.2.6.2.1 Rupture de la barrière épithéliale

L'épithélium des voies aériennes est considéré comme une barrière physique dont la fonction principale est la clairance mucociliaire, empêchant ainsi l'accès des allergènes aux DCs pulmonaires. L'allergénicité des substances inhalées est donc liée à leur faculté à rompre les barrières épithéliales [41] : chez les individus asthmatiques, l'épithélium est fragilisé, et certaines parties de la membrane épithéliale semblent dénuées de cellules ciliées [42]. L'intégrité de la barrière épithéliale dépend des jonctions serrées apicales et des jonctions d'ancrage, responsables de la cohésion et du maintien de la polarité des cellules épithéliales bronchiques [43]. La E-cadhérine est une glycoprotéine essentielle des jonctions d'ancrage, et son expression est réduite dans les biopsies de patients asthmatiques [44]. Il a été montré que les DCs reçoivent un signal inhibiteur résultant de l'interaction avec les cellules épithéliales *via* la E-cadhérine, la perte d'expression de la E-cadhérine faciliterait donc l'activation des DCs et ainsi la sensibilisation allergique [45, 46]. Des cellules épithéliales pour lesquelles l'expression de la E-cadhérine est réprimée induisent également la production de TSLP [47], pouvant ainsi initier la rupture de tolérance aux aéroallergènes chez les patients asthmatiques. La perte de la E-cadhérine ou des jonctions serrées peut être due à l'activité protéolytique de certains allergènes inhalés [48], provenant des acariens domestiques [41, 49], des blattes [50], des pollens [51] ou des champignons [52]. À ces activités protéolytiques des allergènes s'ajoutent des facteurs environnementaux comme l'exposition à la fumée de cigarettes, aux particules fines [13] ou à l'ozone [53], ou aux infections respiratoires par des virus [54]. La rupture des protéines de jonction due aux acariens pourrait aussi être liée à la liaison entre l'EGF ou le TGF-α et l'EGFR [55]. La serpine-2 a aussi été décrite pour son implication dans la régulation de la polarisation des cellules épithéliales, et donc dans la prévention de la dégradation de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire [56]. Enfin, l'IL-4 et l'IL-13 perturbent la fonction de la barrière épithéliale, et pourraient ainsi perpétuer l'inflammation allergique [57].

Des défauts dans la fonction de la barrière épithéliale ont été décrits dans la physiopathologie de l'allergie alimentaire [58], de la rhinosinusite allergique [59] et de la conjonctivite [60]. Dans le cas de la dermatite atopique, des défauts du gène induisant la Filagrine ont été décrits dans certaines études [61].

1.2.6.2.2 Interaction entre cellules épithéliales activées et cellules lymphoïdes innées

À la suite de leur activation par l'allergène, les cellules épithéliales sécrètent certaines cytokines, comme l'IL-25, l'IL-33 ou TSLP, capables d'activer à leur tour certaines cellules du système immunitaire inné impliquées dans la propagation de l'inflammation allergique. Parmi celles-ci, les cellules lymphoïdes innées (CLI), dont les premières descriptions datent du début des années 2000, sont activées. Trois catégories de CLIs (CLI1, CLI2 et CLI3) sont décrites et présentent des analogies fonctionnelles avec les Th1, Th2 et Th17 respectivement. Ces sous-groupes dérivent d'un précurseur commun mais résultent d'un programme transcriptionnel spécifique [62]. De nombreuses études, principalement à partir de modèles murins, ont montré que ces cellules sont importantes pour le maintien de l'homéostasie, mais sont également impliquées lors de conditions inflammatoires et d'infections microbiennes [63]. Les CLIs sont présentes dans le sang et au sein des tissus, en étroite proximité avec les cellules épithéliales. Ainsi, une fonction importante des CLIs pourrait être la traduction et l'amplification des signaux provenant de l'épithélium vers d'autres composants du système immunitaire inné, de même qu'au système immunitaire adaptatif. Des études récentes chez la souris suggèrent ainsi que les CLIs interagissent directement avec les cellules T, pour les activer ou les inhiber, et que les cellules T pourraient être à l'origine de signaux nécessaires à la survie et l'activation des CLIs [64, 65].

Parmi les CLIs, les CLI2 sont impliquées dans la réponse immunitaire de type 2. Ainsi, le rôle des CLI2 dans l'asthme a été démontré à partir de plusieurs modèles murins d'inflammations allergiques des voies aériennes, induits par l'ovalbumine, les acariens, la papaïne ou *Alternaria alternata* [66-70]. Dans ces modèles, l'allergène provoque la sécrétion d'IL-25, d'IL-33 et/ou de TSLP par les cellules de l'épithélium des voies aériennes. Tout comme les cellules Th2, les CLI2 possèdent des récepteurs pour ces cytokines, qui stimulent et régulent la prolifération et la sécrétion de cytokines de type 2, incluant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Ces cytokines contrôlent alors l'hyperplasie des cellules caliciformes, la production de mucus et la contraction du muscle lisse. Les modèles murins ont également montré que les

CLI2 représentent la source principale de cytokines de type 2 dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les poumons au cours d'inflammations des voies aériennes induites par la papaïne, l'IL-25 ou l'IL-33 [68, 69]. Chez l'Homme, des patients souffrant de rhinosinusite chronique présentent des taux de CLI2 accrus dans les polypes nasaux par rapport à des sujets sains non allergiques [71]. L'implication des CLIs dans l'asthme allergique a été adressée par de nombreux modèles murins, cependant le rôle des CLIs dans l'asthme humain, en particulier des CLI2, constitue un axe de recherche à approfondir. Les laboratoires Stallergenes étudient actuellement cette question : des premiers résultats ont montré une augmentation du taux de CLI2 chez des patients allergiques asthmatiques par rapport à celui de patients allergiques non asthmatiques.

1.2.6.2.3 Accroissement de capacité de présentation antigénique des DCs

Après sensibilisation, les cellules T mémoire mettent en place la réponse allergique, par leurs interactions avec les DCs. Celles-ci peuvent par ailleurs étendre leurs dendrites à travers les cellules épithéliales pour gagner la lumière des voies aériennes [72]. Les DCs peuvent ainsi détecter les molécules allergéniques inhalées en formant des jonctions serrées avec les cellules épithéliales adjacentes, sans perturber la barrière épithéliale [73].

Dans les poumons de souris, deux sous-groupes de DCs ont été décrits, selon l'expression de l'intégrine CD11c : on distingue ainsi les DCs conventionnelles, myéloides (cDCs, CD11c+), des DCs plasmacytoïdes (pDCs, CD11c-). De façon semblable, les DCs humaines sont séparées : les CD11c- DCs plasmacytoïdes diffèrent des CD11c+ DCs myéloïdes. Par ailleurs, trois sous-groupes permettent de classifier les DCs myéloïdes, selon l'expression de CD1c, CD141 et CD16 [74]. Des études ont montré que les pDCs et les cDCs étaient plus nombreuses dans les expectorations provoquées et le sang périphérique des patients asthmatiques, et que leur nombre augmentait encore suite à des provocations allergéniques [75].

L'activité protéolytique ainsi que d'autres activités biologiques des allergènes sont à l'origine d'un ensemble de signaux de danger (notés PAMPs pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*), qui initient la maturation des DCs. Au cours des premières heures de contact avec l'allergène, l'activation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs pour *Pattern Recognition Receptors)*, incluant les TLRs (pour *Toll Like Receptors*) à la surface des DCs, augmente la mobilisation de ces dernières en accroissant l'expression des récepteurs des chimiokines, augmentant ainsi leur migration vers les LTs dans les ganglions

lymphatiques [76]. Les DCs myéloïdes sont principalement responsables de la présentation de l'antigène, alors que les DCs plasmacytoïdes sont liées à l'acquisition de tolérance et à la défense antivirale. Au cours de cette phase, les DCs subissent des changements phénotypiques majeurs, passant d'un état quiescent à l'expression d'un ensemble de molécules de co-stimulation ou liées à l'adhésion cellulaire, reconnues par les LTs naïfs et pour le traitement de l'antigène [77]. Les DCs matures présentes dans les ganglions lymphatiques drainant sont ainsi impliquées dans une synapse immunologique avec les LTs spécifiques de l'allergène. Ceci conduit à l'initiation d'une réponse effectrice de LTs : une partie des cellules T auxilliaires, notées Th pour *T helper*, migre vers les lymphocytes B folliculaires pour faciliter la commutation isotypique des IgM vers les IgE, une autre partie retourne les muqueuses aériennes pour mettre en place une réponse Th2, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires [78].

1.2.6.2.4 Consolidation de l'activation des DCs par l'épithélium

Les PRRs exprimés par des DCs conventionnelles ont une fonction essentielle dans l'établissement de la sensibilisation allergique. Parmi eux, les TLRs représentent ainsi des éléments clés du système immunitaire inné, impliqués dans la reconnaissance des signaux de dangers se présentant sous la forme de produits microbiens, viraux ou de champignons, mais également leurs ligands : les endotoxines sont reconnues par TLR4, les lipoprotéines par TLR2 et TLR6, les ARN simple ou double-brin par TLR3 et TLR7/8, et les fragments CpG d'ADN bactériens par TLR9 [79]. D'autres PRRs répondent à d'autres signaux de dangers endogènes, produits lors de la dégradation des tissus comme l'ATP libre, l'acide urique ou HM-GB1 [80]. Les DCs possèdent par ailleurs des récepteurs NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) ainsi que des CLRs (*C-type Lectin Receptors*) capables de reconnaître les motifs de glycosylations des protéines du soi par rapport aux protéines étrangères.

Des études ont montré que la stimulation du TLR4 exprimé à la surface de DCs pulmonaires par de faibles doses de lipopolysaccharide (LPS) était suffisante pour rompre la tolérance à l'inhalation, et promouvoir une réponse Th2 par l'induction de la voie de signalisation contrôlée par MyD88 (*Myeloid Differentiation primary-response gene 88*) [80, 81]. Ce résultat est transposable au niveau clinique puisque la majorité des allergènes inhalés, comme les allergènes dérivés des acariens ou des blattes, sont contaminés par du LPS ou du peptidoglycane. Plusieurs études ont montré que l'exposition d'enfants au LPS, mesurée dans des échantillons de poussières domestiques, était inversement corrélée avec la fréquence de

sensibilisation, le rhume des foins ou l'asthme atopique [82, 83]. Les allergènes de pollen contiennent également des composés non-enzymatiques actifs sur les DCs pulmonaires, qui altèrent la polarisation des cellules T effectrices. Les phytoprostanes-E1 dérivés de pollen sont proches structuralement de la prostaglandine E2 endogène, mais aussi fonctionnellement, puisque ces composés activent les DCs de façon à favoriser une polarisation Th2 [84]. Les pollens contiennent par ailleurs de la NADPH oxidase, une enzyme responsable de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, qui faciliterait donc la réponse Th2 induite par les DCs [85].

La dose de l'agoniste des TLR est un critère déterminant du type de réponse que les LTs montent contre l'allergène. Une forte dose d'agoniste de TLR (par exemple l'addition d'un microgramme de LPS à de l'OVA inhalée) favorise la mise en place d'une réponse protectrice par les Th1, ou une réponse Treg, en stimulant la sécrétion d'IL-12 par les DCs, alors que de faibles doses d'endotoxines (100 ng) favorisent des réponses Th2 en induisant une maturation des DCs en absence d'IL-12 [86, 87]. L'activation sélective des TLRs sur les cellules épithéliales augmente par ailleurs la mobilité des DCs et la prise en charge de l'antigène, par la production de chimiokines (CCL17 et CCL22 *via* le récepteur CCR7) [88] et de cytokines (IL-25, IL-33, GM-CSF et TSLP) impliquées dans la réponse Th2 [89-92]. En l'absence d'engagement des TLRs, les DCs demeurent relativement inactives [93].

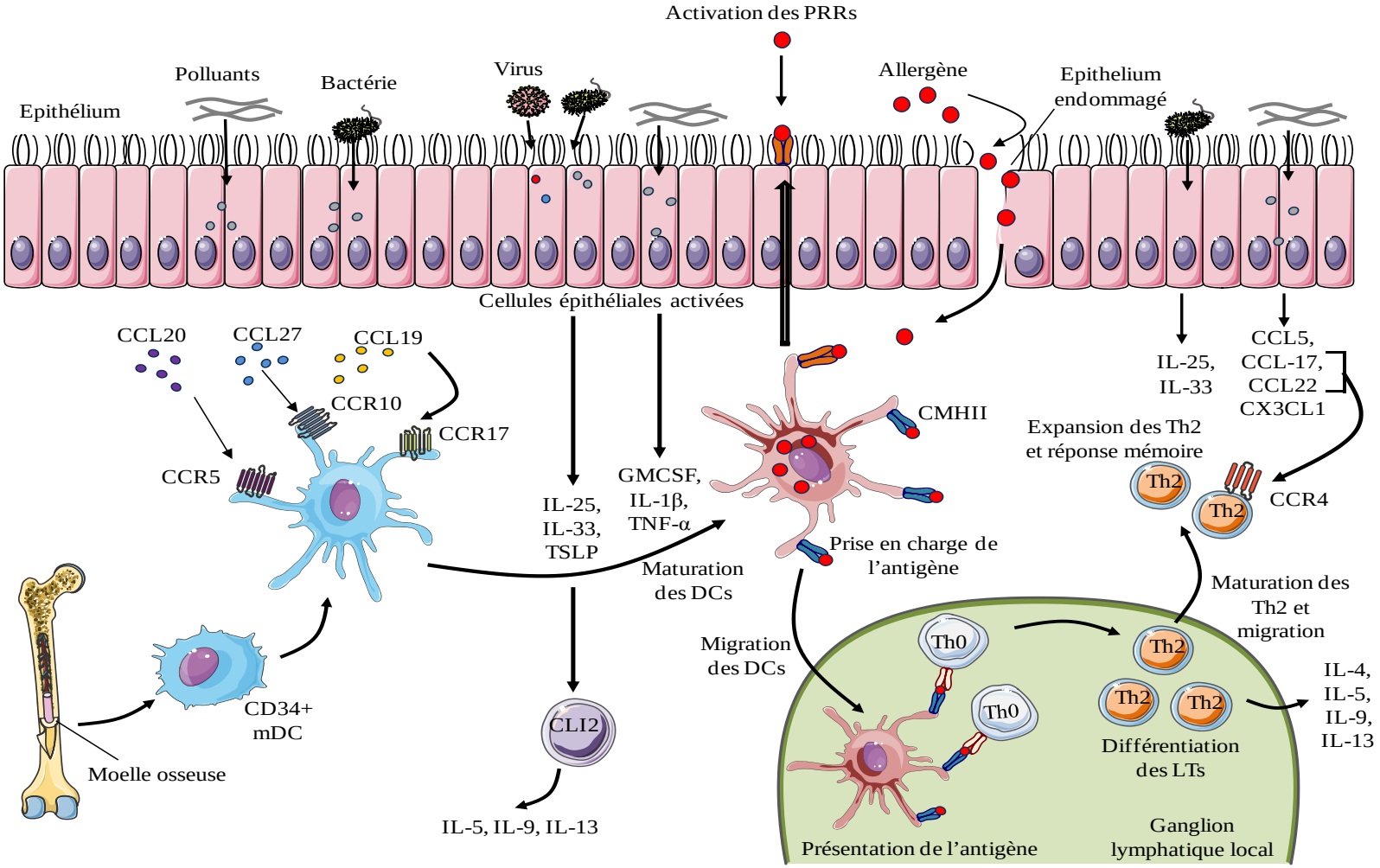


Figure 2 : Phase de sensibilisation des voies aériennes et induction de l'asthme allergique (adapté de [94]).

Les perturbations de la barrière épithéliale et les infections par des agents viraux, bactériens ou polluants fournissent le signal de danger initial et activent les récepteurs de l'immunité innée, entraînant une sécrétion de chimiokines des cellules épithéliales des voies aériennes et la migration des DCs immatures vers la muqueuse épithéliale. Les CLI2s sont activées par la sécrétion de cytokines des cellules épithéliales, tandis que les DCs répondent au signal *via* les PRRs, et maturent en DCs myéloïdes présentatrices d'antigène. Une fois activées, les DCs prennent en charge l'allergène détecté dans les voies aériennes, ou capturent les allergènes ayant franchi la barrière épithéliale. Les DCs chargées d'allergènes migrent vers les ganglions lymphatiques, où elles entrent en interaction avec les LTs naïfs *via* le TCR, le CMHII et des molécules de costimulation entraînant la différentiation des LTs. Les cytokines et chimiokines additionnelles dérivées de l'épithélium, telles que l'IL-25, l'IL-33, CCL17 et CCL22, influencent l'activation des DCs, ainsi que la maturation et la migration des Th2 dans les muqueuses.

1.2.6.3 Sensibilisation et interactions DCs - LTs

Au cours de la phase de sensibilisation, les allergènes sont capturés par les CPAs, situées dans la peau, le tube digestif ou les poumons. Chez les sujets allergiques, cela entraîne une polarisation et une expansion des lymphocytes T CD4+ en Th2. En résulte une sécrétion de cytokines telles que l'IL-4 ou l'IL-13, responsables de la commutation isotypique permettant la production d'IgE par les LBs, ainsi qu'une expansion des LBs mémoire producteurs d'IgE [95]. Chez les sujets poly-sensibilisés et atopiques, la susceptibilité variable à l'apoptose induite par activation cellulaire entre les cellules Th1 et Th2 provoque un déséquilibre en faveur d'une réponse Th2 dans le sang périphérique [96]. Les IgE produites se lient à leurs récepteurs de haute affinité du fragment Fc (FcεRI), à la surface des mastocytes tissulaires et des basophiles du sang, entraînant la sensibilisation du patient [97].

1.2.6.4 Orientation des réponses humorales en faveur des IgE

La commutation isotypique des IgE par les lymphocytes B est le résultat de plusieurs signaux. En premier lieu, les cytokines IL-4 et IL-13 sécrétées par les cellules Th2, les CLI2, les mastocytes et les basophiles se lient à leurs récepteurs à la surface des LBs. Il en découle des signaux intracellulaires à l'origine de l'activation de facteurs de transcription tels STAT-6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*), NF-κB (facteur nucléaire κB), le facteur de transcription B-spécifique (BSAP) ou encore la protéine activatrice 1 (PA-1). Ceux-ci activent des promoteurs de transcription de la chaîne lourde ε. Par ailleurs, la commutation isotypique des IgE découle également de l'interaction entre le CD40, molécule membre de la famille des récepteurs du TNF présente à la surface des LBs, avec le CD40L exprimé par les LTs activés [98].

L'activation et la sécrétion des IgE se déroulent principalement dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, mais également localement au niveau des muqueuses des voies respiratoires ou des poumons [99, 100]. La synthèse locale des IgE permet le maintien de la sensibilisation des mastocytes, la sécrétion de cytokines par ces derniers, ainsi que la sensibilisation des basophiles, en induisant la surexepression du récepteur de surface FcεRI [101].

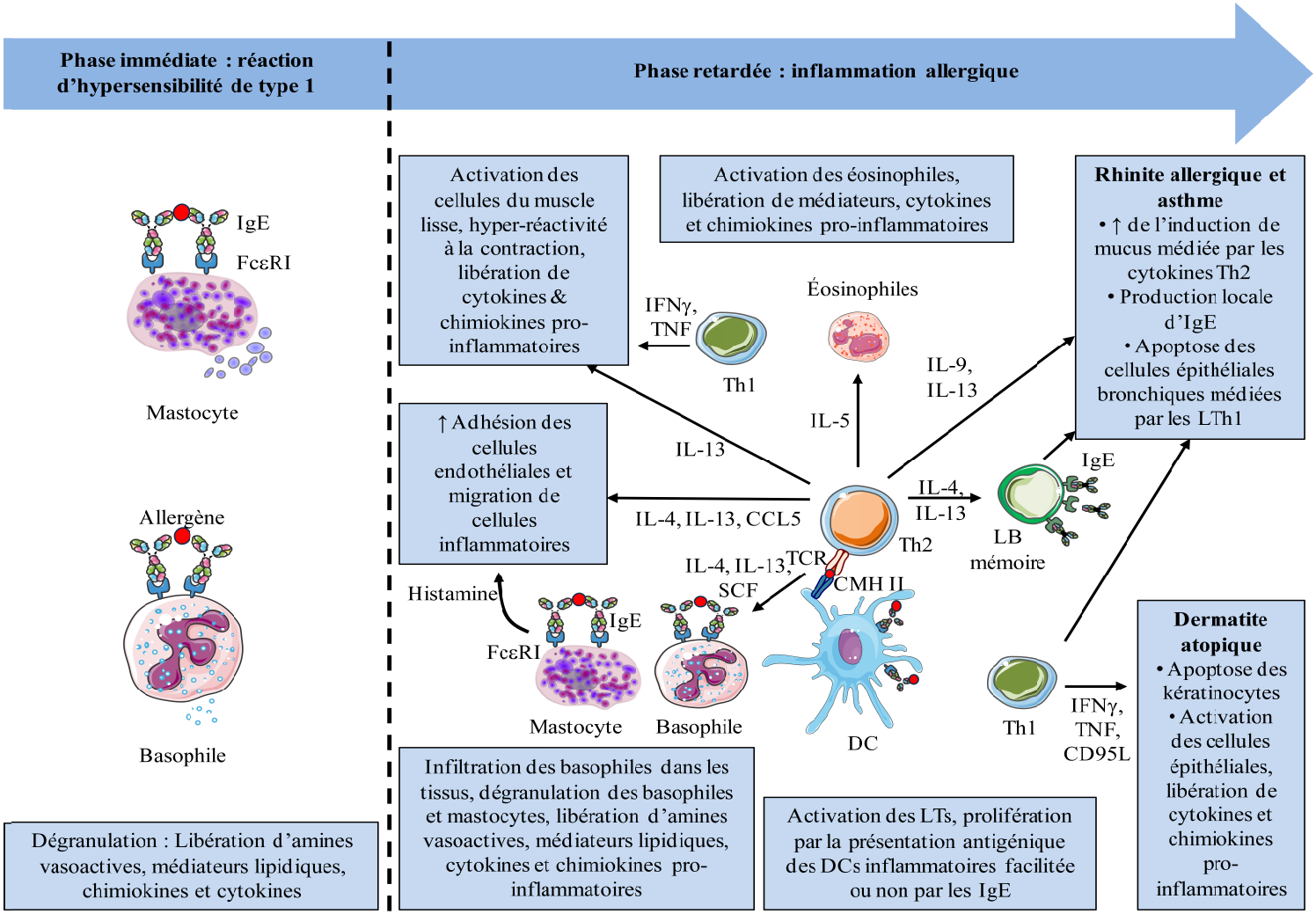


Figure 3 : Phase effectrice de la réponse allergique (adapté de [102] et [103]).

Une fois entrés en contact pour la deuxième fois avec l'allergène, les mastocytes et basophiles libèrent des médiateurs inflammatoires, à l'origine des symptômes immédiats observés. Les cellules Th2 produisent différentes cytokines conduisant à l'activation des éosinophiles, à l'activation des cellules du muscle lisse ou l'augmentation de l'adhésion des cellules endothéliales. Les DCs inflammatoires sont également activées, tandis que des symptômes tardifs de la rhinite allergique, l'asthme ou la dermatite atopique se mettent en place.

1.2.6.5 Phase effectrice

La phase effectrice peut être considérée en deux temps, comme représenté en figure 3 : la phase immédiate, et la phase tardive.

1.2.6.5.1 Phase immédiate

Chez les individus allergiques, dont les mastocytes des tissus et d'autres types cellulaires présentent déjà des IgE liées à leurs récepteurs FcεRI, une deuxième exposition à l'allergène entraîne le pontage des IgE adjacentes et une agrégation des FcεRI. Quand celle-ci est suffisamment importante, elle induit des signaux de dégranulation des mastocytes, ainsi que des basophiles, s'ils sont présents dans les tissus des voies respiratoires. Les composés pro-inflammatoires libérés sont de deux types : i) les médiateurs primaires synthétisés avant la libération des granules cytoplasmiques et stockés dans ceux-ci, comme l'histamine, la sérotonine ou diverses protéases (tryptase, chymase, carboxypeptidase), et ii) les médiateurs secondaires issus du métabolisme des phospholipides membranaires associé au processus de dégranulation [1, 104] (leucotriènes, prostaglandine D2 (PGD2), facteur d'activation des plaquettes (PAF)) ou produits après activation de la cellule cible (cytokines et chimiokines telles que l'IL-8 ou CCL2).

Dans un délai de l'ordre de quelques minutes après l'exposition, la sécrétion rapide des médiateurs entraîne bronchoconstriction, vasodilatation, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sécrétion de mucus. Ces médiateurs sont aussi responsables de la migration, de la maturation et de l'activité des DCs, et peuvent également contribuer à la transition vers la réponse tardive : les leucotriènes B4 recrutent les neutrophiles et les éosinophiles. L'IL-5, l'IL-13, l'IL-25, l'IL-33 et le GM-CSF induisent l'attraction et l'activation des éosinophiles [105, 106], tandis que l'IL-3 et l'IL-5 mobilisent les basophiles [101]. Par ailleurs, il a été montré que l'expression du récepteur à l'IL-4 à la surface des DCs pulmonaires et des cellules épithéliales, l'IL-4RA, pouvait entraîner une boucle de rétro-contrôle par laquelle les cellules productrices d'IL-4 et d'IL-13 entraînent une polarisation Th2 et perpétuent les changements caractéristiques de l'inflammation allergique au niveau de la barrière épithéliale [107, 108]. Des chimiokines comme CCL2, CCL4, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL8, CXCL10 participent également au recrutement des monocytes, des DCs immatures, des lymphocytes T ou des basophiles, des neutrophiles et des éosinophiles [109-111].

Si la réponse immédiate est systémique, elle peut entraîner un choc anaphylactique. Deux grands modèles d'anaphylaxie expérimentale ont été développés chez l'animal pour mettre en évidence des mécanismes. L'anaphylaxie dite active est induite en réponse à l'injection d'allergène chez des

souris préalablement immunisées avec l'allergène. L'anaphylaxie est dite passive lorsque des anticorps spécifiques de l'allergène sont administrés aux souris, avant l'injection de l'allergène. Dans les modèles d'anaphylaxie passive à IgE, l'activation des mastocytes, *via* l'aggrégation des récepteurs FcεRI, serait responsable du choc [112]. D'autres modèles d'anaphylaxie passive, comprenant des injections d'IgG, ont montré que l'activation des basophiles serait responsable du choc [113], par la libération de médiateurs dont le PAF [114]. Récemment, le rôle majeur des neutrophiles, des récepteurs activateurs aux IgG (FcγR), des IgG et PAF dans l'anaphylaxie systémique active a été démontré [115]. Dans cette étude, le modèle d'anaphylaxie est létal pour des souris sauvages, mais pas pour des souris n'exprimant pas de récepteurs activateurs pour les anticorps. Par ailleurs, dans un modèle incluant des souris déficientes pour 5 récepteurs aux IgE et IgG (souris 5KO) et exprimant un seul récepteur activateur pour les IgG (FcγRIV, exprimé par les monocytes, macrophages et neutrophiles), l'injection d'anticorps anti-FcγRIV bloquants abolit le choc dans les souris 5KO. De plus, la déplétion des neutrophiles (mais pas des monocytes ou macrophages) protège les souris 5KO du choc anaphylactique, démontrant que les neutrophiles sont responsables du choc anaphylactique induit par le FcγRIV [116]. Chez des souris sauvages, les neutrophiles contribuent également au choc anaphylactique actif, puisque la déplétion des basophiles n'a pas d'influence sur le choc tandis que la déplétion cumulée des basophiles et des neutrophiles l'abolit.

L'inflammation et les changements fonctionnels associés à la phase immédiate de réponse aux allergènes se résolvent typiquement au bout de quelques heures. Cependant une phase tardive de l'inflammation allergique peut survenir.

1.2.6.5.2 Phase tardive

Pour certains patients, une deuxième phase inflammatoire, dite tardive, se développe au site de contact avec l'allergène et débute quelques heures après l'exposition, et persiste pendant un à deux jours. La libération de médiateurs par les mastocytes au cours de la réaction immédiate provoque ainsi l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire des cellules endothéliales, facilitant l'accumulation des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes. Des chimiokines telles CCL11, CCL24, CCL5 ou CCL13 sont également sécrétées. Leur récepteur CCR3 est présent à la surface des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles et des lymphocytes Th2 [117]. L'ensemble de ces phénomènes engendre un recrutement et une différenciation accrus des cellules effectrices au niveau de la sous-muqueuse, de l'épithélium et de la lumière des voies respiratoires.

Les éosinophiles présents au site inflammatoire sont activés, ce qui provoque leur dégranulation et la libération de médiateurs de l'inflammation, notamment des leucotriènes, des

protéines basiques majeures, PAF, des protéines cationiques (ECP), et des neurotoxines dérivées des éosinophiles. Ces médiateurs contribuent à des lésions tissulaires étendues qui participent à l'inflammation chronique des muqueuses bronchiques caractéristiques de l'asthme persistant [1, 118] .

Les neutrophiles sont également fortement impliqués : attirés au site inflammatoire au cours de la dégranulation des mastocytes, ils sont activés par des cytokines comme l'IL-8, induisant la libération du contenu de leurs granules. Cette libération d'enzymes lytiques, de PAF et de leucotriènes est caractéristique de l'obstruction des voies respiratoires associée à un asthme persistant [119]. La sévérité de l'asthme a également été associée à une diminution de l'apoptose des neutrophiles, mais les facteurs des voies aériennes contribuant à leur survie prolongée demeurent à déterminer [120]. Des modèles animaux ont démontré que les exacerbations de l'asthme allergique seraient favorisées par le recrutement des neutrophiles, attirés dans les voies aériennes par des cellules Th2 produisant de façon simultanée de l'IL-4 et de l'IL-17 [121].

1.2.6.5.3 Polarisations lymphocytaires de la réponse allergique

Si de nombreux types cellulaires sont impliqués au cours de la réaction allergique, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4 joue un rôle primordial, déterminant la cascade réactionnelle à l'origine de la réponse allergique. La réponse Th2 est dominante, cependant différents types de polarisation peuvent se mettre en place, selon le contexte de reconnaissance antigénique.

Les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent ainsi se différencier en différents types de lymphocytes T effecteurs : les lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et lymphocytes T régulateurs (Tregs) [122, 123]. Ces principales populations de lymphocytes Th sont classées selon les cytokines orientant leur différenciation, les facteurs de transcription régulant l'expression de leurs gènes et la nature des cytokines qu'elles sécrètent, comme présenté dans la figure 4.

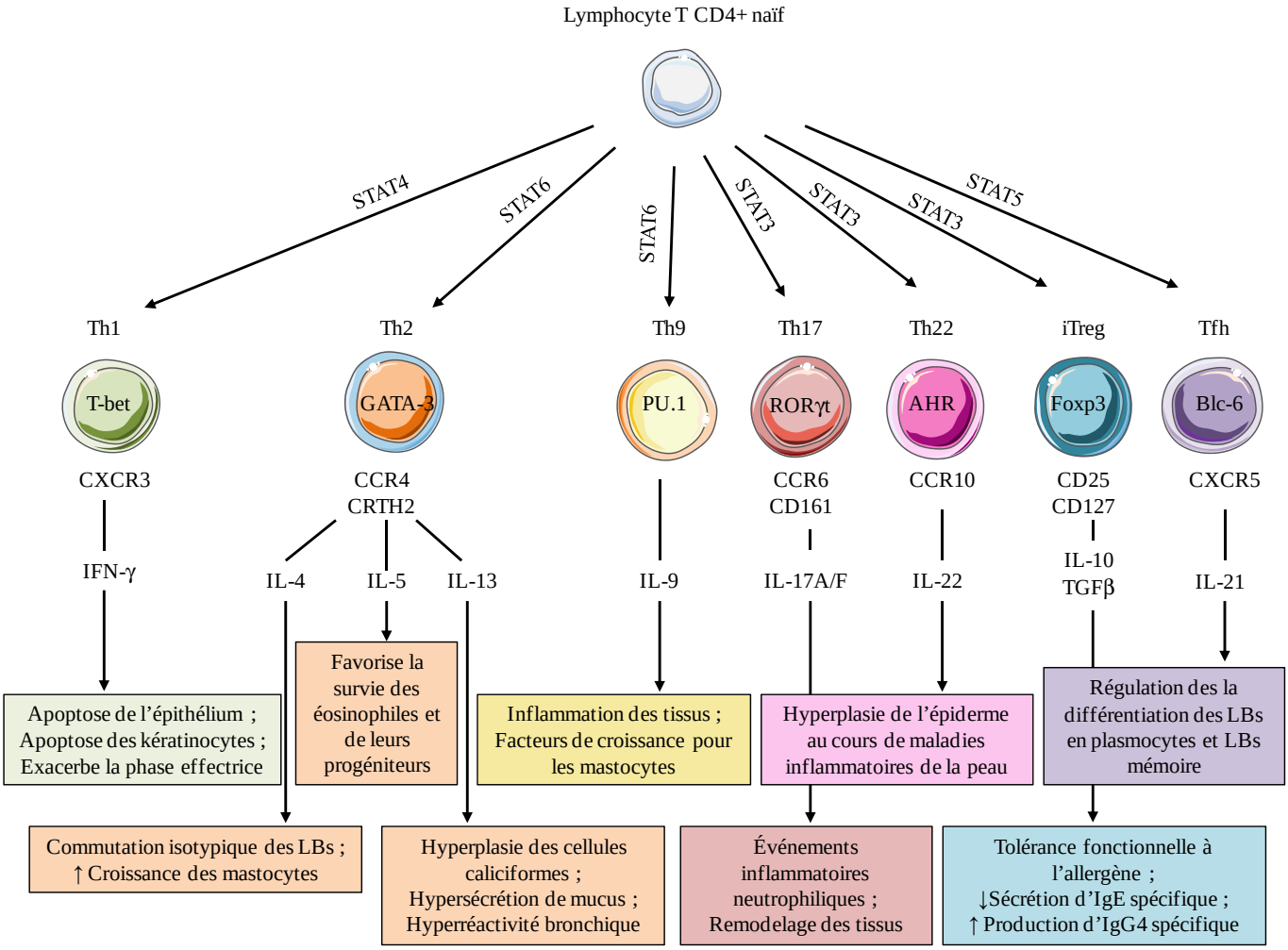


Figure 4 : Représentation schématique des sous-groupes de LTs dans les maladies allergiques (adapté de [124] et [125]).

Les LTs naïfs se différencient en différentes lignées, définies selon leurs facteurs de transcription, leurs marqueurs de surface, les cytokines effectrices sécrétées et d'autres marqueurs. Les implications de chacun des sous-groupes dans la promotion ou la suppression de la réaction allergique sont présentées.

- Les lymphocytes Th2 ont un rôle prédominant dans la phase effectrice de la réaction allergique, de par leur sécrétion de cytokines. Ainsi dans le cas de l'asthme, la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF et TNF permet la survie et l'activation des mastocytes et des éosinophiles, la détérioration des cellules épithéliales, l'hyperplasie des cellules caliciformes, ainsi que le remodelage des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique [102]. Les Th2 induisent également des modifications au niveau des vaisseaux sanguins, par le recrutement des éosinophiles et d'autres cellules inflammatoires, *via* l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). La sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 induit également la commutation isotypique des IgE, et ainsi la production d'IgE par les LBs. Les cytokines Th2 sont par ailleurs

liées à la production de mucus et à la diminution du seuil de contraction des cellules du muscle lisse. Il a été montré que le profil Th2 des patients atopiques était dû à une apoptose dérégulée entre les cellules effectrices Th1 et Th2, favorisant la mort des cellules Th1 circulantes effectrices ou mémoire, en particulier les cellules Th1 productrices d'IFN-γ [126].

- Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans la phase effectrice des réactions allergiques, de par leur sécrétion d'IL-12 et d'IFN-γ. L'IFN-γ influe sur la réponse Th2 en diminuant la sécrétion de l'IL-4 et de l'IL-5, de même qu'en diminuant la prolifération des cellules Th2 et le recrutement des cellules effectrices au site inflammatoire. Les cellules Th1 induisent également l'apoptose des cellules épithéliales et des cellules du muscle lisse des patients asthmatiques [127, 128], ainsi que des kératynocytes des patients souffrant de dermatite atopique [129].
- Les lymphocytes Th17 se différencient à partir des LTs CD4+ sous l'influence de l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et TGF-β, dans un mécanisme induit par le facteur de transcription STAT-3. Cette population de lymphocytes effecteurs sécrète de l'IL-17A et IL-17F [130], mais également de l'IL-6, IL-8, IL-22 et IL-26. Les lymphocytes Th17 sont principalement impliqués dans la survie et le recrutement des neutrophiles dans l'asthme allergique. Ils sont aussi liés à l'hyperréactivité bronchique et au remodelage des voies aériennes [131]. Par ailleurs, chez des patients souffrant de dermatite atopique aigüe, une augmentation de l'IL-17 a été observée dans des biopsies de peau, montrant l'implication des cellules Th17 dans le remodelage des lésions épidermiques [132].
- D'autres polarisations ont également été décrites, en fonction des cytokines sécrétées par les lymphocytes considérés. Ainsi, en présence d'IL-4 et de TGF-β, les lymphocytes Th2 peuvent être reprogrammés en une autre lignée, appelée Th9, exprimant de l'IL-9 et de l'IL-10 [133]. Une autre population de LTs nommés Th22 en lien avec leur sécrétion d'IL-22 a également été décrite pour son rôle dans les maladies allergiques [134]: dans les lésions inflammatoires de la peau présentes chez les patients atteints de dermatite atopique, les Th22 contribuent à l'amplification de la réponse inflammatoire en favorisant la sécrétion induite par TNF-α de cytokines et chimiokines des kératinocytes [135].
- Les Tregs réprésentent également un sous-groupe de lymphocytes T CD4+ clé pour leur implication dans le contrôle de la réponse allergique, comme le montre la figure 5. Les Tregs peuvent être divisés en deux groupes, notés nTreg et iTreg (comprenant les Tr1 et Th3), selon qu'ils sont sélectionnés dans le thymus ou induits en périphérie. Ces deux groupes de Treg diffèrent donc par leur origine, mais aussi par leur phénotype et leur mécanisme d'action. Les deux sous-groupes de Tregs jouent un rôle dans l'induction de tolérance, et peuvent être

induits au cours des traitements d'immunothérapie allergénique, comme présenté dans le chapitre 2 [136].

Les nTregs (Lymphocytes T régulateurs naturels) sont sélectionnés dans le thymus. Ils peuvent donc être notés tTregs pour « *thymic-derived Tregs* ». Ils expriment le récepteur à l'IL-2 (CD25), le facteur de transcription interne Foxp3, mais leur expression de CD127 est faible à la différence des LTs effecteurs activés [137]. Leur développement et leur fonction dépendent du TGF-β, ainsi que de la molécule membranaire CTLA-4 et de GITR (*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*) [138]. De nombreuses études ont décrit les effets des nTregs *in vitro* et *in vivo*. La régulation par les nTregs est contrôlée d'une part par la sécrétion de médiateurs solubles, mais également par contact cellulaire direct [139, 140]. L'action immunomodulatrice des nTregs est dépendante du TGF-β sécrété, qui inhibe la différenciation Th1 ou Th2 en réprimant l'expression des facteurs de transcription T-bet et GATA-3 [141, 142]. Le TGF-β entraîne par ailleurs l'expression de Foxp3 et de CTLA-4 [143, 144], favorisant par un rétro-contrôle positif le développement des nTregs [145].

Les iTregs sont induits en périphérie. Des rôles comparables ont été décrits pour les Tr1, qui sécrètent de l'IL-10 [66], et les Th3, exprimant Foxp3 (*Forkhead box p 3*), suggérant des fonctions et des caractéristiques semblables pour les cytokines et marqueurs de surface de ces Tregs induits [146].

De nombreuses études chez la souris ont montré que les Tregs sont impliqués dans le contrôle de la réaction allergique [147]. Chez l'Homme, les Tregs permettent également de réprimer les réponses Th2, par leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF-β [148]. Les Tregs ciblent également les DCs, les mastocytes et les éosinophiles, et régulent la sécrétion d'IgE spécifique d'allergène, tout en induisant la production d'IgG4 et d'IgA [149] : le transfert adoptif de lymphocytes Tregs à des souris sensibilisées a montré une diminution de l'hyperréactivité bronchique, de l'infiltration éosinophilique et de la sécrétion de cytokines Th2 [150, 151]. L'inhibition de la dégranulation des mastocytes par les Tregs est liée à une interaction cellulaire entre OX40 et OX40L, à la surface des Tregs et des mastocytes, respectivement [152].

- Enfin, une série d'études au début des années 2000 a mis en évidence une sous-population de LTs CD4 différente des cellules T effectrices décrites plus haut [153, 154]. En 2004, ces cellules sont nommées Tfh pour « *T follicular helper* ». Localisées dans les centres germinaux des ganglions lymphatiques, elles expriment le récepteur CXCR5, de même que les

molécules de costimulation CD40L et ICOS, et peuvent sécréter de l'IL-4, de l'IL-10, de même que de l'IL-21. Le facteur de transcription BCl-6 peut contrôler la différentiation des LTfh. Dans le contexte de l'allergie, leur implication dans la commutation isotypique des lymphocytes B en faveur de la production d'IgE a été démontrée [155].

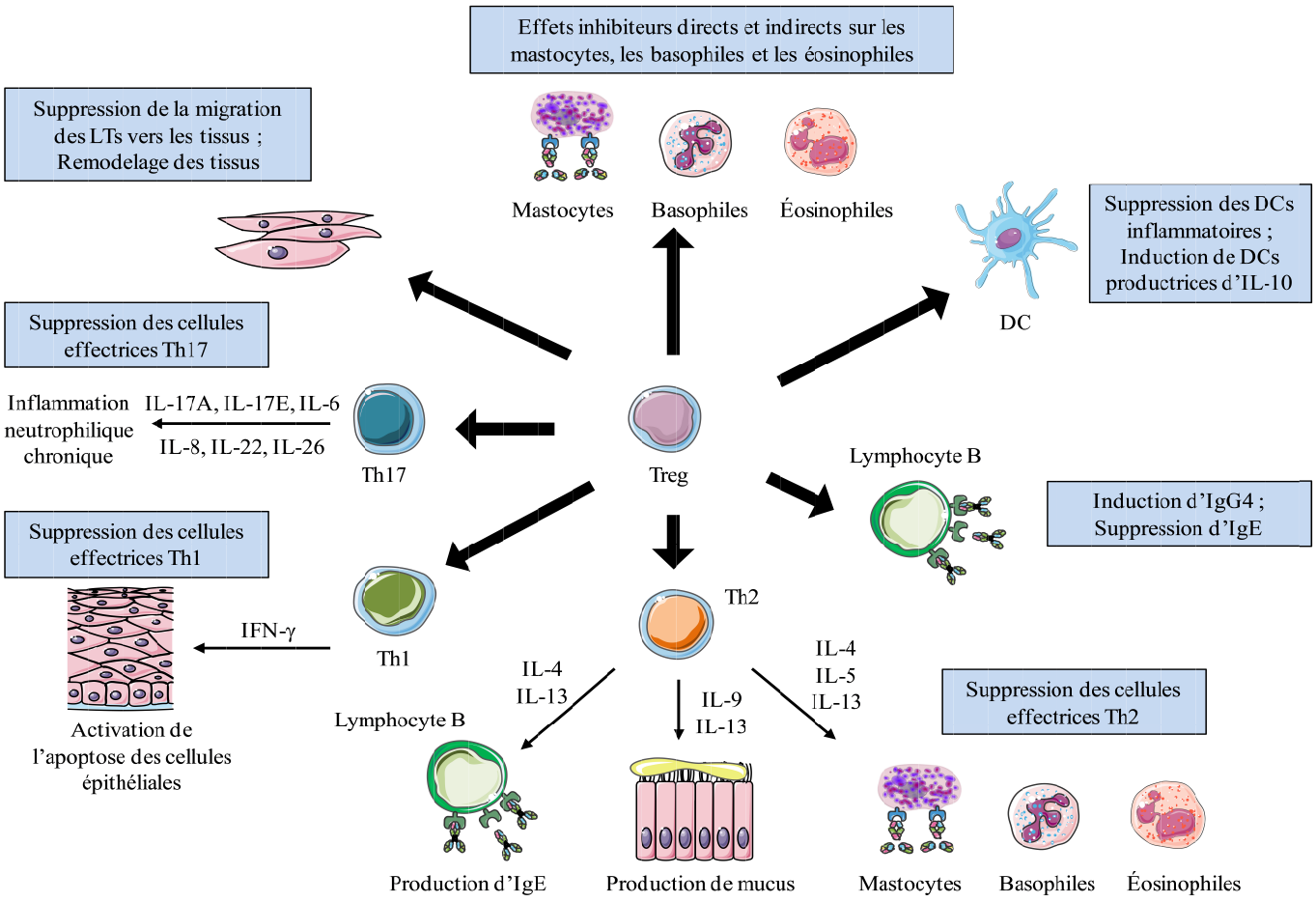


Figure 5 : Fonction des Tregs dans le contrôle de l'asthme allergique (adapté de [136]).

Les Tregs ont des effets inhibiteurs directs ou indirects sur les acteurs de la réaction allergique : les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles, de même que les LTs Th1, Th2, Th17 et les LBs produisant des IgE sont inhibés. Les Tregs répriment également la migration des LTs vers les tissus ainsi que les DCs inflammatoires, tout en induisant des DCs tolérogènes. Indirectement, les Tregs limitent la sécrétion de mucus, le remodelage bronchique, ainsi que l'inflammation neutrophilique chronique.

1.2.7 Traitements

Trois approches thérapeutiques peuvent être envisagées pour améliorer le quotidien les patients allergiques : l'éviction de l'allergène, la pharmacothérapie ou l'ITA. Le management des réactions allergiques dépendra de la facilité à éviter les allergènes responsables des réactions d'hypersensibilité, du soulagement obtenu par le recours à des traitements symptomatiques (phamacothérapie) ou de la nécessité de recourir à un traitement de fond par ITA (figure 6).

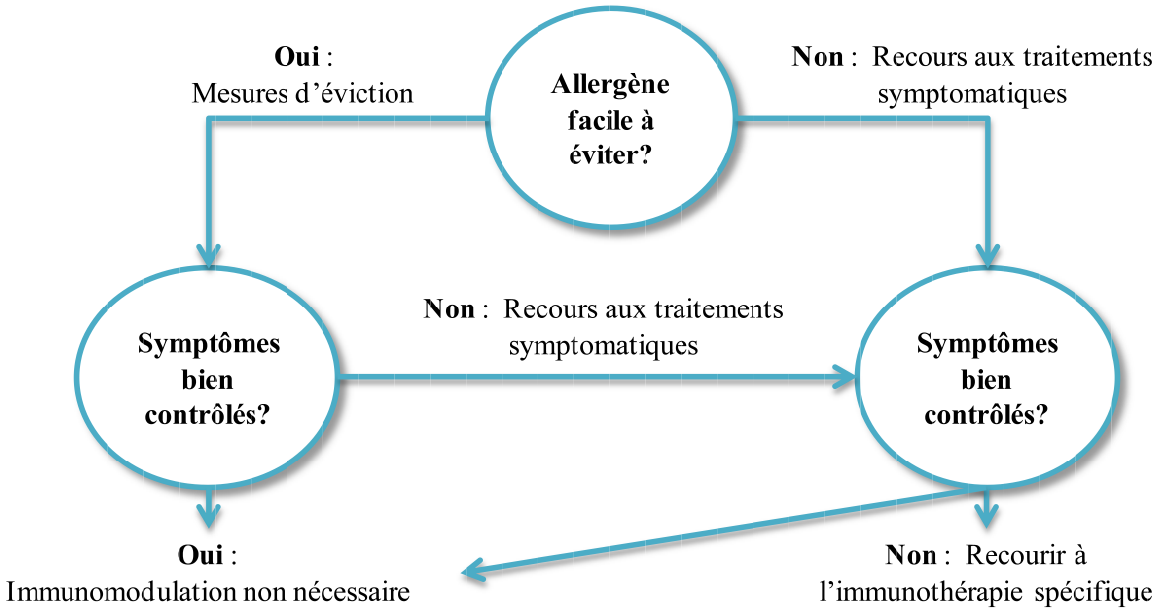


Figure 6 : Management par étapes des réactions allergiques

1.2.7.1 Éviction

Les mesures d'éviction sont des mesures préventives consistant à limiter le contact avec les allergènes. Dans le cas de l'asthme allergique aux acariens, qui ne peuvent être complètement éliminés, des mesures permettent néanmoins de diminuer les symptômes [156, 157] : réduction de l'humidité ambiante et de la température des chambres à coucher, utilisation de housses d'oreillers et de matelas anti-acariens, élimination des tapis et moquettes…

1.2.7.2 Traitements symptomatiques

La pharmacothérapie a pour objectif une diminution de la symptomatologie : son effet se mesure ainsi par la faculté à recouvrer le sommeil, à pratiquer des activités quotidiennes sans baisse d'efficacité, ainsi que des activités sportives ou de loisirs. Le traitement

pharmacologique doit prendre en compte l'efficacité, la sécurité, le coût, les préférences des patients ainsi que la présence de co-morbidités [158].

Différentes classes pharmacologiques peuvent être décrites :

- Les antihistaminiques H1 bloquent l'effet de l'histamine au niveau du récepteur H1, et plus précisément l'effet vasodilatateur et l'augmentation de la perméabilité capillaire induisant les réactions œdémateuses. Administrés par voie orale ou intranasale/intraoculaire, ils sont utilisés depuis plus de 30 ans. Toutefois, les antihistaminiques de première génération ont ouvert la voie au développement de molécules de deuxième génération, aux effets secondaires (effet sédatif et anti-cholinergique) nettement moins importants. Leur effet se met en place rapidement, et persiste pour 24 heures au minimum, permettant une administration quotidienne. L'exemple le plus connu est la citérizine : il a été montré que cette molécule retardait le développement d'asthme allergique chez des enfants allergiques aux pollens de graminées et présentant un eczema atopique [159].

- Les glucocorticoïdes (GCs) sont administrés soit par voie locale, soit par voie systémique. Ils agissent à faibles doses et sont plus efficaces que les antihistaminiques ou les cromones pour le traitement de la rhinite modérée, intermittente et persistante : les symptômes de congestion nasale, ainsi que les symptômes oculaires ou la sinusite sont réduits. Cependant, les traitements ont un délai d'efficacité retardé et de nombreux effets secondaires ont été rapportés, notamment dans les cas d'administration orale, justifiant leur utilisation sur de courtes périodes [25].

- Les bronchodilatateurs : agissant sur la bronchoconstriction par action sur les récepteurs β2-adrénergiques, ils sont divisés en deux catégories selon leur rapidité d'effet. Ainsi, les β2-mimétiques agissant à long terme, sont efficaces pour atténuer certains symptômes de l'asthme (fonctions pulmonaires, exacerbations nocturnes) lorsqu'ils sont combinés avec des glucocorticoïdes. Les β2-mimétiques agissant à court terme sont quant à eux utilisés pour un soulagement rapide contre l'obstruction bronchique, dans le cas de crises d'asthmes aigües et en prévention de bronchoconstriction liée à l'effort [160].

- Les anti-leukotriènes : Dans le cas de rhinite allergique saisonnière et d'asthme, ils permettent de réduire les symptômes d'obstruction nasale et bronchique. Leur effet est équivalent à celui des antihistaminiques mais moindre par rapport aux glucocorticoïdes administrés localement pour le traitement de la rhinite allergique saisonnière, mais ils peuvent être utilisés en

complément et permettent de réduire les doses de glucocorticoïdes inhalés chez les patients souffrant d'asthme modéré à sévère [161].

- Les anticholinergiques : bien qu'ils ne soient pas recommandés pour le management à long-terme de l'asthme infantile, ils sont utiles lorsqu'ils sont administrés en parallèle des agonistes des récepteurs β2-adrénergiques. Ils peuvent également être prescrits pour réduire la rhinorée [162].

- D'autres approches sont basées sur le ciblage d'agents biologiques particuliers, impliqués au cours de l'établissement et du maintien de la réponse allergique. Un agent biologique anti-allergique idéal permet l'inhibition d'une molécule spécifique liée à l'inflammation allergique, sans cependant amoindrir les réactions immunitaires contre les virus ou les bactéries. Au cours de la réaction allergique, les LTs CD4+ de type 2 (Th2) sont stimulés et produisent certaines cytokines en grandes quantités : des stratégies ont été développées pour inhiber l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13, comme représenté en figure 7. À leur tour, les cellules épithéliales, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes, activés par ces cytokines, vont produire d'autres cytokines (IL-15, IL-17, IL-25, IL-33, TSLP) qui peuvent représenter des cibles thérapeutiques [163-167]. Certains traitements ciblant l'IL-4 ont montré des effets bénéfiques dans des sous-groupes de patients souffrant d'asthme allergique, sans provoquer certains effets secondaires dus aux traitements conventionnels de l'asthme. De façon similaire, les composés ciblant l'IL-5 ont montré des effets bénéfiques chez des patients présentant une éosinophilie accrue [168], alors que les patients aux niveaux de périostine sérique plus importants ont une meilleure réponse clinique aux agents biologiques ciblant l'IL-13 [169]. Actuellement, les approches ciblant l'IL-4 et l'IL-13 sont en développement : elles nécessitent une validation clinique incluant de larges cohortes de patients et des durées d'étude prolongées [170].

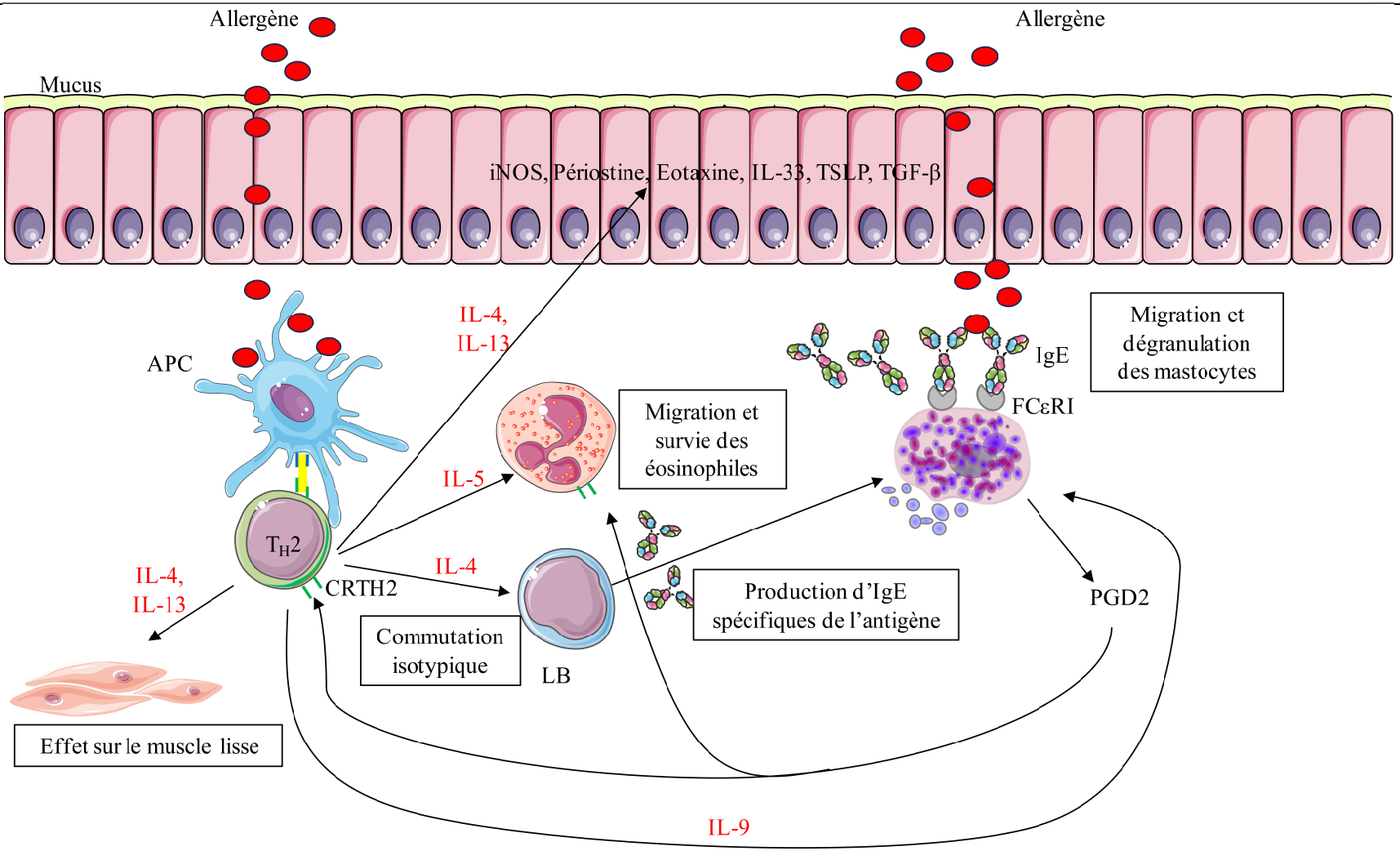


Figure 7 : Thérapies des réactions allergiques basées sur les cytokines (adapté de [171]).

Différentes stratégies thérapeutiques ciblant des cytokines ont été développées, visant à inhiber les réponses Th2 exacerbées au cours de l'inflammation allergique. Il s'agit principalement d'anticorps monoclonaux, dirigés contre l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 ou l'IL-13. Ces thérapies affectent ainsi le muscle lisse, inhibent la communation isotypique des LBs, donc la production d'IgE spécifiques de l'antigène, ou encore la migration des cellules effectrices (mastocytes et éosinophiles).

- Les anti-IgE : il s'agit d'anticorps se liant spécifiquement aux IgE, neutralisant ainsi leur circulation. Les anticorps anti-IgE agissent en empêchant l'interaction entre les IgE et les récepteurs de haute affinité (FcεRI) présents à la surface des mastocytes, des basophiles et des cellules dendritiques, de même qu'entre les IgE et les récepteurs de faible affinité (FcεRII/CD23) à la surface des lymphocytes B et de certaines cellules présentatrices d'antigène. La réponse inflammatoire allergique est ainsi inhibée [172], comme le présente la figure 8. Omalizumab est un anti-IgE approuvé depuis 2003 par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des adultes et des adolescents souffrant d'un asthme persistant modéré à sévère, dont les symptômes ne sont pas maîtrisés en recourant aux glucocorticoïdes. Il a été montré que cet anticorps induit une diminution de l'expression de FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles, bloque la présentation des antigènes dépendante des IgE, et réduit la production d'IgE après un traitement de longue durée [173].

Le traitement est administré par voie sous-cutanée toutes les deux ou quatre heures, les doses étant ajustées en fonction du poids du patient et du taux d'IgE sériques. De nombreuses études cliniques à grande échelle ont montré l'efficacité d'Omalizumab, avec plus de 60% de patients répondeurs pour lesquels une diminution de la fréquence des crises, une réduction de l'usage des glucocorticoïdes et une amélioration de la qualité de vie ont été observées [174, 175]. Au printemps 2014, l'anticorps Omalizumab a été approuvé pour une nouvelle indication. Il est en effet également utilisé dans le traitement de l'urticaire chronique spontané chez les adultes et les adolescents présentant une réponse insuffisante aux traitements antihistaminiques.

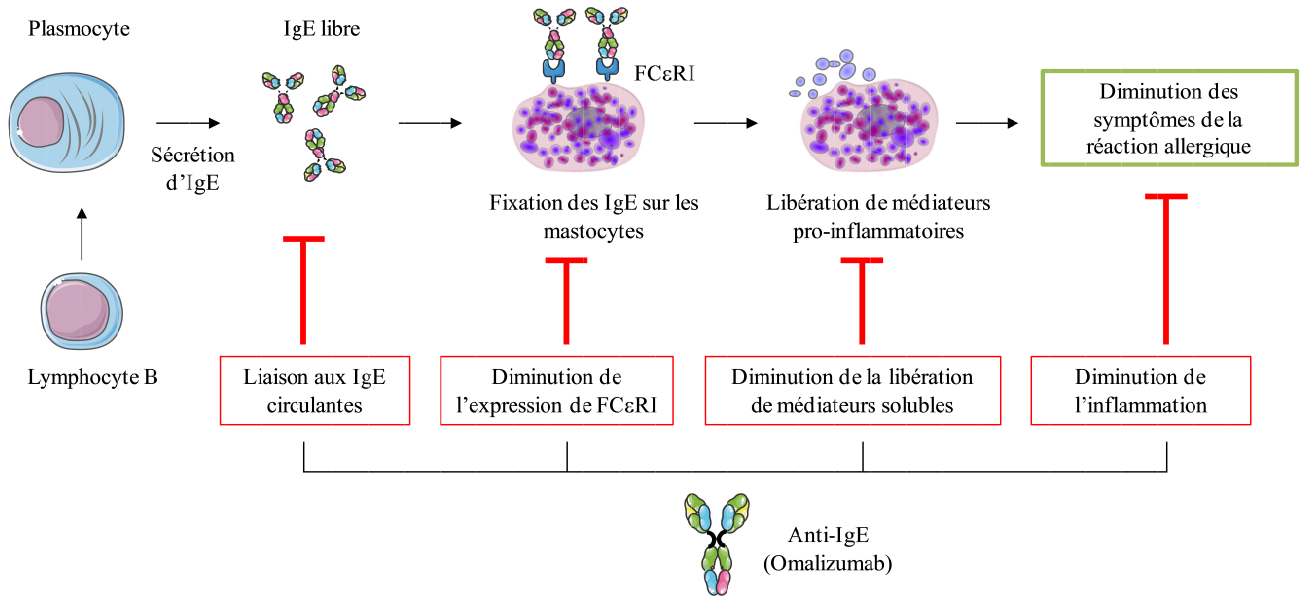


Figure 8 : Mécanismes d'action des thérapies par des anticorps anti-IgE (adapté de [176]).

Les anticorps anti-IgE agisssent en se liant aux IgE circulantes, diminuant ainsi leur concentration et leur liaison aux récepteurs de haute et faible affinité (FcεRI et FcεRII) présents à la surface des mastocytes, éosinophiles et basophiles. La libération des médiateurs solubles est inhibée, et l'inflammation allergique réduite.

La pharmacothérapie ne modifie pas le cours de l'allergie sur le long-terme. En revanche, les traitements d'immunothérapie spécifiques de l'allergène sont des traitements de fond agissant directement sur la cause de l'allergie.

1.2.7.3 Traitement curatif : immunothérapie allergénique

L'immunothérapie allergénique (ITA) est pour la première fois décrite au début du XXe siècle par les médecins britanniques Noon et Freeman, sur des patients allergiques au pollen [85]. Il s'agit d'un traitement ciblant à la fois les symptômes de l'hypersensibilité et sa cause immunologique. Les patients traités par ITA reçoivent des doses répétées et croissantes d'un vaccin allergénique, jusqu'à atteindre une dose induisant une tolérance immunitaire spécifique vis-à-vis de l'allergène [177]. De nombreuses études randomisées ont démontré des améliorations significatives dans les symptômes cliniques, le recours à la pharmacologie, et la qualité de vie, à la fois chez des patients souffrant de rhinite allergique ou d'asthme [178]. De plus, l'effet du traitement est maintenu au-delà de sa durée [179].

Les deux voies d'administration principales sont la voie sous-cutanée (ITSC) et la voie orale (Immunothérapie Spécifique de l'allergène par voie sublinguale, notée ITSL). Pour un traitement d'ITSC, le protocole classique comprend une phase initiale d'une durée de trois à six mois, pendant laquelle l'allergène est injecté une à deux fois par semaine, suivie d'une phase de maintien au cours de laquelle les injections ont lieu toutes les deux à six semaines pendant au moins trois ans. Pour un traitement d'ITSL, il est recommandé d'administrer la dose appropriée déterminée lors de la première visite une fois par jour pendant trois ans, en continu pendant l'année ou en traitement pré ou co-saisonnier. De nombreux protocoles ne nécessitent pas d'accroître la dose administrée.

L'efficacité des deux voies d'administration est comparable : les études en double-aveugle avec un contrôle placebo montrent une amélioration de l'ordre de 20 à 40% des symptômes dans le groupe traité par rapport au placebo [178, 180]. Des magnitudes d'amélioration plus importantes ont été observées pour des patients présentant des symptômes plus marqués [181].

Les effets secondaires associés à l'ITSC incluent des réactions locales, généralement une induration et un érythème au niveau du site d'injection, ainsi que des réactions systémiques. Les réactions anaphylactiques ont ainsi une fréquence de survenue de l'ordre de 0.1% des injections et sont généralement modérées, mais elles peuvent conduire au décès [182, 183]. En raison de ces potentiels effets secondaires graves, il est conseillé que l'administration soit effectuée sous contrôle médical, avec une période de surveillance consécutive à l'injection. Les effets indésirables locaux sont fréquents pour les traitements par ITSL, et incluent des démangeaisons, des douleurs intestinales, un gonflement des lèvres et de la face inférieure de la langue. Ces effets sont d'autant plus fréquents que la dose administrée est importante. Cependant, ils surviennent généralement au début du traitement et s'atténuent spontanément après quelques jours à quelques semaines sans nécessiter d'intervention médicale (ajustement de dose ou prémédication).

L'observance est faible pour les deux voies de traitement, et comparable aux faibles valeurs observées pour les traitements symptomatiques de longue durée. Un suivi clinique plus fréquent, des rappels par télécommunication et des programmes de sensibilisation devraient permettre d'améliorer l'observance.

De nouvelles approches sont également développées pour améliorer l'efficacité tout en réduisant les effets secondaires. Elles incluent les peptides réagissant à l'encontre des cellules T

effectrices [184], les allergènes recombinants et les dérivés d'allergènes hypoallergéniques [185], les allergènes modifiés chimiquement (allergoloïdes) [186], ou encore l'encapsulation des allergènes dans des nanoparticules [187]. De nouvelles voies d'administration sont également à l'étude comme la voie intralymphatique [188] ou épicutanée [189].

L'hypersensibilité de type I est une maladie complexe, de par la multiplicité des facteurs d'origine et des phénotypes des patients, qui peuvent développer des symptômes de rhinite allergique, d'asthme allergique voire des réactions anaphylactiques. Elle s'explique par l'engagement du système immunitaire dans une réponse exagérée à un allergène normalement sans danger pour l'organisme, provenant de pollens d'arbres ou de graminées, d'acariens, de phanères d'animaux… Les traitements symptomatiques visent à soulager les patients lorsque les symptômes se développent. Des traitements ciblant des agents biologiques impliqués ont récemment été mis au point, cependant seul le traitement d'immunothérapie spécifique permet de guérir durablement de l'allergie. En effet, le but de ce traitement est de réorienter le système immunitaire pour que les allergènes soient à nouveau inoffensifs pour l'invidivu. Les mécanismes expliquant l'efficacité du traitement d'ITA sont détaillés dans le chapitre suivant. Il s'agit de parvenir à un état de tolérance vis-à-vis de l'allergène, en inhibant les réponses Th2 tout en induisant des réponses Th1/Treg.

2. MECANISMES D'INDUCTION DE TOLERANCE ET IMMUNOTHERAPIE ALLERGENIQUE

La tolérance immunologique est définie comme l'ensemble des mécanismes mis en œuvre afin de prévenir des réponses inappropriées du système immunitaire contre des antigènes du soi, ainsi que contre les antigènes de l'environnement inoffensifs pour l'organisme. Elle peut être induite au niveau central ou périphérique. La tolérance centrale permet aux cellules immunitaires de l'immunité adaptative - lymphocytes T (LTs) ou lymphocytes B (LBs) - de différencier le soi du non-soi au cours de leur développement dans le thymus et la moelle osseuse, respectivement. La tolérance centrale permet ainsi d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs (dirigés contre le soi), par des mécanismes faisant intervenir une sélection négative ou des Tregs. La tolérance périphérique se met en place lorsque les LBs et les LTs sont en maturation dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus, par des mécanismes d'ignorance, d'anergie [190], de délétion clonale ou de régulation immune par des lymphocytes [191].

2.1 La tolérance périphérique

2.1.1 L'ignorance

L'ignorance correspond à la coexistence de lymphocytes T naïfs potentiellement auto-réactifs et de leur antigène cible dans les tissus périphériques. La distribution restreinte des antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes comme les DCs engendre une présentation de densité insuffisante pour activer les lymphocytes T. En revanche, dans un contexte inflammatoire, la rencontre des LTs spécifiques avec de grandes quantités d'antigène conduit à une activation des LTs et à la destruction des cellules qui l'expriment. L'ignorance peut également découler d'une faible affinité des TCR (*T Cell Receptor*) des lymphocytes T pour le complexe peptide antigénique-CMH, ou du fait que les cellules du soi exprimant l'auto-antigène ne coexpriment pas de molécule du CMH [192].

2.1.2 L'anergie

L'anergie décrit l'incapacité d'un lymphocyte T CD4 à répondre fonctionnellement à l'antigène pour lequel il est spécifique. Suite à une stimulation *via* son TCR, le lymphocyte ne prolifère pas, ni ne sécrète de cytokines. L'anergie peut résulter de la perte d'expression du

TCR, lorsque les LTs sont stimulés *via* celui-ci en l'absence de molécules de costimulation normalement exprimées à la surface de la CPA et du LT [193]. L'expression de la molécule CTLA-4 par les LT régulateurs induit l'anergie : lorsqu'elle interagit avec son ligand, CTLA-4 réprime la maturation des DCs ainsi que l'expression des ligands de costimulation CD80 et CD86 [194]. L'expression d'IDO (indoléamine-2,3-dioxygenase) par les DCs entraîne une déplétion en tryptophane dans l'environnement, ainsi que l'apparition d'un métabolite toxique pour les LTs liés aux DCs, qui peuvent en conséquence également induire l'anergie lymphocytaire.

2.1.3 La délétion clonale

La délétion clonale peut intervenir au niveau central ou périphérique. Au niveau périphérique, elle survient par un mécanisme d'AICD (*Activation-Induced Cell Death*) qui entraîne la mort par apoptose des lymphocytes ayant répondu à l'auto-antigène. La délétion peut être contrôlée par l'engagement de la voie Fas (Fragment inducteur d'apoptose), lorsque Fas à la surface des LTs entre en interaction avec son ligand sur les CPAs [195].

2.1.4 La régulation immune

La tolérance peut enfin être induite par des mécanismes adaptatifs impliquant les Tregs. Ceux-ci répriment les réponses immunitaires inappropriées par des mécanismes sous la dépendance ou non de contacts cellulaires. Les mécanismes peuvent être classés selon quatre modes d'action :

- Suppression par la sécrétion de cytokines inhibitrices, comme l'IL-10, IL-35 ou TGF-β [196-198].

- Suppression par une perturbation métabolique (compétition pour les facteurs de croissance) : les cellules Tregs, par leur forte expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (CD25), induisent un fort engagement de l'IL-2 au niveau local, déplétant ainsi l'IL-2 indispensable à la prolifération et la survie des cellules effectrices de leur environnement [199, 200].

- Suppression par ciblage des DCs : les Tregs peuvent également moduler la maturation et la fonction des DCs, nécessaires à l'activation des cellules T effectrices [201]. Ces effets immuno-modulateurs sont dépendants des molécules telles que CTLA-4, IDO ou LAG3 [202-204].

- Suppression par cytolyse : les Tregs peuvent exercer une activité cytotoxique sur les cellules T effectrices, de par l'expression de granzyme A, granzyme B, et par des mécanismes cytolytiques impliquant la perforine [205].

2.2 Mécanismes de l'immunothérapie allergénique

Les effets de l'ITA sont impliqués au cours de la phase précoce ainsi qu'au cours de la phase tardive de la réponse allergique. Elle entraîne une réduction de la concentration en médiateurs pro-inflammatoires et en granulocytes aux sites exposés à l'allergène [206]. De nombreuses études ont permis de documenter les mécanismes associés à ces changements au niveau des tissus, en examinant les changements dans les paramètres immunologiques associés à des améliorations cliniques au cours de l'ITA [207]. Les effets de l'ITA sur les mécanismes de l'immunité et les paramètres cliniques sont représentés par la figure 9.

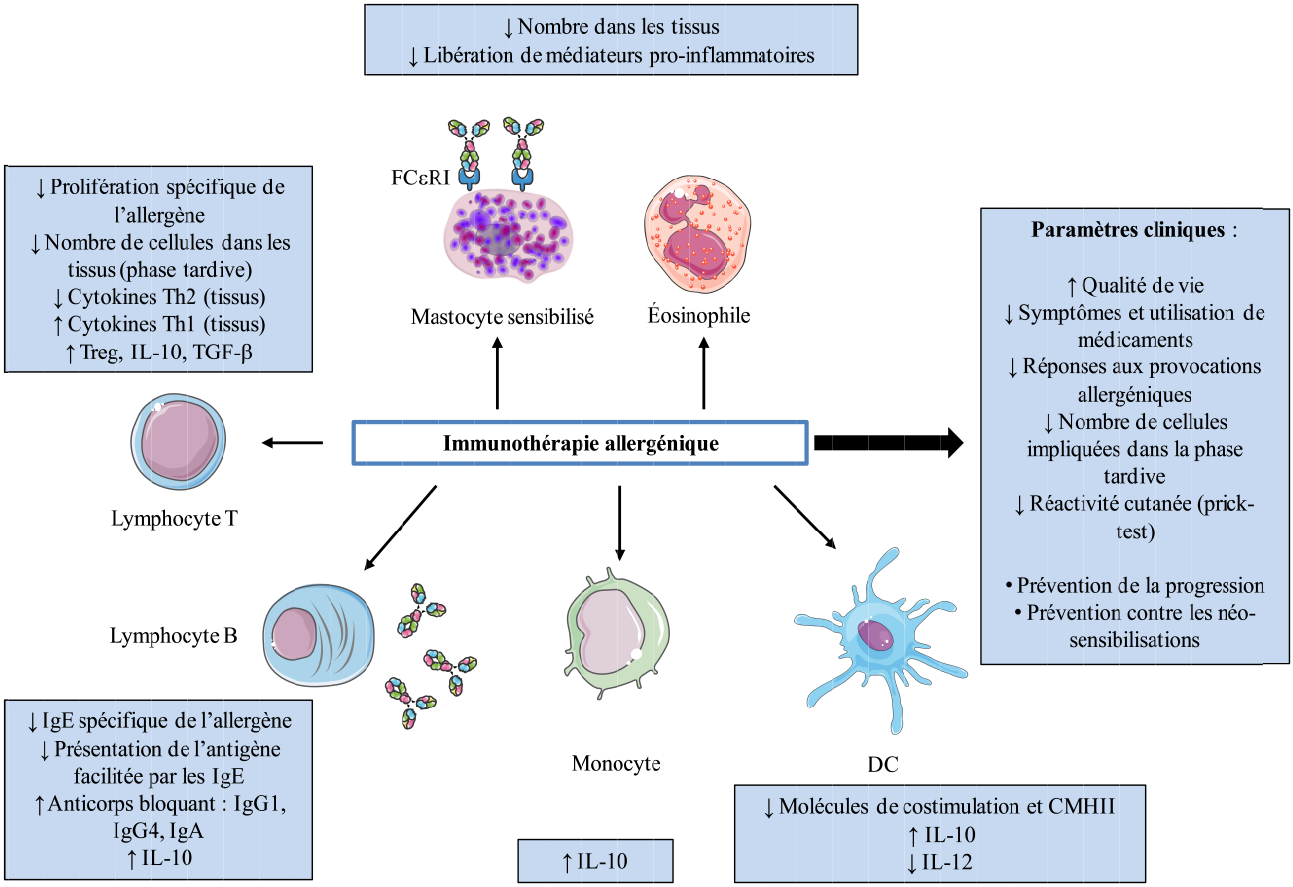


Figure 9 : Effets de l'immunothérapie allergénique sur les paramètres immunologiques et cliniques de l'allergie (adapté de [103]).

L'immunothérapie allergénique influence les réponses cellulaires et humorales dirigées contre l'allergène. La concentration des cytokines Th2 diminue, tandis que celle des cytokines Th1 augmente. Des lymphocytes Tregs sont induits, et la concentration d'IL-10 sécrété par les LTs, les LBs, les monocytes et les DCs augmente. La production d'IL-10 et de TGF-β par les Tregs favorise la commutation isotypique des LBs pour la production d'anticorps bloquant. Le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles aux sites d'expositions à l'allergène est réduit, de même que la dégranulation des mastocytes. Les symptômes cliniques sont diminués durablement à l'issue du traitement.

2.2.1 Effets précoces de l'immunothérapie

Dès le début du protocole d'ITA, parfois dès la première administration, une diminution de l'activité des basophiles et des mastocytes peut être observée, se traduisant par une diminution de leur dégranulation ainsi que leur faculté à induire l'anaphylaxie. En revanche, les patients présentant ces réponses rapides montrent des taux importants d'IgE spécifiques de l'allergène [208]. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette désensibilisation rapide sont encore mal compris, mais les effets sont comparables à ceux observés lors de la désensibilisation rapide des mastocytes et basophiles suite à des réactions anaphylactiques aux médicaments [209]. L'anaphylaxie est associée à une libération de

médiateurs inflammatoires des mastocytes et des basophiles, tandis qu'une hyposensibilisation efficace est caractérisée par une diminution de la libération de ces médiateurs [210]. La libération des médiateurs en faibles quantités, c'est-à-dire en deçà de la dose requise pour provoquer l'anaphylaxie, pourrait affecter le seuil d'activation des mastocytes et des basophiles [208].

L'effet du récepteur à l'histamine H2R a récemment été examiné pour son rôle dans l'induction de désensibilisation rapide, dans une étude incluant des patients allergiques au venin d'hyménoptère. Une augmentation de l'expression d'H2R a ainsi été observée au cours des six premières heures de la phase d'accroissement de dose du traitement d'immunothérapie. La surexpression précoce d'H2R entraîne la suppression de l'activation et de la libération des médiateurs (histamine et leukotriènes) par les basophiles, induite par FcεRI [211].

2.2.2 Rôle des Bregs dans l'immunothérapie

Plusieurs études chez la souris ont fait état de lymphocytes B (LBs) produisant de l'IL-10. Ces cellules, appelées B10 [212], sont caractérisées par leur phénotype $CD1d^{high}CD5+CD19^{high}$ [213], et ont démontré leur capacité à réprimer les réponses inflammatoires dépendant des LTs. Un transfert adoptif de cellules B $CD1d^{high}CD5+$ à partir de souris sensibilisées à l'oxazolone résulte en une diminution des réactions de sensibilisation des souris receveuses, sous la dépendance de l'IL-10 et de façon spécifique à l'allergène. En recherche clinique, les cellules B10 sont caractérisées par leur phénotype $CD24^{high}CD27+$ ou $CD19CD24^{high}CD38^{high}$ [214]. Une proportion plus importante de LBs CD5+ producteurs d'IL-10 a été observée dans le sang périphérique de sujets sains en réponse à un antigène du lait, la caséine, par rapport à des patients souffrant d'allergie au lait de vache [215]. Ces résultats suggèrent une implication des cellules Bregs dans le maintien de la tolérance aux allergènes. Dans une étude récente, des Bregs exprimant l'IL-10 ont été identifiées : ces cellules expriment les marqueurs CD25, CD71, mais l'expression de CD73 est faible [216]. L'enrichissement des cellules B $CD73^{low}CD25^{high}CD71^{high}$ provenant du sang périphérique de patients allergiques au venin d'abeille provoque une augmentation de la sécrétion d'IL-10, ainsi que l'inhibition de la prolifération des LT CD4+ spécifiques de la phospholipase A2 (PLA), qui représente l'un des allergènes du venin d'abeille. De plus, les LBs spécifiques de la PLA, isolés du sang périphérique d'apiculteurs non allergiques, montrent une production d'IL-10 et d'IgG4 accrue. À la suite d'un traitement d'ITA, la proportion de LBs spécifiques de la PLA sécrétant de l'IL-10 augmente également chez certains patients.

Ces données confirment que l'augmentation d'IgG4 à la suite d'un traitement d'ITA, est sous le contrôle de l'IL-10 sécrété par plusieurs types cellulaires, dont les LBs.

2.2.3 Rôle des IgE et IgG dans l'immunothérapie

Au cours de l'immunothérapie, une augmentation transitoire de la concentration sérique en IgE spécifique est observée, avant une diminution progressive, généralement visible après trois à six mois de traitement [217]. À l'inverse, la concentration sérique en IgG spécifiques augmente à la suite d'un traitement d'ITA, et particulier les IgG4 [218], mais aussi les IgA [219]. Les taux d'IgG4 croissent rapidement et fortement, et cette croissance se poursuit tout au long de l'ITA, reflétant l'augmentation de la quantité d'allergène administrée.

L'IL-10 produit par les Tregs réprime potentiellement la production d'IgE spécifiques de l'allergène, tout en induisant la production d'IgG4 [149]. Cependant, l'effet de l'IL-10 sur les taux d'immunoglobulines sériques ne permet pas d'expliquer l'effet thérapeutique de l'ITA, puisque la diminution de la concentration en IgE sériques se produit relativement tardivement après l'initiation du traitement, et ne corrèle pas avec une amélioration des symptômes à l'issue de celui-ci. Une hypothèse est formulée pour expliquer cet écart entre la génération de lymphocytes Tregs et la réponse IgE : la production d'IgE se fait en continu par les cellules du plasma qui demeurent dans la moëlle osseuse, avec une durée de vie élevée [220].

Au cours de la phase effectrice de la réponse allergique, les IgG4 bloquent la liaison de l'allergène aux IgE, greffées aux récepteurs FcεRI localisés à la surface des mastocytes et des basophiles : ils représentent donc un facteur bloquant empêchant l'activation et la dégranulation des cellules effectrices [221]. Par ailleurs, la région charnière des IgG4 présente des motifs structuraux particuliers engendrant une affinité moindre pour certains récepteurs Fcγ, et les IgG4 ne lient pas les protéines du complément et peuvent réprimer la formation de complexes immuns par d'autres isotypes d'anticorps [222]. Au cours des protocoles d'ITA, la relation entre l'induction d'isotypes d'IgG et l'efficacité clinique n'a pas été formellement définie. En effet, la concentration en IgG spécifiques de l'allergène est associée à une amélioration clinique dans certaines études [223], mais ne l'est pas dans d'autres [224]. Il semble plus pertinent de mesurer l'activité bloquante et/ou l'affinité pour l'allergène des IgG spécifiques de celui-ci ou des sous-groupes d'IgG, en particulier les IgG4 et les IgG1, plutôt que leurs concentrations dans le sérum.

2.2.4 Rôle des DCs dans l'immunothérapie

2.2.4.1 Mécanismes moléculaires de génération de Tregs

Les tissus de la muqueuse orale possèdent des caractéristiques intrinsèques tolérogènes : les inflammations aigües ne sont pas amorcées, malgré une importante colonisation bactérienne, et la cicatrisation des plaies est rapide. Une déplétion en cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse orale ainsi qu'une forte perméabilité aux allergènes suggèrent un mode d'action pour l'immunothérapie sublinguale [225]. La première étape de l'ITA sublinguale consiste ainsi en une capture de l'allergène par les cellules de Langerhans (LCs) au sein de la muqueuse orale [226], par affinité aux récepteurs des IgE de surface [227]. Cela entraîne la sécrétion d'IL-10 et l'induction de LTs présentant un phénotype régulateur *in vitro* [228].

Par ailleurs, les voies respiratoires supérieures et les sous-muqueuses gastrointestinales, qui débutent au niveau des amygdales et des ganglions lymphatiques, sont exposées en permanence à des agents antigéniques (bactéries commensales, antigènes dérivés d'aliments, aéroallergènes et agents pathogènes), et constituent donc un micro-environnement favorable à la génération de lymphocytes Tregs contribuant à l'homéostasie [229]. Il a récemment été montré que les DCs immatures ou partiellement matures peuvent entraîner une tolérance périphérique en induisant des Tregs [230]. En outre, les cellules dendritiques peuvent être séparées en deux populations : les DCs myéloïdes (mDCs) et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) sont phénotypiquement différentes, au niveau de l'expression des marqueurs de costimulation, et possèdent des fonctions complémentaires dans l'immunité innée et adaptative [231]. Chez l'Homme, les pDCs en maturation expriment le marqueur ICOS-L et ont la capacité de générer des LTs régulateurs, indiquant que les pDCs constituent une sous-population unique de DCs possédant une faculté intrinsèque tolérogène [231, 232].

2.2.4.2 Effets de l'ITA sur les DCs

L'ITA agit potentiellement sur les cytokines et médiateurs inflammatoires sécrétés par les cellules épithéliales (TSLP, IL-25, IL-33), responsables de l'activation des DCs, qui polarisent ensuite les LTs naïfs vers un phénotype pro-allergique de type Th2. L'induction de DCs tolérogènes au cours de l'ITA permet de basculer vers une polarisation Treg des LTs, produisant de l'IL-10. Les Tregs induits peuvent ainsi à leur tour réprimer les DCs pro-inflammatoires, et moduler la réponse Th2 [233, 234].

L'ITA accroît également la fonction des DCs du sang périphérique dans les mécanismes de l'immunité innée, faisant intervenir TLR9. Pour des patients traités par AIT aux acariens, une étude a montré que la stimulation de DCs plasmacytoïdes par CpG entraînait une augmentation d'un facteur 3 à 5 de l'IFN-α sécrété [235]. Il a par ailleurs été montré qu'à la suite d'un traitement d'ITA sublinguale, les DCs matures du sang expriment CD86 en moindre quantité, et que la production d'IL-12 est diminuée alors que celle d'IL-10 est augmentée [236]. Une autre étude a mis en évidence une population de DCs humaines capables d'induire préférentiellement des LTregs sécrétant de l'IL-10. Ces DCs tolérogènes induites au cours du traitement d'ITA expriment spécifiquement le composant du complément C1Q et la protéine Stabiline-1 [237]. Au niveau du sang périphérique, l'expression de ces marqueurs augmente au cours de l'ITA, et par ailleurs corrèle avec l'amélioration clinique au cours du traitement. Le rôle immunomodulateur de ces marqueurs au cours de l'ITA est en cours d'investigation.

2.2.5 Rôle des LTs dans l'immunothérapie

2.2.5.1 Rôle des LTregs

L'induction de tolérance des LTs périphériques, principalement caractérisée par la génération de Tregs spécifiques de l'allergène, est favorisée par les traitements d'ITA [238]. La tolérance périphérique est initiée par l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β par les Tregs au cours de l'ITA [239].

Chez l'Homme, l'implication des Tregs dans le contrôle de la réponse allergique a été montrée par plusieurs études : les Tregs CD4+ CD25+ des donneurs atopiques présentent une capacité réduite à inhiber la prolifération des CD4+ CD25- par rapport aux Tregs des sujets sains [138]. Au cours de l'ITA, le nombre de LTs CD4+ CD25+ Foxp3+ augmente au niveau de la muqueuse nasale. Par ailleurs cette augmentation des nTregs à la suite du traitement est corrélée à l'amélioration clinique, renforçant l'idée d'induction de tolérance allergénique induite par les Tregs [240].

Les Tregs induits exercent également un rôle dans la tolérance allergénique [241] : dans une étude relative à l'ITA contre l'allergie au pollen de bouleau, les auteurs montrent que les Treg sécrétant de l'IL-10 prolifèrent au cours du traitement [242]. Par ailleurs, les PBMCs enrichies en Tr1 (CD25+) limitent les réponses prolifératives Th2 induites par l'allergène, et

cette suppression est dépendante de l'IL-10 sécrété, comme le prouve l'utilisation d'anticorps neutralisant dirigé contre cette cytokine.

Les propriétés immunomodulatrices de l'IL-10 dans le contexte de l'asthme allergique sont nombreuses. Sécrétée par les lymphocytes T [243, 244], cette cytokine agit de manière synergique avec l'IL-4 sur les LBs en favorisant la commutation isotypique en faveur des IgG4 [245]. Elle diminue également l'activitation des mastocytes par les IgE [246], inhibe la sécrétion de cytokines Th2 [243], et induit une hyporéactivité des LTs en réprimant la phosphorylation de CD28 contrôlée par le récepteur à l'IL-10 [247]. Ce mécanisme de phosphorylation est essentiel pour la costimulation des LTs, au cours de l'activation allergénique par les cellules présentatrices d'antigène. Chez les sujets asthmatiques, les taux d'IL-10 dans les lavages broncho-alvéolaires sont plus faibles par rapport aux sujets sains, de même que l'expression d'ARNm (acides ribonucléiques messagers) [248, 249]. À l'inverse, les patients traités par ITA contre les pollens de graminées présentent une expression accrue d'ARNm d'IL-10 dans les muqueuses nasale et de la peau au cours de la saison pollinique [250].

D'autres approches ont été mises en œuvre pour caractériser les LTregs induits au cours de l'immunothérapie. La caractérisation de la méthylation des sites CpG du facteur de transcription Foxp3 a ainsi été réalisée, à partir des populations de Tregs induites par l'antigène de cacahuète. Ce facteur a ainsi été comparé entre des patients allergiques à la cacahuète et traités par ITA par voie orale, et des patients allergiques pour lequel l'allergène est évité. Trois mois après l'issue du traitement d'ITA, les sites CpG du Foxp3 des patients devenus immunotolérants à la cacahuète sont hypométhylés par rapport à ceux du Foxp3 des patients intolérants, qui développent une réaction allergique après un challenge oral à la cacahuète. En revanche, six mois après l'arrêt du traitement, les sites CpG des cellules Tregs induites par l'antigène sont à nouveau méthylés dans les mêmes proportions que chez les patients non traités, pour la majorité des patients traités par ITA et précédemment qualifiés d'immunotolérants. En conséquence, les modifications à l'échelle de l'ADN du facteur de transcription Foxp3 des populations de Tregs permettraient de prédire un état clinique de tolérance lors d'une ITA contre la cacachuète [251].

Si des études récentes continuent à confirmer que l'efficacité clinique de l'ITA est associée à une augmentation des Tregs induits en périphérie, les changements concomittants dans l'expression des cytokines et la suppression de la prolifération des LTs ne sont donc pas toujours observés. Ainsi, une étude clinique portant sur les modulations des réponses immunes

au niveau de la muqueuse orale à la suite d'une ITA par voie sublinguale a montré qu'il n'y avait pas de différences dans les taux de transcrits d'IL-10 ou de TGF-β détectés au sein de la muqueuse sublinguale de patients, à la suite de leur traitement par SLIT pendant 12 à 18 mois. Cette étude montrait également une augmentation significative des cellules T de l'épithélium sublingual, soulignant une prolifération des cellules T locales à la suite du traitement par SLIT [252]. Ces différences dans la production d'IL-10 observées entre les Tregs périphériques et les Tregs de la muqueuse orale, de même que les variations observées dans la prolifération des LTs, pourraient représenter des changements caractéristiques de l'environnement immunitaire sublingual, qui ne reflètent pas les changements systémiques induits par l'ITA sublinguale. Les résultats variables des différentes études peuvent être liés au fait que celles-ci s'intéressent en particulier aux LTs spécifiques de l'allergène à la suite de l'ITA. Les effets d'immunomodulation que l'ITA (notamment sublinguale) entraîne pourraient être mieux décrits à partir d'une population hétérogène de cellules T, plutôt qu'à partir de la population des LTs spécifiques de l'antigène.

2.2.5.2 Effets sur les LTh

Les Tregs ont également la faculté de produire du TGF-β, qui exerce une activité suppressive sur les réponses Th1 et Th2, et inhibe la production d'IgA et IgE spécifiques [253].

Des études ont par ailleurs été menées afin de suivre les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes au moyen de tétramères de molécules de classe II du CMH. Ces tétramères permettent en effet d'étudier à l'échelle de la cellule la polarisation des réponses immunitaires adaptatives à l'encontre d'épitopes sélectionnés au sein d'un allergène considéré [254]. Ces approches ont permis de montrer que les cellules Th2 spécifiques d'un allergène considéré subissent une différentiation terminale et ne présentent pas le marqueur CD27 à leur surface. La restauration de la tolérance au cours de l'immunothérapie serait par ailleurs liée à une délétion spécifique de ces cellules Th2, plus susceptible d'entrer en apoptose, tandis que les cellules Th1/Treg (de phénotype CD27+ et produisant de l'IL-10) survivraient et deviendraient dominantes [255]. Cependant, une étude récente visant à suivre les réponses des LTs au cours de l'immunothérapie a montré que la fréquence des Th1/Treg n'était pas modifiée à l'issue du traitement [256]. Une autre étude a été menée afin de suivre les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes avec des tétramères de molécules de classe II du CMH, dans le sang périphérique de 32 patients allergiques aux pollens de graminées. Cette approche a également

montré une absence de modifications du phénotype et de la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes, reliées au traitement [257].

2.2.6 Rôle des CLIs dans l'immunothérapie

Les cellules lymphoïdes innées (CLIs) ont récemment été mises en évidence. Parmi ces cellules de l'immunité innée, la population des CLI de type 2, notées CLI2 et abordées dans un paragraphe précédent (1.2.6.2.2), ont une morphologie semblable à celle des lymphocytes, mais ne présentent pas certains marqueurs caractéristiques des lignées des LTs, des LBs ou des NK [258]. Leur développement nécessite par ailleurs l'activité du facteur de transcription GATA3, ainsi que la présence du récepteur orphelin, relié au récepteur à l'acide rétinoïque. Initialement décrites dans des modèles murins, les CLI2 expriment les récepteurs à l'IL-25 (IL-17RB) et à l'IL-33 (ST2), et produisent des cytokines de type 2, en particulier l'IL-5 et l'IL-13, en réponse à l'IL-25, l'IL-33 et au TSLP [259]. Comme indiqué précédemment, les CLI2 seraient impliquées dans l'amplification de l'inflammation allergique, puisqu'elles sont présentes dans la peau et que des cytokines de type 2 sont produites en réponse à l'IL-33, dans un modèle murin d'étude de la dermatite atopique [260]. De plus, les CLI2 sont capables de moduler et de polariser les LTs naïfs en cellules Th2 [261] .

Chez l'Homme, les effets de l'ITA par voie sous-cutanée sur les CLI2 ont récemment été investigués. Une diminution de la proportion des CLI2 au cours de la saison pollinique a été observée dans le sang périphérique de patients allergiques traités par ITA, en comparaison aux patients non traités [262]. Ces premières données doivent néanmoins être complétées par l'étude des CLI2 dans de plus larges cohortes de patients. Une détermination de la proportion de CLI2 avant la mise en œuvre de l'ITA est également nécessaire, pour valider l'hypothèse selon laquelle cette diminution de la proportion des CLI2 est dépendante du traitement.

2.2.7 Effets de l'immunothérapie sur les réponses cellulaires en phase tardive

L'ITA de longue durée est associée à une diminution significative de la réponse immédiate à la provocation allergénique, ainsi que de la réponse tardive dans les muqueuses bronchiques ou nasales et la peau. Etant donné que la réponse allergique tardive s'accompagne d'une hyperréactivité bronchique et nasale et mime la physiopathologie de l'inflammation allergique chronique, l'effet de l'ITA sur la réponse tardive serait lié à son efficacité clinique

[263]. À l'issue d'une ITA efficace, le seuil de concentration en allergène nécessaire pour induire l'activation des mastocytes et des basophiles au cours des réponses immédiates ou retardées dans les tissus exposés est augmenté [264, 265]. Les hyperréactivités bronchique, nasale et conjonctivale aux stimuli non spécifiques, semblant refléter l'inflammation mucosale sous-jacente, sont diminuées après l'ITA et sont associées à l'amélioration clinique [266].

Les concentrations de certains médiateurs inflammatoires sont également modulées au cours de l'ITA : le taux d'ECP (*Eosinophil Cationic Protein*), marqueur de l'activation des éosinophiles, est ainsi diminué après une immunothérapie contre l'allergie au pollen de bouleau. Il a également été montré que l'expression de molécules chémoattractantes des éosinophiles et des neutrophiles est associée à une diminution de l'hyperréactivité bronchique et à l'amélioration clinique [267]. Par ailleurs, la concentration plasmatique et la production *in vitro* d'endothéline-1 (peptide pro-inflammatoire et bronchoconstricteur) d'enfants asthmatiques diminuent significativement après deux ans d'immunothérapie avec des extraits d'acariens [268]. Les mécanismes de l'ITA sont représentés en figure 10.

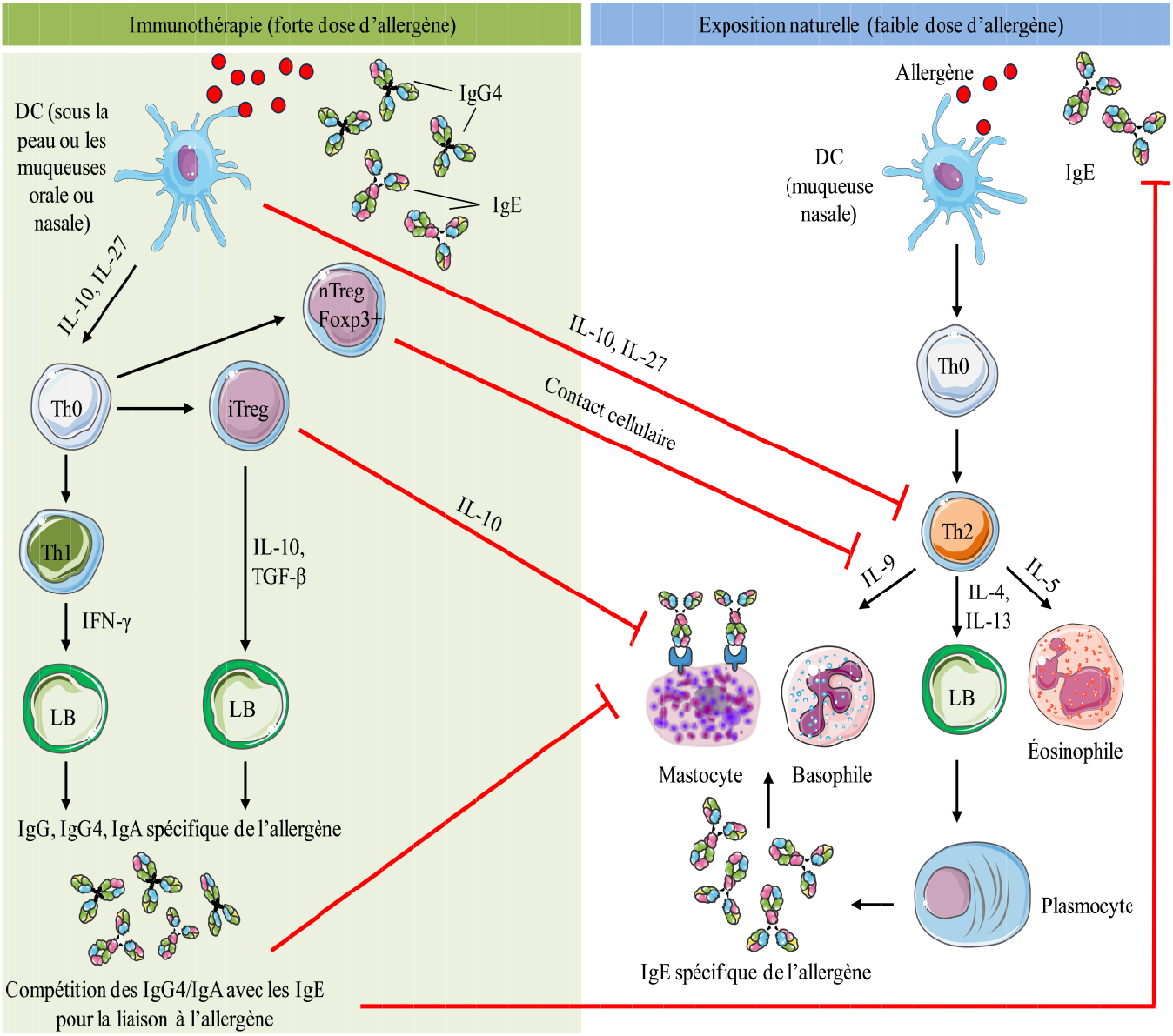


Figure 10 : Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie aux aéroallergènes (d'après [269]).

Une exposition répétée et à faible dose à l'allergène au niveau des muqueuses de surface, chez les individus atopiques conduit à une réaction d'hypersensibilité de type I. L'exposition à forte dose à l'allergène par les voies sous-cutanée ou sublinguale conduit à une transition de la polarisation des LTs, d'une réponse Th2 à une réponse Th1. Cela s'accompagne par une augmentation de la quantité de cytokines Th1 (IFN-γ et IL-12) sécrétées, par rapport aux cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13). L'induction de lymphocytes T régulateurs (Tregs inductibles (iTreg) et Tregs naturels (nTreg)) et des cytokines (IL-10 et TGF-β) à la suite de l'immunothérapie jouent un rôle important dans la suppression des réponses Th1 et Th2, et contribuent à l'induction d'anticorps IgA, IgG et particulièrement des IgG4 bloquants, spécifiques de l'allergène. Les IgG4 peuvent réprimer la présentation de l'allergène facilitée par les IgE, contrôlée par FcεRI et CD23, et la libération de médiateurs inflammatoires par les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles.

L'ITA vise à induire une tolérance spécifique des patients allergiques vis-à-vis des allergènes. Les mécanismes et les effets de l'ITA par voie sous-cutanée ou sublinguale sont similaires, et se manifestent d'abord par une réponse immédiate, puis par une réponse tardive. Au cours du traitement, il se produit notamment une induction de DCs tolérogènes, ainsi qu'une déviation des réponses lymphocytaires de type Th2 vers des réponses Th1/Treg. De même, une modification des réponses lymphocytaires B a lieu, en faveur de la production d'IgG4 et d'IgA.

Malgré des réponses immunitaires bien caractérisées, l'identification de biomarqueurs caractéristiques des réponses allergiques et liés à l'efficacité de l'immunothérapie représente un atout majeur. Ce type de marqueurs permettrait en effet d'augmenter le taux de pénétration, de sélectionner les patients pour lesquels le traitement aura le meilleur bénéfice clinique, d'améliorer le suivi pour permettre des adaptations éventuelles des protocoles, et indirectement d'accroître l'efficacité.

3. BIOMARQUEURS

L'immunothérapie confère de nombreux bénéfices cliniques pour les patients traités, cependant le taux de pénétration du traitement est encore faible. Si l'analyse des données cliniques et biologiques guide le choix de la thérapie à mettre en œuvre, ces paramètres ne permettent cependant pas de prévoir l'efficacité ou l'absence de toxicité du traitement. De plus dans le cas d'une ITA, de longues périodes de traitement sont requises, et la définition du temps d'arrêt adapté n'est pas claire. Ces facteurs peuvent également influencer négativement les patients et diminuer l'observance de l'ITA.

Dans ce contexte, la mise en évidence de biomarqueurs fiables et objectifs pour apprécier l'efficacité et la sécurité des traitements d'ITA est un défi à relever. Les marqueurs devraient en effet permettre d'identifier les patients pour lesquels le traitement sera bénéfique, sans effets secondaires, et également de suivre l'efficacité clinique en se basant sur les réponses immunologiques à l'allergène considéré. Des marqueurs devraient également permettre de déterminer la période appropriée pour un arrêt du traitement. Ensemble, les différents types de marqueurs, mesurés par des méthodes les moins invasives possibles, devraient permettre d'accroître le taux de pénétration ainsi que l'observance au traitement d'ITA.

3.1 Définitions des biomarqueurs

Le cadre réglementaire des biomarqueurs a été précisé au début des années 2000 par l'EMEA (*European Medicines Evaluation Agency*) et le NIH (*National Institute of Health*). Les marqueurs biologiques, ou biomarqueurs, sont ainsi définis comme des caractéristiques objectivement mesurées et évaluées comme des indicateurs de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique [270].

Les biomarqueurs peuvent être divisés en deux catégories, selon leur lien potentiel à pathologie ou à une thérapie. Parmi ces deux groupes, il existe différents types de biomarqueurs, présentés dans les sections suivantes et résumés dans le tableau 9 (en annexe).

3.1.1 Biomarqueurs associés à une pathologie

Il s'agit de marqueurs utilisés indépendamment d'une intervention thérapeutique spécifique. Ces marqueurs sont recherchés pour identifier une prédisposition pathologique, aider à son diagnostic ou définir le stade d'avancement de celle-ci. Il s'agit de marqueurs liés aux caractéristiques biologiques des pathologies, qui ne prennent pas en compte les modifications induites par les éventuelles thérapies. Par exemple, les gènes BRCA1 et BRCA2

sont des gènes de susceptibilité des cancers du sein et de l'ovaire. Les femmes porteuses de mutations ont ainsi un risque de 65% à 85% de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans. Le risque est également plus important chez les femmes porteuses de ces mutations de développer une tumeur dans l'autre sein [271].

Certains biomarqueurs de diagnostic sont révélateurs de la présence d'une pathologie chez les individus, tandis que d'autres marqueurs permettent d'attribuer des degrés de sévérité des pathologies. Par exemple, les critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer ont récemment été mis à jour. Il repose ainsi sur un profil clinique évocateur, confirmé ou infirmé par des biomarqueurs : les biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (peptide Ab1-42, protéine tau totale et protéine tau phosphorylée 181) sont le reflet de lésions neuropathologiques cérébrales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Ils permettent d'étayer le diagnostic de la maladie dans les cas cliniques complexes ou chez le sujet jeune. La détection de ces marqueurs est complétée par la neuro-imagerie TEP (tomographie par émissions de positons), permettant la visualisation du traceur amyloïde [272].

3.1.2 Biomarqueurs associés à un traitement

Ces marqueurs sont aussi parfois appelés biomarqueurs « compagnons » du traitement. Deux types de biomarqueurs peuvent être distingués : i) les marqueurs utilisés une seule fois avant la prescription du traitement, afin de sélectionner les patients pouvant en bénéficier, et ii) les marqueurs utilisés au cours de la thérapie, pour évaluer l'efficacité ou la toxicité de celle-ci.

3.1.2.1 Biomarqueurs prédictifs

Les biomarqueurs prédictifs de toxicité et de réponse au traitement vont faciliter la sélection des patients pour lesquels une réponse positive est attendue, ou l'exclusion des patients non-répondeurs ou pour lesquels le traitement sera toxique.

Pour être considéré comme prédictif, un marqueur doit ainsi remplir deux conditions :

- il doit être un « modificateur » de l'effet du traitement, c'est-à-dire prédire en fonction de sa valeur l'effet du traitement pour un critère particulier.
- le recours à ce marqueur pour la sélection de patients à traiter doit démontrer une utilité clinique. L'efficacité sera ainsi optimisée chez les patients porteurs du marqueur, alors que son intérêt sera moindre chez les autres patients.

Par exemple, dans le cas d'une thérapie anti-EGFR dans le cadre du traitement du cancer colorectal métastatique, certaines mutations du gène KRAS sont prédictives de l'inefficacité du traitement. Il est recommandé par les autorités de santé de procéder à un test déterminant les mutations éventuelles du gène KRAS avant de procéder à un traitement par un anti-EGFR [273].

Lorsqu'ils sont validés cliniquement, les marqueurs prédictifs peuvent à terme entraîner le développement de tests compagnons. Un test compagnon est ainsi utilisé pour la sélection des patients pour lesquels le traitement est susceptible d'apporter un bénéfice, pour une pathologie donnée [274].

3.1.2.2 Biomarqueurs d'efficacité

Les marqueurs d'efficacité à court-terme, incluant les marqueurs d'activité ou pharmacodynamiques, permettent de démontrer la mise en place d'une réponse au traitement, peu après son initiation. Dans le cadre de l'ITA, les marqueurs d'efficacité à long-terme sont destinés à détecter l'apparition de tolérance, à prévoir son maintien et à définir s'il est possible d'arrêter le traitement. Certains exemples sont présentés dans une section ultérieure. Les marqueurs d'efficacité sont utiles pour ajuster les traitements en fonction des réponses cliniques, ainsi que pour favoriser l'observance des patients.

3.2 Stratégies thérapeutiques associées aux biomarqueurs

Les biomarqueurs peuvent avoir un rôle en recherche exploratoire, être validés, selon leurs applications scientifiques, l'approbation par la communauté scientifique et l'acceptation par les autorités réglementaires. L'impact des biomarqueurs a considérablement augmenté dans le domaine du diagnostic moléculaire, et dans l'aide à la prise de décision liée au développement pharmaceutique, aux études cliniques et à la médecine personnalisée. Des avancées importantes ont été réalisées dans la recherche de biomarqueurs en oncologie, en neurologie, mais aussi dans les pathologies inflammatoires.

Les biomarqueurs ont un intérêt majeur dans le développement de stratégies thérapeutiques autres que l'approche « traditionnelle », consistant à prescrire un médicament à l'ensemble des patients présentant un même tableau clinique. Visant à soigner le plus grand nombre de patients, cette approche se déroule par essais successifs de plusieurs stratégies jusqu'au succès de l'une d'entre elles. Cependant, une proportion importante des patients peut

ne pas répondre au traitement, et des effets secondaires parfois très significatifs peuvent être observés. Les différentes approches thérapeutiques sont schématisées en figure 11.

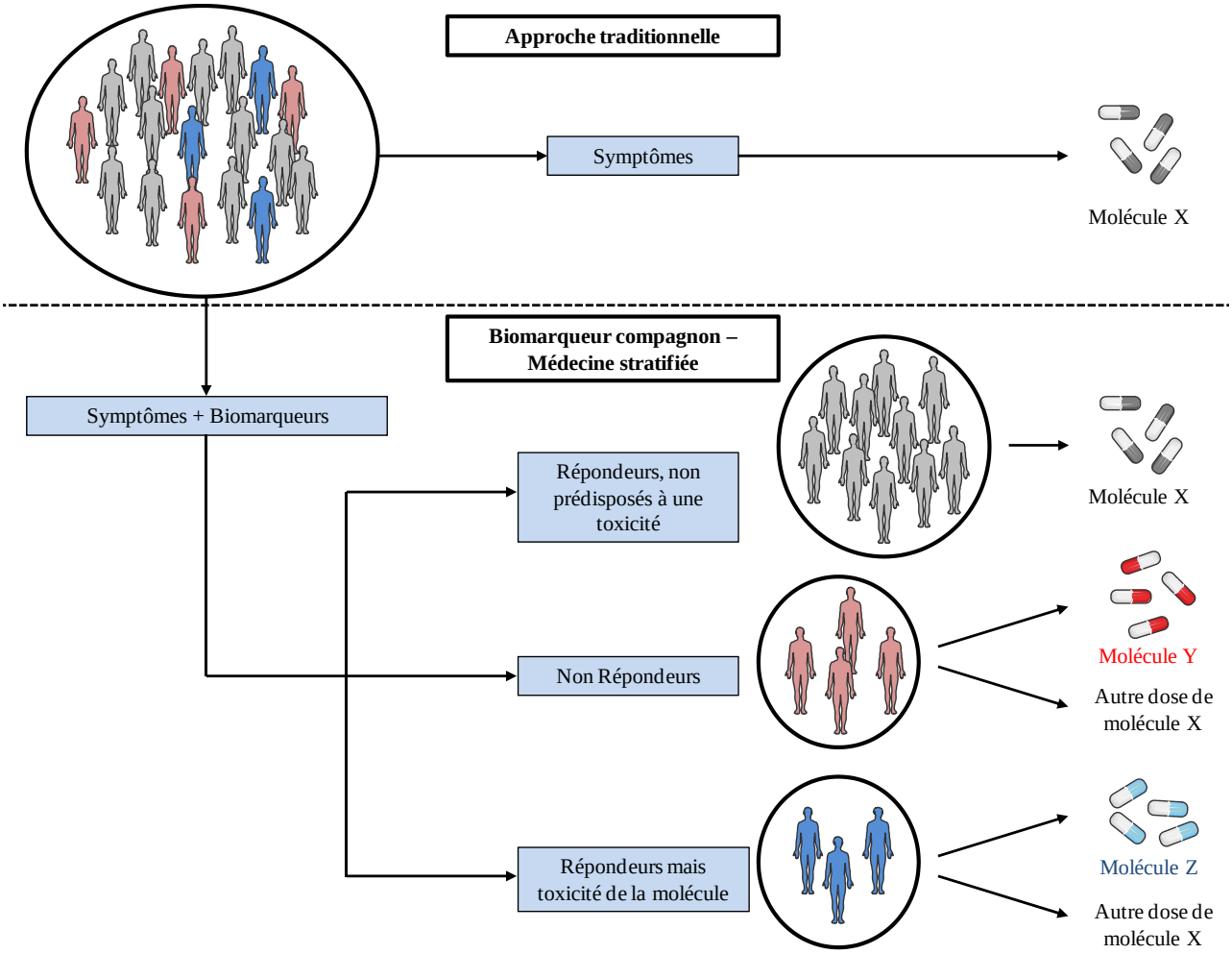


Figure 11 : Stratégies thérapeutiques traditionnelle et stratifiée.

La détermination de patients « répondeurs toxiques » et « non répondeurs » par les biomarqueurs compagnons permettra de mettre en place des thérapies alternatives.

La stratégie thérapeutique associée à l'utilisation de marqueurs prédictifs « compagnons » est souvent qualifiée de médecine personnalisée ou individualisée. Il s'agit cependant d'un abus de langage, puisque les marqueurs prédictifs sont utilisés dans une approche populationnelle et statistique, correspondant à une approche de type médecine stratifiée. Dans ce cadre, les estimations sont affinées et seules certaines sous-populations de patients sont considérées. L'effet du traitement peut ainsi être estimé en moyenne dans ces sous-populations (ou strates) de patients, mais il n'est pas estimé pour chaque patient individuellement.

3.3 Complexité et intérêts du développement d'un biomarqueur

3.3.1 Caractéristiques idéales d'un biomarqueur lié à une thérapie

Idéalement, un biomarqueur doit remplir les critères suivants : i) être détectable par des méthodes peu invasives, et des techniques répétables, ii) être généralisable, c'est-à-dire présenter une faible variabilité biologique, iii) avoir une bonne sensibilité et spécificité, donc minimiser les erreurs d'interprétations par la prise en compte de faux-positifs ou faux-négatifs, et iv) être lié à la réponse clinique.

Les méthodes de découverte de biomarqueurs sont très diverses et liées à la variété des composés pouvant être considérés comme molécules d'intérêt. Les biomarqueurs peuvent ainsi être des dérivés d'acide nucléotidique, des gènes ou variants génétiques, des produits d'expression génétique (ARN ou protéines), des métabolites, des polysaccharides ou d'autres molécules.

3.3.2 Découverte et développement du test

3.3.2.1 Découverte du biomarqueur

La découverte du biomarqueur et son évaluation scientifique constituent les premières étapes du développement. Dans certains cas, le candidat biomarqueur est identifié à partir de connaissances scientifiques et médicales existantes. Il peut ainsi être associé à l'état clinique ciblé, ce qui permet d'initier rapidement les phases de développement en vue de son utilisation en clinique.

Dans la majorité des cas cependant, le candidat biomarqueur est identifié empiriquement, par des méthodes de génomique, de transcriptomique, de protéomique ou de métabolomique, à partir d'échantillons issus d'une bio-banque spécifique de la pathologie. Cette phase de découverte nécessite donc d'importants moyens. Une fois la pertinence du biomarqueur validé dans des études *ad hoc*, le développement d'un test commercial peut être envisagé.

3.3.2.2 Développement du test

Lorsque le biomarqueur d'intérêt est clairement identifié et caractérisé, le développement d'un test à visée commerciale permettant son dosage en routine peut être

entrepris. L'évaluation des performances devra être réalisée. L'échantillonnage et le test devront également être standardisés, de même que la méthode de traitement des données.

Les tests diagnostiques développés pour des biomarqueurs prédictifs, déterminant le statut des patients pour ce marqueur, doivent être évalués à trois niveaux : la validité analytique, la validité clinique et l'utilité clinique sont ainsi déterminées.

- La validité analytique du test diagnostique correspond à sa capacité *in vitro* à réaliser la mesure d'intérêt de façon exacte et fiable. Les caractéristiques techniques du test doivent donc être prises en compte. Elles incluent l'exactitude, la sensibilité et la spécificité analytiques, la robustesse, la répétabilité, la reproductibilité, la satisfaction des contrôles qualités. Généralement, les performances d'un nouveau test sont comparées à celles des dispositifs équivalents déjà existant. Dans le cas de nouveaux biomarqueurs sans équivalents sur le marché, des échantillons de patients caractérisés sur le plan clinique servent de référence, afin de corréler les performances du test aux données cliniques, et d'en déduire sa sensibilité et sa spécificité.
- La validité clinique du test diagnostique correspond à sa capacité à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt. Il s'agit de déterminer si le test permet d'identifier l'évènement clinique pour lequel il est réellement destiné, donc s'il existe une relation, et laquelle, entre les résultats du test et le phénotype d'intérêt. La validité clinique prend en compte les paramètres de sensibilité et de spécificité cliniques, déterminés à partir de cohortes de sujets atteints et non atteints. Par ailleurs, la validité clinique permet de définir les valeurs prédictives positive et négative du test, qui définissent ses « performances diagnostiques ».
- L'utilité clinique du test diagnostique correspond à la démonstration de l'utilité et de la valeur ajoutée du test sur la prise en charge des patients. Les résultats fournissent des informations utiles pour la prise de décision concernant la stratégie thérapeutique. En effet, le test compagnon doit permettre de ne pas traiter inutilement des patients pour lesquels le traitement serait inefficace, et inversement ne pas exclure des patients pour lesquels le traitement serait en réalité bénéfique.

3.3.3 Intérêts du développement de biomarqueurs prédictifs

L'utilisation de biomarqueurs prédictifs permet d'optimiser chaque étape de la chaîne de valeur du médicament. En particulier, des objectifs scientifiques et médicaux, mais également économiques, gouvernent leur développement, que ce soit pendant les phases

précédant la mise sur le marché de la thérapie, ou après la mise sur le marché. Ces différents objectifs sont synthétisés dans le tableau 4.

<table>
<tr><th></th><th>Phases précédant la mise sur le marché</th><th>Phases consécutives à la mise sur le marché</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Objectifs scientifiques et médicaux</td><td>• Réduire le taux d'attrition :
- éliminer au plus tôt les candidats thérapeutiques les moins efficaces (phases I/II/III)
- anticiper les échecs en phases avancées de développement (phase III)</td><td rowspan="2">• Améliorer le ratio bénéfice/risque :
- diminuer les effets secondaires
- éviter les rappels de produits
- améliorer la durée et la qualité de vie des patients</td></tr>
<tr><td>• Améliorer le ratio bénéfice/risque :
- améliorer l'efficacité thérapeutique en ciblant les patients répondeurs
- diminuer la toxicité de la thérapie</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Objectifs économiques</td><td>• Identifier de nouvelles populations cibles</td><td>• Dynamiser le cycle de vie du médicament</td></tr>
<tr><td rowspan="2">• Optimisation de la R&D :
- réduire la taille des cohortes, par la stratification des patients
- diminuer la durée de la phase de développement</td><td>• Générer un retour sur investissement plus important</td></tr>
<tr><td>• Avantage compétitif sur la concurrence</td></tr>
</table>

Tableau 4 : Intérêts du développement de biomarqueurs « compagnons » dans le cycle de vie du médicament.

Nous présentons dans la section suivante certains biomarqueurs décrits pour la pathologie des voies respiratoires inférieures qu'est l'asthme. Ceux-ci peuvent différer des marqueurs de la rhinite allergique, dont les symptômes sont relatifs aux voies respiratoires supérieures. Les études comparant les biomarqueurs présents chez des sujets allergiques, allergiques non asthmatiques ou allergiques asthmatiques mettent ainsi en évidence des phénotypes différents pour les pathologies allergiques des voies respiratoires, mais également des marqueurs communs [275].

3.4 Biomarqueurs de l'asthme

Dans le cas d'une pathologie hétérogène comme l'asthme, les biomarqueurs associés en combinaisons donnent la possibilité de classer selon des groupes phénotypiques les patients partageant des caractéristiques pathologiques identiques [276]. Les biomarqueurs de l'asthme,

obtenus par des méthodes plus ou moins invasives de collecte de divers milieux biologiques, sont synthétisés en figure 12.

3.4.1 Biomarqueurs des voies respiratoires inférieures

Les biomarqueurs utilisés actuellement par les cliniciens proviennent de milieux biologiques variés. Il peut ainsi s'agir de l'observation d'infiltrations d'éosinophiles ou de l'augmentation des cytokines Th2 dans les biopsies bronchiques ou les lavages broncho-alvéolaires des patients asthmatiques [277, 278]. L'inconvénient majeur de ces marqueurs est dû au caractère invasif des techniques mises en œuvre pour obtenir les échantillons pulmonaires. Par ailleurs, le dosage de ces marqueurs est restreint à des centres médicaux spécialisés [279].

3.4.2 Biomarqueurs obtenus par des méthodes semi-invasives

3.4.2.1 Biomarqueurs provenant de l'air exhalé

La fraction expirée du monoxyde d'azote (FeNO) a été décrite dans de nombreuses études comme un indicateur de risques d'exacerbations asthmatiques [280] : de fortes valeurs de FeNO seraient associées à une inflammation éosinophilique des voies aériennes, et pourraient être révélatrices d'un asthme incontrôlé [281]. Cependant l'intérêt clinique de la valeur de FeNO pour prédire les exacerbations asthmatiques est discuté. En effet, plusieurs études ne permettent pas d'associer des valeurs élevées de FeNO avec l'éosinophilie accrue dans les expectorations ou les échantillons bronchiques [282, 283]. D'autres équipes n'ont pas observé de corrélations entre la FeNO et le contrôle de l'asthme. Des facteurs autres que les symptômes asthmatiques semblent influencer la valeur de FeNO, comme l'inflammation des voies aériennes, l'âge, le statut atopique ou le recours à des traitements symptomatiques [281]. Le manque de spécificité de la valeur de FeNO conduit à utiliser cette donnée en combinaison avec d'autres marqueurs de l'inflammation asthmatique, pour améliorer l'évaluation du statut pathologique associé [284].

3.4.2.2 Biomarqueurs provenant des expectorations

Les expectorations provoquées constituent également une source biologique pour la recherche de cellules inflammatoires [285]. Une augmentation du nombre d'éosinophiles a été observée dans des échantillons d'expectorats provenant de patients allergiques symptomatiques, plus marquée au cours des exacerbations spontanées ou des modèles

d'exacerbations asthmatiques (par exemple, au cours de la réponse tardive induite par l'allergène et suite à la diminution des doses de glucocorticoïdes administrées) [286]. Au cours d'une étude, le traitement est ajusté dans deux groupes de patients, en considérant les patients en fonction de l'amélioration des symptômes et de l'énumération des éosinophiles des expectorations d'une part, ou en fonction de l'amélioration des scores symptomatiques et des fonctions pulmonaires d'autre part. À l'issue de l'étude, une diminution de la fréquence des exacerbations asthmatiques sévères est observée, dans le groupe de patients pour lesquels le traitement est ajusté en fonction des symptômes cliniques et du dénombrement d'éosinophiles [40].

3.4.2.3 Biomarqueurs sanguins

L'évaluation de marqueurs dans le sang périphérique représente une alternative aux mesures invasives décrites plus haut. Ainsi, l'éosinophilie dans le sang est associée à l'hyper-réactivité bronchique et à l'inflammation asthmatique [287]. Cependant l'utilisation de l'éosinophilie pour diagnostiquer l'asthme est limitée par son manque de spécificité, puisque les allergies, les maladies auto-immunes et les infections parasitaires sont également responsables d'un accroissement de l'éosinophilie sanguine. Il en est de même pour les taux d'IgE sériques [288]. Récemment, la protéine matricellulaire périostine a été décrite en tant que biomarqueur potentiel. Une équipe a ainsi montré que la concentration sérique de cette protéine sécrétée par les cellules épithéliales bronchiques sous l'influence de l'IL-13 était corrélée à l'éosinophilie dans les expectorations de patients asthmatiques [289]. De plus, les patients présentant de forts taux de périostine sérique présentent une amélioration clinique plus importante suite à un traitement par un anti-IL-13 (Lebrikizumab), par rapport aux patients dont les taux sériques sont faibles [169]. D'autres équipes ont montré que les concentrations sériques en protéines éosinophiliques granulaires (ECP et plus particulièrement l'EDN, *Eosinophil-Derived Neutoxin*) étaient associées à la sévérité de l'asthme pédiatrique [290].

D'autres protéines circulantes ont également été décrites comme marqueurs de l'asthme. Par une analyse protéomique en éléctrophorèse bidimensionnelle, un panel de quatre protéines a été identifié, permettant de différencier les sujets sains par rapport aux patients asthmatiques. La ceruloplasmine, l'haptoglobine, l'hémopéxine, et l'α2-macroglobuline sont ainsi plus abondantes dans le sérum des patients allergiques [291].

3.4.3 Biomarqueurs obtenus par des méthodes non invasives

La mesure des métabolites contenus dans l'urine représente la méthode la moins invasive pour l'étude des réponses des patients asthmatiques. Les échantillons sont en effet facilement obtenus des patients ne pouvant pas produire d'expectorations, rendant la méthode adaptée à l'étude de l'asthme chez les jeunes enfants.

Les leukotriènes cystéinylés (LTC4, LTD4 et LTE4) sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique par les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles et les monocytes [292]. Le LTC4 constitue le métabolite de l'acide arachidonique le plus abondant dans les tissus pulmonaires. Très instable, il est rapidement métabolisé en LTD4 puis en LTE4, qui représente le métabolite final stable, évacué dans l'urine. Il a été montré que les concentrations en LTE4 urinaire sont plus importantes chez les sujets asthmatiques (enfants [293] ou adultes [294]), et qu'elles sont par ailleurs associées à la sévérité de la maladie et à la fréquence des exacerbations.

Par ailleurs, des études ont également été menées pour lier les métabolites de la PGD2 et l'asthme. En effet, la prostaglandine D2 (PGD2) induit la bronchoconstriction et la vasodilatation des voies respiratoires des patients asthmatiques. Cette prostaglandine est sécrétée par les mastocytes pulmonaires activés, et métabolisée en 9α, 11β-PGF2, à son tour rapidement éliminé par l'urine. Une augmentation du 9α, 11β-PGF2 urinaire a été observée chez les patients asthmatiques subissant un challenge allergénique [295]. De même, des enfants souffrant d'un asthme aigu ou d'un asthme induit par l'exercice présentent des concentrations urinaires élevées de ce composé [296].

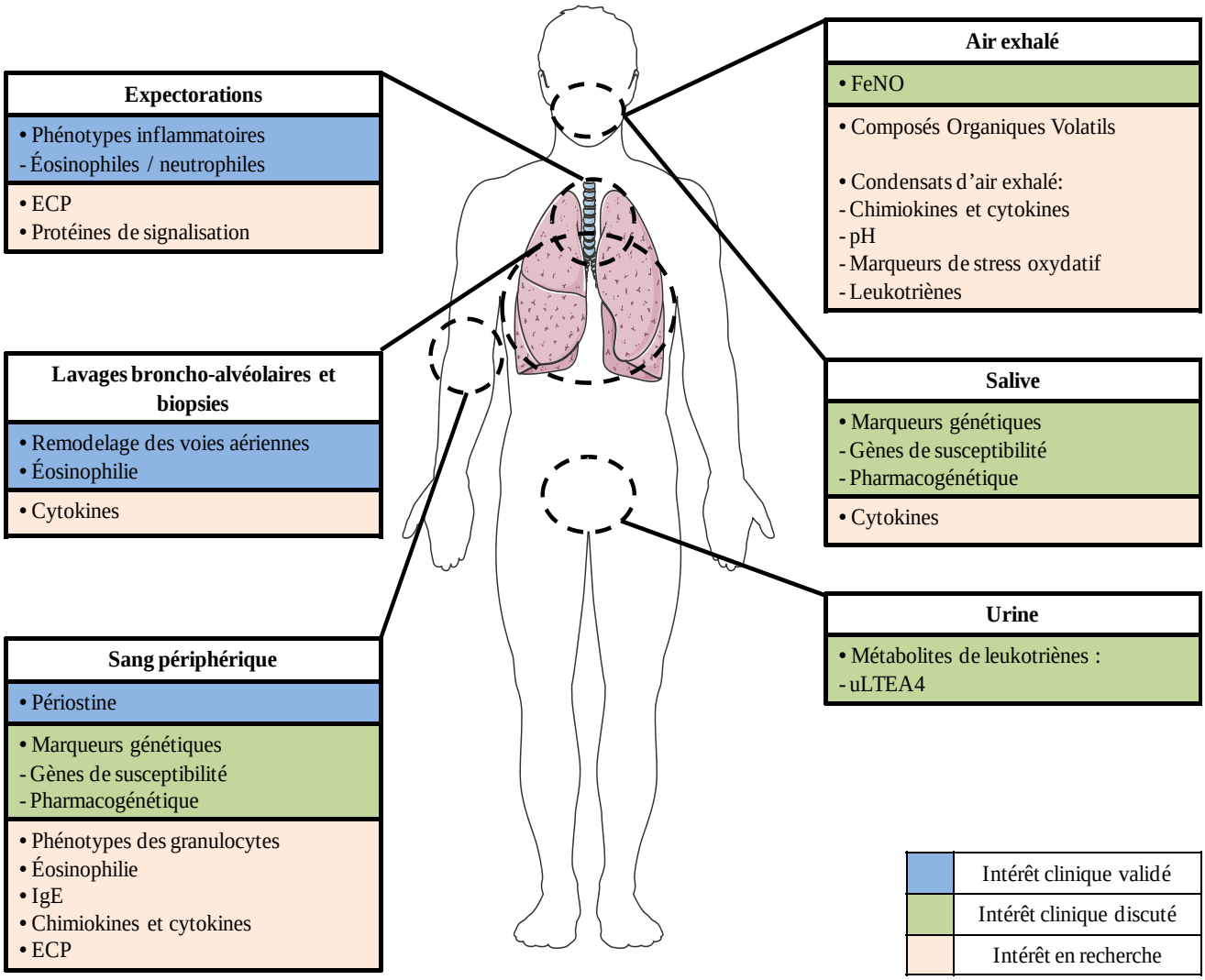


Figure 12 : Biomarqueurs de l'asthme (adapté de [297]).

Abréviations : ECP = *Eosinophil Cationic Protein* ; FeNO = fraction expiree du monoxyde d'azote ; uLTE4 = leukotriène E4 urinaire.

3.5 Biomarqueurs de la rhinite allergique et de réponse à l'ITA

3.5.1 Biomarqueurs de la rhinite allergique

Les marqueurs de la rhinite allergique sont relatifs à l'activité des cellules effectrices au cours de la phase immédiate ou de la phase tardive.

3.5.1.1 Marqueurs dérivés des mastocytes

Au cours de la phase immédiate de la réponse allergique, l'histamine est le médiateur le plus abondamment libéré des mastocytes et des basophiles. Cette libération importante se

manifeste par une valeur maximale de la concentration en histamine dans les lavages nasaux, quinze à vingt minutes après des challenges allergéniques [298]. Cependant, des niveaux de base élevés en histamine ainsi que la variabilité importante entre les sujets empêchent de considérer ce médiateur comme un marqueur de sévérité de la maladie. Des lavages nasaux peuvent être réalisés avant les challenges allergéniques, pour éliminer l'histamine déjà présente [299]. D'autres marqueurs de la dégranulation des mastocytes, présentant une meilleure stabilité, peuvent être pris en compte. Ainsi, la tryptase [300], la PGD2 [301] et les leukotriènes [302] sont présents dans les lavages nasaux au cours de la phase immédiate de la réponse allergique.

3.5.1.2 Marqueurs dérivés des éosinophiles

Les éosinophiles sont présents dans les culots cellulaires des lavages nasaux. Des médiateurs tels que l'ECP et l'EPX (*Eosinophil Peroxidase*) sont révélateurs d'une activation des éosinophiles, et apparaissent dans les lavages nasaux environ six à dix heures après le challenge allergénique [303]. Malgré une variabilité importante entre les individus, il a été démontré que les variations de la concentration en ECP après un challenge aux pollens de graminées sont corrélées avec les symptômes d'obstruction et d'écoulements nasaux [304]. De plus, la concentration en ECP dans les lavages nasaux des patients allergiques est augmentée au cours de la saison pollinique [305]. La diminution de la concentration en ECP dans les lavages nasaux est également associée à une diminution des symptômes de la rhinite allergique en phase tardive, lorsqu'un traitement par le glucocorticoïde fluticasone est appliqué [299].

3.5.1.3 Oxyde nitrique nasal

De façon semblable à la mesure de la FeNO chez les sujets asthmatiques, l'oxyde nitrique nasal (nNO) représente un marqueur caractéristique de l'inflammation des voies respiratoires supérieures, au cours de la rhinite allergique. Des méthodes standardisées ont ainsi été mises en place pour procéder à sa mesure [306].

Le nNO est produit au niveau des sinus paranasaux par des enzymes de synthèse exprimées dans l'épithélium. La concentration standard du nNO est comprise entre 400 et 900 ppb. Le nNO contenu dans les sinus aurait pour fonction d'accroître la protection de l'hôte, en inhibant la multiplication des agents pathogènes et en stimulant l'activité mucociliaire [307]. À la synthèse endogène de nNO s'ajoute l'oxyde nitrique environnant, qui peut affecter la mesure du nNO, et ainsi empêcher son interprétation [308].

Il a été montré que la production de nNO est accrue, chez des patients allergiques symptomatiques ou asymptomatiques, en comparaison à des sujets sains [309]. Cependant en pratique, la mesure du nNO est peu applicable en tant que marqueur de suivi de la pathologie ou d'évaluation de l'efficacité des traitements : pour un même individu, des variations importantes seront observées sur le long terme, résultant de la combinaison de facteurs endogènes et environnementaux. Certains travaux ont par ailleurs montré que les traitements anti-inflammatoires étaient associés à une diminution de la concentration en nNO [310], tandis que d'autres études montrent un effet marginal des traitements sur la teneur en nNO [311].

3.5.2 Biomarqueurs de réponse à l'ITA

Les marqueurs présentés précédemment permettent de caractériser biologiquement l'activité pathologique au cours de la rhinite allergique. Certains sont également utilisés pour le suivi de la réponse clinique à la suite de traitements symptomatiques. Il est également important de disposer de marqueurs prédictifs et de suivi d'efficacité des traitements d'ITA.

3.5.2.1 Les immunoglobulines, marqueurs de suivi d'efficacité ?

Comme précisé précédemment, le diagnostic de l'hypersensibilité de type I s'appuie sur le dosage des IgE sériques, en association avec l'interrogatoire clinique du patient. Par ailleurs, l'issue favorable d'un traitement d'immunothérapie est évaluée par la désensibilisation effective du patient, en constatant l'amélioration de la qualité de vie et en évaluant la diminution de la proportion des IgE spécifiques de l'allergène par rapport aux IgE totales dans le sang. Dans des études sur des patients traités par immunothérapie aux pollens de graminées, la fraction d'IgE spécifiques par rapport aux IgE totales dans le sang est associée à l'amélioration clinique [312-314]. L'immunothérapie contre l'allergie aux acariens domestiques a cependant montré des résultats contradictoires, les ratios des IgE spécifiques par rapport aux IgE totales n'étant pas corrélés avec les scores de symptômes et médicamenteux ou à l'échelle analogue visuelle (EAV) de sensibilisation, basée sur la taille des papules [315].

Le taux d'IgG4 par rapport aux IgG1 a également été étudié pour renseigner la probabilité de réponse à l'ITA [316]. Cependant cette hypothèse demeure controversée : si de nombreuses études indiquent une augmentation des taux d'IgG4 bloquant au cours des traitements d'ITA [250, 317], ceux-ci ne permettent d'expliquer qu'une faible proportion de la variabilité des réponses cliniques [318]. Les progrès techniques devraient permettre d'accroître la valeur prédictive des diagnostics moléculaires, en quantifiant la sensibilité des IgE aux

allergènes majeurs [319]. Dans le cas de l'allergie aux graminées, il s'agit de détecter la réactivité des IgE à Phl p 1 et Phl p 5 plutôt qu'aux panallergènes Phl p 4 ou Phl p 12 [320]. En cas de contradictions entre le statut clinique et les dosages d'IgE, les provocations allergéniques locales aux organes cibles (œil, nez, bronches) pourraient être utiles, de même que la quantification des IgE locales dans les sécrétions nasales, les larmes ou les lavages broncho-alvéolaires. Cependant, la valeur prédictive de réponse à l'immunothérapie des tests de provocations allergéniques ou du dosage des IgE locales n'a pas été démontrée à ce jour.

Des tests basés sur la fonctionnalité des IgG sériques ont été mis au point. Ils reposent sur l'activité inhibitrice des IgG pour l'activation des basophiles stimulés par l'allergène [321], ou sur l'activité inhibitrice des IgG pour la liaison des complexes IgE-allergènes aux lymphocytes B (test IgE-FAB) [322]. Dans une étude, l'inhibition de la réponse sérique en IgE-FAB est modestement corrélée à la réponse clinique, alors que cette corrélation n'est pas mise en évidence avec les taux d'IgG4 immunoréactifs [319].

3.5.2.2 Autres marqueurs émergeants

La connaissance des mécanismes régissant l'ITA incite à considérer les variations des réponses T et les signatures cellulaires des LTs et des DCs comme des biomarqueurs potentiels pour le suivi précoce de l'efficacité du traitement. Les marqueurs protéiques C1Q et STAB1 ont ainsi été mis en évidence comme marqueurs de suivi de l'efficacité de l'ITA : leur expression est corrélée à l'amélioration clinique après quatre mois d'ITA chez des patients allergiques aux pollens de graminées [237]. Cependant, la complexité des procédés pour réaliser leur quantification amoindrit la possibilité de déployer ces marqueurs en routine pour le suivi de l'efficacité de l'ITA. Des travaux portant sur les taux de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) sérique circulant ont également mis en évidence une diminution de sa concentration après des traitements d'ITA [323]. Le lien entre la réponse clinique au traitement d'ITA et le taux de cette molécule TRAIL, impliquée dans le remodelage des voies aériennes et liée aux voies de signalisation du TGF-β, doit néanmoins être validé.

D'autres études se sont portées sur les variations du complexe majeur d'histocompatibilité soluble, la molécule sHLA-G, au cours de l'ITA par voie sublinguale. En effet HLA-G contrôle des mécanismes immunosuppresseurs, mais il a également été montré que HLA-G pouvait moduler la sécrétion des cytokines de type Th2 ou associées à profil régulateur, comme constaté au niveau de la sécrétion de l'IL-3, l'IL-4 et l'IL-10 [324]. La concentration sérique en sHLA-G augmente dans différentes conditions pathologiques, comme

chez les sujets atteints de sclérose en plaque ou transplantés, ou dans le cas de certaines tumeurs [325]. À l'issue de trois mois d'immunothérapie pré-saisonnière au pollen de graminées, les patients traités présentent une diminution significative de la concentration sérique en sHLA-G. De plus, le pourcentage de variation de la concentration en sHLA-G est associé au score des symptômes cliniques, évalué six mois après le début du traitement par une échelle analogue visuelle [326].

Par ailleurs, des approches récentes à partir de tétramères de molécules de classe II du CMH ont été menées afin de suivre la polarisation des LTh spécifiques de l'allergène au cours du traitement d'ITA. Ce traitement est en effet associé à une déplétion des Th2, au profit des cellules de type Th1/Treg, de phénotype CD27+ [255]. Ces approches considérant les Th2 comme marqueurs de suivi doivent néanmoins être validées à partir de cohortes de patients inclus dans des protocoles cliniques d'ITA.

Enfin, l'activation des basophiles représente un paramètre d'étude également utilisé pour le suivi de la réponse à l'ITA, mais le test nécessite d'avoir accès à des échantillons de sang frais et à une plateforme de cytométrie en flux dans un délai de quelques heures. Par ailleurs, les résultats sont controversés quant à la corrélation entre l'activation des basophiles et l'efficacité clinique [327, 328].

Actuellement, à l'exception du recours aux taux d'IgE sériques spécifiques d'allergène [329] dont le dosage est bien standardisé, et malgré les limites que présente la mesure du ratio entre les IgE spécifiques et les IgE totales, aucun biomarqueur prédictif fiable et recommandable pour la sélection individuelle de patients pour lesquels le traitement d'ITA serait bénéfique n'a été identifié.

Les biomarqueurs associés à des thérapies sont de diverses natures et fonctions, selon qu'ils sont utilisés pour le diagnostic, l'étude des mécanismes ou de la pharmacodynamique d'une pathologie, ou qu'ils interviennent pour le suivi de la toxicité ou de l'efficacité du traitement. D'autres marqueurs, dits prédictifs, visent à prédire la réponse clinique des patients avant la conduite du traitement. Des biomarqueurs liés à la réponse à l'immunothérapie peuvent faciliter le suivi de l'efficacité du traitement : les ratios des taux d'immunoglobulines ou le dosage de certaines protéines sériques constituent des options à l'étude. Cependant, il n'y a pas à ce jour de biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'ITA décrit.

La découverte de tels biomarqueurs est donc essentielle pour améliorer la sélection des patients pouvant bénéficier du traitement. Les méthodes d'analyse protéomique différentielle présentées dans la section suivante sont des outils de choix pour l'identification de biomarqueurs à partir de divers échantillons biologiques.

4. PROTEOMIQUE ET RECHERCHE DE BIOMARQUEURS

Comme présenté précédemment, les biomarqueurs sont des caractéristiques biologiques mesurées objectivement, traduisant des états physiologique, pathologique ou leur évolution. Parmi les différents types de marqueurs, les biomarqueurs moléculaires peuvent être de natures variées : ADN, ARN, protéines ou métabolites. Notre étude se concentrera sur les protéines, qui représentent une vaste source de biomarqueurs et un système dynamique.

4.1 Définition et applications de la protéomique

4.1.1 Définition

Le terme « protéomique » correspond au domaine de recherche associé à l'analyse des protéines, généralement à grande échelle, dans les tissus, cellules ou fluides biologiques à un temps donné et selon des conditions données. Le terme « protéome » est employé pour la première fois en 1995 par Wilkins, pour désigner l'ensemble des protéines cellulaires ou tissulaires décrites à partir de la séparation de complexes protéiques [330].

Le but de la protéomique consiste non seulement à identifier toutes les protéines, mais également à créer un réseau multidimensionnel des protéines, en intégrant leurs interactions et localisations. Le protéome est dynamique puisqu'il est directement lié à l'environnement immédiat dans lequel il est étudié. En réponse à un signal interne ou externe, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles, être synthétisées ou dégradées, changer de compartiment cellulaire ou être sécrétées. En conséquence, le cadre d'étude du protéome doit être précisément défini.

4.1.2 L'étude d'un système dynamique

La protéomique est concentrée sur l'étude des protéines, tandis que la génomique, la transcriptomique et la métabolomique concernent respectivement l'étude des gènes, des fragments d'ARN et des métabolites.

Si le protéome d'une cellule ou d'un organisme est directement lié à son génome, le séquençage du génome ne permet cependant pas de déterminer les protéines exprimées par une cellule à un instant considéré. Par exemple, le nombre de gènes identifiés dans le génome humain est proche de 20 000 [331], et ces gènes sont relativement stables au cours des différents cycles cellulaires, tandis que le transcriptome et le protéome sont dynamiques. La

transcriptomique étudie les ARN messagers (ARNm), c'est-à-dire le niveau d'expression des gènes. L'épissage alternatif des ARNm apporte un premier degré de complexification, un gène pouvant conduire à plusieurs ARNm. Au cours de la traduction, la séquence protéique est formée dans le ribosome à partir de ces ARNm.

La complexité du protéome humain dépasse d'un facteur 3 à 4 celle du génome [332]. Cette complexité résulte alors de la combinaison de plusieurs facteurs, à la fois de régulation interne mais également externe. Par exemple, les protéines peuvent présenter des modifications post-traductionnelles (PTMs) de différentes natures. Certaines peuvent représenter des signatures d'altération des protéines, comme la déamidation ou l'oxydation [333], d'autres peuvent être ajoutées par des réactions enzymatiques se produisant après la traduction. Les PTMs peuvent être temporaires et réversibles, et avoir une influence sur la demi-vie des protéines, ainsi que sur leur fonction. Différents facteurs pouvant entraîner une fluctuation du protéome sont représentés en figure 13. Le terme « protéoforme » est adapté pour décrire la complexité protéique, résultant de la variation induite par la traduction des gènes, par l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles [334].

La protéomique, au même titre que la génomique, la transcriptomique ou la métabolomique, fait partie des technologies haut-débit de recherche de biomarqueurs. Cependant, les protéines reflètent de façon plus précise la physiologie cellulaire par rapport aux marqueurs nucléotidiques, et représentent donc des molécules prometteuses pour une application en tant que biomarqueurs. La protéomique permettra par exemple de comparer qualitativement et quantitativement des empreintes protéiques entre sujets sains et pathologiques, et ainsi de faire émerger des listes de candidats biomarqueurs.

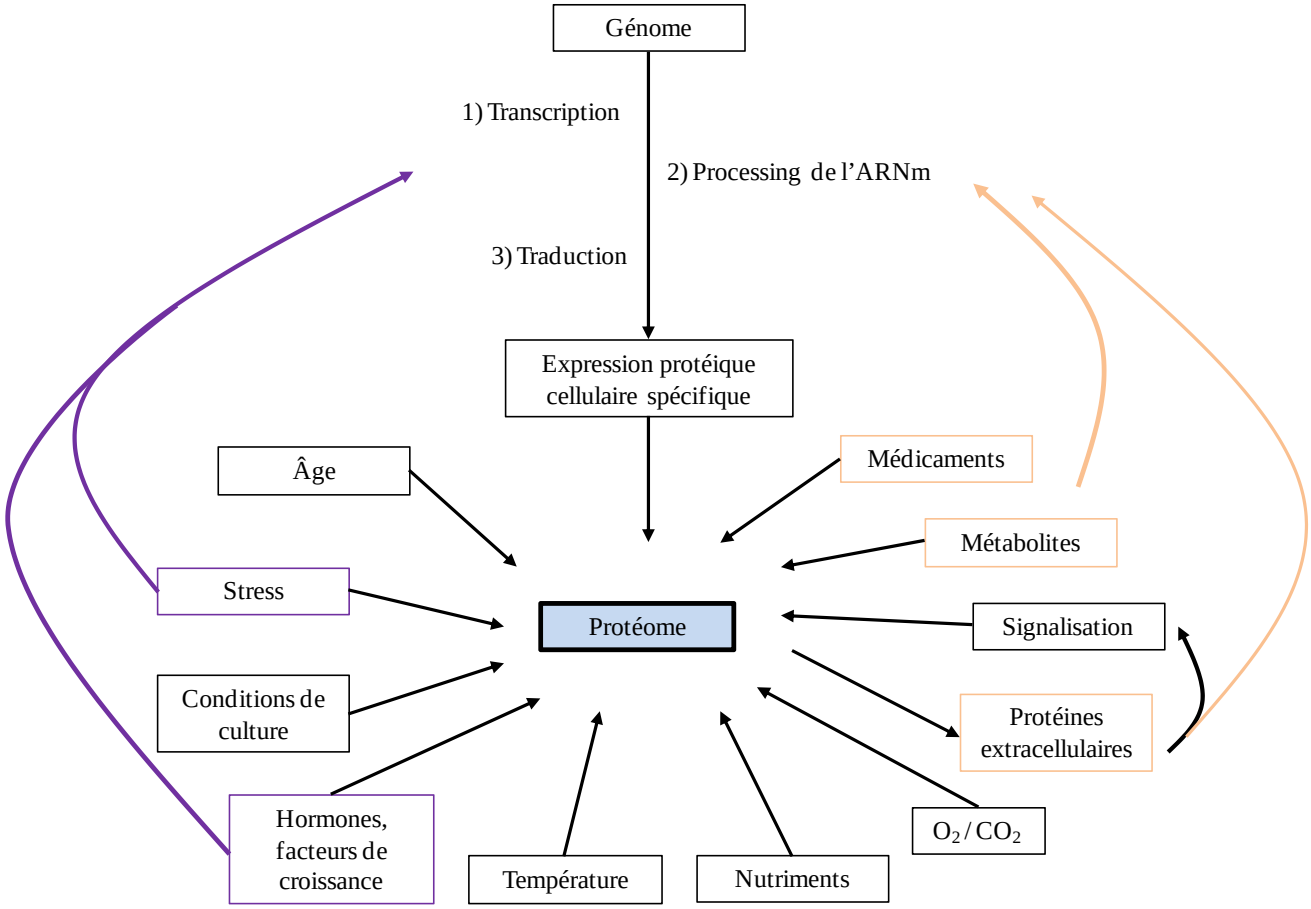


Figure 13 : Le protéome, un système dynamique.

Des facteurs externes ont une incidence sur le protéome, soit directement, soit *via* le génome.

4.1.3 Historique et applications de la protéomique

Les premières approches de protéomique remontent aux années 1970, lorsque les premiers travaux sur les méthodes de séparation de protéines en électrophorèse bidimensionnelle furent présentés [335]. Des mélanges de protéines complexes issues d'*Escherichia coli* [335], les protéines solubles de tissus murins [336], ou les protéines non-histones de la chromatine murine [337] ont ainsi constitué les sources d'analyses initiales. La première analyse du plasma humain par électrophorèse bidimensionnelle est réalisée en 1977 et permet la détection de 300 spots protéiques [338]. Les avancées technologiques des années 1980 et du début des années 1990 ont permis d'accroître la sensibilité des techniques d'identification des protéines séparées sur gel. Ainsi, le séquençage d'Edman, à partir de l'amine terminale de protéines intactes ou de fragments digérés enzymatiquement représentait l'approche la plus courante pour identifier les protéines séparées sur gel [339]. Malgré les avantages de fiabilité et d'automatisation, la méthode de séquençage d'Edman présente des

limites en termes de sensibilité et de rapidité. Les progrès des technologies d'analyses des protéines, couplés aux développements de la spectrométrie de masse, des bases de données et des outils de recherche dans ces bases, ont rendu possible l'identification et l'étude de l'expression des protéines résolues en gels bidimensionnels, dès le début des années 1990.

Au cours des deux dernières décennies, le domaine de la protéomique a connu une forte expansion. Celle-ci est due à l'évolution constante des instruments de spectrométrie, aux nouvelles méthodes de préparation des échantillons, au séquençage génomique de nombreux organismes permettant ainsi une recherche des protéomes dans les bases de données, ainsi qu'à la mise à disposition d'outils bio-informatiques performants [340].

Il est actuellement possible de considérer les applications de la protéomique selon trois objectifs : i) la cartographie protéique, qui comprend la détection et la localisation des protéines sub-cellulaires, mais aussi la caractérisation des interactions protéiques [341, 342], ii) la caractérisation des modifications protéiques (dont les modifications post-traductionnelles), et iii) la quantification (relative ou absolue) des protéines. Une analyse protéomique est constituée généralement de quatre grandes étapes : la préparation, la séparation, et l'identification / caractérisation des protéines de l'échantillon.

Le cadre de la recherche de biomarqueurs a largement tiré profit des différentes applications de protéomique. Celles-ci s'appuient considérablement sur la spectrométrie de masse, présentée dans la section suivante.

4.2 La spectrométrie de masse, outil de choix pour la recherche de biomarqueurs protéiques

4.2.1 Définition et principe général

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse permettant la détection et l'identification de molécules d'intérêt, par la détermination de leur masse moléculaire. Elle s'appuie sur le passage en phase gazeuse des composés, dont une partie sera ionisée. Les ions en phase gazeuse sont ainsi séparés selon leur rapport masse sur charge (*m/z*). Il est ainsi possible de déduire la masse moléculaire des composés, d'identifier des protéines d'intérêt, de même que de déterminer la nature de structures chimiques, en fragmentant les molécules.

Du fait de la variété des applications possibles (détermination de la nature, de la composition ou de la structure d'espèces), les domaines d'utilisation de la MS sont très larges et comprennent la chimie organique ou inorganique, la biochimie, la chimie clinique et environnementale, la géochimie…

4.2.2 Éléments d'un spectromètre de masse

Le spectromètre de masse comprend les éléments suivants, synthétisés en figure 14 : une source, un analyseur, un détecteur et un système informatique.

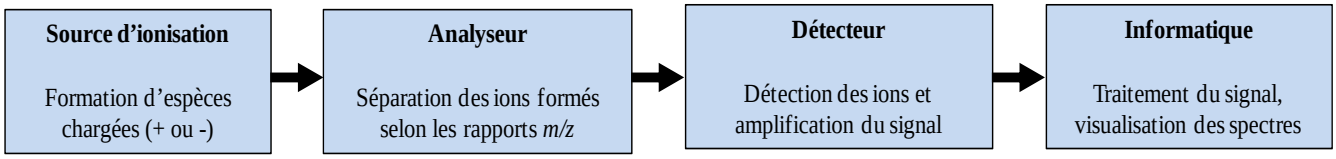


Figure 14 : **Éléments constituant un spectromètre de masse.**

4.2.2.1 La source d'ionisation

Elle permet l'ionisation des substances à analyser. Il existe une grande variété de sources, qui diffèrent notamment par l'énergie transférée au cours du processus d'ionisation.

Dans le cadre de l'analyse de protéines ou de peptides, les premières méthodes d'ionisation employées entraînaient une destruction de ces larges molécules. D'autres techniques d'ionisation, dites douces, se sont développées à la fin des années 1980 : il s'agit principalement des ionisations par électronébulisation (dite ESI pour *Electrospray Ionisation*) [343] et MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) [344]. Elles sont adaptées à l'analyse de biopolymères comme les peptides, les protéines, les oligonucléotides [345]…

Dans le cas d'une ionisation par ESI, l'échantillon solubilisé est introduit dans un capillaire soumis à un fort potentiel électrique, à pression atmosphérique. Il en résulte la formation d'un nuage de gouttelettes chargées. La désolvatation se produit ensuite lorsque ce spray traverse un gradient de champ électrique et de pression, avant de parvenir à l'analyseur. L'ionisation ESI forme des ions multichargés, et plus spécialement pour des molécules de masses moléculaires élevées telles que les protéines, qui peuvent porter plusieurs dizaines de charges. Étant donné que les spectromètres de masse mesurent un rapport *m/z*, le spectre résultant pour un analyte donné présente une gamme d'états de charges, et une multitude d'ions peuvent être détectés. L'obtention d'ions multichargés a pour principal avantage de permettre

l'analyse de composés de masses moléculaires très élevées, à l'aide d'instruments comprenant des analyseurs possédant une faible gamme de masse analysable (puisque la grandeur mesurée ne correspond pas la masse d'un ion, mais à son rapport *m/z*).

Dans le cas d'une ionisation MALDI, l'échantillon est déposé sur une surface métallique, appelée cible, en présence d'une matrice organique avec laquelle il co-cristallise. La cible est placée au niveau de la source maintenue sous un vide poussé. Sous l'effet d'une impulsion laser, la matrice s'ionise par absorption d'un photon [346]. Le transfert d'un proton de la matrice à l'échantillon permet ensuite l'ionisation de celui-ci [347]. Typiquement, des ions monochargés sont observés en MALDI. Ces ions sont alors accélérés en direction de l'analyseur, à l'aide d'un champ électrostatique. Des analytes de très grandes masses moléculaires, dépassant les 100 000 Da, peuvent être ionisés par MALDI [348]. Ce mode d'ionisation est également moins sensible aux détergents et sels que l'ESI, et les spectres générés sont simples. Cependant après une digestion de protéines, l'analyse MALDI des peptides générés ne produira qu'un nombre limité d'ions, et ne couvrira donc généralement qu'une partie de la séquence protéique, de l'ordre de 30 à 45% [349]. En effet, les peptides doivent pouvoir co-cristalliser efficacement avec la matrice. Le choix de cette dernière est donc primordial pour observer une bonne absorption et désorption des composés. La technique MALDI, qui repose sur une analyse chimique, peut donc être plus délicate à mettre en œuvre que l'ESI sur des milieux protéiques complexes, tels que le sérum ou le plasma.

Que l'on considère l'une ou l'autre des méthodes d'ionisation, la spectrométrie de masse est sujette à un phénomène de compétition d'ionisation intervenant au niveau de la source. Par conséquent, les molécules les plus concentrées seront préférentiellement ionisées au détriment des molécules plus faiblement abondantes [350], en particulier lors d'analyses en milieux complexes. C'est pourquoi l'utilisation de méthodes séparatives en amont de la MS (détaillées dans une section ultérieure) telle que la chromatographie liquide (LC) est incontournable.

4.2.2.2 L'analyseur

4.2.2.2.1 Types d'analyseurs

L'analyseur sépare les ions produits en fonction de leur rapport *m/z*. La nature de l'analyseur détermine la façon de séparer les ions. Concernant les analyses en protéomique, quatre grands types d'analyseurs sont couramment utilisés : le quadripôle (Q), la trappe

ionique, l'analyseur à temps de vol (ToF pour *Time of Flight*) [351], les analyseurs à transformée de Fourier (FT, pour *Fourier Transform*) comprenant le piège à ion électrostatique appelé trappe orbitale (ou « Orbitrap ») [352] et le piège à ion magnétique à résonance cyclotronique d'ion (ICR pour *Ion Cyclotron Resonance*) [353]. Ces analyseurs sont physiquement différents, mais peuvent être classés en deux familles : i) les analyseurs à faisceaux d'ions (tels que le Q ou le ToF) sont dits « in space » et permettent de détecter les ions successivement au cours du temps, et ii) les analyseurs à piégeage d'ions (tels que l'Orbitrap ou le FT-ICR), dits « in time », qui permettent de détecter de façon simultanée les ions piégés.

Les critères de performances des analyseurs sont multiples. Parmi ceux-ci, on peut mentionner la gamme de masse analysable, qui décrit les valeurs limites des rapports *m/z* mesurables. La vitesse d'acquisition, ou vitesse de balayage, correspond à la vitesse à laquelle l'analyseur est capable de couvrir une gamme donnée de rapports *m/z*. Le pouvoir résolutif de l'analyseur correspond à sa capacité à fournir des signaux pouvant être distingués, pour deux ions de masses voisines [354]. L'exactitude en masse est le critère de précision de la mesure des rapports *m/z*. Elle est dépendante de la stabilité de l'analyseur, de sa résolution, ainsi que de l'étalonnage employé, et s'exprime en part par million (ppm). Les critères de sensibilité et de gamme dynamique analysable sont également variables selon les analyseurs.

Dans le cas de la recherche de marqueurs à partir d'un milieu très complexe comme du sérum ou du plasma, une méthode d'analyse très sélective est nécessaire afin de différencier et quantifier un analyte spécifique dans un mélange ou une matrice, en minimisant les interférences avec les autres composés. Ainsi, lors d'une analyse LC-MS où de multiples composés sont co-élués de la colonne chromatographique, le pouvoir résolutif des analyseurs de MS représente ainsi un paramètre essentiel. Les analyseurs à transformée de Fourier ou les analyseurs à temps de vol de dernière génération présentent des capacités de résolution très fortes (>50 000), augmentant ainsi la sélectivité.

4.2.2.2.2 Spectrométrie de masse en mode tandem

Lorsque les analyseurs sont combinés en série, on parle alors de spectrométrie de masse en tandem (notée MS/MS). Il est ainsi possible d'obtenir un spectre de masse résultant de la fragmentation d'un ion sélectionné: un ion M1, appelé précurseur, est sélectionné dans le premier analyseur, et fragmenté par activation énergétique. Les ions produits, aussi appelés ions fils, sont analysés par le second analyseur. Un ion de valeur *m/z* donnée, observé dans le

spectre MS, peut donc être sélectionné et fragmenté spécifiquement de façon à obtenir le spectre de masse des fragments produits (MS/MS).

Plusieurs modes de fragmentations existent. Le CID (pour *Collision-Induced Dissociation*) [355] est par exemple une méthode communément employée pour la fragmentation des peptides : l'ion précurseur d'intérêt est sélectionné à l'entrée de la cellule et va entrer en collision avec les molécules de gaz inerte de celle-ci. Un transfert d'énergie se produit au cours de la collision, entraînant la fragmentation de l'ion précurseur et la génération de fragments chargés. Pour les spectromètres basés sur une séparation spatiale, une cellule de collision est disposée sur la trajectoire des ions. Pour les spectromètres de masse en tandem basés sur une séparation temporelle, le gaz est introduit dans la cellule après sélection de l'ion.

Afin d'obtenir les informations les plus complètes, il est important que le mode d'acquisition ne soit pas uniquement focalisé sur la sélection des ions précurseurs générant les signaux de MS les plus intenses. L'association d'analyseurs différents permet de combiner leurs propriétés avantageuses, dans des instruments dits hydrides. Par exemple dans le cas d'un Q-ToF, un double quadripôle, comprenant le premier analyseur et une cellule de collision, est associé un analyseur ToF, qui présente de bonnes performances en termes de sensibilité, de rapidité d'analyse, ainsi qu'un pouvoir résolutif élevé et une bonne précision de masse.

4.2.2.3 Le détecteur et l'analyse informatique

Le détecteur décèle le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur. Le courant ionique est détecté et amplifié en un signal exploitable. Cette détection est dépendante de la charge, de la masse, ainsi que de la vitesse des ions. La dernière étape correspond au traitement informatique des données générées. Un spectre de masse est obtenu : il s'agit de la représentation de l'intensité des signaux détectés en fonction des rapports *m/z* des ions.

Les progrès techniques liés aux instruments ainsi qu'aux outils informatiques associés à l'analyse des données de MS ont permis d'accroître les performances analytiques des méthodes de protéomique basées sur la MS. La reproductibilité, la profondeur d'analyse, les limites de détection, l'exhaustivité et la qualité des résultats générés se sont ainsi considérablement améliorés [356]. La spectrométrie de masse fait donc très couramment partie intégrante des analyses protéomiques, dont les étapes majeures sont présentées.

4.3 Préparation des échantillons

Les échantillons biologiques sont d'origines, de compositions et de concentrations protéiques variées. Il peut s'agir de tissus, de cellules, d'organites cellulaires, ou de fluides biologiques comme l'urine, les sécrétions nasales, le sérum ou le plasma contenant des protéines solubilisées. Le succès des analyses protéomiques dépend entre autres de la mise en œuvre d'étapes de préparation adaptées aux échantillons considérés.

4.3.1 Choix de l'échantillon biologique

Le sérum présente l'avantage d'être collecté facilement, il est donc possible de créer de larges banques d'échantillons sériques au cours d'études cliniques. Cependant, la présence de protéases sériques intervenant au cours de la coagulation et la variabilité de celle-ci peuvent altérer les concentrations de protéines faiblement abondantes. De ce fait, le plasma fait partie des échantillons de choix pour les études de protéomique quantitative en clinique [357]. Il nécessite l'ajout d'anticoagulants comme l'EDTA et un stockage des échantillons à -80°C. La richesse protéique du plasma ou du sérum est un autre élément expliquant l'essor des analyses protéomiques sur ce type d'échantillons. Dans le cas d'analyses protéomiques à partir de ce type de matrices biologiques, les analytes sont de même nature que la matrice les contenant (protéines). Cette matrice biologique entraîne un bruit de fond pouvant parfois réduire l'intensité des pics liés aux analytes d'intérêt, voire masquer leur détection [358]. De plus, la très large gamme dynamique du plasma et du sérum, pouvant dépasser dix ordres de grandeurs, complexifie les analyses [359]. Ainsi, la présence de protéines d'abondance très élevée telles que l'albumine (35-50 mg/mL) ou les immunoglobulines (18 mg/mL) complique fortement l'analyse des protéines dont les concentrations sont inférieures au µg/mL. Or les technologies développées pour la recherche de biomarqueurs doivent s'attacher à la détection de protéines plasmatiques de faibles concentrations, idéalement en deçà du ng/mL. La protéolyse éventuelle des échantillons introduit un degré de complexité supplémentaire. L'analyse de milieux de large gamme dynamique de concentration protéique, comme du plasma ou du sérum, nécessite donc des étapes de préparations d'échantillons pour répondre à ces difficultés techniques.

4.3.2 Premières étapes de préparation

Ces étapes sont essentielles à la réussite des analyses protéomiques. Elles incluent diverses méthodes visant à extraire, enrichir, concentrer les protéines, ou à éliminer des contaminants tels que les sels [360].

La lyse des échantillons et l'extraction des protéines font notamment partie des premières étapes de préparation des échantillons. La solubilisation des protéines est ensuite facilitée dans des tampons contenant des agents chaotropiques, des détergents ioniques, non-ioniques ou zwitterioniques… Par exemple, une étude comparative portant sur 16 méthodes d'extraction des protéines du cerveau de souris a abouti à un nombre variable de protéines identifiées selon le tampon de lyse cellulaire employé [361] : les tampons de lyse contenant des détergents (SDS, CHAPS, Triton) permettent l'identification finale de plus de protéines par rapport aux tampons contenant des solvants organiques. Aussi, le détergent octyl-β-D-glucopyranoside donne les meilleurs résultats, avec 541 protéines identifiées en nano-LC-MS/MS, dont 29% de protéines membranaires, contre 423 ou 272 protéines identifiées dans les cas où le CHAPS ou le Triton-100 sont utilisés, respectivement. Des inhibiteurs de protéase peuvent également être ajoutés, afin de limiter la dégradation des protéines de l'échantillon. Au préalable d'une analyse MS, les substances interférant avec la séparation des protéines, inhibant leur digestion (généralement par la trypsine), ou entrant en conflit avec la MS, doivent être éliminées. Des dispositifs sont ainsi commercialisés pour éliminer les sels, tampons, détergents, acides nucléiques, lipides…

4.3.3 Méthodes séparatives

Afin d'améliorer l'analyse des protéines, des méthodologies de séparation sont requises. Ces méthodes de séparation doivent maintenir les protéines sous forme soluble et être compatibles avec l'analyse MS consécutive [362]. Deux grandes approches sont utilisées en protéomique : i) les techniques chromatographiques, présentées ci-dessous, et ii) les techniques électrophorétiques, qui permettent la séparation des protéines en s'appuyant sur des gels (électrophorèse sur gel 2D ou 2D-DIGE pour *2 Dimensional Differential Gel Electrophoresis*). L'électrophorèse bidimensionnelle s'est ainsi développée depuis une quarantaine d'années et est reconnue comme une méthode de choix pour la séparation et la quantification relative de protéines [336]. Les protéines sont séparées dans une première dimension en fonction de leur pI (point isoélectrique), puis dans une deuxième dimension en fonction de leur masse moléculaire.

D'autres méthodes séparatives combinent les techniques chromatographiques à d'autres approches, afin de réduire l'abondance de certaines protéines, ou à l'inverse se concentrer sur une population protéique d'intérêt.

4.3.3.1 Techniques chromatographiques de séparation

Dans cette approche séparative, la chromatographie en phase liquide à haute perfornance (HPLC) est communément employée pour la séparation de mélanges peptidiques avant leur analyse par MS [363], notamment en raison de sa simplicité de couplage avec la source ESI. Le principe repose sur la séparation des analytes en fonction de leur affinité différentielle entre une phase stationnaire et une phase mobile. Le flux de la phase mobile est continu, la rétention variable des analytes sur la phase stationnaire de la colonne de chromatographie permet donc leur séparation. De façon commune en protéomique, des colonnes de type « phase inverse » (RP, pour *Reverse Phase*) composées de silice greffée à des chaînes linéaires de 4 à 18 atomes de carbones (C_4 ou C_{18}) sont utilisées. La séparation des analytes (protéines ou peptides) se produit en fonction de leur hydrophobicité, par l'application d'un gradient de solvant organique (généralement de l'acétonitrile) : les composés hydrophiles sont peu retenus sur la colonne, tandis que les plus hydrophobes sont élués lorsqu'une concentration plus importante en solvant organique est appliquée.

Dans le cas d'échantillons complexes à analyser, des séparations complémentaires peuvent être mises en œuvre. Par exemple, en amont de la RP, une autre dimension de séparation chromatographique peut être réalisée en fonction de la charge des peptides. Les colonnes échangeuses de cations (SCX ou MCX, pour *Strong Cation Exchange* et *Multiple Cation Exchange*, respectivement) peuvent être utilisées à cette fin. Dans cette méthode, les peptides (chargés positivement en milieu acide) sont élués de la colonne SCX par l'application d'un gradient de sels. Les peptides sont ensuite séparés par RP, avant d'être analysés en MS. Le fractionnement permet d'augmenter la détection de protéines peu abondantes, en concentrant les analytes en fonctions de leurs propriétés physico-chimiques dans des fractions spécifiques. L'application du fractionnement par échange de cation couplé à des méthodes de LC-MS permet ainsi de diminuer considérablement les limites de détection des instrumentations, qui peuvent atteindre des concentrations protéiques de l'ordre du ng/mL [364]. À l'issue d'un fractionnement, le nombre d'échantillons à analyser est accru, augmentant la durée d'analyse et rendant ainsi compliquée l'analyse d'échantillons issus de larges cohortes cliniques. Des variations peuvent être induites par le protocole expérimental de fractionnement. Par exemple,

de légères variations dans la distribution des protéines collectées dans les différentes fractions complexifient le traitement bio-informatique nécessaire, dans le cas où l'objectif est la détection de profils protéiques associés à des pathologies.

4.3.3.2 Déplétion et égalisation des protéines

Dans le cas d'analyses sur des échantillons plasmatiques, la déplétion des protéines les plus abondantes constitue une autre approche couramment employée pour accroître la couverture du protéome et descendre dans la gamme dynamique de concentration. Des méthodes de déplétion par immuno-affinité ont été développées et automatisées pour permettre d'éliminer l'albumine ou les deux, trois, six, sept, douze ou quatorze protéines plasmatiques les plus abondantes. Ces méthodes de déplétion tirent profit de la bonne reproductibilité liée à l'HPLC, afin d'enrichir les protéines faiblement abondantes, par l'élimination de 90 à 95% de la masse protéique. L'élimination des sept ou quatorze protéines les plus abondantes permet par exemple d'accroître de 25% le nombre de protéines identifiées [365, 366]. Ces méthodes présentent par ailleurs l'avantage de ne générer que peu de fractions à partir d'un échantillon : une seule fraction est généralement collectée pour les analyses ultérieures (fraction non retenue par les anticorps de capture). L'élimination de protéines liées de façon non spécifique aux anticorps de capture représente néanmoins une limite de l'approche de déplétion de protéines ciblées [367]. De plus, il est essentiel de contrôler la reproductibilité de la déplétion entre différents échantillons.

L'égalisation du contenu protéique représente une approche opposée à la déplétion, puisqu'elle vise à enrichir les protéines minoritaires pour ajuster la gamme dynamique des protéines plasmatiques. Elle s'appuie sur des librairies combinatoires de ligands peptidiques (hexapeptides) d'une grande diversité, greffés à des billes. En effet, avec une diversité suffisante de ligands, il est théoriquement possible de disposer d'un ligand pour chaque protéine d'un mélange complexe [368]. Ainsi, les protéines d'abondances élevées saturent leurs hexapeptides de haute affinité (la majorité de ces protéines ne sera donc pas liée). Au contraire, les protéines de faibles abondances ne vont pas saturer leurs ligands spécifiques (et la majorité sera ainsi liée). Les protéines capturées sont ensuite recueillies et analysées. Les performances de cette approche ont été démontrées. Par exemple, à l'issue d'une égalisation et d'une analyse MS de lysats d'une lignée cellulaire cancéreuse, les nombres de peptides et d'isoformes identifiés ont été augmentés, par rapport au contrôle sans égalisation, de près de 35% et de plus de 20%, respectivement [369]. Dans le cas d'une analyse protéomique différentielle visant à

étudier les modulations de protéines de faible abondance, le système d'égalisation protéique peut induire un biais portant sur le matériel protéique d'intérêt. Cette méthode semble donc moins pertinente que la déplétion, qui laisse « intactes » les protéines de faible abondance.

4.3.3.3 Enrichissement d'analytes ciblés, exemple des glycoprotéines

Suivant l'objectif de l'étude, et en fonction du milieu biologique considéré, des populations protéiques ou peptidiques spécifiques (portant des modifications post-traductionnelles par exemple) peuvent être enrichies par différentes méthodes. En particulier, dans le cas d'analyses sur des échantillons sériques, plasmatiques, ou provenant de membranes cellulaires, la purification des protéines glycosylées représente un domaine important du fractionnement par affinité.

4.3.3.3.1 Les glycoprotéines

Environ 50% des protéines sont glycosylées [370], et la glycosylation joue un rôle majeur dans le repliement des protéines, leur stabilité, leur activité, leur mobilité, mais également dans la reconnaissance moléculaire et l'immunogénicité [371]. L'altération de la glycosylation des protéines est décrite dans de nombreux contextes pathologiques [372], en particulier pour le cancer [373] et certaines maladies immunitaires comme l'arthrite rhumatoïde [374]. La majorité des processus de glycosylation des protéines consistent en l'attachement d'unités oligosaccharides, soit :

- à la chaîne latérale d'un résidu asparagine, dans une séquence du type Asp-X-Y, où Y est une sérine, une thréonine ou occasionnellement une cystéine, et X peut être n'importe quel acide aminé, excepté une proline [375]. On parle alors de N-glycosylation.
- à la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine, sans lien avec une séquence consensus [376]. On parle dans ce cas de O-glycosylation.
- au carbone en C2 du noyau indole sur le premier tryptophane d'une séquence de type Trp-X-X-Trp. Ce type d'addition d'un résidu mannose est pour la première fois décrit pour la protéine humaine RNase Us [377].

Dans le cas de la N-glycosylation, le processus d'ajout des sucres se produit au niveau post-traductionnel dans la lumière du réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Deux grandes étapes constituent les mécanismes de N-glycosylation : l'assemblage de l'oligosaccharide lié à un lipide, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, suivi

du transfert de l'oligosaccharide aux résidus asparagines sélectionnés sur les polypeptides en formation.

Dans le cas de la O-glycosylation, l'attachement des sucres se produit au niveau post-traductionnel dans l'appareil de Golgi, le plus fréquemment sous l'action d'une enzyme, responsable du transfert d'un résidu N-acétyl-galactosamide à la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine. À la suite de ce transfert et sous l'action de transférases spécifiques successives, une élongation se produit, pouvant donner lieu à différentes structures glycanniques. Celles-ci peuvent être à leur tour allongées ou modifiées par l'extension de certains résidus ou par des réactions de sialylation, de sulfatation, d'acétylation, de fucosylation [376].

La glycosylation des protéines introduit donc un degré d'hétérogénéité considérable, par la génération de différents « noyaux » oligosaccharides, l'addition variable de sucres, de même que l'action enzymatique partielle sur les chaînes latérales des sucres liés. Les fonctions biologiques majeures de la glycosylation justifient l'intérêt croissant pour le suivi des glycoprotéines dans des contextes pathologiques, notamment afin de développer des biomarqueurs ou des thérapies ciblant les protéines dont la glycosylation est anormale. Le domaine de la « glycoprotéomique » s'appuie notamment pour cela sur des analyses MS, mises en œuvre à la suite de méthodes d'enrichissement des glycoprotéines ou des glycopeptides.

4.3.3.3.2 Méthodes d'enrichissement des glycoprotéines

Les approches de fractionnement et de déplétion décrites plus haut correspondent à des stratégies où les protéines non ciblées (par exemples les plus abondantes) sont éliminées par la séparation par immuno-affinité ou le fractionnement en LC. Des méthodes d'enrichissement « positives » ont également été développées et reposent sur l'enrichissement par affinité de protéines ou peptides, ou l'enrichissement de différents sous-groupes protéiques.

Des méthodes variées ont été mises en œuvre pour enrichir spécifiquement les glycoprotéines ou les glycopeptides du plasma. Elles sont synthétisées dans le tableau 5 et reposent majoritairement sur des purifications par affinité pour les lectines ou les groupements hydrazide. A l'issue des méthodes d'enrichissement, la complexité plasmatique est fortement réduite : il est possible de ne considérer qu'une partie du protéome (les glycoprotéines), ce qui réduit la complexité de la digestion, tandis que l'enrichissement d'une fraction des peptides générés seulement (les peptides glycosylés) peut également diminuer la complexité du milieu analytique.

Méthode d'enrichissement	Cible	Spécificité envers les structures glycaniques	Conservation des structures glycaniques
Capture par couplage avec billes greffées hydrazide	Peptides, protéines	Non spécifique	Non conservées
Capture par l'acide boronique	Peptides, protéines	Non spécifique	Conservées
Capture par les lectines	Peptides, protéines	Spécifique	Conservées
Carbone graphite	Peptides	Non spécifique	Conservées
Sépharose	Peptides	Non spécifique	Conservées
Chromatographie Liquide d'Intéraction Hydrophile (HILIC)	Peptides	Non spécifique	Conservées

Tableau 5 : Méthodes courantes d'enrichissement des glycoprotéines ou glycopeptides.

La spécificité envers les structures glycanniques, leur conservation au cours de la méthode d'enrichissement, ainsi que la compatibilité en aval avec une analyse LC-MS sont variables.

4.4 Identification et caractérisation de protéines par spectrométrie de masse

Au cours d'analyses protéomiques, dès lors qu'une préparation des échantillons adaptée a été mise en œuvre, la spectrométrie de masse permettra d'identifier les protéines présentes, mais également de les caractériser, notamment en déterminant leurs modifications post-traductionnelles.

4.4.1 Identification de protéines

Deux grandes approches complémentaires sont employées pour l'identification des protéines : il s'agit des approches dites « bottom-up » et « top-down », schématisées en figure 15. Dans ces analyses protéomiques par spectrométrie de masse, de larges jeux de données sont générés qu'il convient de traiter et d'interpréter pour identifier les protéines présentes dans les milieux considérés, ainsi que leurs caractéristiques structurales. De nombreux logiciels, accessibles librement ou commercialisés, ont ainsi été développés, pour permettre l'analyse des différents types de données issues des méthodes de protéomique. Des stratégies d'analyses des

données *via* des outils bio-informatiques spécifiques permettent ainsi d'identifier les protéines et d'interpréter les résultats dans les contextes biologiques considérés.

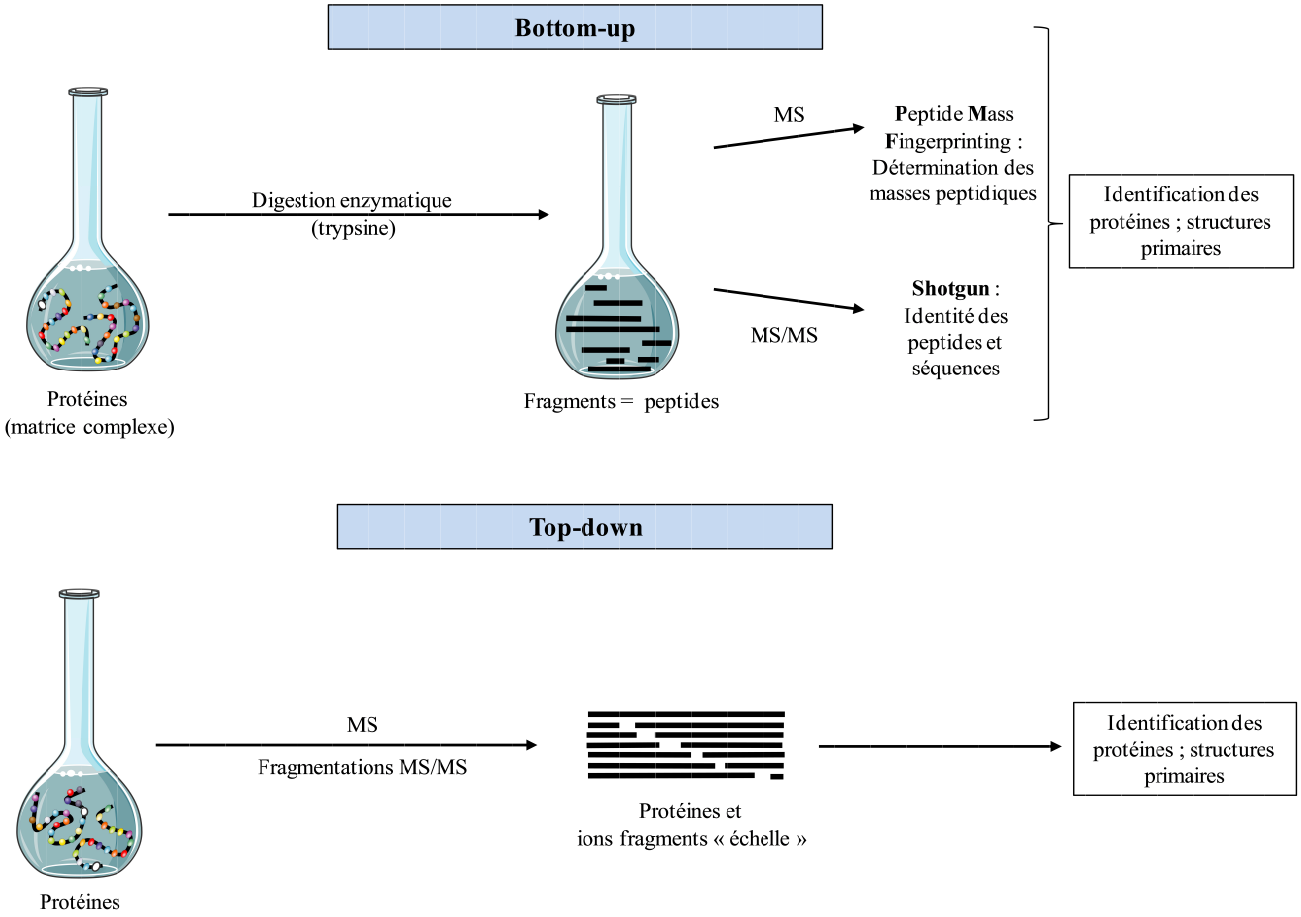


Figure 15 : Détermination de la structure primaire des protéines par deux approches de MS : « bottom-up » et « top-down » (d'après [378]).

En « top-down », les protéines intactes sont portées en phase gazeuse, fragmentées et analysées par spectrométrie de masse, conduisant à la masse moléculaire des protéines, ainsi qu'à celles des ions fragments. La signature moléculaire des protéines peut être déduite. En « bottom-up », les protéines d'intérêt sont digérées en solution par une enzyme (comme la trypsine), et les peptides sont analysés en phase gazeuse par spectrométrie de masse. Dans l'étape de « MS », les masses des peptides intacts sont déterminées ; dans la seconde étape de « MS/MS », les peptides sont fragmentés, permettant d'identifier la séquence peptidique (incluant les modifications) et ainsi la protéine d'origine. Les deux méthodes sont complémentaires et s'appuient sur la comparaison des données expérimentales à celles comprises dans des bases de données.

4.4.1.1 Approche d'identification « bottom-up »

Le terme « bottom-up » est représentatif de ce type de méthode, qui s'appuie sur l'identification des peptides pour remonter à celle des protéines. Dans cette approche, les protéines d'intérêt sont en effet digérées par une enzyme telle que la trypsine. Cette enzyme

effectue une protéolyse spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son groupement carboxyl est une lysine ou une arginine. Une fois séparés (de façon courante par LC), les peptides résultant sont analysés en spectrométrie de masse [379, 380]. L'échantillon peut ensuite être analysé soit par MS simple afin d'établir une empreinte peptidique massique (méthode PMF pour *Peptide Mass Fingerprinting*), soit par MS/MS (méthode « shotgun »), comme présenté ci-dessous. Il est à noter que le nombre de caractéristiques mesurables est considérablement augmenté lorsque les protéines sont digérées, ce qui génère de multiples cibles potentielles dans une application de recherche de biomarqueurs. De plus, la digestion protéique représente un avantage certain pour une identification non ambigüe dans des matrices complexes.

4.4.1.1.1 Identification par PMF

Dans le cas d'une approche « bottom-up » où l'analyse est réalisée en mode MS seul, l'identification des protéines s'appuie sur la méthode dite PMF. Les premières applications de cette méthode remontent au début des années 1990, lorsque des équipes identifièrent les protéines visualisées sur des gels d'électrophorèse bidimensionnelle en développant des algorithmes de recherche [381-384]. Dans ces études, l'excision des spots protéiques est suivie par une digestion trypsique. Les peptides sont ensuite extraits, et analysés en MS. La liste des masses expérimentales générées représente une signature, ou empreinte, de la protéine. Cette liste est ensuite comparée par l'intermédiaire d'un moteur de recherche aux données obtenues par digestion *in silico* des protéines répertoriées dans des bases de données, comme Uniprot [385] ou NCBI [386]. La recherche conduit à l'identification ou non des protéines, en attribuant un score de confiance, prenant en compte le nombre de masses peptidiques correspondant à la protéine considérée, le pourcentage de recouvrement de la séquence protéique, ainsi que la précision de mesure des masses peptidiques. Les limites de l'identification des protéines par PMF sont liées au faible pourcentage de recouvrement de séquence si de nombreuses modifications sont présentes, ou si la mesure de masse n'est pas très précise. Il y a donc un risque d'ambiguïté d'identification dans le cas où des mélanges protéiques complexes sont analysés, car la superposition d'empreintes PMF est difficile à interpréter.

4.4.1.1.2 Identification par « Shotgun »

Lors d'une analyse « bottom-up » à partir d'un mélange de protéines, une approche d'identification appelée « shotgun », par analogie avec l'approche de séquençage « shotgun » du génome [387], peut être employée. Cette approche permet de déterminer non seulement les

masses des peptides par analyse MS, mais également des informations sur leurs séquences grâce à la fragmentation en MS/MS [388]. Les ions fragments générés possèdent des masses caractéristiques de la séquence peptidique. Comme en PMF, l'identification du peptide, donc de la protéine, se fait par l'intermédiaire d'un moteur de recherche. Celui-ci compare les données MS/MS expérimentales (c'est-à-dire les couples masse peptidique et spectre MS/MS) aux profils de fragmentations théoriques des peptides, obtenus après digestion *in silico* des protéines présentes dans une base de données. Des informations de séquence et l'identification des peptides sont ainsi obtenues selon un score de probabilité. Les séquences peptidiques assignées permettent de remonter à l'identité des protéines présentes dans l'échantillon. En pratique, la digestion *in vitro* génère classiquement beaucoup moins de peptiques que la digestion théorique. Par exemple, la digestion *in silico* du protéome d'une levure a pu générer près de 300 000 peptides, soit environ 10 fois plus que le nombre communément identifié dans une seule analyse protéomique [389]. L'identification en « shotgun » est limitée dans le cas où les fragments générés ne sont pas répertoriés dans les bases de données.

En PMF ou en « shotgun », des moteurs de recherches sont largement utilisés : on peut citer MASCOT [390], SEQUEST [391] ou X !TANDEM [392]. Lors de la confrontation des données expérimentales aux bases de données théoriques, les paramètres choisis sont par exemple : i) l'enzyme de digestion, ii) la tolérance relative à la masse de l'ion précurseur, iii) les modifications fixes ou variables sur les acides aminés, iv) la tolérance relative à la masse des ions fragments, ou v) les types de fragments recherchés. Les méthodes de PMF et « shotgun » sont dépendantes des bases de données, qui doivent être les plus complètes possibles. Afin de valider les données générées en minimisant les taux de faux positifs (*False Discovery Rate*) des identifications, des stratégies de leurres peuvent être employées. Elles impliquent la confrontation des données à une base de données correcte ainsi qu'à une base rendue incorrecte volontairement. Celle-ci contient par exemple des séquences peptidiques inversées ou mélangées aléatoirement, mais de tailles identiques. En utilisant cette approche, l'expérimentateur peut définir un seuil de score de corrélation correspondant à un FDR souhaité [393, 394].

La détermination des modifications et des variants issus d'épissage alternatif peut être compliquée dans l'approche « bottom-up » [378]. De plus les analyses protéomiques engendrent des mélanges peptidiques complexes, contenant typiquement des centaines de milliers de peptides uniques. Ainsi, un très grand nombre d'ions candidats à la fragmentation peuvent être élués simultanément à l'issue de la chromatographie. Cette complexité peut être

problématique même pour les instrumentations les plus modernes qui présentent une vitesse d'acquisition élevée, et peut engendrer une perte des données potentiellement utiles pour l'identification. De plus, la fragmentation répétée de certains ions - les plus intenses notamment - au détriment d'autres, représente une autre limite dans l'identification des peptides générés expérimentalement [395].

Cependant, l'approche « bottom-up » reste adaptée à l'objectif de découverte de biomarqueurs, car des milieux très complexes comme le sérum ou le plasma peuvent être analysés. La méthodologie des expériences de protéomique utilisant l'approche « bottom-up » en MS repose classiquement sur les étapes schématisées dans la figure 16.

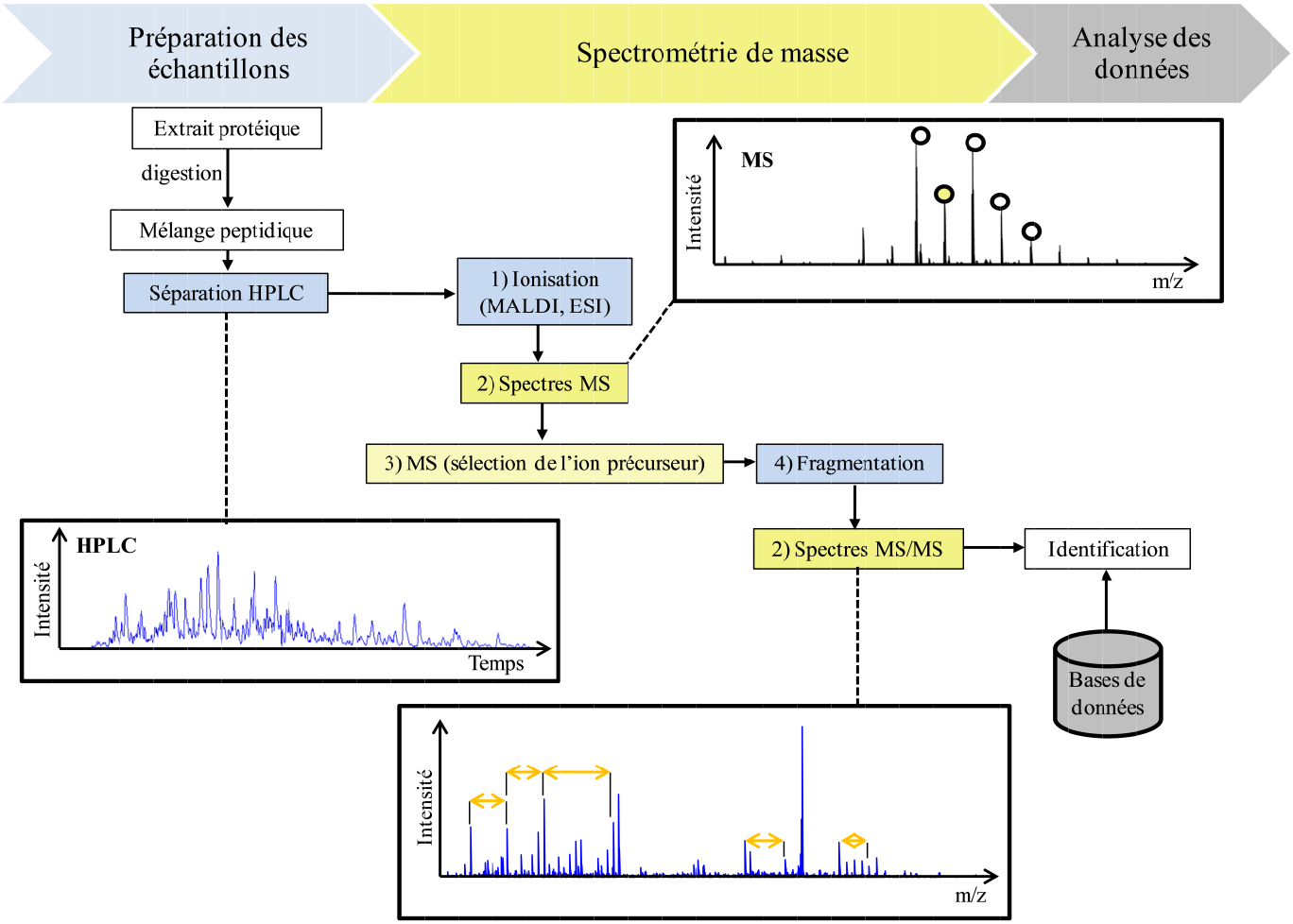


Figure 16 : Workflow d'une expérience de protéomique en MS, dans une approche de type « bottom-up » (adapté de [356]).

Les protéines sont digérées pour produire un mélange complexe de peptides ensuite séparés par HPLC avant d'être analysés en MS. Cette analyse consiste en l'ionisation des peptides, l'acquisition d'un spectre et la sélection d'ions précurseurs spécifiques. Ceux-ci sont fragmentés et des spectres MS/MS sont acquis (spectres d'ions produits). Les données sont processées pour déterminer les séquences en acides aminés, *via* la comparaison aux données incluses dans des bases.

4.4.1.2 Approche d'identification « top-down »

La deuxième approche protéomique, dite « top-down », permet d'analyser les protéines intactes en les introduisant en phase gazeuse. Des spectres des ions moléculaires sont ensuite générés et indiquent les masses moléculaires des protéines individuelles. La fragmentation de ces ions de masses sélectionnées permet d'obtenir des morceaux de séquence des protéines. L'approche « top-down » permet d'obtenir une signature moléculaire des protéines, comprenant les modifications post-traductionnelles [396]. Les protéines intactes de masses élevées peuvent être difficilement ionisables [397] et peu de fragments sont générés. De plus, des instruments très résolutifs doivent être utilisés, pour permettre l'analyse d'ions

multichargés. Malgré certaines limites, des protéines de masses de plus de 200 kDa ont cependant pu être identifiées [398].

4.4.2 Caractérisations de protéines

Les analyses protéomiques peuvent être mises en œuvre afin de caractériser une sous-population protéique d'intérêt. Elles permettent notamment la caractérisation de protéines au niveau post-traductionnel. Les analyses protéomiques de protéines modifiées débutent généralement par une préparation spécifique de l'échantillon, afin d'enrichir le milieu biologique en protéines ou peptides d'intérêt. En particulier, des méthodes d'enrichissement des glycoprotéines ou des glycopeptides, présentées plus haut, sont couramment employées. En protéomique, l'analyse et la caractérisation des glycoprotéines constitue ainsi un domaine de recherche à part entière, englobé sous le terme de « glycoprotéomique ».

4.4.2.1 Caractérisations de protéines modifiées en MS

L'identification et la caractérisation des modifications post-traductionnelles portées par une protéine d'intérêt est réalisée par spectrométrie de masse, puisque ces modifications induisent des décalages de masses. Des modifications courantes sont listées dans le tableau 10 (en annexe). Dans le cas de modifications simples comme la phosphorylation ou l'acétylation, les décalages induits sont constants, ce qui facilite la caractérisation des peptides modifiés. Par exemple, la caractérisation d'une phosphorylation repose sur le fait que le groupe phosphate est labile au cours d'une fragmentation de type CID. Les mécanismes de fragmentation caractéristiques produisent des ions signatures, ce qui permet la différentiation avec les peptides non modifiés.

Lorsque la source est utilisée en mode positif, les résidus sérine ou thréonine phosphatés subissent une perte de neutre correspondant à l'acide phosphorique H_3PO_4 (98 Da) par une β-élimination. Une perte de HPO_3 peut également être observée pour les peptides contenant des sérines, thréonines ou tyrosines phosphorylées. De plus, la présence d'une tyrosine phosphorylée peut être mise en évidence par l'ion immonium caractéristique, de rapport m/z = 216.043. Cependant dans ce cas, des instruments de hauts pouvoir résolutif et précision de masse (par exemple de type Q-TOF, FT-ICR et Orbitrap) sont nécessaires pour le différencier d'autres fragments présentant la même masse.

L'utilisation d'une ionisation en mode négatif, pour l'étude consécutive des ions négatifs, est plus couramment employée pour une détection plus sensible des phosphopeptides.

Les spectres des ions négatifs, produits par la fragmentation MS/MS de résidus sérine, thréonine ou tyrosine phosphorylés, montrent des pics aux rapports *m/z* = 79 et *m/z* = 63, correspondant respectivement aux groupes PO_3^- et PO_2^-. En conséquence, un scan de l'ion précurseur à *m/z* = 79 en mode négatif peut être utilisé pour détecter sélectivement les phosphopeptides, qui génèrent par leur fragmentation cet ion marqueur.

De façon similaire, la sialylation représente une modification post-traductionnelle qui pourra être contrôlée, puisque les acides sialiques seront détectés par leurs ions de rapport *m/z* = 291.09. Dans le cas de la glycosylation, la très grande variété des structures possibles complexifie l'analyse. Des efforts importants ont été consacrés afin d'appliquer des techniques de spectrométrie de masse pour l'étude des glycopeptides N- ou O-liés [399-404]. Cependant, l'interprétation des spectres MS de glycopeptides intacts nécessitent toujours une annotation et une évaluation manuelle complexes.

4.4.2.2 Stratégies des analyses de « glycoprotéomique »

De par ses performances en termes de sensibilité et de spécificité, la MS constitue l'outil le plus performant pour l'analyse des glycoprotéines, que ce soit pour leur identification, l'estimation des sites de glycosylations ou la détermination des structures des oligosaccharides. Les analyses de « glycoprotéomique » les plus couramment utilisées sont basées sur la caractérisation de glycopeptides générés par la digestion de glycoprotéines, en analysant soit les peptides déglycosylés (sous l'action d'enzymes), soit les glycopeptides intacts portant les motifs oligosaccharides, comme représenté sur la figure 17.

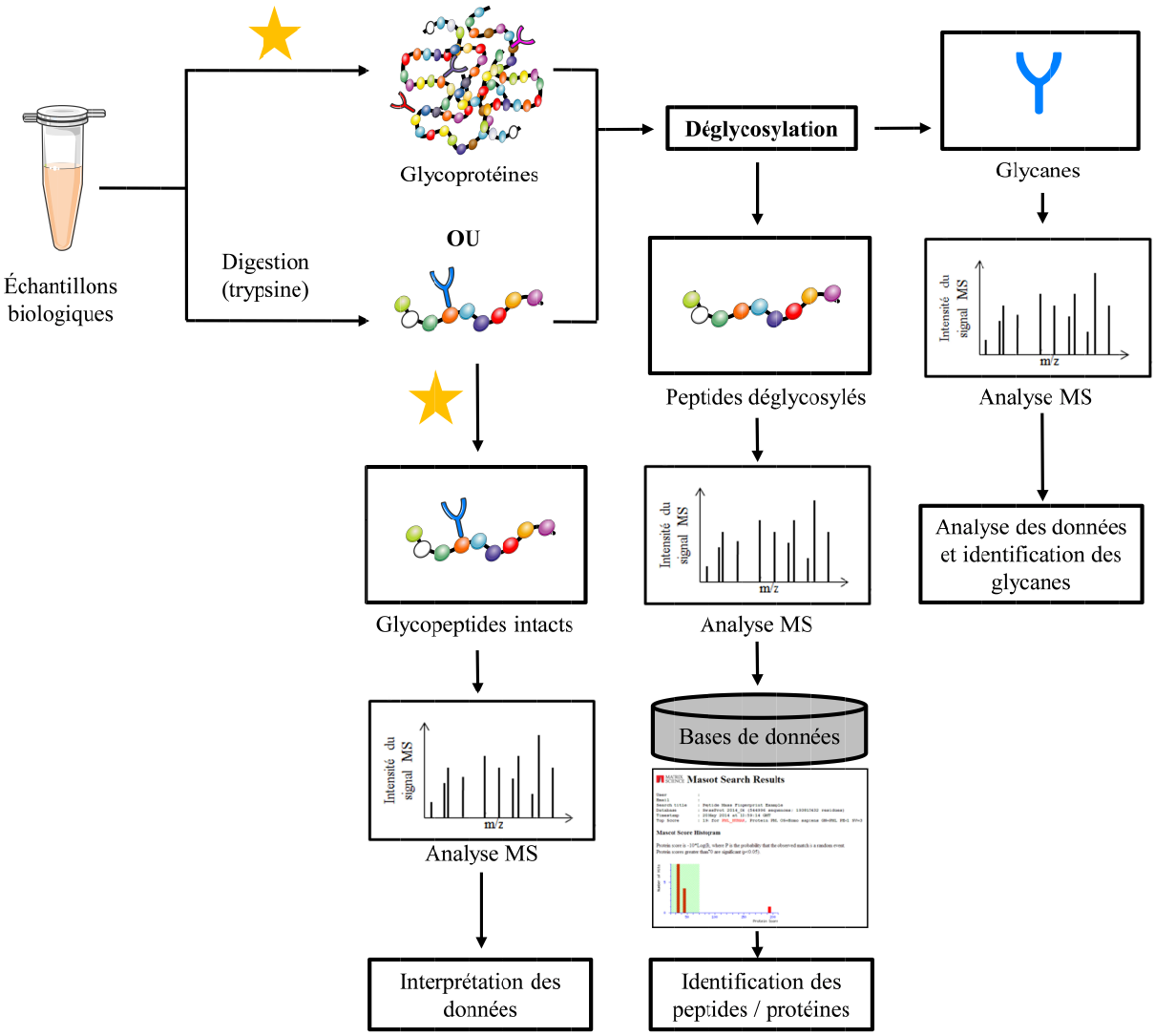


Figure 17 : Diagramme représentatif des stratégies des analyses « glycoprotéomiques » s'appuyant sur la spectrométrie de masse.

Les étoiles symbolisent les niveaux d'enrichissement possibles.

4.5 Découverte de biomarqueurs cliniques par analyse protéomique différentielle

Une application importante des analyses protéomiques concerne la découverte de biomarqueurs, par l'analyse de protéines dont l'expression diffère entre diverses conditions (par exemple entre un groupe traité ou non traité de patients). Le succès des études de recherche de biomarqueurs par des analyses protéomiques différentielles, dont les stratégies sont variées, dépend fortement de la robustesse et de la reproductibilité de la préparation des échantillons. Chaque étape du processus expérimental, depuis le prélèvement biologique jusqu'à

l'interprétation des données, peut être source d'erreurs et introduire des biais, conduisant potentiellement à des résultats trompeurs.

4.5.1 Les stratégies d'analyse protéomique différentielle

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études visant à la découverte de biomarqueurs par des méthodes protéomiques ont permis la détection de protéines spécifiquement associées à des pathologies, en comparant les profils protéiques de sujets malades par rapport à des sujets sains. Diverses méthodes de protéomique quantitative, relative ou absolue, se sont ainsi développées. Le choix de la méthode de quantification dépend des avantages et inconvénients de chacune, mais également de l'objectif recherché lors des différentes étapes du processus de développement de biomarqueurs : la découverte, la vérification ou la validation de biomarqueurs ne font pas appel aux mêmes méthodes.

Au cours des étapes de découverte de biomarqueurs, des méthodes de quantification relative, réalisées sans *a priori*, sont mises en œuvre. Au cours des étapes de vérification et de validation des biomarqueurs précédemment identifiés, la quantification réalisée est absolue et dite ciblée. Par ailleurs, le nombre de réplicats biologiques et le coût des approches justifient également le choix de méthodes de quantifications spécifiques [405, 406].

4.5.1.1 Méthodes de quantification relative par gels 2D

Cette méthode permet de séparer, visualiser et quantifier plusieurs milliers de spots protéiques sur un simple gel. Les spots protéiques présentant des différences d'abondances entre les groupes d'échantillons sont ensuite excisés du gel, digérés en peptides avant d'être analysés par MS. Cette étape permet l'identification des protéines correspondantes.

La variabilité entre les gels 2D constitue une limitation importante de cette approche. L'introduction de la 2D-DIGE (*2 Dimentional Differential Gel-Electrophoresis*) dans le domaine a permis de s'affranchir de cet inconvénient [407]. Cette approche permet de comparer deux échantillons en même temps et sur le même gel, réduisant ainsi les variations d'alignement de spots lors de l'analyse d'image. Deux extraits protéiques à comparer sont ainsi marqués par des cyanines fluorescentes spécifiques, de masses identiques mais présentant des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission différentes. Les échantillons marqués sont ensuite mélangés avant la séparation bidimensionnelle. Le gel est alors scanné aux deux longueurs d'ondes spécifiques des fluorochromes, permettant la quantification des spots par la détection de leurs volumes (en multipliant leurs surfaces par les intensités de fluorescence). Un standard

interne, marqué par une troisième cyanine, est utilisé pour normaliser les données issues de différents gels d'une même expérience, et ainsi pouvoir les comparer [408]. Ce standard interne permet de réduire la variation expérimentale. L'image finale met en valeur les spots différentiellement régulés, ou éventuellement absents par rapport à une condition contrôle. La limite de détection du marquage minimal est semblable à celle de la détection à l'argent (de l'ordre du ng/spot), mais la détection par fluorescence présente des avantages supplémentaires en termes de linéarité, de gamme dynamique (jusqu'à cinq ordres de magnitude), et d'homogénéité grâce à un standard interne. De plus, les cyanines n'interfèrent pas avec une analyse en spectrométrie de masse. Le principe de l'analyse est présenté en figure 18, avec l'exemple de la recherche de protéines différentielles dans le sérum de patients.

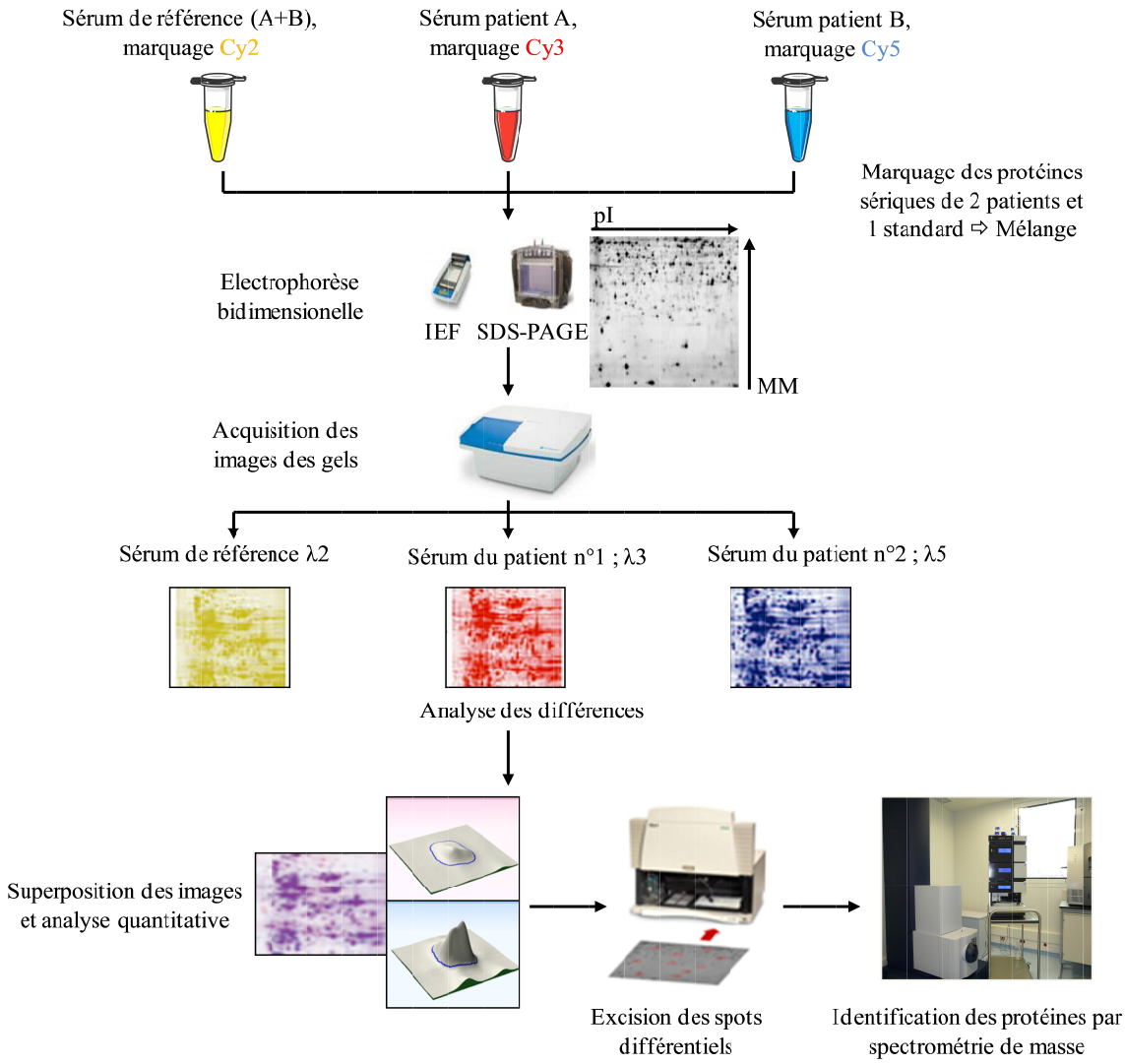


Figure 18 : Principe d'une analyse DIGE avec l'exemple de la recherche de protéines différentielles dans des échantillons sériques.

Deux extraits protéiques n°1 et n°2 sont marqués par des cyanines fluorescentes (Cy3 et Cy5), et un mélange des deux extraits est marqué avec une troisième cynanine (Cy2), pour normaliser les signaux. Les trois extraits sont mélangés et soumis à une électrophorèse bidimensionnelle. Les gels sont scannés aux longueurs d'ondes spécifiques des fluorochromes. Les différences d'abondances entre les protéines sont analysées et quantifiées par un logiciel spécifique (ici Samespot, Non Linear Dynamics). Les spots différentiels sont excisés, pour une digestion *in gel* des protéines et une analyse en LC-MS. Il est ainsi possible d'identifier les protéines différentiellement exprimées entre les deux extraits.

De nombreuses études ont tiré profit du développement de la 2D-DIGE pour l'identification de marqueurs associés à diverses pathologies [409, 410] ou à la progression tumorale [411]. La méthode permet également l'évaluation de marqueurs dont les concentrations varient à la suite d'interventions thérapeutiques [412]. Dans chaque cas, une validation rigoureuse des différences observées doit être mise en œuvre par d'autres techniques (Western Blot, PCR), afin de s'assurer de la fiabilité des résultats.

Les approches basées sur les gels permettent une quantification relative sensible. Il est également possible de visualiser des variations de masses moléculaires ou de points isoélectriques pour les protéines portant certaines modifications post-traductionnelles. Cependant les multiples étapes expérimentales représentent une limite de ces méthodes, car elles réduisent le débit analytique. De plus, les protéines présentant des points isoélectriques très acides ou basiques, ou les protéines fortement hydrophobes (comme les protéines membranaires) sont difficilement analysables par ces méthodes. Enfin, les protéines de faibles poids moléculaires peuvent ne pas être retenues dans le maillage du gel. En parallèle des méthodes d'analyses protéomiques basées sur les gels, les améliorations techniques dans les domaines de la chromatographie et de la spectrométrie de masse ont permis le développement de méthodes de quantifications ne reposant pas sur l'utilisation de gels.

4.5.1.2 Méthodes de quantification relative par LC-MS

Les méthodes de quantification relative par spectrométrie de masse sont généralement basées sur l'approche « bottom-up » de type « shotgun », permettant à la fois l'identification des protéines de l'échantillon (comme décrit précédemment) et leur quantification relative. La quantification des différences protéiques s'effectue en comparant l'intensité des courants ioniques mesurée pour un peptide considéré entre plusieurs échantillons. Les méthodes de quantification relative peuvent être classées selon qu'elles ont recours à des marquages isotopiques ou non. Les méthodes de marquages se différencient en fonction du niveau où elles interviennent, comme schématisé par la figure 19.

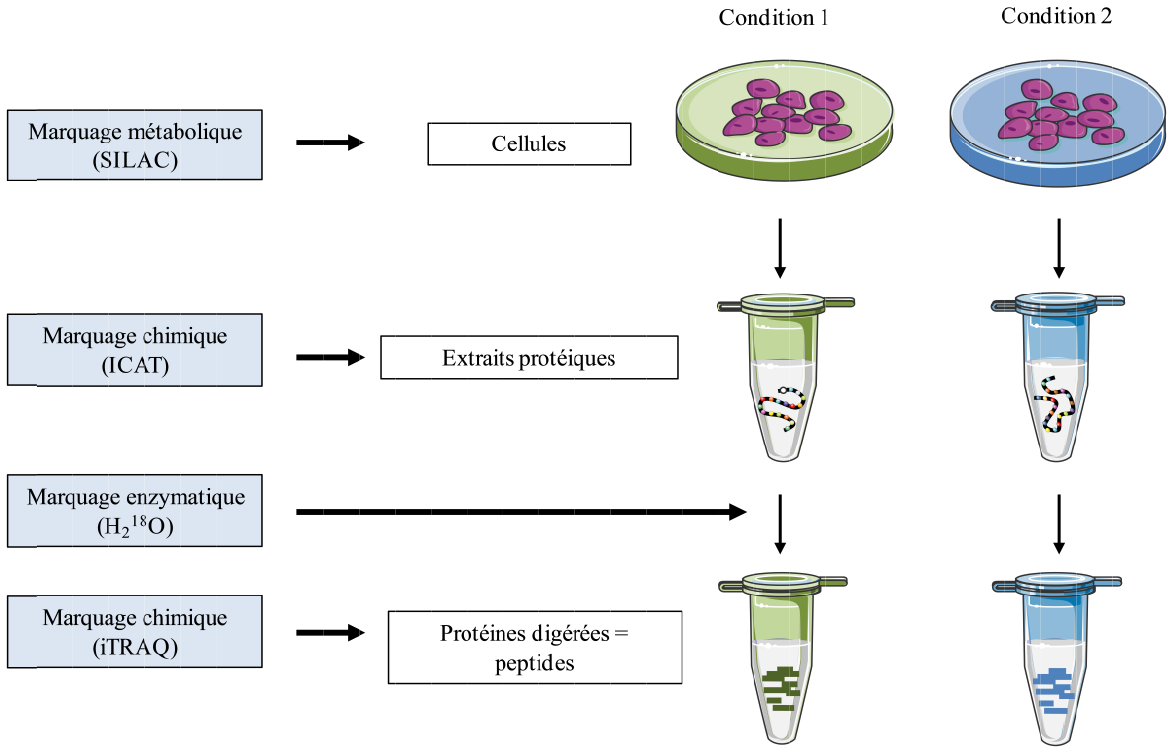


Figure 19 : Les niveaux de marquage sont variables selon les échantillons considérés.

4.5.1.2.1 Les méthodes avec marquage isotopique

Les méthodes utilisant le marquage isotopique reposent sur le fait qu'un peptide marqué par un isotope stable, dit « lourd », a les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide correspondant non marqué, dit « léger », lors des étapes de fractionnement, d'extraction, de séparation chromatographique, d'ionisation et de fragmentation. La différenciation des deux espèces sera réalisée grâce au décalage de masse détectée par l'analyseur. Dans le cas où une condition est marquée et l'autre non, la quantification relative des peptides discriminés en MS pourra être déterminée en calculant un ratio d'abondance entre le peptide marqué et le peptide endogène. Au niveau peptidique, les méthodes de marquages varient dans la façon dont les isotopes sont incorporés, et peuvent être classées en deux catégories : les techniques de dérivatisation chimique *in vitro* et les techniques de marquage métabolique *in vivo*.

a) Marquage isotopique *in vitro*

Il existe de nombreuses méthodes d'incorporations d'isotopes lourds *in vitro*. Les stratégies couramment utilisées incluent le marquage à l'eau lourde ($H_2{}^{18}O$), la méthode ICAT

(*Isotope-Coded Affinity Tag*), la méthode TMT (*Tandem Mass Tags*) ou encore la méthode iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*).

- Méthodes de quantification relative, au niveau du spectre MS

Dans le cas d'un marquage par ^{18}O, la digestion trypsique en présence d'eau lourde introduit des écarts de masse de 4 Da. La méthode présente des avantages liés à la stabilité de l'eau enrichie en ^{18}O, au décalage de masse constant introduit pour les peptides, et au fait que des réactions secondaires soient bloquées par ce marquage. Cependant, l'utilisation du marquage à ^{18}O est limitée à cause de la difficulté d'obtenir un marquage complet, ainsi que du manque de robustesse [413].

Pour la méthode ICAT, les résidus cystéine sont modifiés spécifiquement avec un réactif présentant soit 0 soit 8 atomes deutérés, ainsi qu'un groupement biotinylé pour permettre la purification des peptides contenant des cystéines [414]. La purification par affinité avec les groupements biotinylés permet d'accroître la détection des peptides de faible abondance contenant des cystéines.

Pour ces deux méthodes, la quantification relative des différents ions précurseurs est réalisée par MS et l'identification peptidique par MS/MS. Les marquages présentent l'inconvénient de complexifier les données, en introduisant des paires de peptides sur les spectres MS. Cela peut par exemple entraîner un chevauchement des profils MS pour des peptides endogènes de masses proches, rendant impossible leur quantification relative.

- Méthodes de quantification relative, au niveau du spectre MS/MS

Il est possible de s'affranchir de la complexité découlant des différentes masses peptidiques grâces aux méthodes iTRAQ et TMT. Dans ces méthodes, les marqueurs ont une masse identique, les mêmes peptides de différents échantillons sont donc isobariques à la suite du marquage. Ils apparaissent alors à un seul rapport *m/z* dans les scans de MS.

Les réactifs de marquage isobarique comprennent une amine primaire réactive, ainsi qu'un groupe isotopique « rapporteur » lié à un groupe « balance » non chargé, pour la normalisation de la masse totale des marquages. Le groupe rapporteur et le groupe balance ont des masses variant entre 114 à 117 Da et 31 à 28 Da respectivement, la somme des deux groupes constituant le tag isobarique possédant toujours une masse de 145 Da. Le groupement rapporteur est utile pour la quantification, car il est clivé au cours de la dissociation induite par collision (CID), entraînant la formation d'un fragment isotopique particulier. Le ratio des intensités des différents groupements rapporteurs permet ainsi la quantification des peptides et

donc des protéines. Les méthodes de marquages isobariques offrent la possibilité de comparer plusieurs échantillons au cours de la même analyse : l'iTRAQ permet ainsi le marquage et la quantification relative simultanés de 8 échantillons au maximum, tandis qu'il existe une version 10-plex de la méthode TMT. Cependant, ces méthodes nécessitent de recourir à des réactifs coûteux et se basent sur l'incorporation d'isotopes qui peut être incomplète. Le marquage est par ailleurs réalisé tardivement au cours du protocole expérimental : il intervient après la digestion protéique, et des biais expérimentaux au cours des étapes préalables peuvent fausser la quantification.

b) Marquage isotopique *in vivo*

Les processus métaboliques peuvent également être utilisés pour l'incorporation d'isotopes stables au sein des protéines, en enrichissant les milieux de culture avec des isotopes lourds ou légers (^{2}H, ^{13}C, ^{15}N). Le marquage métabolique a lieu dès le début de l'expérience, et les protéines présentant les marqueurs légers et lourds sont extraites simultanément, réduisant ainsi l'erreur et la variabilité de quantification introduite au cours de la préparation des échantillons. La stratégie la plus couramment utilisée pour le marquage métabolique est la technique SILAC (*Stable-Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture*), introduite au début des années 2000 [415].

Au cours d'une expérience SILAC, une population cellulaire croît en milieu classique, ou léger, tandis qu'une autre population croît dans un milieu alourdi avec des acides aminés (arginines ou lysines) enrichis par des isotopes ^{15}N ou ^{13}C. Il est par ailleurs nécessaire d'incorporer des acides aminés que la cellule n'est pas capable de synthétiser naturellement. L'une des deux populations cellulaires subit un stress ou un stimulus, puis les deux populations sont mélangées. Les protéines sont ensuite extraites, digérées et les peptides générés sont analysés en MS et MS/MS. De même que pour la méthode ICAT, les différences relatives d'expressions protéiques sont déterminées à partir du rapport des intensités de signal extraites des chromatogrammes des formes lourdes et légères, qui traduit la différence de concentration peptidique dans le mélange analysé. À nouveau, un inconvénient majeur de la méthode est la complexification des spectres MS par incorporation d'isotopes lourds. De plus, elle n'est pas applicable à l'analyse de protéines sériques ou extraites de tissus.

La stratégie SILAC est cependant un outil puissant pour l'étude des signaux de transduction intracellulaires. Récemment, cette méthode a été utilisée pour l'analyse quantitative des voies de signalisation dépendantes des phosphotyrosines. Les deux populations

cellulaires sont d'abord marquées différentiellement par SILAC, puis le récepteur tyrosine kinase est activé dans l'une des populations pour déclencher la phosphorylation des tyrosines des effecteurs de la voie de signalisation. L'Afadine et Shep1 sont des exemples d'effecteurs dont l'expression est variable dans cette voie de signalisation [416]. Cette approche a également permis d'identifier et de caractériser la dynamique de plus de 6 000 sites de phosphorylations, dans une lignée de cellules humaines cancéreuses [417].

Les marquages isotopiques constituent des outils puissants pour les applications de protéomique quantitative, cependant les méthodes de quantification par marquage présentent certains inconvénients. Le marquage isotopique est coûteux et complexifie la préparation des échantillons. De plus, seules les méthodes TMTs et iTRAQ permettent l'analyse simultanée de plusieurs échantillons (jusqu'à dix). La comparaison de plus de dix échantillons au cours d'une même expérience nécessite donc le recours à un échantillon standard. Cet échantillon marqué pourra être utilisé pour comparer différents groupes, comprenant chacun jusqu'à neuf échantillons marqués par les différents tags.

4.5.1.2.2 Les méthodes sans marquage (« label free »)

Pour répondre aux limitations décrites précédemment, les études de protéomique différentielles utilisant la quantification sans marquage dite « label free » se sont développées, permettant alors une analyse à haut débit. Des études comparatives ont été menées entre les méthodes de quantification avec marquage et sans marquage. Les stratégies de quantification avec marquage présentent des avantages en termes d'exactitude de quantification et de reproductibilité. Cependant une étude des protéines identifiées par « label free » ou par les stratégies de marquage métabolique, d'iTRAQ, TMT à partir d'un spectromètre de type LTQ-Orbitrap Velos (développé par la société Thermo) a montré certains avantages de l'approche « label free ». Dans cette étude, l'approche sans marquage présentait une plus grande gamme dynamique, et permettait d'identifier un plus grand nombre de protéines (près de 1 600 par expérience contre 1200 à 1400 avec les marquages métaboliques, le marquage iTRAQ ou TMT) [418]. Les méthodes de protéomique différentielle par quantification sans marquage sont basées sur le nombre de spectres MS/MS acquis pour les peptides d'une protéine considérée, ou sur les intensités des courants ioniques, comme présenté dans la figure 20.

a) Méthode basée sur le « spectral counting »

La méthode s'appuie sur le dénombrement et la comparaison du nombre de spectres d'ions fragments (scans MS/MS) acquis pour les peptides d'une protéine donnée. En s'appuyant sur l'observation que le nombre de scans MS/MS d'un peptide particulier augmente lorsque la concentration de la protéine correspondante augmente, une quantification relative des protéines présentes dans différents échantillons est possible [419]. Le résultat dépend donc fortement des paramètres d'acquisition du spectromètre de masse, et plus particulièrement des paramètres d'exclusions dynamiques (tels que l'intensité, la charge, le profil isotopique…) qui peuvent être ajustés afin d'éviter la sélection et l'acquisition répétée de scans MS/MS pour le même ion [420]. Cette méthode demeure controversée car le résultat s'appuie sur le dénombrement des spectres acquis plutôt que sur les propriétés physico-chimiques des peptides. En effet, la probabilité de détection de peptides dépend des propriétés physico-chimiques de ceux-ci, ce qui peut biaiser la quantification par « spectral counting ». L'élution des peptides au cours de la phase chromatographique séparative, l'efficacité d'ionisation variable dans la source, de même que la longueur de la séquence peptidique, sa masse, sa composition en acides aminés, sa solubilité ou sa charge nette sont ainsi autant de critères pouvant influencer la détection [421]. Une méthode de « spectral counting » modifiée a été développée en 2007, incluant un facteur correctif pour prendre en compte cette probabilité de détection peptidique variable selon la méthodologie MS considérée [422]. De plus, une quantification rigoureuse nécessite l'observation de nombreux spectres pour une protéine donnée. Une équipe a montré que des variations d'abondances protéiques d'un facteur trois pouvaient être déduites avec seulement quatre spectres, cependant le nombre de spectres requis augmente de façon exponentielle pour des variations relatives d'abondances plus faibles [423].

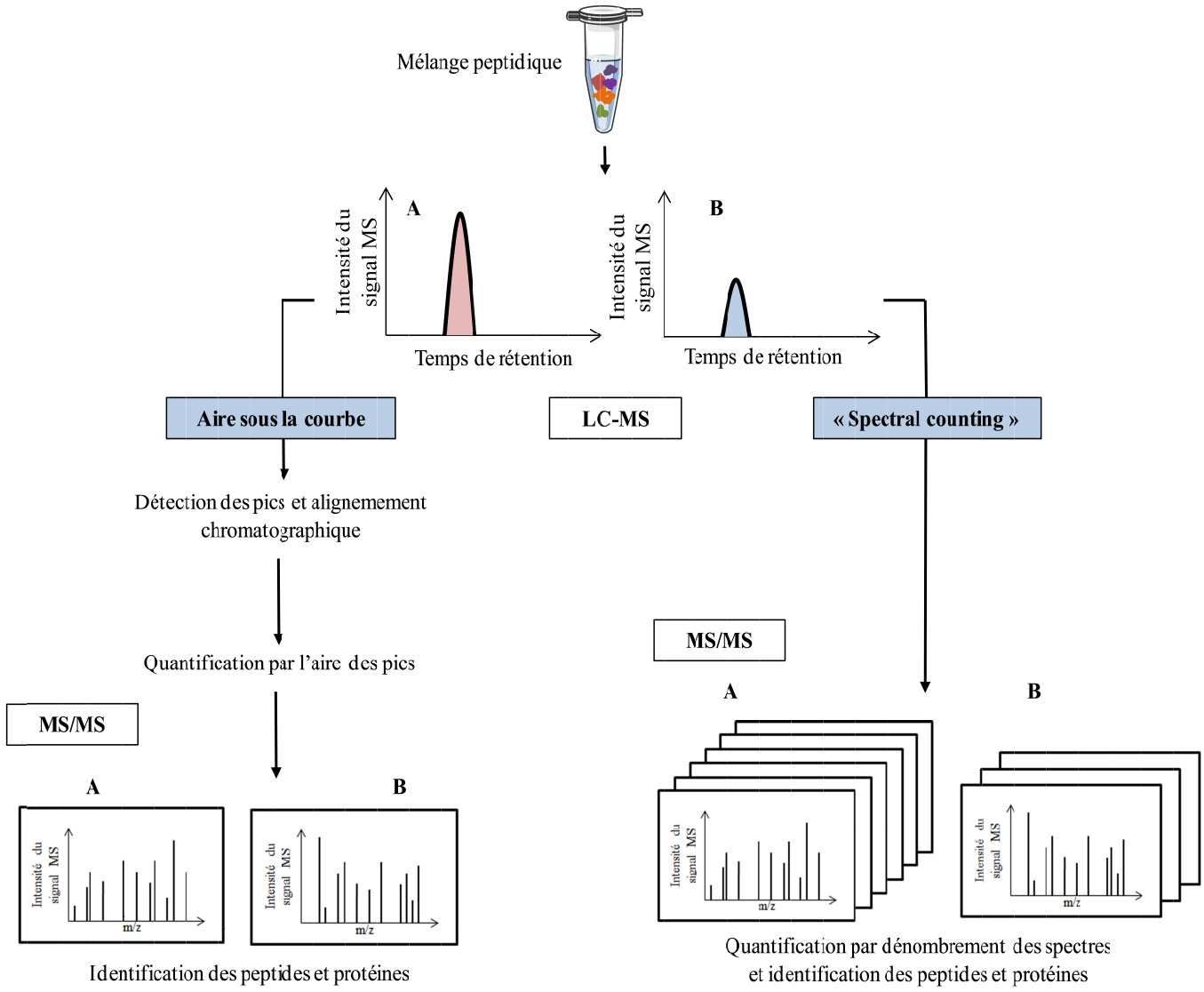


Figure 20 : Diagramme représentatif des deux principales approches de protéomique pour la quantification sans marquage (adapté de [424]).

Deux échantillons A et B présentent un différentiel d'expression protéique. L'approche basée sur l'aire sous la courbe quantifie les peptides au niveau de la MS, par la mesure et la comparaison des aires des pics chromatographiques. Les peptides présentant des expressions différentielles sont identifiés par MS/MS au cours d'une étape de fragmentation simultanée ou consécutive. Dans l'approche par « spectral counting », les identifications des peptides et protéines, de même que la quantification sont réalisées au niveau de la MS/MS. La quantification se base sur le nombre de spectres MS/MS acquis.

b) Méthode basée sur l'intensité des courants ioniques

Cette méthode repose sur la mesure des aires de pics chromatographiques (aussi appelées intensités de signal de spectrométrie de masse) des ions précurseurs. Dans le spectre de masse acquis, chaque peptide de masse et de charge données engendre un pic correspondant à l'ion mono-isotopique. L'intensité de ce pic en fonction du temps de rétention peut être extraite et visualisée par un chromatogramme, appelé EIC (*Extracted Ion Chromatogram*), et l'aire sous la courbe (AUC pour *Area Under the Curve*) est déterminée. La corrélation entre les aires des pics chromatographiques et l'abondance des protéines liées a été vérifiée sur une large gamme de concentrations, ce qui permet d'utiliser cette méthode pour des études de quantification relatives [425]. Le principe de cette approche est schématisé en figure 21.

Les analyses quantitatives basées sur les intensités de courants ioniques nécessitent un traitement des données brutes générées en LC-MS, incluant la détection des pics, l'alignement des temps de rétention, la normalisation des intensités de MS (afin de limiter les variations d'intensités de pics dues à des variations expérimentales comme la préparation ou l'injection des échantillons), et la réduction du bruit de fond. La reproductibilité de la chromatographie représente par ailleurs un facteur clé pour assurer la fiabilité de la quantification, puisque l'identité d'un analyte est déterminée par le couple de son ratio *m/z* et de son temps de rétention. L'ajout d'un standard interne, par exemple un mélange de peptides marqués par des isotopes, permet de s'assurer du maintien des performances de la LC-MS, et peut servir de repère pour l'alignement des chromatogrammes au cours de l'analyse des données [426].

La quantification sans marquage est une méthode reconnue pour la quantification relative de protéomes complexes. De plus, la possibilité de comparer de multiples échantillons cliniques, représente un avantage certain des méthodes « label free », dès lors que leurs performances sont optimisées. Elles constituent donc des approches de choix pour la recherche de biomarqueurs.

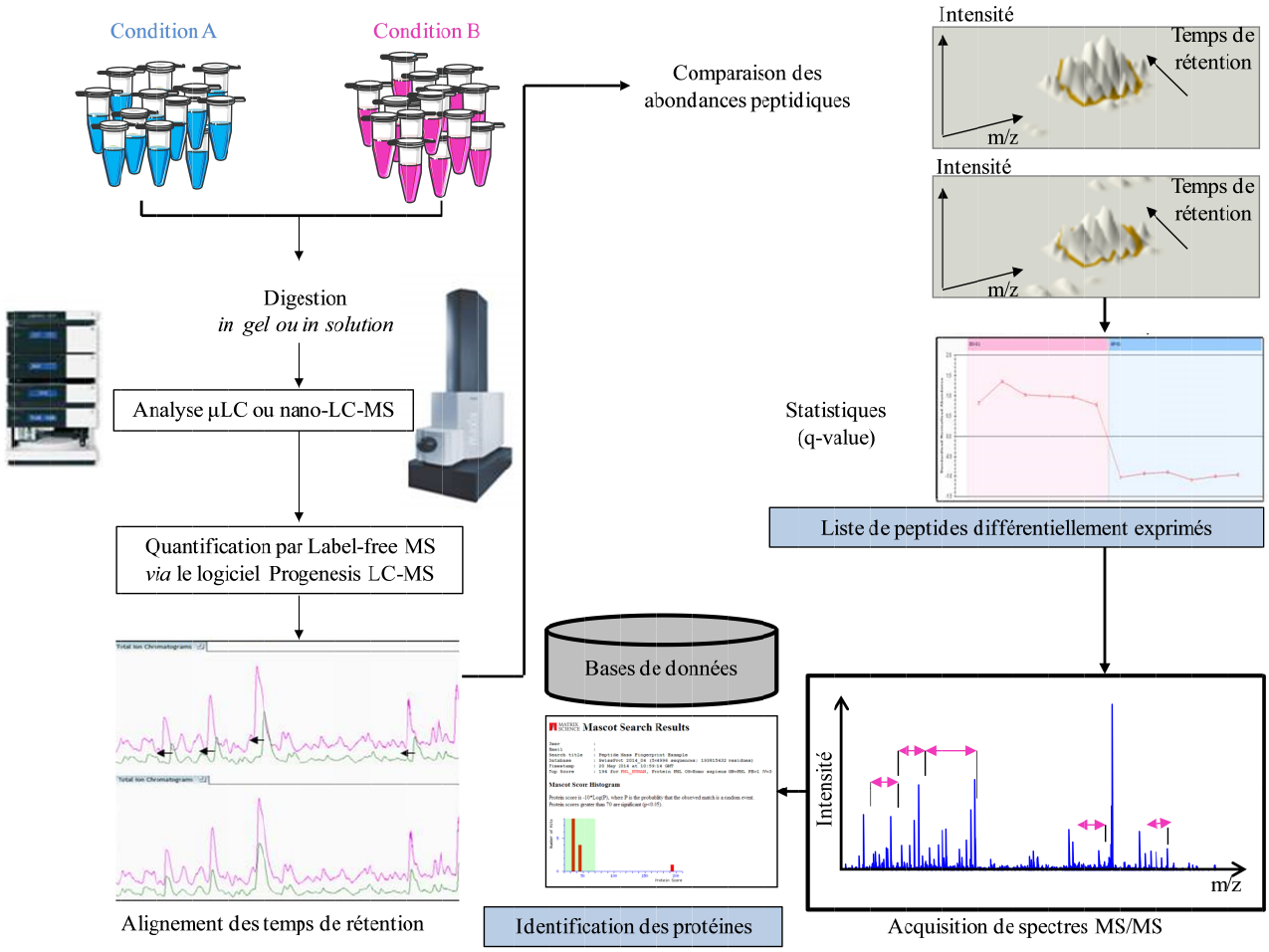


Figure 21 : Représentation schématique de la stratégie « label free », basée sur l'intensité des courants ioniques.

Les protéines provenant de deux échantillons de conditions A et B sont digérées et analysées en LC-MS. La quantification « label free » des peptides s'appuie sur différentes étapes de traitement informatique des données, *via* un logiciel (ici Progenesis LC-MS, Non Linear Dynamics) : les peptides sont détectés sur une carte en fonction de leur temps de rétention et de leur rapport *m/z*, les chromatogrammes sont alignés selon les temps de rétention, une normalisation des intensités peptidiques est éventuellement réalisée, et les abondances peptidiques sont comparées. Un traitement statistique permet de générer une liste de peptides différentiellement exprimés. Ceux-ci sont sélectionnés et analysés en LC-MS/MS, aboutissant à l'identification des protéines différentielles.

4.5.1.3 Logiciels d'interprétation des analyses protéomiques différentielles

Les méthodes de protéomique appliquées à la quantification relative des protéines nécessitent le traitement des données par des logiciels dédiés. Ceux-ci diffèrent en fonction de la compatibilité avec les instruments de MS, de la méthode de quantification en elle-même, des tests statistiques employés, ainsi que des données de spectrométrie de masse prises en compte (MS ou MS/MS) [427, 428]. Dans le cas de quantifications *via* les intensités ioniques, les logiciels peuvent varier en fonction des critères d'alignements des chromatogrammes, de

normalisation, ainsi que des algorithmes de détection des pics [429, 430]. Certains des logiciels sont disponibles en accès libre, comme MaxQuant [431] ou SuperHirn, d'autres comme DeCyder MS, Progenesis LC-MS ou Scaffold sont commercialisés.

Les jeux de données générés par les analyses protéomiques différentielles incluent des identifications de protéines, ainsi que des variations relatives d'abondances entre des groupes d'échantillons. Cependant, les données biologiques pertinentes doivent être extraites de données en quantités importantes, en identifiant et annotant fonctionnellement les protéines quantifiées dans des processus biologiques. Les analyses des mécanismes et des voies de signalisations, la construction et la visualisation de réseaux d'interactions peuvent être utiles dans ce contexte. En particulier, les études de recherche de biomarqueurs nécessitent de prendre en considération les données clinico-pathologiques disponibles, et de mettre en évidence des variations dans la régulation des protéines d'intérêt éventuellement déjà rapportées pour certains contextes pathologiques. Différents logiciels sont disponibles pour faciliter l'interprétation des données de protéomique dans des contextes biologiques [432].

4.5.2 Sources de variabilité

Les analyses protéomiques destinées à la recherche de biomarqueurs doivent s'attacher à limiter les sources de variabilité. Il est en effet essentiel que des différences liées à une pathologie ou à un traitement ne soient pas masquées par des différences artificielles, liées à une forte variabilité dans le procédé [433]. Les sources de variabilité peuvent être classées en deux catégories : on distingue ainsi la variabilité pré-analytique de la variabilité analytique.

La variabilité pré-analytique comprend de nombreux critères à contrôler au cours de la collecte des échantillons, de leur stockage et de leur préparation en vue d'analyses protéomiques. Au cours de la collecte des échantillons, des facteurs aussi variés que les caractéristiques cliniques des patients, les tubes de collecte, l'heure de prélèvement peuvent ainsi constituer des sources de variabilité. Les étapes de préparation des échantillons, comprenant la lyse cellulaire, l'isolation, la dénaturation et la digestion protéique peuvent également influencer de façon significative l'issue des études protéomiques. Les pertes non reproductibles de matériel biologique sur les parois des tubes, la reproductibilité de méthodes pré-analytiques comme la déplétion, les erreurs de pipetage constituent d'autres facteurs de variabilité pré-analytique qui doivent être examinés avec soin. Par ailleurs, l'efficacité de la digestion enzymatique (par la trypsine ou d'autres protéases) est également variable selon la méthode protéomique considérée. Par exemple, la digestion en gel pourra être choisie dans le

cas où des tampons de lyse cellulaire contenant des détergents sont utilisés, puisque ceux-ci interfèrent avec la MS. Cependant, la digestion en gel peut être incomplète, et une partie de l'échantillon peut être perdue à cause d'une extraction peptidique incomplète. La digestion en solution présente ainsi un avantage en termes de rendement de digestion, mais les échantillons devront être purifiés pour éliminer les éventuels détergents utilisés pour la dénaturation et la solubilisation, avant de pouvoir être analysés en LC-MS [434]. Ces étapes de purification peuvent elles-aussi être source de variabilité inter-échantillons.

La variabilité analytique dans les analyses de LC-MS doit également être contrôlée, que ce soit au cours des étapes de découvertes de biomarqueurs ou de la validation. Elle dépend notamment de la reproductibilité de la séparation chromatographique, de la disponibilité de réplicats techniques afin d'atténuer la variabilité de la MS. D'autres paramètres liés aux spectromètres de masse, tels que le pouvoir résolutif, la gamme dynamique ou les énergies de collision, représentent des critères de variabilité analytique.

Lorsque des candidats biomarqueurs sont identifiés par des méthodes protéomiques dont les sources de variabilité sont maîtrisées, l'étape consécutive consiste à valider les données.

4.6 Validation des données de protéomique

La validation des candidats biomarqueurs identifiés par les analyses protéomiques différentielles est nécessaire pour assurer, par une analyse orthogonale, une convergence des résultats. L'objectif est ainsi d'éliminer des faux-positifs potentiels, et d'apporter une confirmation de l'intérêt des candidats pour des études cliniques ultérieures. Des méthodes basées sur les acides nucléotidiques sont employées, telles que la PCR quantitative ou le séquençage. Elles sont complétées par des méthodes s'appuyant sur les immuno-affinités ou la spectrométrie de masse dite ciblée.

4.6.1 Méthodes basées sur les anticorps

Les techniques immunologiques basées sur les anticorps sont couramment utilisées pour la validation des différences protéiques observées dans les échantillons issus de groupes de patients distincts. Elles sont fondées sur la liaison spécifique entre un antigène et un anticorps, suivie par la fixation et la détection d'un traceur pour ce complexe. L'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), dont le débit d'analyse peut être augmenté (Luminex), l'immunohistochimie (IHC) ou l'immunoempreinte (Western Blot) sont des méthodes de

référence. L'utilisation d'un anticorps de capture et d'un anticorps de détection assure une forte spécificité au dosage ELISA. Par ailleurs, les analytes peuvent être rapidement dosés dans des milieux complexes (milieux de culture, sérum), avec des sensibilités pour les protéines plasmatiques allant du pg/mL au mg/mL [435, 436]. Dans le cas de l'IHC, les protéines exprimées peuvent être visualisées *in situ* à partir de biopsies, facilement accessibles en milieu hospitalier. Cependant les approches immunologiques sont dépendantes de la disponibilité d'anticorps spécifiques des cibles à tester. Le coût et la complexité du développement des méthodes de Western-Blot ou d'ELISA, qui requièrent ces anticorps spécifiques, peuvent représenter un obstacle pour la validation dans de larges cohortes cliniques, de la totalité ou d'une partie des candidats identifiés par des méthodes de protéomique comparatives basées sur la MS. Les tests ELISA peuvent par ailleurs être biaisés par de la réactivité croisée [437]. La présence de contaminants dans le milieu à analyser peut aussi inhiber la liaison entre l'anticorps de capture et l'antigène d'intérêt, entraînant une sous-estimation des résultats. La surface des puits, de même que les liaisons hydrophobes des anticorps de capture peuvent également accroître le bruit de fond. L'ELISA est couramment réalisé en plaque 96 puits, où les anticorps de capture sont immobilisés dans les puits, nécessitant des quantités relativement importantes d'anticorps pour capturer l'antigène d'intérêt. Le dosage ELISA s'appuie par ailleurs sur l'amplification du signal dépendant d'enzymes, pour obtenir une sensibilité raisonnable. Cette amplification n'est pas toujours linéaire, ce qui peut fausser les résultats. Enfin, ces méthodes n'offrent pas toujours la spécificité requise pour l'analyse de variants protéiques (isoformes dues à des substitutions d'acides aminés ou des modifications post-traductionnelles).

Des méthodes alternatives sont donc requises pour permettre l'identification des protéines ciblées, en particulier si elles correspondent à différentes protéoformes. La quantification absolue par spectrométrie de masse peut être mise en œuvre pour vérifier et valider des candidats marqueurs protéiques.

4.6.2 Quantification absolue par spectrométrie de masse

L'utilisation de standards internes marqués aux isotopes stables représente la solution la plus communément employée pour une quantification absolue. En fonction de sa nature, le standard interne est introduit plus ou moins précocement au cours du processus d'analyse, corrigeant un nombre variable d'étapes de la préparation d'échantillons. Les peptides AQUA (pour *Absolute Quantification*) [438] peuvent ainsi servir de standards internes pour une quantification absolue au niveau peptidique. L'ajout de polypeptides [439], de protéines

tronquées [440] ou de protéines entières [441], marqués par des isotopes, représentent des options de quantification absolue pour les protéines, qui permettent de prendre en compte (au moins partiellement) les variations induites par la digestion enzymatique.

Idéalement, les méthodes de quantification doivent être capables de mesurer un grand nombre de biomarqueurs simultanément. Par rapport aux méthodes reposant sur l'immunoaffinité, les analyses quantitatives basées sur la spectrométrie de masse ciblée (parmi lesquelles les méthodes SRM, pour *Selected Reaction Monitoring*) constituent une stratégie alternative pour la vérification et la quantification de biomarqueurs [442]. Les instruments de type triple quadripôle (TQ) utilisés en mode SRM sont les plus appropriés pour cet objectif. Il s'agit de l'application la plus courante de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour la quantification absolue [356].

La SRM s'appuie sur des hypothèses relatives aux peptides d'intérêt : ceux-ci doivent être préalablement connus, de même que les fragmentations qui en découlent. Les expériences de SRM sont basées sur la détection spécifique d'un couple formé d'un ion précurseur et d'un ion fragment, appelé transition : dans le premier quadripôle, un ion précurseur de rapport *m/z* donné est sélectionné, puis isolé dans le deuxième quadripôle où a lieu la fragmentation. Le ou les fragments les plus intenses sont ensuite sélectionnés et suivis dans le troisième quadripôle. Le nombre de fragments fils qui atteignent le détecteur est acquis au cours du temps : les chromatogrammes obtenus permettent de déterminer les profils d'intensité des ions fragments, et ainsi une quantification précise des peptides.

La quantification et la validation de protéines ou de peptides par la SRM s'appuie généralement sur l'utilisation de peptides de référence, marqués par des isotopes, pour la protéine d'intérêt. Les propriétés intrinsèques des peptides sont importantes : ceux-ci doivent avoir un rapport *m/z* dans la gamme de détection de l'appareil, ainsi qu'une efficacité d'ionisation élevée, afin d'accroître le rapport signal/bruit. Il est essentiel de considérer des peptides protéotypiques [395], c'est-à-dire des peptides issus de façon reproductible de la digestion enzymatique, générant des signaux intenses et spécifiques d'une protéine considérée. Les peptides comprenant des résidus méthionine, tryptophane ou cystéine sont généralement exclus des expériences de quantification par SRM, à cause de l'oxydation variable qu'ils peuvent subir. Les asparagines et glutamines sont également à éviter, du fait de leur instabilité chimique induisant la formation d'acide aspartique et acide glutamique, respectivement. Il convient également que la taille de la séquence peptidique soit comprise entre 5 et 25 acides aminés, puisque les peptides de masses trop faibles, hydrophiles, ne seraient pas retenus sur la

colonne de séparation, tandis que les longs peptides hydrophobes pourraient être adsorbés de façon permanente.

La limite majeure pour la quantification de peptides par SRM est la possibilité d'interférences et d'effets de suppressions d'ions résultant de la co-élution de plusieurs peptides. En effet la SRM est généralement réalisée sur des instruments dont les analyseurs sont du type triple quadripôle, qui présentent une basse résolution de la sélection de masse : la présence d'interférents de co-élution issus d'un milieu complexe peut entraîner la suppression d'ionisation des peptides d'intérêt et induire des faux-positifs. Pour normaliser ces biais analytiques, l'utilisation de standards internes représente la meilleure solution car ils présentent l'avantage de posséder les mêmes propriétés physico-chimiques (ils subiront donc les mêmes séparations chromatographiques, ionisations et fragmentations). Ainsi, deux types de kits ont récemment été développés pour permettre de s'assurer des performances des instruments, dans le cas d'expériences de MS ciblées [443]. Mis au point à partir de peptides standards marqués par des isotopes, ils permettent de tester l'efficacité d'une plateforme de LC-MS visant une quantification absolue et ciblée, ou un processus analytique complet. Le premier kit comprend ainsi sept échantillons de peptides trypsiques du plasma prêts à être injectés, dopés avec un mélange de peptides marqués par des isotopes. Le deuxième kit, permettant la validation du processus expérimental, inclut trois échantillons de base (du plasma, de la trypsine et un mélange de peptides marqués) permettant la préparation de sept standards de concentrations fixes en peptides endogènes, et variables en peptides exogènes. Les performances de ce deuxième kit ont été évaluées à partir de la variabilité des concentrations observées pour 22 protéines plasmatiques, dans six plateformes d'analyses par MS ciblée indépendantes.

Quand les méthodes SRM sont mises au point pour une liste de peptides données, elles peuvent être appliquées à haut-débit pour l'analyse d'un grand nombre de biomarqueurs simultanément (plus de 1 000 transitions SRM par heure [444]), avec une très bonne reproductibilité, même si les mesures sont réalisées par des laboratoires indépendants [445]. Le débit d'analyse et la très bonne sensibilité (allant du µg/mL au ng/mL) de la quantification par SRM en font une stratégie de choix pour la validation de biomarqueurs protéiques [446, 447]. Des études sont menées pour accroître encore davantage la sensibilité et la gamme dynamique de cette méthode [448]. Des stratégies s'appuyant sur la mise au point de traitements des échantillons, en combinant des étapes de fractionnement ou d'enrichissement, permet d'accroître la sensibilité de plus de 3 ordres de grandeurs [449, 450]. À partir d'instruments hybrides, comprenant un quadripôle et des analyseurs à haute résolution ainsi qu'à haute précision de mesure de masse, les performances de la quantification sont accrues. Sur un

instrument de type QqToF, la méthode SWATH-MS permet d'atteindre 89% de spécificité pour les transitions recherchées à partir du protéome de levure, ainsi que de gagner 4 ordres de grandeurs dans la gamme dynamique [451]. L'instrument Q-Exactive (Thermo) couple un quadripôle à l'Orbitrap et permet la détection en parallèle de tous les ions produits, ciblés en une seule analyse dans l'analyseur à haute résolution [352]. Ce type d'acquisition est appelé PRM (pour *Parallel Reaction Monitoring*) et a par exemple permis d'analyser 770 peptides trypsiques de levure dans une expérience de 60 minutes [452].

De nombreuses méthodes d'analyse protéomique différentielle sont utilisées pour la recherche de biomarqueurs. Elles permettent en effet d'analyser et comparer des populations cellulaires ou des fluides biologiques complexes. Des méthodes spécifiques sont ensuite mises en œuvre pour la validation des candidats identifiés.

La communauté scientifique s'est largement appuyée sur les méthodes de protéomique différentielle pour découvrir des marqueurs prédictifs ou de suivi de pathologies. En particulier, des candidats marqueurs de suivi d'efficacité de l'immunothérapie allergénique ont été identifiés dans une précédente étude des laboratoires Stallergenes.

Au cours de cette étude, la protéine Fétuine-A a été identifiée par différentes méthodes de protéomique quantitative comme étant différentiellement exprimée entre des groupes de patients, notamment entre les patients recevant un traitement d'immunothérapie et présentant une amélioration clinique et les patients traités pour lesquels le bénéfice clinique est moindre. Ces variations étant observées avant que les patients n'aient reçu le traitement, la Fétuine-A est donc considérée comme candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie. Nous présentons dans la section suivante les caractéristiques et fonctions biologiques connues à ce jour sur le candidat biomarqueur Fétuine-A.

5. FÉTUINE-A

L'étude menée par analyse protéomique différentielle a permis d'identifier la fétuine-A comme un candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'ITA. Dans cette partie, nous présentons certaines caractéristiques biologiques majeures relatives à cette protéine connues à ce jour.

5.1 Historique et biosynthèse

En 1944, Pederson isola et décrivit la plus abondante des protéines du sérum de veau fœtal sous le nom de « Fétuine ». L'homologue chez le rat de cette protéine a été décrit sous les noms de sialoprotéine d'os de 59 kDa [453], de glycoprotéine acide de l'os de 60 kDa [454], ou de PP63 [455]. La Contretrypsine [456], isolée à partir du plasma murin, a été décrit comme l'homologue murin de la fétuine. L'homologue humain de la protéine a longtemps été appelé α2-HS-glycoprotéine ou α2- Heremans Schmid glycoprotéine, d'après le nom des deux chercheurs l'ayant identifié, et le gène associé est symbolisé par *Ahsg*. L'homologie de séquence élevée entre les protéines issues d'espèces variées suggère une provenance d'un même gène ancestral. En conséquence, le nom fétuine a été adopté pour la nomenclature de la protéine dans les différentes espèces [457]. Au début des années 2000, la découverte d'un deuxième membre de la famille de la fétuine, nommé fétuine-B, a entraîné l'apparition de l'appellation fétuine-A pour désigner la fétuine originelle [458]. Dans ce travail, nous faisons référence à la fétuine-A.

La fétuine est exprimée au cours du développement du fœtus par de nombreux organes, incluant le foie, les reins, le tractus gastro-intestinal, la peau et le cerveau [459, 460]. Par ailleurs chez l'Homme, la fétuine-A est principalement synthétisée par les hépatocytes, et dans une moindre mesure les ostéoblastes [461]. Elle est sécrétée dans le plasma [458]: sa concentration plasmatique diminue rapidement après la naissance, suggérant une implication dans le développement du fœtus [462]. Sa concentration plasmatique est en effet de l'ordre de 2 à 4 mg/mL pour le fœtus, et d'environ 500 µg/mL chez l'adulte, ce qui la classe parmi les protéines plasmatiques de concentrations classiques comprises entre le µg/mL et le mg/mL [359, 463]. La protéine sécrétée est par ailleurs transportée vers les os, puis retenue au sein de la matrice de minéralisation osseuse, à cause d'une forte affinité pour l'hydroxyapatite [464, 465]. Une étude a également montré, à partir d'échantillons issus de biopsies osseuses provenant de patients adultes en dialyse, que les ostéoblastes synthétisaient la fétuine-A au

niveau local [466]. La fétuine-A est une protéine de phase aigüe (APP, pour *Acute Phase Protein*), dont la synthèse est modulée au cours d'évènements traumatiques ou infectieux [467]. Nous détaillerons dans une section ultérieure ces variations opposées, qui justifient de considérer la protéine comme une APP positive ou négative.

5.2 Caractéristiques génétiques et structurales de la fétuine-A

5.2.1 Génétique et famille protéique

Le gène humain de la fétuine-A, *Ahsg*, est situé sur le chromosome 3 (locus 3q27), et contient sept exons et six introns, couvrant une région d'environ 8.2 kbases. Un unique transcrit d'ARN messager code pour la synthèse du précurseur de la fétuine-A [468]. L'activité transcriptionnelle du gène de la fétuine-A est par ailleurs régulée par plusieurs sites de liaisons aux facteurs de transcription (C/EBP)-β et NF-1 dans sa région promoteur.

La fétuine-A appartient à la superfamille des cystatines, un groupe d'inhibiteur de la cystéine protéase [469]. La protéine possède deux domaines N-terminaux semblables aux cystatines, désignés par D1 et D2, ainsi qu'un domaine C-terminal noté D3, dont la similarité avec les cystatines est faible [470]. Etant donné les propriétés d'inhibition à l'action des cystéine-protéases des domaines semblables aux cystatines, il était attendu que les domaines D1 et D2 inhibent l'activité de la papaïne ou de la cathepsine. Cependant, puisque la fétuine-A purifiée ne présente pas d'activité inhibitrice envers ces enzymes, les domaines D1 et D2 pourraient avoir perdu leur faculté à inhiber les cystéines-protéases au cours de l'évolution [471].

Des polymorphismes du gène *Ahsg* ont été décrits dès les années 1980 [472]. Certains des polymorphismes ont par ailleurs été associés à des risques accrus de développer certaines pathologies. Deux polymorphismes de nucléotides uniques (SNP pour *Single Nucleotide Polymorphism*), codant pour les substitutions d'une méthionine en thréonine en position 248 et d'une sérine en thréonine en position 256, sont associés à une densité osseuse du col du fémur et des vertèbres lombaires plus importante chez des femmes nord-américaines [473]. D'autres polymorphismes ont été liés à une probabilité plus forte de développer un diabète de type 2, dans une cohorte comprenant 7683 patients danois [474]. Une étude de suivi de patients, 2 ans après qu'ils ont présenté des maladies rénales avancées, a montré un lien entre une homozygotie pour l'allèle 256 et une mortalité accrue, ainsi qu'une tendance à une accélération de la calcification vasculaire [475].

5.2.2 Séquence de la protéine et modifications post-traductionnelles

5.2.2.1 Structure protéique

La fétuine-A est une protéine dont la masse moléculaire théorique est proche de 39 kDa, et de point isoélectrique théorique de 5,43. Sa séquence comprenant 367 acides aminés est divisée en quatre domaines : i) un pro-peptide de 18 acides aminés, ii) une première chaîne, dite chaîne A, longue de 282 acides aminés, iii) un pro-peptide permettant la liaison entre les deux chaînes protéiques, de 40 acides aminés, et iv) une deuxième chaîne, notée chaîne B, longue de 27 acides aminés. La protéine présente par ailleurs six ponts disulfure participant à la stabilisation de la structure tertiaire, dont l'un relie les chaînes A et B [476]. La séquence de la protéine est représentée par la figure 22.

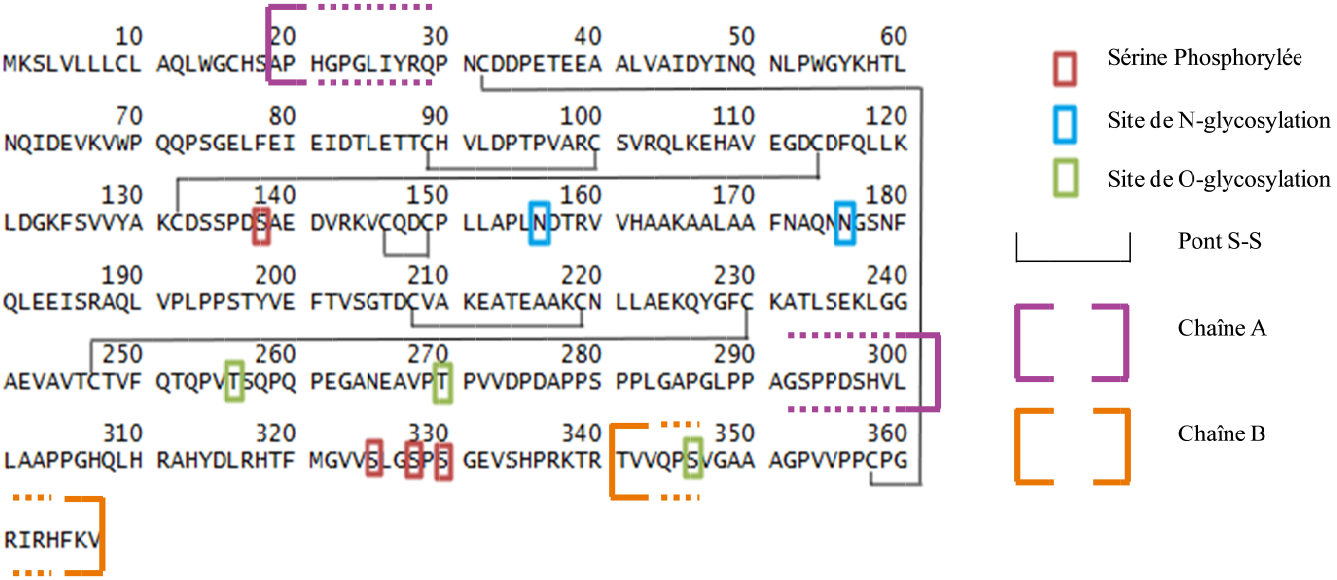


Figure 22 : Séquence de la fétuine-A.

Les deux chaînes de la protéine sont reliées par un pont disulfure. Des résidus portent des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, N- et O-glycosylations).

5.2.2.2 Modifications post-traductionnelles

La fétuine-A est sujette à des modifications post-traductionnelles, aujourd'hui bien décrites grâce aux avancées technologiques de protéomique quantitative et notamment de la spectrométrie de masse [477]. Les isoformes de la fétuine-A sont souvent utilisées comme modèles pour certaines études de caractérisations de glycoprotéines, notamment pour la

détermination des motifs glycanniques greffés [478, 479]. Des sites de N-glycosylations [480, 481] et de O-glycosylations [477, 482] ont ainsi été décrits.

Ainsi, les asparagines en positions 156 et 176 représentent des sites de N-glycosylations. Trois sites de O-glycosylations sont par ailleurs décrits, au niveau des thréonines en positions 256 et 270, ainsi qu'au niveau du résidu sérine en position 346. Les motifs glycanniques ainsi que leurs sites d'attachement sur la séquence protéique sont synthétisés dans le tableau 6.

Par ailleurs, la séquence comprend quatre sérines phosphorylées, en positions 138, 325, 328 et 330 [483, 484].

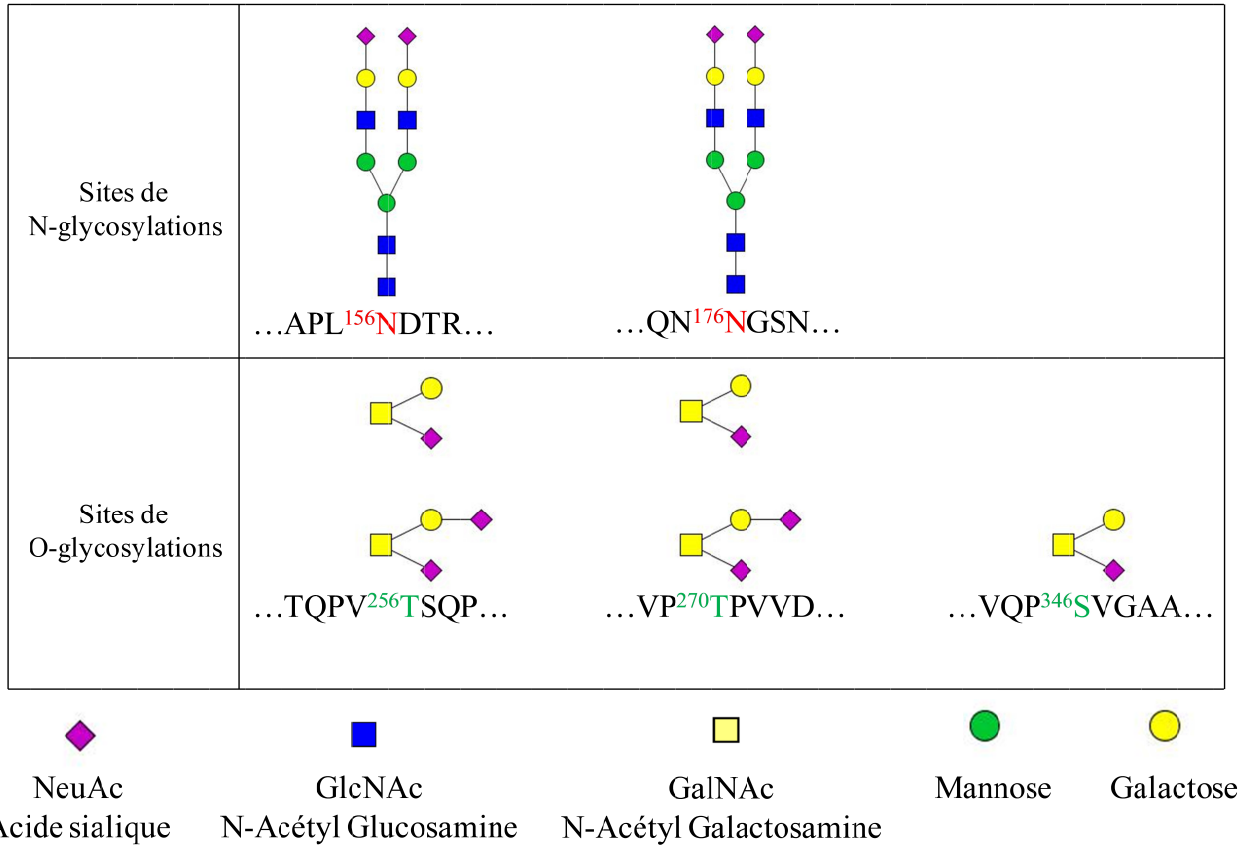


Tableau 6 : Sites de glycosylations de la fétuine-A et motifs glycanniques potentiellement associés.

5.2.2.3 Homologies de séquences

L'alignement des séquences entre la fétuine-A et ses homologues pour différentes espèces montre des taux d'homologie très variables. La fétuine-A présente par exemple 64% d'identité de séquence avec la protéine bovine ou ovine, 61% avec la protéine de rat, et 59%

avec la protéine murine. En particulier, la longueur de la chaîne protéique de souris est réduite à 345 acides aminés. Certains sites de N-glycosylations de la protéine humaine ne sont pas conservés dans la séquence de la protéine murine, et les sites de O-glycosylations ne sont pas décrits à ce jour.

Des études ont cependant montré que certaines fonctions biologiques de la protéine étaient relativement conservées entre les homologues : la fétuine bovine et la fétuine-A recombinante humaine montrent par exemple des activités comparables envers le récepteur à l'insuline [485].

5.3 Fonctions biologiques de la fétuine-A

La fétuine-A possède de nombreuses fonctions biologiques, dans diverses conditions physiologiques ou pathologiques. La protéine appartient au groupe des protéines dites de la phase aigüe, dont l'expression varie en fonctions de conditions pathologiques. Par ailleurs, la fétuine-A est impliquée dans le système osseux, le système cardiovasculaire, le système nerveux central et le métabolisme, comme présenté en fin de chapitre par la figure 26.

5.3.1 La fétuine-A, protéine de la phase aigüe

En réponse à des infections ou à des lésions, la synthèse protéique hépatique est priorisée en faveur d'un ensemble de protéines dites de la phase aigüe, les APPs. Elles sont dites APPs « positives » ou « négatives », selon que leur concentration plasmatique croît ou diminue pendant l'inflammation. La fétuine-A fait partie des APPs, mais elle est classée soit parmi les parmi les APPs négatives, soit parmi les APPs positives, puisque sa synthèse est inversement régulée suite à une infection ou une lésion.

5.3.1.1 Régulateurs de l'expression hépatique de la fétuine-A

L'expression hépatique de la fétuine-A est régulée par plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, les niveaux d'expression de la protéine par la lignée de cellules hépatiques HepG2 sont réduits sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6 ou l'IFN-γ [486]. Une étude a montré que des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/mL en IFN-γ étaient suffisantes pour diminuer de 50% l'expression

hépatique de la fétuine-A [487]. D'autres équipes de recherche ont formulé l'hypothèse selon laquelle la protéine HM-GB1, médiateur pro-inflammatoire précoce impliqué dans l'établissement de lésions traumatiques [488], pourrait réguler l'expression de la fétuine-A par les cellules hépatiques.

5.3.1.2 Rôle d'APP négative en cas d'infection

Dans des modèles animaux d'endotoxémie létale ou de septicémie, induits par des injections intra-péritonéale de LPS, ou la ligation et la ponction du coecum (LPC), les concentrations de fétuine-A circulante diminuent rapidement entre 2 et 6 heures, avant d'atteindre un minimum autour de 24 à 48 heures après l'infection. Le niveau de fétuine-A augmente ensuite, pour retrouver son niveau basal environ 72 heures après l'infection. De plus, des souris rendues déficitaires en IFN-γ ne montrent pas de diminution de l'expression de la fétuine-A sous le contrôle des endotoxines [487]. Ces éléments permettent de considérer la fétuine-A comme une APP négative dans les modèles animaux d'endotoxémie létale et de septicémie.

La fétuine-A est également considérée comme une APP négative chez l'Homme, puisque son expression est diminuée au cours d'infections ou de certaines pathologies inflammatoires. Les taux de fétuine-A circulant sont en effet réduits de 20 à 30% chez des patients atteints d'arthrite rhumathoïde [489, 490], de pancréatites [491] ou de maladies rénales chroniques [492].

5.3.1.3 Rôle d'APP positive en cas de lésion

Dans un modèle animal d'ischémie cérébrale focale, induit par occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne, les concentrations de fétuine-A circulant dans les tissus cérébraux varient au cours du temps. Elles augmentent dans un premier temps, pour atteindre une valeur maximale environ 24 à 48 heures après l'ischémie, avant de revenir à une valeur basale 72 heures après l'occlusion artérielle [493]. Cette augmentation au cours du temps des concentrations cérébrales en fétuine-A peut être mise en parallèle de l'augmentation temporaire de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [494], et suggère que la fétuine-A rejoigne la zone d'ischémie cérébrale en franchissant cette barrière hémato-encéphalique. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de fétuine-A, administrée par voie intra-veineuse et

marquée par un fluorochrome, dans la zone d'ischémie cérébrale 24 heures après l'occlusion artérielle [493].

Au niveau clinique, les concentrations plasmatiques en fétuine-A augmentent à la suite de lésions ischémiques cérébrales [495, 496]. Des concentrations élevées en fétuine-A sont également associées à un risque accru de maladies cardiovasculaires, et notamment les accidents vasculaires cérébraux ischémiques [495]. Cependant, une étude récente démontre que ce risque accru serait dépendant du fait que les patients soient atteints d'un diabète de type 2 [497]. De plus, il reste à déterminer si des concentrations élevées en fétuine-A sont liées à l'ischémie cérébrale (facteur d'exacerbation), ou si ces concentrations sont augmentées à la suite des accidents ischémiques (facteur de protection).

5.3.2 Fétuine-A et système osseux

Les modèles animaux développés à partir de souris pour lesquelles le gène de la fétuine-A est inactivé (souris knock-out) ont permis de mieux comprendre le rôle de la protéine dans le système osseux. Les premières souris knock-out étudiées étaient fertiles, se développaient normalement, et ne présentaient pas d'anomalies de croissance flagrantes [498]. Cependant selon la souche considérée, les souris déficitaires en fétuine-A peuvent présenter une calcification importante des tissus mous [499], notamment au niveau de la peau, des reins, et des testicules. Par ailleurs, la fétuine-A se liant aux minéraux peut entraîner la formation de complexes solubles (appelés FMCs ou CPPs pour *Fetuin-Mineral Complexes* ou *Calciprotein Particles*), qui neutralisent les ions des minéraux et préviennent la calcification ectopique excessive [500]. Ces résultats démontrent que la fétuine-A représente un inhibiteur systémique de la calcification ectopique, comme représenté sur la figure 23.

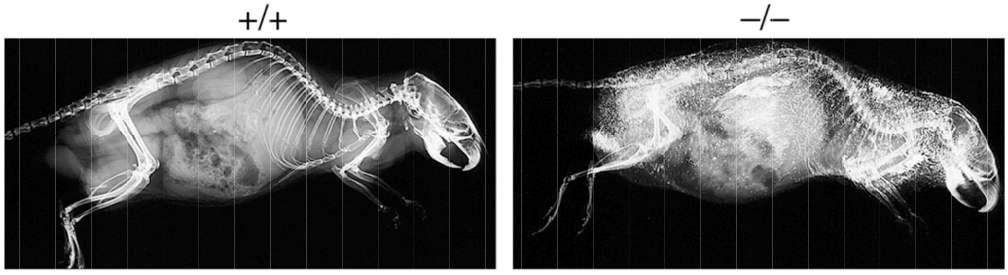


Figure 23 : Analyse radiographique de souris déficitaires en fétuine-A (DBA/2-*Ahsg*$^{-/-}$).

Le déficit en fétuine-A chez des souris mâles de 9 semaines, de la souche DBA/2 entraîne une sévère calcification ectopique, avec un régime alimentaire classique. La calcification se produit au niveau du thorax, des reins et des testicules (d'après [499]).

La fétuine-A sécrétée après la naissance s'accumule au niveau du tissu osseux. Il est donc vraisemblable qu'un seuil de concentration doive être atteint pour que la protéine montre un effet biologique. Le remodelage osseux se produit par ailleurs constamment et résulte d'un équilibre entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. De nombreux facteurs solubles, comme des hormones et des cytokines, sont impliqués dans ces mécanismes de régulation et de formation osseuse. Ainsi, le TGF-β et la protéine morphogénétique osseuse ont des effets réprimés par leur liaison directe avec la fétuine-A [501], ce qui entraîne pour les souris déficitaires en fétuine-A une formation osseuse accrue. Celle-ci se manifeste par une augmentation de l'épaisseur du cortex, un remodelage accéléré de l'os trabéculaire, ainsi qu'une augmentation du nombre d'ostéoblastes à la surface des os [502].

5.3.3 Fétuine-A et métabolisme

Après des premiers travaux portant sur les homologues bovin et du rat, il a été démontré que la fétuine-A purifiée à partir du sérum entraîne une inhibition de la phosphorylation spontanée du récepteur à l'insuline et de l'un des substrats du récepteur à l'insuline [503]. Les sites d'interaction de la fétuine-A et du récepteur à l'insuline sont encore peu décrits. Cependant, une étude a montré que la fétuine-A inhibait totalement l'auto-phosphorylation du récepteur à l'insuline régulée par la trypsine, et ce en l'absence de la partie principale de la chaîne α du récepteur à l'insuline [504]. Ces résultats permettent de valider l'hypothèse selon laquelle la fétuine-A n'est pas en compétition avec l'insuline pour la liaison à son récepteur [503]. Des expériences *in vitro* ont également montré que la fétuine-A module l'activité des adipocytes. Ainsi, des adipocytes issus de biopsies et traités par la protéine présentent une diminution de l'expression d'ARN messager de l'adiponectine, adipocytokine impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose [505].

L'implication de la fétuine-A dans le système métabolique a surtout été démontrée par le lien existant entre les concentrations sériques et la résistance à l'insuline. Une équipe a ainsi dosé la fétuine-A dans le sérum de patients atteints de diabète de type 2, ainsi que chez des sujets non diabétiques, et montré que l'augmentation de la concentration en fétuine-A est associée à une sensibilité à l'insuline accrue chez les individus non diabétiques, mais pas chez les patients diabétiques [506]. Des études incluant de larges cohortes de patients non diabétiques ont confirmé ce résultat. Elles ont en effet montré que des patients présentant une tolérance au glucose altérée présentent une concentration sérique en fétuine-A accrue [507].

La fétuine-A est par ailleurs décrite pour son lien avec l'accumulation de lipides dans le foie, comme la stéatose hépatique non alcoolique (SHNA) ou l'obésité. Une étude par spectroscopie par RMN a montré une corrélation positive entre la concentration en fétuine-A et le niveau lipidique du foie [508]. De même, la concentration sérique en fétuine-A est augmentée chez des patients atteints de SHNA, en comparaison avec des individus sains [509]. Les concentrations de fétuine-A ont également été comparées chez des sujets atteints d'une obésité morbide par rapport à des individus non obèses et en bonne santé : la fétuine-A est environ trois fois plus abondante chez les sujets obèses [510]. D'autres études portant sur des enfants donnent des résultats similaires, et présentent l'avantage de limiter les cofacteurs des populations adultes (maladies coronariennes, prise médicamenteuse, tabagisme, consommation d'alcool).

Récemment, le mécanisme expliquant le lien entre fétuine-A et la résistance à l'insuline a été clarifié. Chez des patients obèses souffrant de diabète de type 2, les acides gras accumulés provoquent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, uniquement chez les patients pour lesquels la fétuine-A est présente dans les cultures d'adipocytes [511]. La fétuine-A sert ainsi de molécule adaptatrice des acides gras libres pour l'interaction avec le TLR4, à l'origine de la voie de signalisation de résistance à l'insuline, comme le représente la figure 24. Cette association entre les acides gras libres et la fétuine-A a été validée cliniquement. Ainsi, parmi les patients pour lesquels existe un risque élevé de développer un diabète de type 2, la sensibilité à l'insuline est amoindrie dans des groupes de patients présentant de fortes concentrations sériques en acides gras libres et en fétuine-A [512]. Plusieurs études de cas ont associé la concentration sérique en fétuine-A et le risque de développer un diabète de type 2. Dans ces études où le suivi est réalisé pendant plusieurs années, il est démontré qu'une concentration sérique élevée en fétuine-A est corrélée à une incidence accrue du diabète de type 2 [513], ou que le niveau basal en fétuine-A permet de prédire l'incidence de la maladie, indépendamment d'autres facteurs de risques [514].

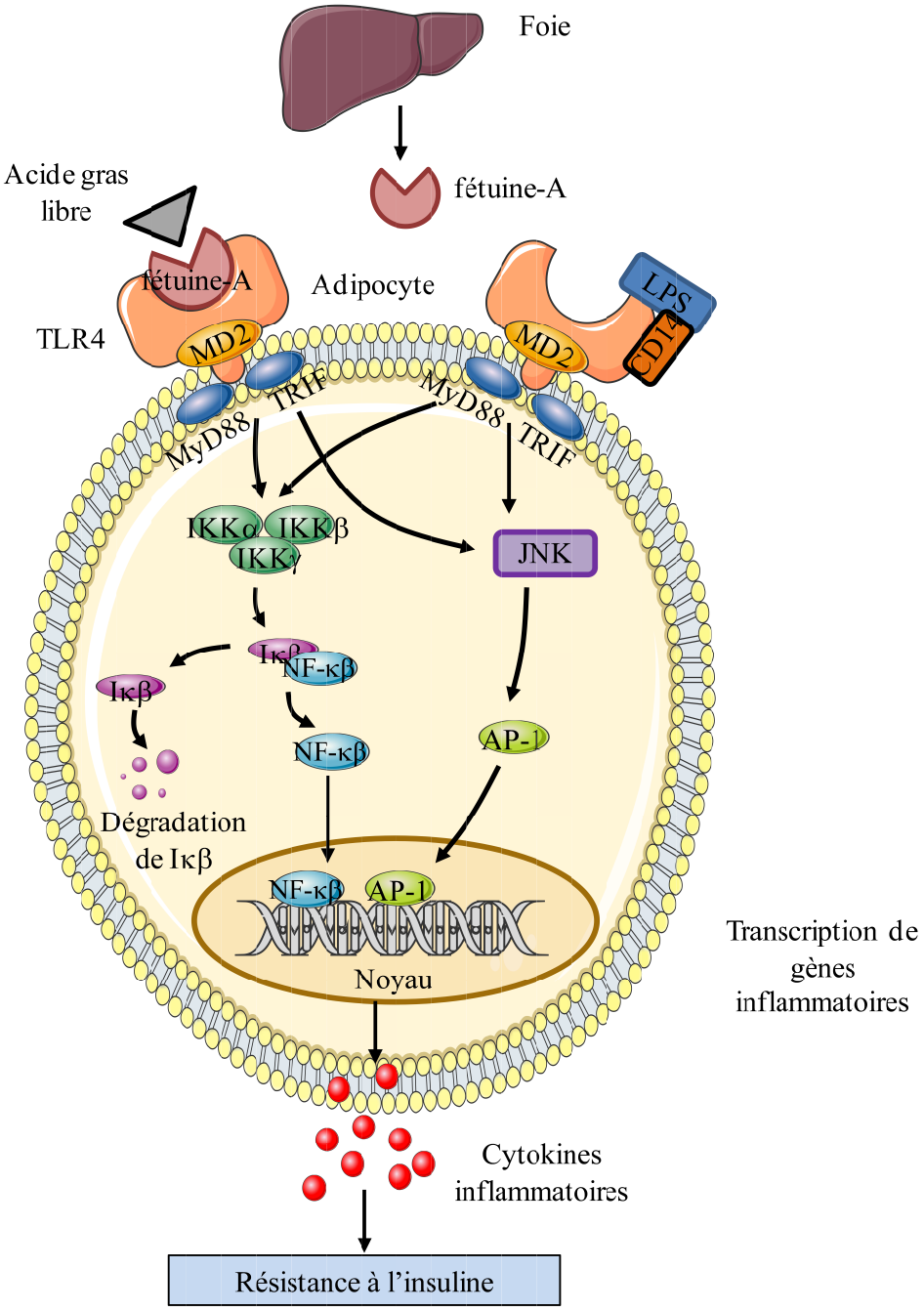


Figure 24 : La fétuine-A est une protéine adaptatrice entre les acides gras et la voie de signalisation du TLR4, dans l'inflammation induite par les lipides (d'après [515]).

Les acides gras libres et le LPS peuvent stimuler la voie de signalisation du TLR4 : le LPS se lie directement au complexe TLR4-CD14, et les acides gras se lient à la fétuine-A, qui se lie à son tour au TLR4. La voie de signalisation du TLR4 active les facteurs de transcription NF-κβ et AP-1, augmentant la transcription de gènes inflammatoires. Il en résulte une résistance à l'insuline, *via* la production de cytokines inflammatoires. IKK : inhibiteur de kinase NF-κβ ; Iκβ : inhibiteur de κβ ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; MD2 : *Myeloid differentiation protein-2* ; TRIF : protéine adaptatrice induisant l'IFN-β ; MyD88 : *Myeloid Differentiation primary-response gene 8.*

5.3.4 Fétuine-A et système cardio-vasculaire

Deux mécanismes distincts font intervenir la fétuine-A au cours des maladies cardiovasculaires. La fétuine-A peut induire des maladies métaboliques comme la résistance à l'insuline et la dyslipidémie comme décrit ci-dessus, contribuant au déclenchement et au maintien de l'athérosclérose. A l'inverse, la fétuine-A est aussi un inhibiteur de la calcification vasculaire, caractéristique d'un stade avancé d'athérosclérose [516].

5.3.4.1 Propriétés athérogéniques

Plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la concentration sérique en fétuine-A et l'épaisseur médiane de l'intima carotidienne, marqueur reconnu des modifications athéromateuses précoces [517, 518]. Cependant, des résultats contradictoires sont rapportés : des variations de la rigidité de la carotide artérielle sont corrélées positivement ou négativement à la concentration en fétuine-A sérique [519, 520]. Il est donc important dans ces études de limiter les variables et les facteurs confondants, en excluant les patients présentant des dysfonctions rénales, des calcifications vasculaires sévères ou un diabète.

5.3.4.2 Propriétés d'inhibition de la calcification vasculaire

In vitro, la protéine inhibe la formation d'apatite par la formation de complexes solubles (FMCs et CPPs). Chez l'Homme cependant, le rôle de la fétuine-A dans l'inhibition de la calcification reste à clarifier. La calcification vasculaire donne un exemple de calcification ectopique : les patients en hémodialyse sont ainsi étudiés, car ils présentent fréquemment une calcification vasculaire sévère. Pour ces sujets, les taux de fétuine-A sériques sont diminués [521]. La concentration de la protéine fait partie des éléments permettant de prédire les chances de survie de patients en dialyse : il existe ainsi une relation inverse entre la concentration sérique en fétuine-A et le taux de mortalité des patients en hémodialyse [522, 523].

Dans la population générale, des résultats variables sont décrits dans la littérature. Ils soulignent l'importance de prendre en considération l'existence de facteurs confondants tels que le diabète. En effet, la corrélation positive observée entre la concentration sérique en fétuine-A et la résistance à l'insuline n'est plus observée en cas de diabète déclaré. Un phénomène semblable peut se produire dans la relation entre la fétuine-A, la calcification vasculaire, et la mortalité. Par exemple, les insuffisances rénales en stade terminal s'accompagnent d'une diminution de la concentration en fétuine-A [524], mais une autre étude

a montré que la concentration de la protéine était inversement associée à la fonction rénale [525]. L'insuffisance rénale peut donc représenter un facteur confondant pour l'étude du lien entre la concentration en fétuine-A et d'autres paramètres cliniques.

La dualité de l'effet de la fétuine-A dans l'établissement de l'athérosclérose est schématisée par la figure 25.

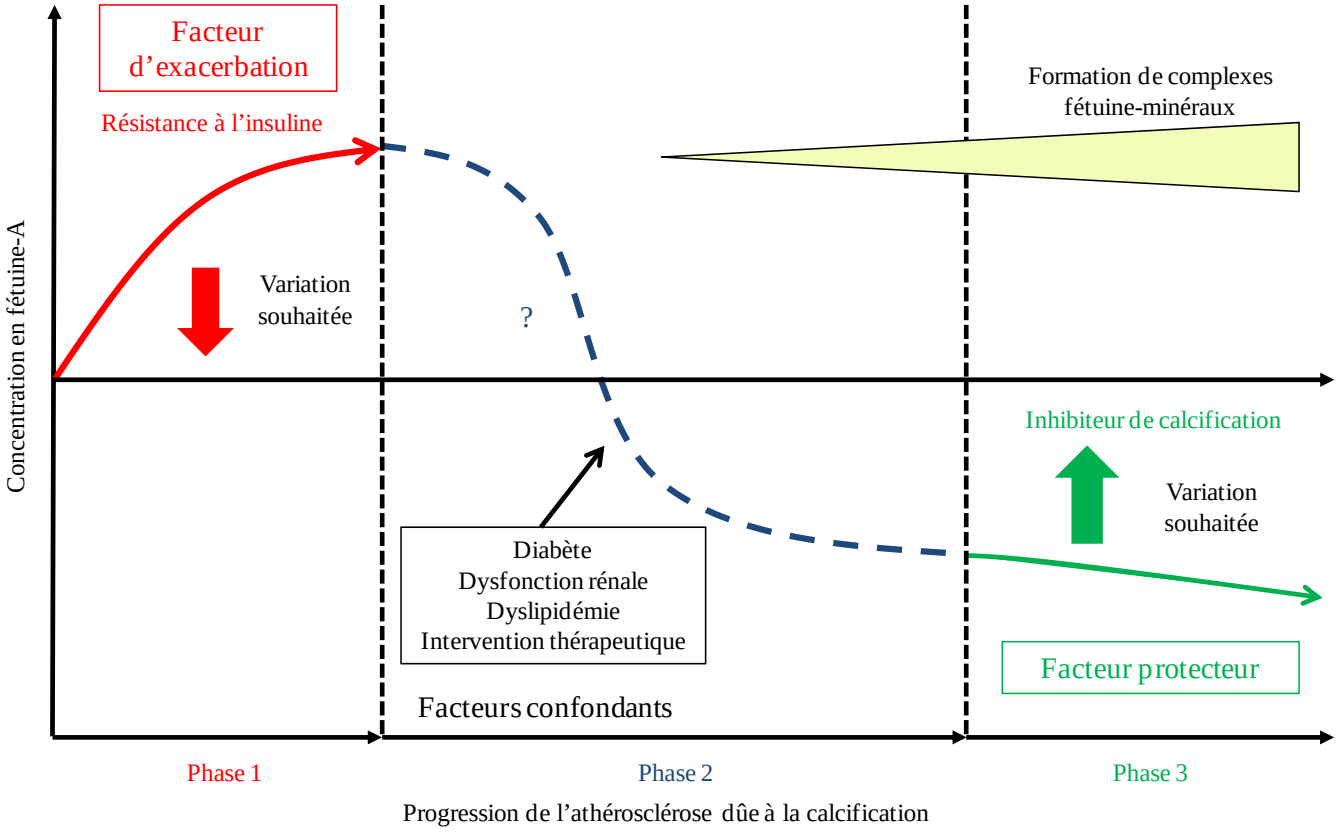


Figure 25 : La fétuine-A a un effet biphasique supposé dans le développement de l'athérosclérose (adapté de [526]).

5.3.5 Fétuine-A et système nerveux central

La fétuine-A est détectée à de fortes concentrations dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) fœtal humain. De plus, les ratios de concentrations en fétuine-A dans le LCR par rapport à la concentration plasmatique sont plus élevés chez le fœtus que chez l'adulte. Ces éléments suggèrent une implication de la protéine au cours du développement du système nerveux [527]. La protéine est par ailleurs détectée par immunohistochimie dans une population cellulaire du cortex cérébral formant la structure appelée plaque corticale [528], ainsi que dans des populations cellulaires temporaires de l'embryon [529]. Il reste à établir si ces cellules synthétisent elles-mêmes la fétuine-A, ou si elles l'acquièrent du milieu environnant.

La fétuine-A est également impliquée dans certaines conditions pathologiques du système nerveux. En particulier, un lien a été montré entre une concentration élevée en fétuine-A et un risque accru d'AVC ischémique [495]. Des études ont été menées pour comprendre si la protéine se comporte comme un facteur d'exacerbation, ou si sa concentration élevée en cas d'AVC est révélatrice d'une fonction protectrice de la protéine. Dans des modèles *in vivo* de lésions ischémiques cérébrales, l'administration périphérique de fétuine-A entraîne chez les rats traités la réduction du volume de l'infarctus cérébral. À l'inverse, l'administration d'anticorps dirigés contre la fétuine-A se traduit par une augmentation du volume de l'infarctus [493]. De plus, la fétuine-A administrée entraîne une diminution de la libération d'HM-GB1 du cœur ischémique, réduisant ainsi l'activation des cellules immunitaires centrales (microgliocytes) et périphériques (monocytes et macrophages), et par conséquent la réponse inflammatoire dans les tissus ischémiques.

L'analyse du protéome du LCR a permis d'identifier certains marqueurs prédictifs de la sclérose en plaque, dont la fétuine-A [530]. Une étude récente a en effet montré cliniquement que la concentration en fétuine-A dans le plasma et le LCR était associée à la sévérité des symptômes de la sclérose en plaque, tandis que sa concentration diminue après traitement par l'anticorps Natalizumab. De plus, des souris déficitaires en fétuine-A déclarent la maladie plus tardivement et présentent des symptômes moins sévères, dans un modèle de sclérose en plaque par encéphalomyélite allergique expérimentale [531]. D'autres études protéomiques ont examiné l'implication de la protéine dans la maladie d'Alzheimer : le LCR de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer a été comparé par électrophorèse bi-dimensionnelle à celui de sujet sains, montrant une abondance de la fétuine-A plus faible chez les sujets malades [532]. L'abondance plasmatique de la fétuine-A est par ailleurs corrélée à la sévérité des troubles cognitifs des patients atteints d'Alzheimer [533].

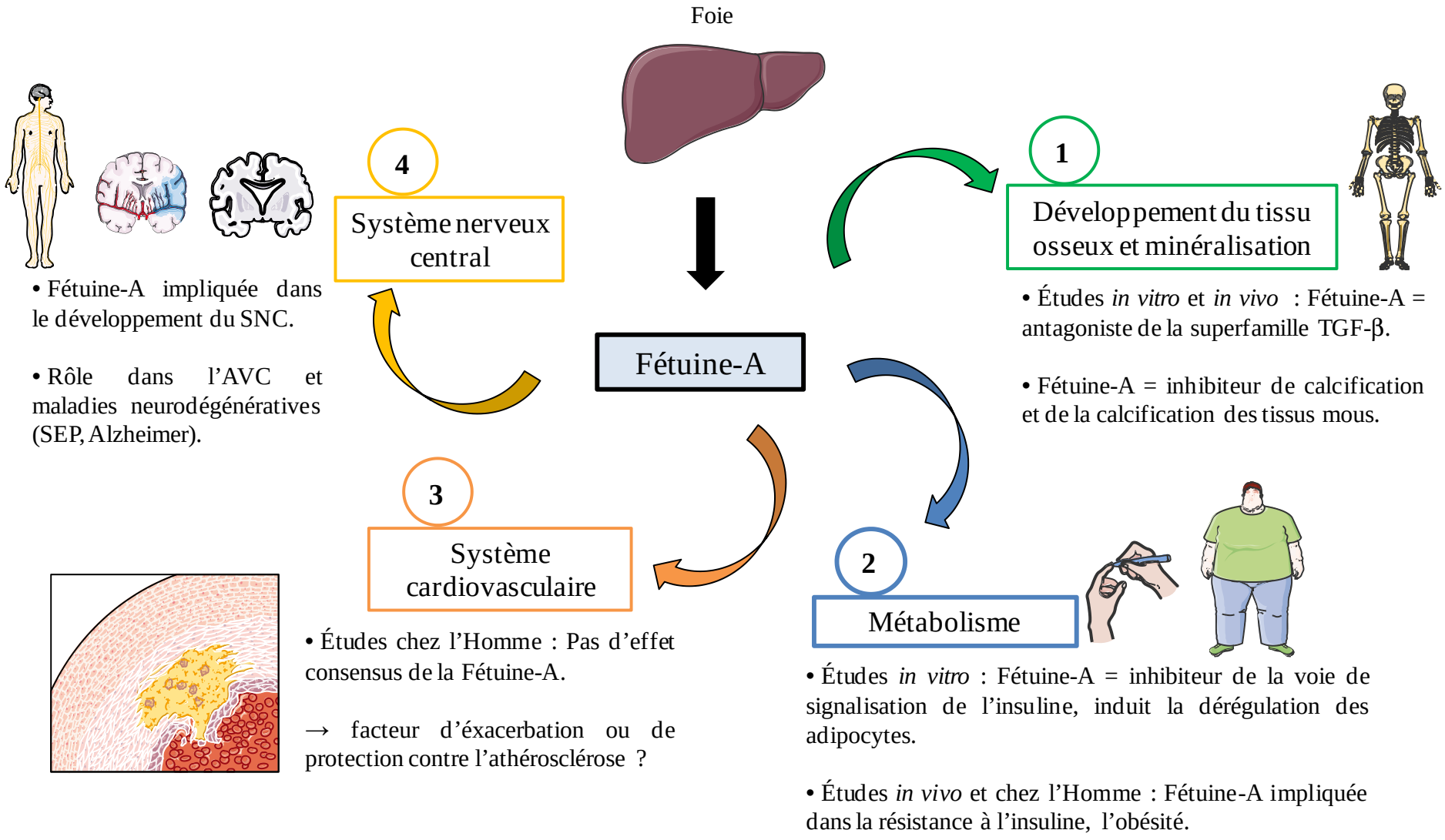


Figure 26 : Fonctions biologiques de la fétuine-A (adapté de [526]).

La protéine est impliquée dans le développement du tissu osseux et la minéralisation, le métabolisme, le système cardiovasculaire ainsi que le système nerveux central.

5.4 Fonctions biologiques des modifications post-traductionnelles de la fétuine-A

5.4.1 Fonctions biologiques de modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles représentent des caractéristiques importantes des protéines. Parmi celles-ci, les phosphorylations sont connues pour leur influence sur la régulation des fonctions biologiques des protéines, des voies de signalisation métaboliques, ainsi que pour leur rôle dans les systèmes intracellulaires de transduction du signal. Comme présenté en chapitre 4, les glycosylations représentent également des modifications post-traductionnelles courantes des protéines, puisque la moitié des protéines sont supposées être glycosylées [534]. La N-glycosylation est la modification la plus courante pour les protéines du sérum. La O-glycosylation est moins fréquente pour les protéines du sérum. Les résidus carbohydratés et les chaînes d'oligosaccharides peuvent intervenir dans divers processus biologiques, comme le maintien de la conformation des protéines, leur protection contre les protéases, le contrôle des épitopes actifs et l'antigénicité, la coagulation sanguine, l'embryogénèse et le développement [535]. En particulier, les acides sialiques représentent les résidus carbohydratés les plus courants dans la terminaison des structures glycanniques des glycoprotéines. Ils contribuent donc de façon importante à la charge et à l'activité des protéines. La désialylation peut en effet entraîner des altérations de la structure et de la fonction des glycoprotéines [536], affecter les intéractions inter-protéiques [537], perturber l'adhésion cellulaire dépendante de l'intégrine [538], ou affecter la reconnaissance immunitaire [539]. Dans le cas des glycoprotéines circulantes, la perte des acides sialiques peut accélérer la dégradation des protéines par les cellules hépatiques, à cause de la liaison aux récepteurs aux asialoglycoprotéines [540].

5.4.2 Modifications post-traductionnelles de la fétuine-A et pathologies

Les modifications post-traductionnelles de la fétuine-A influent sur les propriétés biologiques de la protéine. Dès 1989, l'influence de la phosphorylation de la fétuine a été explicitée chez le rat, la fétuine non phosphorylée ne possédant plus la capacité d'inhiber l'activité du récepteur à l'insuline [541]. Par ailleurs, la phosphorylation de la fétuine-A est un critère majeur dans la formation des complexes avec les minéraux et des calciprotéines (CPPs). Seule la protéine phosphorylée sur tous ses sites décrits intervient dans la formation des complexes liant la fétuine-A et les minéraux, dans le sérum de rats présentant une insuffisance rénale [500, 542]. Dans une étude *in vitro* sur une lignée de macrophages murins, la

phosphorylation de la fétuine-A est également un critère important, influençant la capacité d'apoptose des macrophages : les macrophages incubés avec des CPPs dont la fétuine-A est phosphorylée ont une apoptose accrue comparativement à ceux incubés avec des CPPs dont la fétuine-A est non phosphorylée [543]. La phosphorylation de la fétuine-A pourrait donc correspondre à un signal intracellulaire pour la mise en place de réponses à l'inflammation.

La sialylation de la fétuine-A est également un facteur essentiel influençant l'activité biologique de la protéine. Il a ainsi été démontré que la propriété d'adhésion cellulaire de la fétuine-A en présence d'ions bivalents était dépendante de la présence des acides sialiques terminaux de la protéine [544]. Dans un modèle décrivant la réponse inflammatoire de macrophages stimulés par du LPS, la fétuine-A intervient par une liaison avec la spermine, polyamine ubiquitaire anti-inflammatoire libérée aux sites de lésions et d'infections. Cette interaction provoque une diminution de la sécrétion de TNF-α, mais dépend de la présence des acides sialiques de la fétuine-A, l'asialofétuine-A ne se liant pas à la spermine [545]. Des modèles animaux étudiant l'inflammation systémique létale ont également montré un taux de survie variable à la suite de l'endotoxémie en fonction de l'administration de la fétuine-A dans sa forme sialylée ou désialylée. La survie est ainsi améliorée lorsque de la fétuine-A sialylée est injectée, mais l'asialofétuine-A ne montre pas cet effet protecteur [487]. Au niveau clinique, la sialylation de la protéine varie selon certaines conditions pathologiques. Une étude, s'appuyant sur une purification de la fétuine-A du sérum et la liaison de ses oligosaccharides à des lectines greffées sur des micropuces, a montré que la sialylation de la protéine était amoindrie chez des patients atteints d'un cancer du pancréas, en comparaison à la sialylation de la protéine du sérum de sujets sains [546]. Une autre étude sur le protéome de nouveaux-nés présentant des troubles de la croissance intra-utérine a mis en évidence l'absence d'acides sialiques liés aux O-glycosylations de la fétuine-A, chez ces nouveaux-nés [547]. Enfin, la fétuine-A de patients atteints d'arthrite rhumathoïde présente également une sialylation altérée de ses résidus N-glycanniques [490].

La fétuine-A est une glycoprotéine décrite pour ses nombreuses implications au cours de processus physiologiques, comme au cours du développement fœtal, mais aussi pathologiques. La fétuine-A est ainsi associée à une résistance à l'insuline, ou représente un marqueur de risque de l'athérosclérose. Le développement de méthodes analytiques telles que l'ELISA dirigé contre la protéine a également permis de valider son rôle en tant que biomarqueur d'efficacité de traitement contre la sclérose en plaque. Par ailleurs, l'importance des modifications post-traductionnelles de la fétuine-A dans l'établissement de ses fonctions biologiques est soulignée par l'altération de ces modifications dans certaines conditions pathologiques.

La fétuine-A est décrite comme un facteur protecteur dans des conditions inflammatoires, cependant son rôle dans la mise en place ou la régulation de l'inflammation allergique n'est pas connu à ce jour.

OBJECTIFS

Identifier des biomarqueurs d'efficacité des traitements d'ITA représente un enjeu majeur. En effet, ces marqueurs favoriseraient le suivi thérapeutique des patients ou représenteraient des outils décisionnels pour la sélection des patients les plus à même de répondre favorablement au traitement. Dans ce dernier cas, on parle de biomarqueurs prédictifs, et ceux-ci peuvent être recherchés dans différents types de milieux biologiques tels que l'air exhalé, les lavages nasaux, le sang, l'urine… Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur la recherche et la caractérisation de marqueurs sanguins, car l'ITA module de nombreux paramètres immunologiques dans le sang.

Le premier objectif a été de caractériser un candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie allergénique, identifié par la méthode de protéomique quantitative de 2D-DIGE. Cette approche a en effet permis d'analyser les sera, prélevés avant traitement, de patients allergiques aux pollens de graminées et ayant suivi 4 mois d'ITA. Spécifiquement, le candidat biomarqueur identifié correspond à différentes protéoformes comprises dans le sérum, dont les abondances sériques varient entre les groupes de patients. Une première partie a donc consisté à caractériser les modifications post-traductionnelles présentes sur la protéine, grâce à sa purification à partir de sérum, ainsi que son analyse consécutive en spectrométrie de masse. La mise en œuvre d'une approche protéomique en « label free » MS a ensuite permis de montrer que des peptides sialylés de la protéine candidate sont différentiellement exprimés parmi les groupes de patients.

Le deuxième objectif s'est porté sur l'étude de l'implication de la protéine candidate au cours de l'inflammation allergique. En particulier, les effets sur la polarisation des DCs de la forme native ainsi que d'une forme désialylée de la protéine ont été comparés, mettant en évidence le rôle de ces modifications post-traductionnelles dans le développement de l'inflammation allergique. De plus, la fonction de la protéine candidate a été examinée dans des modèles murins, au cours duquel un asthme allergique est induit, tandis que l'expression de la protéine candidate est réprimée. Les résultats observés confirment un rôle de cette protéine dans l'allergie mais suggèrent fortement que les variations de séquence entre les homologues de la protéine influencent ses fonctions au cours de l'allergie.

Enfin, le dernier objectif a été de valider les candidats biomarqueurs prédictifs identifiés dans d'autres études cliniques. La même approche de protéomique a été menée, en analysant en « label free » MS les sera provenant de larges cohortes cliniques, incluant des patients traités pour l'allergie aux pollens de graminées ou aux acariens. Dans ces études, les

peptides candidats biomarqueurs ont montré une expression indépendante du traitement et de la réponse à celui-ci. Ces résultats soulignent la difficulté de validation de tels candidats marqueurs, ainsi que l'importance de la nature des échantillons, de la méthode d'évaluation de l'efficacité clinique, voire de la conception même des études, pour mettre en œuvre les étapes de découverte et/ou de validation de candidats biomarqueurs protéiques, prédictifs de l'efficacité de l'ITA.

RESULTATS

1. Article : La Fétuine-A est un candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie au pollen de graminées

Cette étude s'est d'abord concentrée sur l'identification de marqueurs protéiques prédictifs de l'efficacité de l'ITA, c'est-à-dire différentiellement exprimés avant le traitement, chez des patients allergiques aux pollens de graminées répondant positivement au traitement d'immunothérapie. Pour cela, une analyse protéomique par 2D-DIGE a été réalisée, à partir d'échantillons de sérum prélevés à des patients allergiques aux pollens de graminées, avant qu'ils ne soient traités pendant 4 mois d'ITA. Les symptômes des patients sont mesurés au cours de challenges allergéniques réalisés en chambre d'exposition, ce qui permet de suivre leur évolution au cours de l'ITA. Dans ce cadre, des protéines ont été identifiées, dont l'expression est associée à l'efficacité clinique. En particulier à l'issue des analyses 2D-DIGE et LC-MS, une protéine, la fétuine-A, est différentiellement exprimée entre les groupes de patients traités par ITA. La fétuine-A est résolue sur les gels 2D sous la forme d'un train de spots ; les variants acides de la protéine sont plus abondants dans le sérum des patients répondeurs, tandis qu'un variant basique est plus fortement exprimé dans le sérum des patients non répondeurs. L'abondance sérique de ces variants acides est corrélée avec l'amélioration clinique à l'issue du traitement, dans le groupe des patients traités avec le comprimé actif uniquement.

Une analyse par spectrométrie de masse de la fétuine-A purifiée a permis de mettre en évidence différentes modifications post-traductionnelles portées par la protéine. Ainsi, la fétuine-A comporte certains résidus phosphorylés, ainsi que des motifs de N- et de O-glycosylations, dont les sialylations terminales sont variables. La sialylation est par ailleurs partiellement responsable du nombre de variants protéiques observés en DIGE. Des peptides O-glycosylés de la protéine, portant de deux à quatre acides sialiques, ont également été mis en évidence. Suite à cette caractérisation de la protéine, une deuxième analyse protéomique de l'ensemble du protéome a été entreprise par LC-MS/MS sans marquage, sur les échantillons de l'étude clinique précédemment étudiés en 2D-DIGE. Cette approche a permis de mettre en lumière les différences d'expression des peptides O-glycosylés de fétuine-A en fonction de la réponse au traitement. En particulier, un peptide modifié de la fétuine-A, comprenant deux motifs de O-glycosylation portant chacun deux acides sialiques terminaux, est plus abondant dans le sérum des patients actifs répondeurs par rapport aux patients actifs non répondeurs.

Son abondance sérique est associée au bénéfice clinique constaté en fin de traitement, dans le groupe des patients traités par le comprimé actif. Ces deux approches protéomiques permettent de considérer les variants de fétuine-A O-glycosylés et sialylés comme des candidats biomarqueurs prédictifs d'une réponse positive au traitement d'ITA.

L'implication fonctionnelle de la fétuine-A au cours de l'inflammation allergique a été examinée, dans des modèles cellulaires. *In vitro* chez l'Homme, la fétuine-A est à l'origine d'un effet synergique avec le LPS, entraînant une réponse pro-Th2 accrue des DCs dérivées de monocytes. L'engagement du récepteur TLR4 semble être plus marquée lorsque la protéine est présentée aux cellules sous sa forme native, que lorsqu'elle est privée de ses acides sialiques terminaux à la suite d'un traitement par la neuraminidase. Ces résultats ont été confirmés dans un autre système, impliquant une lignée cellulaire rapportrice de l'activation de TLR4. Le rôle de la fétuine-A au cours de l'inflammation allergique a également été étudié dans un modèle murin d'asthme allergique, incluant des souris rendues déficitaires en fétuine-A par administrations répétées d'une séquence d'ARN interférant. Les souris sensibilisées pour lesquelles l'expression de la fétuine-A est réprimée montrent une exacerbation de la réponse inflammatoire, caractérisée par l'augmentation de l'hyperréactivité bronchique et de la production de cytokines Th2. Ces résultats *a priori* contradictoires obtenus entre les modèles fonctionnels humains et murins peuvent néanmoins s'expliquer par une faible homologie entre les séquences de la protéine chez l'Homme et chez la souris. De plus, une caractérisation par LC-MS/MS de la fétuine-A contenue dans le sérum murin a souligné des différences dans les modifications post-traductionnelles par rapport à celles des protéoformes du sérum humain, notamment dans les motifs de O-glycosylations.

Les O-glycopeptides sialylés de fétuine-A représentent d'intéressants candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'immunothérapie allergénique. La validation de ces candidats sur de plus larges cohortes cliniques représente une étape décisive pour envisager le développement d'un test compagnon basé sur l'abondance sérique de ces peptides. Idéalement, définir un seuil d'abondance de biomarqueurs prédictifs permettrait d'affiner la sélection des patients, pour lesquels les chances d'amélioration clinique seraient les meilleures à la suite d'une ITA.

Sialylated glycoforms of FetA in the blood of allergic patients predict their likelihood to benefit from allergen immunotherapy

Caillot N. [1], Bouley J. [1], Jain K. [1], Mariano S. [1], Chenau J. [1], Luce S. [1], Horiot S. [1], Beauvallet C. [2], Devillier P. [3], Chollet-Martin S. [4], Kellenberger C. [5], Lombardi V. [1], Nony E. [1], Chabre H. [1], Batard T. [1], Baron-Bodo V. [1] & Moingeon P. [1]

[1] Research and Pharmaceutical Development, Stallergenes SA, Antony, France

[2] INRA, UMR 1313 GABI, Centre de recherche de Jouy-en-Josas, Jouy-En-Josas, France

[3] UPRES EA 220 & Clinical Research Department, Foch Hospital, Suresnes, France

[4] INSERM, UMR 996, Paris-Sud University, Châtenay-Malabry, France

[5] CNRS, UMR 6098, AFMB, Marseille, France

Correspondence : Philippe Moingeon, Research and Pharmaceutical Development, Stallergenes SA, 6 rue Alexis de Tocqueville, 92160 Antony, France, Tel : + 33 1 55 59 25 20, Fax : + 33 1 55 59 21 02, e-mail : pmoingeon@stallergenes.fr

Declaration of sources of funding: This study was funded by Stallergenes. Several co-authors were or are currently employed by Stallergenes (NC, JB, KJ, SM, JC, SH, VL, EN, HC, TB, VB-B, PM)

Abstract

With the aim to identify biomarkers predicting clinical efficacy of allergen immunotherapy, we carried out a comparative proteomic analysis of pre-treatment sera from 82 grass-pollen allergic patients receiving immunotherapy for 4 months. Patients with high levels of O-glycosylated sialylated Fetuin-A (FetA) isoforms, were more likely to exhibit a decrease in rhinoconjunctivitis symptoms during allergen immunotherapy. Sialylated FetA, but not the desialylated form, synergizes with LPS to engage TLR4 receptors, thereby enhancing T_H2 inflammatory responses to grass pollen or house dust mite allergens. *In vivo* silencing of the FetA gene in BALB/c mice resulted in a dramatic upregulation of airway hyperresponsiveness, as well as lung resistance, following allergic sensitization to ovalbumin. Together, our results demonstrate that FetA plays either an amplification or inhibitory role in allergic inflammation, depending upon post-translational modifications of the molecule, and sialylated glycoforms are plausible biomarkers to predict grass pollen immunotherapy efficacy.

Abbreviations

AIT: Allergen Immunotherapy

AR, ANR: Active (Non) Responders

ARTSS : Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score

DC: Dendritic Cells

FetA: Fetuin-A

LC: Liquid Chromatography

MS: Mass Spectrometry

PR, PNR: Placebo (Non) Responders

Reg : Regulatory

TLR4 : Toll-Like Receptor 4

Allergen immunotherapy (AIT) performed *via* the subcutaneous or sublingual routes is currently established as a safe and efficacious treatment for type I IgE-dependent respiratory allergies, with a disease modifying effect [1-3]. Patients' eligibility to immunotherapy is currently based on documented IgE reactivity to specific allergens on the basis of the *in vitro* and *in vivo* testing, on the severity of their symptoms and their responsiveness to symptomatic treatments. Patient selection would greatly benefit from the identification of biomarker [4,5] allowing to predict the clinical outcome of AIT.

Most investigations related to the quest for biomarkers of efficacy have so far relied on the paradigm that AIT acts by shifting allergen-specific $CD4^+$ T-cells responses from a T_H2 to a T_H1/regulatory T-cell (Treg) pattern [6]. Thus, clinically efficacious AIT has been related to the induction of allergen-specific regulatory T cells, together with IgG1 or IgG4 antibody responses, encompassing high affinity blocking antibodies competing with IgE for allergen binding [7-9]. Recently, we documented that AIT clinical efficacy was correlated with molecular signatures in peripheral blood reflecting the induction of monocyte-derived regulatory DCs with a concomitant down-regulation of DC2 cells [10]. Also, patients with severe rhinoconjunctivitis symptoms, high basophil responsiveness to allergens [11], and elevated allergenic-specific IgE titers [12-14] appear more likely to benefit from AIT. As of today however, no predictive marker of AIT efficacy has been firmly established [15].

Herein, we searched for biomarkers of sublingual AIT clinical efficacy in sera from 82 grass pollen allergic patients included in a double-blind placebo controlled study, performed in an exposure challenge chamber [16]. Using comparative proteomics, we provide evidence of an increased O-linked sialylation of FetA in sera collected before treatment from patients exhibiting clinical responses. We demonstrate that O-glycosylated sialylated FetA, but not its desialylated counterpart (termed AsialoFetA), enhances TLR4-mediated allergic inflammation.

Online Methods

Clinical samples from VO56.07A pollen chamber study

Details on the clinical study have been published elsewhere [16]. Briefly, eighty-nine grass pollen allergic patients were randomized 1:1 to receive once daily for 4 months either a grass pollen (n=42) or placebo (n=40) tablet through the sublingual route. Patients were exposed to grass pollen grains in an exposure chamber (Allergy center in Vienna West, Austria), before treatment as well as after 1 week and 1, 2, and 4 months of treatment [16]. Clinical responses were evaluated following allergen challenge in each individual patient as percentages of improvement in Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Scores (ARTSSs). The median percentage of ARTSS improvement in the active group after treatment was used as a threshold to identify clinical responders, with patients exhibiting a higher ARTSS improvement (≥ 43.9%) considered as responders, and those with a lower improvement as non-responders. Based on the median percentage, 4 patient subgroups were defined, including active responders (AR, n = 21), active non responders (ANR, n = 21), placebo responders (PR, n = 7), and placebo non responders (PNR, n = 33).

2D gel-based proteomics

Serum samples (340 µL each) were processed using a human Multiple Affinity Removal System (MARS) Human 6 (Hu-6HC column, 10 x 100 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) and an Ultimate 3000 HPLC apparatus (Thermo scientific, Waltham, USA). Flow-through proteins were collected and concentrated according to the manufacturer's instructions. Following depletion, samples were stored at –80°C until analysis. The run-to-run reproducibility of depletion was confirmed by chromatography and SDS-PAGE analyses under reducing conditions, using 4-12% NuPAGE gels (Thermo scientific).

Samples were then precipitated using a 2D clean-up kit according to GE Healthcare's protocol (Fairfield, USA), solubilized in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 30 mM Tris pH 8.8 (all obtained from Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the Bradford assay (BioRad, Hercules, USA) and 50 µg of depleted serum proteins were labeled with 400 pmol of either Cy2 (internal standard), Cy3, or Cy5 dyes (GE Healthcare), as described in the instruction manual. A dye-swapping scheme was used to preclude any specific dye-labeling artefact. The Cy2-labeled

internal standard was obtained by pooling equal amounts (25 µg) of proteins from all 82 patients' sera. Protein samples labeled with Cy2, Cy3, and Cy5 dyes were then mixed and diluted with rehydration buffer pH 4-7, containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 100 mM DTT and 0.5% IPG, under a final volume of 450 µL. Proteins (150 µg) were then applied to 24-cm-long immobilized pH 4–7 gradient strips (GE Healthcare) via the passive rehydration technique for 15 h and isoelectric focusing (IEF) was performed using an IPGPhor 3 electrophoresis unit (GE Healthcare) cooled to 18 °C for a total of 74 kVh. Strips were then equilibrated in urea-containing buffer, and placed on top of pre-cast SDS-12.5% polyacrylamide gels (GE Healthcare). SDS-PAGE was carried out at 0.5 W for 1 h followed by 1 W for 16 h (Ettan DALT Twelve Electrophoresis System, GE Healthcare). DiGE gels were scanned using an Ettan DiGE Imager (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Differentially expressed spots were determined by image analysis with the SameSpots program (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) and selected for automatic spot picking (EXquest^{TM} Spot Cutter, BioRad). Preparative gels stained with Sypro Ruby (Thermo scientific) were used for spot picking and protein identification by tandem mass spectrometry (MS/MS).

Identification of protein spots by tandem mass spectrometry

Gel plugs were digested with trypsin (from porcine pancreas, T6567, Sigma-Aldrich) and peptides were separated by reversed-phase chromatography using an Ultimate 3000 RS-nanoLC system (Thermo scientific). Peptides were injected and trapped on an Acclaim® PepMap100 column (100 µm x 2 cm; C_{18}, 5 µm particles and pore size at 100 Å, Thermo scientific), followed by separation using a C_{18} column (Acclaim® PepMap RSLC 75 µm ID, 15 cm, 2 µm particles, and pore size at 100 Å, Thermo Scientific). The nanoLC system was coupled to a high-resolution maXis 4G ESI-Qq-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). NanoLC-MS/MS data were analyzed using an in-house Mascot server (Matrix Science Ltd, London, UK) or PEAKS program (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) to search public databases, such as the UniprotKB/TrEMBL and nonredundant National Center for Biotechnology Information (nrNCBI) databases, assuming tryptic digestion. Precursor mass and fragment mass were searched with initial mass tolerance of 8 ppm and 0.05 Da, respectively. The search included fixed modification of carbamidomethyl (CAM) cysteine. The minimal peptide length was set to 6 amino acids, with

only one miscleavage allowed. Peptide identifications were accepted when established with a probability ≥ 95%, as specified by Mascot or PEAKS softwares.

Label-free mass spectrometry-based proteomics

Fifty micrograms of depleted serum proteins were solubilised in a buffer containing 8 M urea and 75 mM Tris pH 8.5, reduced and alkylated with 20 mM DTT and 50 mM iodoacetamide, respectively, and digested with trypsin (1:25 w/w, 37°C, overnight). Peptides were then acidified with 2.5% formic acid (FA) and analyzed by LC-MS or LC-MS/MS using the Ultimate 3000 RSLC system (Thermo scientific) coupled to the maXis 4G ESI-Qq-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics). Five micrograms of tryptic peptides were injected on an Acquity C_{18} BEH130 column (10 mm ID, 10 cm, 1.7 µm particles, Waters, Milford, USA) equilibrated at 40°C with 95% solvent A (0.15% FA) and 5% solvent B (100% ACN, 0.15% FA) at a flow rate of 0.4 mL/min. Peptide separation was performed at a flow rate of 0.4 mL/min with a linear gradient obtained using 5 to 40% solvent B over 30 min. Ion intensities recorded in LC-MS data were analyzed using the Progenesis LC-MS v4.1 software (Nonlinear Dynamics) to provide reliable measurements of peptide abundance across samples. Lock mass calibration was performed and peptide detection was performed with peptide intensity > 1000, peptide abundance > 2000 and peptide charge between 2+ and 12+. Data were then normalized by the "normalize to all features" method and differentially represented peptides between the four groups of samples obtained from ARs, ANRs, PRs and PNRs were identified. LC-MS/MS data were analyzed using an in-house Mascot server against the Swiss-Prot database, taxonomy *Homo sapiens*, assuming tryptic or semi-tryptic digestion, as described above.

Characterization of human FetA and AsialoFetA

FetA was purified out of pooled sera obtained from AB^+ individuals (Lonza, Walkersville, USA), diluted 1/10 v/v in PBS 1X. Affinity chromatography was performed using a FetA-specific murine monoclonal antibody (clone 162919, R&D Systems, Minneapolis, USA), coupled to a 5 mL Hitrap affinity column pre-equilibrated in binding buffer (PBS 1X pH 7.4). After loading samples at a flow rate of 0.8 mL/min, the column was washed with 8 volumes of binding buffer until the optical density (OD_{214}) dropped below 5% of its maximum value.

FetA was eluted by running 7 volumes of 50 mM Glycin-HCl pH 3 at a flow rate of 1 mL/min, followed by neutralization with 1 M Tris-HCl pH 9. Subsequently, samples were diafiltered and concentrated using an Amicon ultra-15 mL membrane with a cutoff of 10 kDa (Millipore, Billerica, USA), prior to SDS-PAGE (4-12% NuPAGE gel, Thermo scientific) and Western blotting analysis, using an anti-FetA antibody (R&D Systems) and an anti-mouse sheep IgG-peroxidase antibody (Sigma-Aldrich) for revealing.

For desialylation, 31.2 µg of native purified FetA were mixed with 10 µL of 5X Reaction Buffer and 1 µL of α-(2→3,6,8,9)-Neuraminidase (EDEGLY kit, Sigma-Aldrich), to reach a final enzymatic activity of 0.109 U/mL. The mixture was incubated overnight at 37°C, and complete desialylation was confirmed by SDS-PAGE (4-12% NuPAGE gel, Thermo scientific) and MS characterization. AsialoFetA samples were run on Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions. Levels of endotoxin in FetA and AsialoFetA samples, controlled by Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermo Scientific) were always below 0.2 EU/mg protein.

Measurements of the average mass (Mav) of intact purified FetA or AsialoFetA were performed on a maXis ESI-Qq-TOF mass spectrometer coupled to an Ultimate 3000 RSLC system (Thermo Scientific). Proteins were denatured and reduced in a buffer containing 8 M urea, 75 mM Tris pH 8.5, 20 mM DTT for 20 min and acidified by 2.5% FA. Protein samples were then desalted and concentrated for 4 min onto a Acquity C4 BEH300 column (10 mm ID, 10 cm, 1.7 µm particles, Waters) equilibrated at 70°C with 95% solvent A (0.15% FA) and 5% solvent B (100% ACN, 0.15% FA) at a flow rate of 0.4 mL/min. Proteins were eluted directly into the mass spectrometer with a linear gradient from 5 to 60% solvent B over 30 min. Mass spectra were deconvoluted using MaxEnt software, and the precise Mav of proteins was determined with the Data Analysis software (Bruker Daltonics).

The presence of post-translational modifications (PTMs) was determined on purified FetA or AsialoFetA by nanoLC-MS/MS, as described above. Purified proteins were solubilized in a buffer containing 8 M urea, 75 mM Tris pH 8.5 and 5 mM TCEP. Proteins were then alkylated with 10 mM iodoacetamide (IAA) for 20 min and digested with trypsin in-solution (1:50 w/w) for 3 h at 37°C in presence of 0.02% ProteaseMax surfactant (Promega, Madison, USA). Subsequently, 2.5% FA was added to the mixture to quench enzymatic activity and peptides were stored at -80°C until analysis. Peptide samples were then spun at 18,000 g and

run on a C18 column (Acclaim® PepMap RSLC 75 µm ID, 25 cm, 2 µm particles, and pore size at 100 Å, Thermo Scientific). N- and O-glycopeptides were manually characterized, based on the presence of glycan-specific oxonium ion fragments, using the Data Analysis software.

Enrichment and characterization of murine FetA

Fifty micrograms of anti-murine FetA monoclonal antibody (clone DY1563, R&D Systems) were covalently linked to magnetic beads (Dynabeads M-280 tosylactivated, Thermo scientific), to obtain 125 µL of IgG-coupled bead solution. Forty microliters of this solution was added to 250 µL of sera from BALB/c mice diluted in PBS (1:1, v/v). Samples were incubated for 2 hours, washed twice with PBS, and proteins were then eluted with a 50% ACN, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution. FetA immunoprecipitates were dried by vacuum centrifugation, and resuspended in 40 µL of 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0. Following reduction with 5 µL of 45 mM DTT at 60°C for 30 min, and alkylation with 8 µL of 100 mM IAA at room temperature for 45 min, samples were incubated overnight at 37°C with 1 µg trypsin. After quenching with FA (0.5% v/v final), samples were injected into a C18 column (Acclaim® PepMap RSLC 75 µm ID, 25 cm, 2 µm particles, and pore size at 100 Å, Thermo Scientific). The column effluent was directly introduced into the electrospray source of an ImpactHD ESI-Qq-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics). Characterization of the glycosylation pattern was performed manually using the Data Analysis software version 4.2 (Bruker Daltonics).

Immunomodulatory properties of FetA and AsialoFetA

Monocytes isolated from PBMCs of healthy volunteers with CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were cultured in presence of GM-CSF and IL-4 (Miltenyi Biotec) for 6 days. DC differentiation was confirmed by flow cytometry based on the loss of CD14 expression and the upregulation of CD1a and CD11c surface expression. Immature monocyte-derived DCs (MoDCs) or MoDCs polarized towards a DC2 pattern were cultured in serum free medium [17] (CellGro DC medium, Cellgenix, Freiburg, Germany) for 24 hours, in presence of either medium alone, or medium supplemented with either ultra-pure LPS-EB from *Escherichia coli* (100 ng/mL, Invivogen, Toulouse, France), native purified

FetA (10 µg/mL), AsialoFetA (10 µg/mL), a grass pollen or *Dermatophagoïdes farinae* allergen extract (20 or 1 µg/mL, respectively, Stallergenes SA, Antony, France), or combinations of these reagents. The TLR4 pathway was blocked by adding LPS from *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS, 10 µg/mL, Invivogen) to MoDCs for 30 minutes. Supernatants were harvested to measure cytokine production (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF-α) using a Luminex assay (Milliplex, Millipore). Surface expression of maturation markers (CD80, CD83 and CD86, BD Biosciences, San Jose, US) was assessed on DCs by flow cytometry. Total RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Venlo, Netherlands) was isolated to evaluate the expression of C1QA, CD163, GATA3, MX1, NMES1, and PADI2 genes by real-time PCR [10] using β-actin as an endogenous reference gene (the following primers, all from Thermo scientific, were used: Hs00381122_m1, Hs00174705_m1, Hs00231122_m1, Hs00895608_m1, Hs00260902_m1 and Hs00247108_m1, respectively). In DC/T-cell coculture experiments, DCs, treated as described above, were cultured with magnetically sorted allogeneic naive $CD4^+$ T cells (naive CD4 isolation kit II, Miltenyi Biotec), in a 1:10 DC/T-cell ratio. T cell purity was confirmed to be greater than 95% based on CD3, CD4, and CD45RA surface expression assessed by flow cytometry. Coculture supernatants were harvested after 5 days to measure cytokines (IL-5, IL-9, IL-13) production using a Luminex assay (Milliplex, Millipore).

In parallel, *in vivo* silencing of the FetA gene was performed in female BALB/c mice (6 to 8 weeks of age, Charles River, Wilmington, US) to assess its impact on allergic inflammation. International levels of ethical standards were applied for animal handling, and animal protocols were validated by an internal ethics committee. Mice were sensitized using 10 µg OVA adsorbed on 2 mg $Al(OH)_3$, followed by a 20-minute aerosol challenge at day 7 and 8 delivering 50 µg OVA by mouse. FetA silencing was achieved by 4 intravenous injections of specific vivo-morpholino (5'-AAGACCAGGGACTTCATGGTTGCTC-3', Gene Tools, Philomath, USA), using 40 nM one day prior to sensitization and 25 nM at day 2, 5 and 7. A standard irrelevant vivo-morpholino sequence was used in parallel for mock treatment in control animals [18]. Measurement of airway hyperresponsiveness (AHR) was performed by whole body plethysmography using a Buxco apparatus (Wilmington, USA) after exposure to increasing doses (from 0 to 50 mg/mL) of nebulized Methacholine [19], and determination of enhanced pause (Penh) values [19]. Bronchial resistance was measured using a FinePointe RC system (Buxco), and mice were subsequently sacrificed. Serum FetA levels were assessed by ELISA (R&D Systems) on retro-orbital bleeds at 4 time points during sensitization and after

sacrifice. Splenocytes were stimulated with either 100 µg/mL of OVA or medium. After 72 hours of incubation at 37°C and 5% CO_2, cell supernatants were collected to measure IL-5, IL-10, IL-13 and IFN-γ concentrations using a Luminex assay (Millipore).

Surface Plasmon Resonance (Biacore) study

We performed Surface Plasmon Resonance experiments on a Biacore T200 instrument (GE Healthcare) using HC200m (CM5 type) sensor chips according to manufacturer's instructions. Briefly, the HC200m sensor chip was used for direct immobilization by the amine-coupling method of proteins, to reach 1500 Response Unit (RU) and 2500 RU of immobilized FetA and AsialoFetA, respectively. Blocking a reference flow cell was accomplished with activation followed by an immediate quenching, as for the active flow cell. A running buffer containing Hepes 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM and Tween (0.05% v/v) was used for the whole experiments. The flow rate was between 10 and 30 µl/min. LPS was injected at various concentrations (13 – 122 µM) over the FetA- or AsialoFetA-immobilized and reference flow cells. Additional studies were performed with 100 µM of LPS, or a combination of 100 µM of LPS and 300 nM of FetA or AsialoFetA over the 660 RU - TLR4-MD-2- immobilized CM5 sensor chip. The sensorgrams represent the response of the active flow cell subtracted from that of the reference cell.

Statistical analyses

Data are expressed as means ± SEMs. Statistical differences between groups were assessed by using either 2-tailed nonparametric Mann-Whitney tests, or 2-tailed parametric t-tests and the Friedman test for multiple comparisons. Correlation analyses were performed by using the parametric Pearson test. p-values ≤ 0.05 were considered as significant. Statistical and graphic analyses were performed with the GraphPrism 5 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA). Differences in protein expression or in peptide abundance, observed by DiGE analysis or label-free MS experiments, respectively, were assessed for statistical significance by using an ANOVA p-value threshold of 0.01. A fold-change filter (≥ 1.5) was used in those analyses. Statistics on proteomic data were performed with the Samespots or Progenesis LC-MS programs from Nonlinear Dynamics.

Results

FetA protein spots are differentially expressed in pre-treatment sera of clinical responders

To identify predictive markers capable of predicting the clinical response to AIT, we compared proteomes profiles in pre-treatment sera obtained from clinical responder and non-responder patients (Supplementary Fig.1). Patients were stratified in 4 subgroups (see Material and Method section), including active responders (ARs; n = 21), active non-responders (ANRs; n = 21), placebo responders (PRs; n = 7), and placebo non-responders (PNRs; n = 33). Serum samples obtained in these various subgroups were retrospectively compared in a blind manner by using 2D-DiGE (**Fig. 1, a**), after immunoaffinity depletion of the 6 quantitatively most represented proteins to enhance the detection of less abundant proteins. Major differentially expressed protein spots were cut out from 2D-gels, digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry (MS). From these analyses, differences in levels of expression of the FetA protein (also termed Alpha-2-HS-glycoprotein, AHSG) were observed in sera from AR and ANR patients (**Fig. 1, b and** Supplementary Table E1). More specifically, four proteoforms (spots 419, 428, 439 and 448) were highly expressed in pre-treatment sera of AR individuals relative to other patient subsets ($p \leq 0.01$ or 0.001, **Fig. 1, c**), whereas expression of spot 469 was rather decreased ($p \leq 0.05$). When plotted against percentages of symptom score improvements for each individual patient, the abundance of acidic spots, *i.e.* spots 428, 439 and 448, was significantly correlated (with Pearson correlation of $r = 0.45$, $p = 0.0034$) with clinical benefit in patients from the active group (**Fig. 1, d**), whereas no such correlation was observed in placebo-treated patients (**Fig. 1, e-f**). Interestingly, we did not observe any variation in seric levels of FetA acidic forms in the course of AIT, suggesting that patterns of FetA glycosylation and sialylation are tightly regulated as a characteristic of each individual patient (Supplementary Fig. 2). Collectively, our results indicate that FetA variants with acidic pI values are highly expressed in pre-treatment sera of AR patients, suggesting a potential contribution of post translational modifications of FetA in those observed differences.

O-glycosylated sialylated FetA is highly abundant in pretreatment sera of clinical responders

FetA is a heterodimeric protein containing a 282 amino acid A chain and a 27 amino acid B chain held together by a single disulfide bond. The protein carries both N-linked and O-linked oligosaccharide chains decorated with sialic acid residues (Swiss-Prot accession number P02765) [20]. To investigate post-translational modifications occurring on FetA, we purified the molecule out of sera from healthy human individuals by affinity chromatography (Supplementary Fig. 3). Measurements of intact masses by MS pointed out to the presence within FetA of multiple proteoforms with sialic acids (N-acetylneuraminic Acid, noted Neu5Ac) branched on glycan moieties (**Fig. 2, a** and Supplementary Fig. 4**, a**), consistent with a previous report in the literature [20]. The MS analysis further revealed that the FetA B chain can be decorated as well with up to two Neu5Ac (Supplementary Fig. 4**, b-d)**. Since Neu5Ac is anionic, it can contribute to the migration of the molecule toward acidic pI during 2D-DiGE, as observed in samples from AR donors. The latter assumption was documented by MS analysis (Supplementary Fig. 5), following removal of sialic acids on purified FetA with α-(2→3,6,8,9)-Neuraminidase, which dramatically changed the 2D-gel profile with a complete disappearance of the spot charge-train (**Fig. 2, b**, to be compared to **Fig. 1, b**). Taken together, we conclude that the shift of FetA molecular forms toward acidic variants observed in AR patients was related to sialylation levels, with highly sialylated FetA proteoforms being more abundant in pre-treatment sera of clinical responders.

Clinical samples were subsequently analyzed to confirm the potential predictive value of sialylated FetA glycoforms in relationship with AIT efficacy. Tryptic glycopeptides from purified FetA were first assigned based on accurate precursor and fragment ion mass measurements. For example, glycopeptides containing sialylated glycans yielded b-type ions corresponding to neutral masses of 291 Da and 273 Da (corresponding to Neu5Ac and dehydrated Neu5Ac, respectively). Two N-glycosylation sites were also identified, involving residues N_{156} and N_{176}, with the most abundant N-glycan moiety on each asparagine bearing two sialic acid residues ($Hex5HexNAc_4Neu5Ac_2$, Supplementary Table E2). Strikingly, we observed O-glycopeptides from the A chain, harboring two mucin-type glycans branched on threonine residues T_{256} and T_{270}, each sialylated with one or two Neu5Acs, thus yielding variants with 2, 3 or 4 Neu5Acs termed O-glycopeptide 1 (OG1), O-glycopeptide 2 (OG2), and O-glycopeptide 3 (OG3), respectively (**Fig. 2, c** and Supplementary Table E2). In

addition, the B chain also encompasses both non-, mono- and di-sialylated forms with Neu5Ac attached to serine residue S_{346} **(**Supplementary Fig. 4**, b-d)**.

A label-free MS analysis was next developed to assess FetA glycopeptides in the various subgroups of patients (Supplementary Table E2). O-glycopeptides containing (HexNAc-Hex)1-core branched with two Neu5Acs were significantly increased in pre-treatment sera from AR individuals (*i.e.* OG2, $p \leq 0.01$ and OG3, $p \leq 0.001$, **Fig. 3, a** and disialylated B chain $p \leq 0.01$, Supplementary Table E2). Importantly, levels of the tetrasialylated glycopeptide OG3 (and to a lower extent of trisialylated glycopeptide OG2) significantly correlated with clinical benefit in patients from the active group (with Pearson correlation of $r = 0.47$, $p = 0.0002$, **Fig. 3, b**), whereas no such correlations were observed in placebo-treated patients (**Fig. 3, c-d**). Total seric FetA concentrations irrespective of the isoform were not correlated with clinical benefit (data not shown), confirming that the predictive value is strictly linked to O-glycosylated sialylated FetA.

Taken together, patients with high levels of sialylated FetA in pre-treatment sera are more likely to be clinical responders, in direct link with numbers of Neu5Ac moieties attached to O-linked oligosaccharide chains of the protein.

FetA, but not AsialoFetA, synergizes with LPS in a TLR4-dependent pathway

FetA has a bivalent role in the context of inflammation, as it can be both protective against lethal systemic inflammation [21], or act as an anti-inflammatory acute-phase protein [22-23]. Specifically, FetA has been shown to promote inflammation as an endogenous TLR4 ligand leading to lipid-induced insulin resistance [18-24]. As of today, however, no specific link between FetA and allergic inflammation has been reported. In this context, we examined whether FetA could contribute to allergic inflammation in a TLR4-dependent manner, and what could be the potential role of FetA sialylation in this regard. In a first set of experiments, functional interactions between FetA and TLR4 were examined using HEK-293 cells expressing human TLR4 and an inducible secreted embryonic alkaline phosphatase as a reporter gene. Those cells were stimulated with either LPS, native putified FetA at various doses, or a mixture of both. As shown in **Fig. 4, a**, FetA alone had no effect, whereas a combination of FetA and LPS acted in synergy to activate TLR4 in a dose-dependent manner. Since dendritic cells (DCs) are critical for T cell priming against allergens [25-27], and with

the notion that bacterial LPS is an important sensitization cofactor [28,29], we subsequently examined the capacity of FetA to synergize with LPS and/or allergens, to impact DC polarization. We first incubated MoDCs generated in serum-free medium with either LPS, FetA at various doses, or a combination of both. Stimulation of MoDCs with a mixture of LPS and FetA enhances the expression of CD83 and CD86, and to a lower extent of CD80 co-stimulatory molecules (**Fig. 4, b**), whereas LPS or FetA alone have no effect. Similarly, a combination of the two molecules increases as well the secretion of IL-6, IL-10, IL-12 p-70 and TNF-α cytokines, when compared with LPS alone, whereas FetA in itself has no activity (**Fig. 4, c**). Noteworthy, the synergy observed between LPS and FetA was totally abrogated by adding the TLR4 antagonist LPS-RS [30] (**Fig. 4, b-c**), establishing that FetA and LPS synergize to activate the TLR4 pathway [31-32].

We subsequently compared natural and desialylated FetA (*i.e.* Neuraminidase-treated FetA, termed AsialoFetA) for their capacity to synergize with LPS in those human cellular assays. LC-MS experiments verified the complete experimental desialylation of FetA (Supplementary Fig. 5). The synergistic modulation of TLR4 activity by LPS was substantially decreased when hTLR4 HEK-293 cells were costimulated with AsialoFetA as opposed to FetA (**Fig. 4, d**). Consistent with this observation, no synergistic effect was observed between LPS and AsialofetA on MoDCs, both in terms of the induction of co-stimulatory molecules (**Fig. 4, e**) and cytokine secretion (**Fig. 4, f**). Importantly, no stimulation of MoDCs was observed in presence of α-(2→3,6,8,9)-Neuraminidase, desialylation buffer or free sialic acids (data not shown). Finally, we investigated by Surface Plasmon Resonance the potential physical interactions between TLR4-MD2, LPS, and FetA or AsialoFetA. Both FetA and AsialoFetA were confirmed to bind to LPS, with a slightly stronger association observed with AsialoFetA compared to FetA (**Fig. 4, g-h**). In contrast, neither FetA nor AsialoFetA bound to TLR4-MD2 or enhanced its physical interaction with LPS (Supplementary Fig. 6**, a-c**). Collectively, our results establish the synergistic activation of the TLR4 pathway by LPS and FetA, with evidence for sialylation of the latter in this functional interaction.

FetA, but not AsialoFetA, enhances the pro-allergic features of type 2 MoDCs (DC2s)

Engagement of TLR4 is known to contribute to allergic inflammation, for example during concomitant exposure to allergens with endotoxins [33-36], or as a consequence of a functional mimicry of MD2 by the allergen [37]. We thus investigated the potential

contribution of FetA glycoforms to such TLR4-mediated allergic inflammation. Immature MoDCs were polarized towards a DC2 phenotype (*i.e.* capable to polarize naïve $CD4^+$ T cells towards IL-5 and IL-13 secreting T_H2 cells), using a mixture of TSLP, IL-25, IL-33 and low doses (*i.e.* 10 ng/mL) of LPS, in presence of 10 µg/mL FetA or AsialoFetA, respectively. A flow cytometry analysis revealed an up-regulation of CD83 and CD86 co-stimulatory markers in presence of FetA but not AsialoFetA (**Fig. 5, a**). Similarly, DC2 cells differentiated in presence of FetA secreted higher levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α (**Fig. 5, b**), when compared to AsialoFetA-treated DC2 cells. The latter observation was further confirmed when monitoring the expression of genes specifically associated with a DC2 polarization, such as PADI2, GATA3 and NMES1 (our unpublished data). Such DC2 marker genes were only overexpressed in presence of FetA, but not AsialoFetA (data not shown). Moreover, the expression of genes rather associated with DC1 or regulatory phenotypes, such as MX1 or C1QA, respectively [38], was highly down-regulated when DC2 cells were cultured in the presence of FetA, but not AsialoFetA (**Fig. 5, c**). In addition, following a stimulation of DC2 cells with a combination of aqueous allergen extracts and FetA or AsialoFetA, FetA synergized with a grass pollen extract to induce the secretion of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α cytokines (**Fig. 5, d**), whereas no such effect was observed with AsialoFetA. Similarly, DCs cultured with house dust mite (HDM) *Dermatophagoïdes farinae* (*D. far.*) allergen extract secreted higher amounts of IL-6, IL-10, and TNF-α in presence of FetA, whereas this synergy was not observed with AsialoFetA (**Fig. 5, e**). No clear influence of FetA or AsialoFetA was observed on IL-8 secretion, already very high in presence of *D. far.* allergen extract. Eventually, cocultures between DCs and naive $CD4^+$ T cells confirmed that FetA promotes T_H2 polarization since IL-5, IL-9 and IL-13 secretions by T cells at day 5 are enhanced in FetA-DC/$CD4^+$ T-cell cocultures (**Fig. 5, f**), in contrast with AsialoFetA-DC/$CD4^+$ T cells conditions. Collectively, those experiments establish that FetA can enhance the proallergic profile of DC2s in presence of natural allergens, in relationship with sialylation levels of the FetA molecule.

In vivo FetA silencing in BALB/c mice exacerbates OVA-induced allergic inflammation

To further investigate the implication of FetA in allergic inflammation, the FetA gene was inactivated in BALB/c mice sensitized with ovalbumin (OVA). To this aim, a group of animals received multiple intravenous injections of FetA-specific vivo-morpholino (**Fig. 6, a**),

whereas naïve (*i.e.* non sensitized) or sensitized mice and animals receiving an irrelevant morpholino were used as controls in those experiments. The efficacy of FetA silencing was confirmed by ELISA, with a 55.7 +/- 13.3 % (mean +/- SEM, n = 3) decrease in FetA seric concentrations at day 9 compared to pre-treatment values ($p \leq 0.05$), in animals receiving the FetA-specific vivo-morpholino. In contrast, levels of FetA remained stable over time in sera from naïve or mock-treated animals (**Fig. 6, b**). Surprisingly, FetA silencing resulted in exacerbated airway hyperresponsiveness (AHR) when compared with either naïve mice, untreated sensitized mice or OVA-sensitized animals receiving the control morpholino ($p \leq 0.0001$, **Fig. 6, c**). These results were further confirmed by invasive plethysmography, since animals in which FetA was silenced also exhibited a statistically significant increase ($p \leq 0.05$) in bronchial resistance compared to control animals (**Fig. 6, d**). In agreement with those results, the production of IL-5, IL-10 and IL-13 T_H2 cytokines was significantly ($p \leq 0.0001$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.01$, respectively) increased in splenocytes from FetA-silenced mice, when compared with control animals (**Fig. 6, e**). Importantly, murine FetA shares 59% amino acid identity with the human counterpart (Supplementary Fig. 7), and an extensive MS characterization of the molecules revealed major differences in patterns of O-glycosylation and sialylation. In particular, we identified O-glycopeptides, decorated with a glycan branched on the threonine residue T_{267}, not sialylated or bearing one or two N-glycolyl neuraminic acids (NeuGc), thus yielding variants without or with 1 or 2 NeuGcs termed O-glycopeptide 1 (OG1), O-glycopeptide 2 (OG2), and O-glycopeptide 3 (OG3), respectively (**Fig. 6, f**, to be compared to **Fig. 2, c)**. Taken together, our experiments highlight that a downregulation of the FetA gene results in an exacerbated murine allergic inflammation and revealed fundamental structural differences between the murine and human proteins.

Discussion

AIT is a well-established treatment for type I respiratory allergies, inducing a long-lasting reduction of symptoms in association with a down-regulation of allergen-specific T_H2 responses. As of today however, less than one third of eligible patients undertake AIT [39]. With patients commonly selected based on symptom severity, or high titers of allergen-specific IgEs [13], patient eligibility as well as compliance to treatment could be significantly improved by biological markers allowing to select before AIT those patients more likely to benefit from this treatment.

To address this issue, we performed a comparative proteomic analysis on pre-treatment serum samples obtained from 82 grass-pollen allergic patients included in a double-blind placebo-controlled clinical study performed in an allergen challenge chamber [16]. Symptom scoring of each individual patient before and after 4 months of sublingual AIT allowed to distinguish responders from non-responder patients. A statistically significant decrease in ARTSS was detected in the active group compared with the placebo group, as early as after 1 month, with up to 30% symptom improvement after 4 months [16]. Comparative analyses of serum proteomes by 2D-DiGE combined with LC-MS/MS established that FetA is differentially expressed in the sera of ARs relative to ANRs, PR or PNRs. Specifically, FetA resolves as multiple isoforms, with acidic isoforms being highly abundant in the sera of ARs. Consistent with the known presence of PTMs on FetA [20, 40], we confirmed that the presence of Neu5Acs present on glycan moieties is responsible for the shift towards acidic pI of FetA isoforms observed in sera from patients with clinical responses. A comprehensive MS characterization confirmed that FetA O-glycopeptides containing (HexNAc-Hex)1-core with Neu5Acs were differentially expressed in the sera of ARs relative to ANRs, with levels of tetrasialylated O-glycopeptide positively correlated ($p \leq 0.001$) with clinical improvement.

FetA is an abundant blood protein produced in the liver, with multiple known functions. It acts as a mineral carrier protein and thus contributes to regulation of osteogenesis and to the prevention of vascular calcification [41]. In this regard, low FetA levels have been associated with cardiovascular mortality [42, 43]. FetA is also known as an endogenous ligand for the insulin receptor, contributing to the establishment of metabolic disorders such as insulin resistance and dyslipidemia [44]. In various animal models of systemic inflammatory diseases, administration of FetA results in a dose-dependent and long-lasting anti-

inflammatory activity [45, 46]. The protein is considered either as a negative or positive acute phase protein, as its concentration can vary in response to infection and injury [47]. For example, patients suffering from rheumatoid arthritis [48] or chronic kidney disease [49] exhibit decreased levels of FetA, whereas in animal models, FetA levels are increased after cerebral ischemia [46]. Measurement of FetA concentration is already used as a diagnostic tool for diabetes or multiple sclerosis, and as a prognostic tool for cancer [50-53].

Whereas collectively these results are consistent with the notion that FetA may act either as a promoter or inhibitor of chronic inflammation, up to now no specific link had been made with FetA and T_H2-mediated allergic inflammation. FetA has been recently identified as a central adaptor molecule contributing to fatty acid-mediated inflammation through an engagement of TLR4 [18]. Importantly, with a growing evidence that allergen sensitization can potentially involve TLR4 activation [28, 29, 31, 32, 54, 55] and since DCs are instrumental for the induction of T_H2 immune responses [25, 27], we examined whether FetA could modulate the activation of DCs through TLR4. We established that FetA synergizes with LPS to activate TLR4, and promotes the differentiation of MoDCs into DC2s, increasing cytokine secretion as well as the down-regulation of genes associated with DC1 or DCregs. Further supporting a role of FetA in allergic sensitization, the latter was found to increase TLR4 engagement by grass pollen or HDM extracts, known to contain both allergens and endotoxins. Interestingly, this synergistic activation of the TLR4 pathway was lost with Neuraminidase-treated FetA, highlighting the key role of sialic acids branched on FetA in this pro-allergic cascade. This synergy between LPS and FetA, but not AsialoFetA, was also confirmed when using hTLR4 HEK-293 epithelial cells, although for unclear reasons we did not observe it when using primary epithelial cells from human bronchial tissues (data not shown). Surface Plasmon Resonance experiments confirmed that both FetA and AsialoFetA bind to LPS, without evidence in our hands for any direct binding to the TLR4-MD2 complex.

Whereas *in vitro* models establish that human FetA enhances pro-allergic inflammation, we observed unexpectedly that FetA-silencing in mice rather leads to an exacerbated allergic inflammation. Although the reason for this discrepancy is presently unclear, one potential explanation, in light of the impact of post-translational modifications on FetA functional properties, is that human and murine FetA molecules differ significantly. With only 59% homology with its human counterpart in the amino acid sequence (Supplementary Fig. 7), murine FetA lacks the sialylated O-glycans found in the human protein. This hypothesis that depending upon sialylation patterns, FetA could act either as a pro- or an anti-inflammatory molecule is consistent with the observation that FetA acts as a protective factor in several

murine models of chronic or systemic inflammations [9]. A reduced O- and N-linked sialylation of FetA has been observed in neonates with intrauterine growth restriction [56] and in patients suffering from rheumatoid arthritis [57], respectively. How sialylation could influence the involvement of FetA in chronic inflammation is not understood yet. Nonetheless, the terminal β-galactoside moiety of FetA appears essential to the interaction with TLR4 and for binding to lipids leading to insulin resistance [18].

Despite the new evidence presented in this study that FetA can contribute to allergic inflammation, and that the latter is influenced by sialylation, it is still unclear why sialylated forms of FetA can be used to predict the likelihood of clinical benefit to AIT. A high degree of FetA sialylation could reflect a higher susceptibility to allergen sensitization. Indeed patients with a higher FetA sialylation exhibit higher symptom severity before treatment, which is known to correlate with clinical improvement during AIT (Supplementary Fig. 8, **a-b**) [58]. One limitation concerning the utilization of FetA as a biomarker predictive of AIT efficacy is that this protein is ubiquitous and has a role in many inflammatory contexts. Thus, other pathologies distinct from allergy, may impact serum FetA O-glycopeptide levels, precluding its use as a predictive biomarker for AIT efficacy. Interestingly however, for all patients, we observed a remarkably stable level of FetA acidic variants (**Fig. 3, e**) over the 4 months of the study, irrespective of allergen exposure in the allergen chamber or in the course of AIT, suggesting a strong homeostatic control of FetA post-translational modifications.

Validation of FetA isoforms as candidate predictive biomarkers must be performed in larger clinical cohorts, in patients facing natural exposure, to either seasonal or perennial allergens, *e.g.* from house dust mites. In this regard, we have preliminary evidenced that a high level of FetA tetrasialylated O-glycopeptide in serum samples from patient undergoing AIT against HDM can be used to enhance differences in clinical scores between active and placebo groups (data not shown). We conclude that sialylated FetA should be considered as a valid candidate biomarker predictive of AIT efficacy.

References

1. Canonica, G.W*., et al.* Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organ J* **7**, 6 (2014).
2. Cox, L., Compalati, E., Kundig, T. & Larche, M. New directions in immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep* **13**, 178-195 (2013).
3. Eifan, A.O., Shamji, M.H. & Durham, S.R. Long-term clinical and immunological effects of allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11**, 586-593 (2011).
4. Senna, G., Calderon, M., Makatsori, M., Ridolo, E. & Passalacqua, G. An evidence-based appraisal of the surrogate markers of efficacy of allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11**, 375-380 (2011).
5. Shamji, M.H., Ljorring, C. & Wurtzen, P.A. Predictive biomarkers of clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy: how to proceed. *Immunotherapy* **5**, 203-206 (2013).
6. Akdis, C.A. & Akdis, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 18-27 (2011).
7. Baron-Bodo, V*., et al.* Heterogeneity of antibody responses among clinical responders during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy* **43**, 1362-1373 (2013).
8. Birkner, T*., et al.* Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy* **45**, 418-426 (1990).
9. Shamji, M.H*., et al.* Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy* **67**, 217-226 (2012).
10. Zimmer, A*., et al.* A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 1020-1030 (2012).
11. Ozdemir, S.K*., et al.* Reliability of basophil activation test using CD203c expression in diagnosis of pollen allergy. *Am J Rhinol Allergy* **25**, e225-231 (2011).
12. Ciprandi, G., Alesina, R. & De Amici, M. Serum specific IgE: biomarker for specific immunotherapy responsiveness? *Allergol Immunopathol (Madr)* **42**, 369-371 (2014).
13. Ciprandi, G. & Sivestri, M. Serum specific IgE: a biomarker of response to allergen immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* **24**, 35-39 (2014).
14. Fujimura, T*., et al.* Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin Immunol* **139**, 65-74 (2011).
15. Van Overtvelt, L*., et al.* Changes in basophil activation during grass-pollen sublingual immunotherapy do not correlate with clinical efficacy. *Allergy* **66**, 1530-1537 (2011).
16. Horak, F*., et al.* Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 471-477 (2009).
17. Hildenbrand, B*., et al.* IFN-y enhances T(H)1 polarisation of monocyte-derived dendritic cells matured with clinical-grade cytokines using serum-free conditions. *Anticancer Res* **28**, 1467-1476 (2008).
18. Pal, D*., et al.* Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* **18**, 1279-1285 (2012).
19. Razafindratsita, A*., et al.* Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 278-285 (2007).
20. Huang, J*., et al.* Glycomic analysis of high density lipoprotein shows a highly sialylated particle. *J Proteome Res* **13**, 681-691 (2014).
21. Li, W*., et al.* A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation. *PLoS One* **6**, e16945 (2011).
22. Wang, H*., et al.* Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophagedeactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14429-14434 (1998).

23. Ombrellino, M.*, et al.* Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock* **15**, 181-185 (2001).
24. Stefan, N. & Haring, H.U. Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nat Med* **19**, 394-395 (2013).
25. Hammad, H.*, et al.* Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* **207**, 2097-2111 (2010).
26. van Rijt, L.S.*, et al.* In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* **201**, 981-991 (2005).
27. Plantinga, M.*, et al.* Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* **38**, 322-335 (2013).
28. Barboza, R.*, et al.* Endotoxin Exposure during Sensitization to Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. *PLoS One* **8**, e67115 (2013).
29. Eisenbarth, S.C.*, et al.* Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* **196**, 1645-1651 (2002).
30. Coats, S.R., Pham, T.T., Bainbridge, B.W., Reife, R.A. & Darveau, R.P. MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize Escherichia coli lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. *J Immunol* **175**, 4490-4498 (2005).
31. Shalaby, K.H.*, et al.* Inhaled birch pollen extract induces airway hyperresponsiveness via oxidative stress but independently of pollen-intrinsic NADPH oxidase activity, or the TLR4-TRIF pathway. *J Immunol* **191**, 922-933 (2013).
32. Tan, A.M.*, et al.* TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen. *J Immunol* **184**, 3535-3544 (2010).
33. Kamijo, S.*, et al.* Cupressaceae pollen grains modulate dendritic cell response and exhibit IgE-inducing adjuvant activity in vivo. *J Immunol* **183**, 6087-6094 (2009).
34. Mittag, D.*, et al.* TLR ligands of ryegrass pollen microbial contaminants enhance Th1 and Th2 responses and decrease induction of Foxp3(hi) regulatory T cells. *Eur J Immunol* **43**, 723-733 (2013).
35. Li, D.Q.*, et al.* Short ragweed pollen triggers allergic inflammation through Toll-like receptor 4-dependent thymic stromal lymphopoietin/OX40 ligand/OX40 signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 1318-1325 (2011).
36. Hammad, H.*, et al.* House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* **15**, 410-416 (2009).
37. Trompette, A.*, et al.* Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* **457**, 585-588 (2009).
38. Zimmer, A.*, et al.* Identification of a new phenotype of tolerogenic human dendritic cells induced by fungal proteases from Aspergillus oryzae. *J Immunol* **186**, 3966-3976 (2011).
39. Weberschock, T.*, et al.* Use of specific immunotherapy--a survey of 15 164 employed persons in Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* **12**, 341-345 (2014).
40. Halim, A., Nilsson, J., Ruetschi, U., Hesse, C. & Larson, G. Human urinary glycoproteomics; attachment site specific analysis of N- and O-linked glycosylations by CID and ECD. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111 013649 (2012).
41. Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schafer, C. & Ketteler, M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* **108**, 1494-1509 (2011).
42. Ketteler, M.*, et al.* Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* **361**, 827-833 (2003).
43. Stenvinkel, P.*, et al.* Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int* **67**, 2383-2392 (2005).

44. Goustin, A.S., Derar, N. & Abou-Samra, A.B. Ahsg-fetuin blocks the metabolic arm of insulin action through its interaction with the 95-kD beta-subunit of the insulin receptor. *Cell Signal* **25**, 981-988 (2013).
45. Dziegielewska, K.M. & Andersen, N.A. The fetal glycoprotein, fetuin, counteracts ill-effects of the bacterial endotoxin, lipopolysaccharide, in pregnancy. *Biol Neonate* **74**, 372-375 (1998).
46. Wang, H.*, et al.* Peripheral administration of fetuin-A attenuates early cerebral ischemic injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 493-504 (2010).
47. Wang, H. & Sama, A.E. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Curr Mol Med* **12**, 625-633 (2012).
48. Sato, H.*, et al.* Decreased levels of circulating alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A (AHSG) in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med* **46**, 1685-1691 (2007).
49. Metry, G.*, et al.* Low serum fetuin-A concentration predicts poor outcome only in the presence of inflammation in prevalent haemodialysis patients. *Eur J Clin Invest* **38**, 804-811 (2008).
50. Mori, K., Emoto, M. & Inaba, M. Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* **5**, 124-146 (2011).
51. Harris, V.K.*, et al.* Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Mult Scler* **19**, 1462-1472 (2013).
52. Inoue, K.*, et al.* Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS One* **8**, e77118 (2013).
53. Petrik, V.*, et al.* Serum alpha 2-HS glycoprotein predicts survival in patients with glioblastoma. *Clin Chem* **54**, 713-722 (2008).
54. Beutler, B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 109-120 (2002).
55. Ullah, M.A.*, et al.* Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 440-450 (2014).
56. Karamessinis, P.M.*, et al.* Marked defects in the expression and glycosylation of alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction: proteomics screening and potential clinical implications. *Mol Cell Proteomics* **7**, 591-599 (2008).
57. Saroha, A., Kumar, S., Chatterjee, B.P. & Das, H.R. Jacalin bound plasma O-glycoproteome and reduced sialylation of alpha 2-HS glycoprotein (A2HSG) in rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* **7**, e46374 (2012).
58. Howarth, P., Malling, H.J., Molimard, M. & Devillier, P. Analysis of allergen immunotherapy studies shows increased clinical efficacy in highly symptomatic patients. *Allergy* **67**, 321-327 (2012).

FIGURE 1

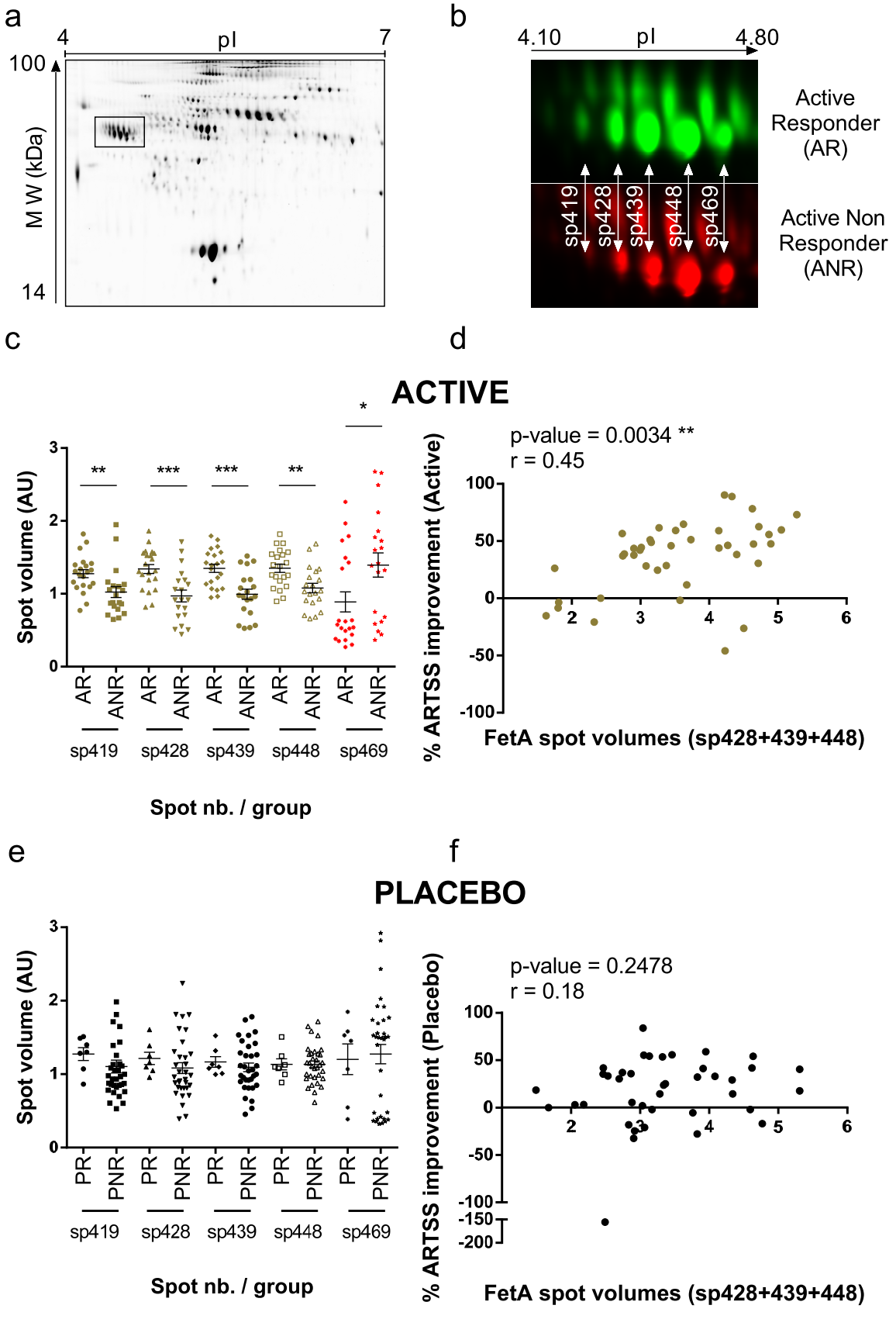
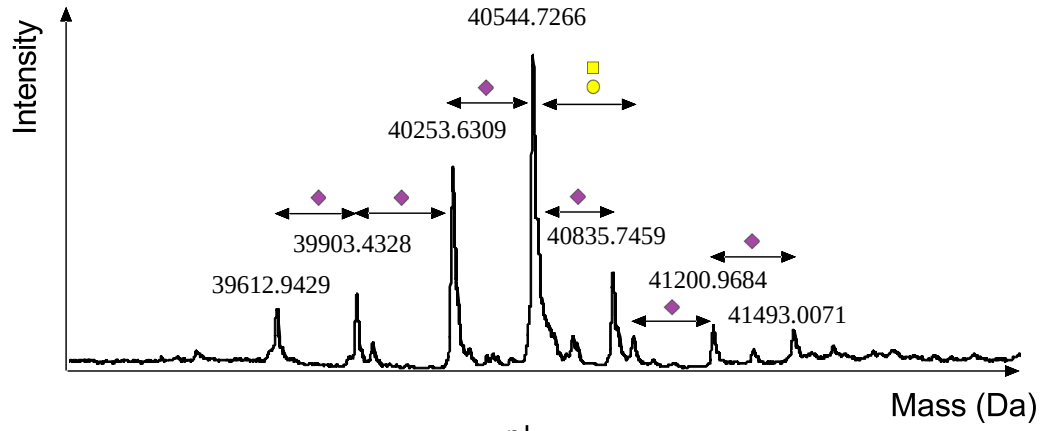
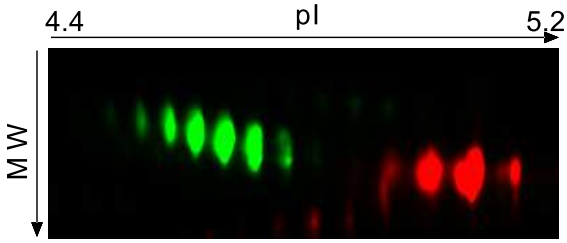

a
4
pI
7
100
M W (kDa)
14
b
4.10
pI
4.80
Active Responder (AR)
sp419
sp428
sp439
sp448
sp469
Active Non Responder (ANR)
c
d
ACTIVE
Spot volume (AU)
AR
ANR
sp419
sp428
sp439
sp448
sp469
Spot nb. / group
p-value = 0.0034 **
r = 0.45
% ARTSS improvement (Active)
FetA spot volumes (sp428+439+448)
e
f
PLACEBO
PR
PNR
p-value = 0.2478
r = 0.18
% ARTSS improvement (Placebo)

FIGURE 2

a



b



c

Peptide	Mass (M+H⁺) (Da)	Sialic acid (Neu5Ac)	Sequence / PTM
OG1	**8705.15** = 7392.7386 + (2 x 656.22)	**2**	LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR
OG2	**8996.26** = 7392.7386 + (656.22 + 947.32)	**3**	LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR
OG3	**9287.36** = 7392.7386 + (2 x 947.32)	**4**	LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR

FIGURE 3

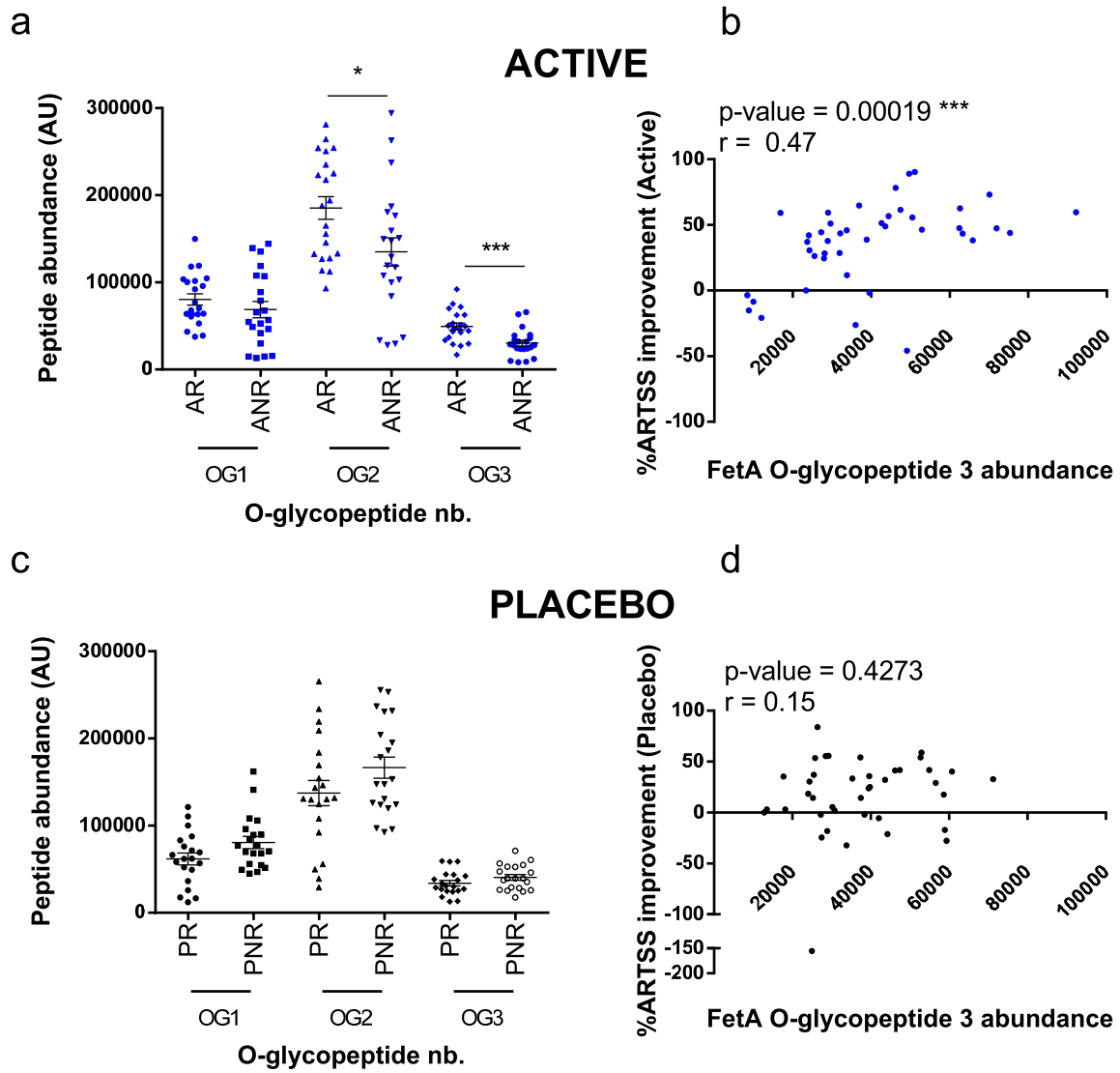

a
ACTIVE
Peptide abundance (AU)
300000
200000
100000
0
*
***
AR
ANR
AR
ANR
AR
ANR
OG1
OG2
OG3
O-glycopeptide nb.
b
p-value = 0.00019 ***
r = 0.47
%ARTSS improvement (Active)
100
50
0
-50
-100
20000
40000
60000
80000
100000
FetA O-glycopeptide 3 abundance
c
PLACEBO
Peptide abundance (AU)
300000
200000
100000
0
PR
PNR
PR
PNR
PR
PNR
OG1
OG2
OG3
O-glycopeptide nb.
d
p-value = 0.4273
r = 0.15
%ARTSS improvement (Placebo)
100
50
0
-50
-100
-150
-200
20000
40000
60000
80000
100000
FetA O-glycopeptide 3 abundance

FIGURE 4

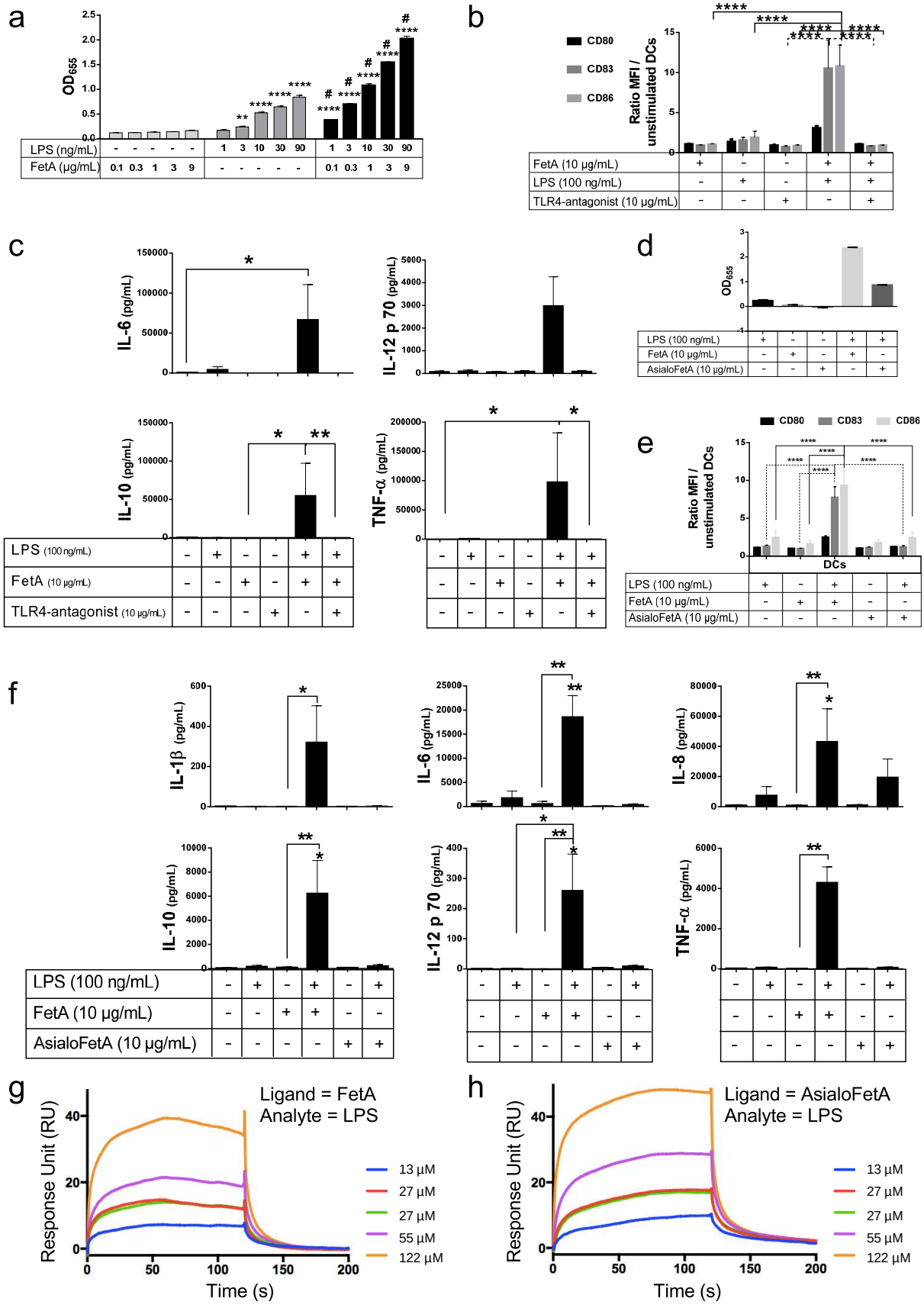

a
OD655
LPS (ng/mL)
FetA (µg/mL)
b
CD80
CD83
CD86
Ratio MFI / unstimulated DCs
FetA (10 µg/mL)
LPS (100 ng/mL)
TLR4-antagonist (10 µg/mL)
c
IL-6 (pg/mL)
IL-12 p 70 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
LPS (100 ng/mL)
FetA (10 µg/mL)
AsialoFetA (10 µg/mL)
d
OD655
e
DCs
f
IL-1β (pg/mL)
IL-8 (pg/mL)
g
Ligand = FetA
Analyte = LPS
Response Unit (RU)
Time (s)
13 µM
27 µM
27 µM
55 µM
122 µM
h
Ligand = AsialoFetA
Analyte = LPS

FIGURE 5

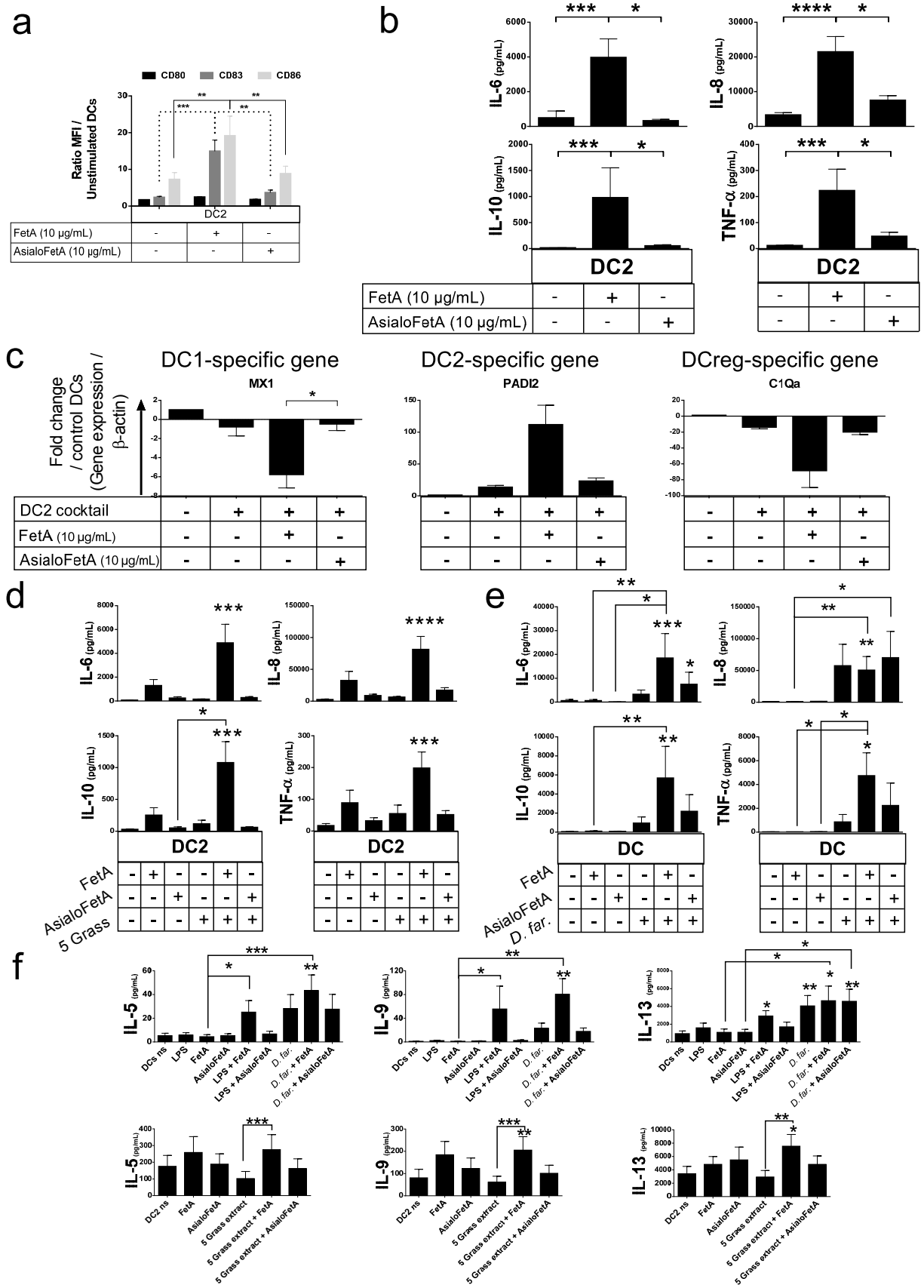

a
CD80
CD83
CD86
Ratio MFI / Unstimulated DCs
DC2
FetA (10 µg/mL)
AsialoFetA (10 µg/mL)
b
IL-6 (pg/mL)
IL-8 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
DC2
FetA (10 µg/mL)
AsialoFetA (10 µg/mL)
c
DC1-specific gene
DC2-specific gene
DCreg-specific gene
MX1
PADI2
C1Qa
Fold change / control DCs (Gene expression / β-actin)
DC2 cocktail
FetA (10 µg/mL)
AsialoFetA (10 µg/mL)
d
IL-6 (pg/mL)
IL-8 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
DC2
FetA
AsialoFetA
5 Grass
e
IL-6 (pg/mL)
IL-8 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
DC
FetA
AsialoFetA
D. far.
f
IL-5 (pg/mL)
IL-9 (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
DCs ns
LPS
FetA
AsialoFetA
LPS + FetA
LPS + AsialoFetA
D. far.
D. far. + FetA
D. far. + AsialoFetA
DC2 ns
5 Grass extract
5 Grass extract + FetA
5 Grass extract + AsialoFetA

FIGURE 6

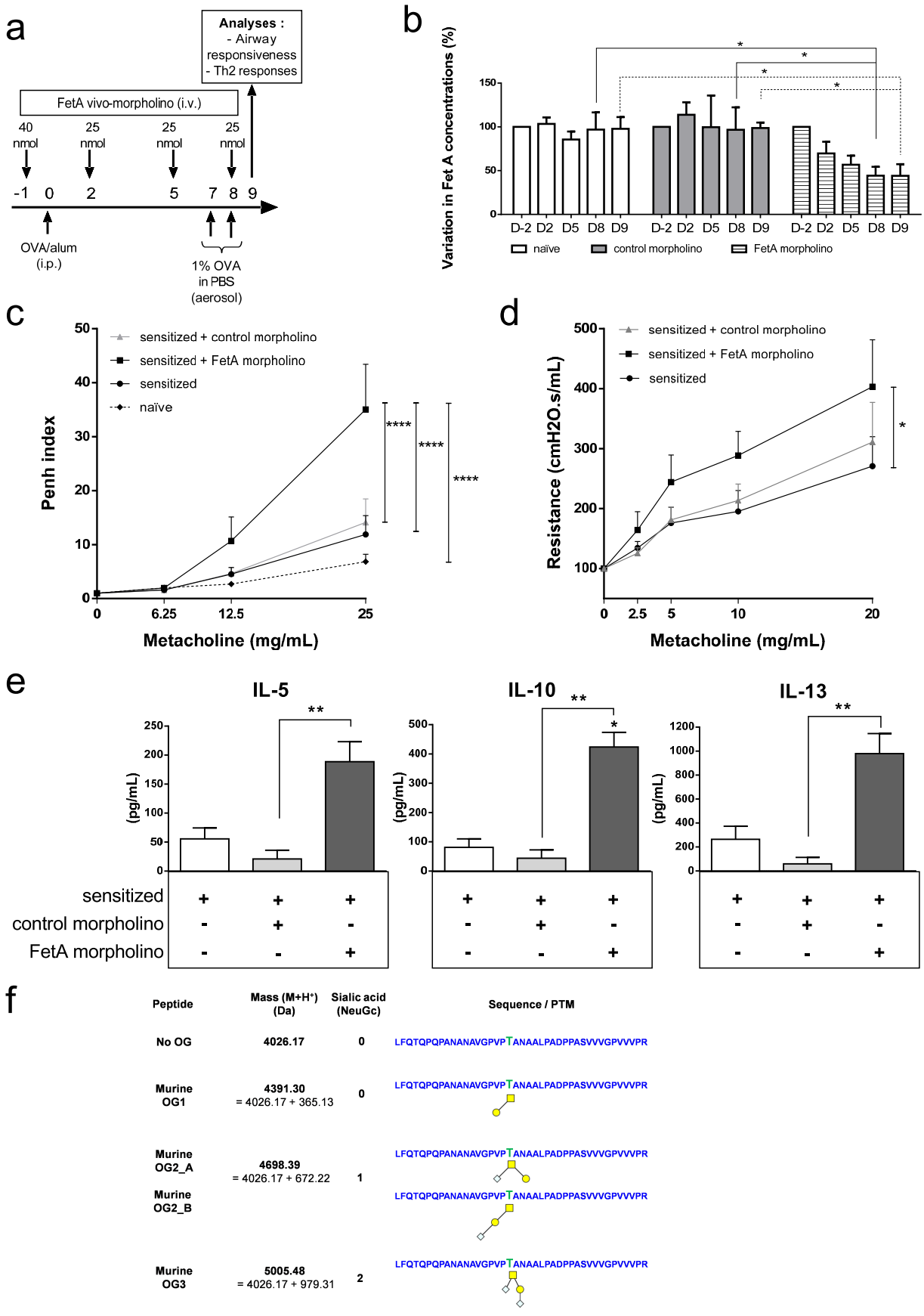

a
Analyses :
- Airway responsiveness
- Th2 responses
FetA vivo-morpholino (i.v.)
40 nmol
25 nmol
25 nmol
25 nmol
-1 0 2 5 7 8 9
OVA/alum (i.p.)
1% OVA in PBS (aerosol)
b
Variation in Fet A concentrations (%)
D-2 D2 D5 D8 D9 D-2 D2 D5 D8 D9 D-2 D2 D5 D8 D9
naïve
control morpholino
FetA morpholino
c
Penh index
sensitized + control morpholino
sensitized + FetA morpholino
sensitized
naïve
Metacholine (mg/mL)
d
Resistance (cmH2O.s/mL)
sensitized + control morpholino
sensitized + FetA morpholino
sensitized
Metacholine (mg/mL)
e
IL-5
IL-10
IL-13
(pg/mL)
sensitized
control morpholino
FetA morpholino
f
Peptide
Mass (M+H+) (Da)
Sialic acid (NeuGc)
Sequence / PTM
No OG
4026.17
0
LFQTQPQPANANAVGPVPTANAALPADPPASVVVGPVVVPR
Murine OG1
4391.30
= 4026.17 + 365.13
0
Murine OG2_A
Murine OG2_B
4698.39
= 4026.17 + 672.22
1
Murine OG3
5005.48
= 4026.17 + 979.31
2

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Levels of acidic forms of FetA in pre-treatment sera from grass-pollen allergic patients correlates with AIT clinical efficacy.

a) Representative 2D-gel image of a human serum from grass pollen allergic patients, with localization of FetA isoforms. b) Enlarged image of FetA proteoforms showing a shift of pI in sera from AR. Green and red spots are obtained from a Cy2- or a Cy3-labeled serum sample, respectively. Protein spot volumes are shown as mean ± SEM in active (c) and placebo (e) groups. p-values of less than 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***) are considered significant (Mann-Whitney test). Pearson correlations of acidic-protein spot volumes with percentages of ARTSS improvement in patients from active (d) and placebo (f) groups after 4 months of AIT (AR; n = 21, ANR; n = 20, PR; n = 7, PNR; n = 33).

FIGURE 2: FetA contains sialylated O-linked carbohydrate moieties.

a) Mass spectrometry analysis of FetA purified (A chain) from human serum. The most abundant sialylated-forms are indicated on the deconvoluted mass spectrum. Purple diamond = N-acetylneuraminic acid (sialic acid). b) FetA (green) and AsialoFetA (red) protein spots documenting differences in pI values. c) Identification of sialic acid–containing O-glycopeptides by LC-MS/MS. Yellow square = N-acetylglucosamine; yellow circle = hexose; purple diamond = N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac).

FIGURE 3: Levels of O-linked sialylated FetA in pre-treatment sera from grass-pollen allergic patients correlate with AIT clinical efficacy.

O-glycopeptide abundances are shown as means ± SEM in active (a) and placebo (c) groups. p-values of less than 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***) are considered significant (Mann-Whitney test). Pearson correlation of O-glycopeptide 3 abundance with percentages of ARTSS improvement in patients from active (b) and placebo (d) groups after 4 months of AIT (AR; n = 21, ANR; n = 21, PR; n = 7, PNR; n = 33).

FIGURE 4: FetA, but not AsialoFetA, synergizes with LPS to engage the TLR4 pathway.

Human TLR4 activation in hTLR4 HEK-293 reporting cells stimulated with either LPS, FetA, AsialoFetA or a combination of those molecules (a, d). * and # indicate a statistically

significant difference versus FetA-stimulated or LPS-stimulated hTLR4 HEK-293 cells respectively (Two- way ANOVA test with Tukey's correction). The expression of CD80, CD83 and CD86 co-stimulatory markers (b, e) and the cytokine production in DCs were assessed using flow cytometry and a Luminex assay, respectively (c, f). Data are shown as means ± SEM (n = 4) in panels b and c and ± SEM (n = 6) in panels e anf f. p-value of less than 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***) are considered significant (Friedman test). g) Results obtained from Surface Plasmon Resonance analyses for label-free investigation of the interaction between injected LPS and FetA (g) or AsialoFetA (h), both immobilized at 750 µM on CM5 sensorchips. Sensorgrams are represented as response units at specified times (s).

FIGURE 5: FetA, but not AsialoFetA, enhances specific DC2 pro-inflammatory characteristics.

The expression of CD80, CD83 and CD86 co-stimulatory molecules (a) and the cytokine production (b) in DC2 cells cultured in serum-free medium in presence of FetA or AsialoFetA were assessed tested using flow cytometry and a Luminex assay, respectively. c) Expression of DC1, DC2 or DCreg-related genes evaluated by qPCR. Data are shown as means ± SEM (n = 4) (a-c). p-values of less than 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***) were considered significant (Friedman test). The cytokine production in DC2 cells (d) or DCs (e) cultured in presence of FetA or AsialoFetA (both at 10 µg/mL) and a 5-grass pollen (20 µg/mL, d) extract or a *D. far.* (1 µg/mL, e) extract was assessed using a Luminex assay. Results are presented as means ± SEM for n = 6 (out of 12 and 6 donors tested in d and e, respectively). f) Cytokine production by $CD4^+$ T cells cultured with DCs or DC2s was measured using a Luminex assay (means ± SEM on n = 7 and 6 donors, respectively). A p-value ≤ 0.05 is considered significant (Friedman test).

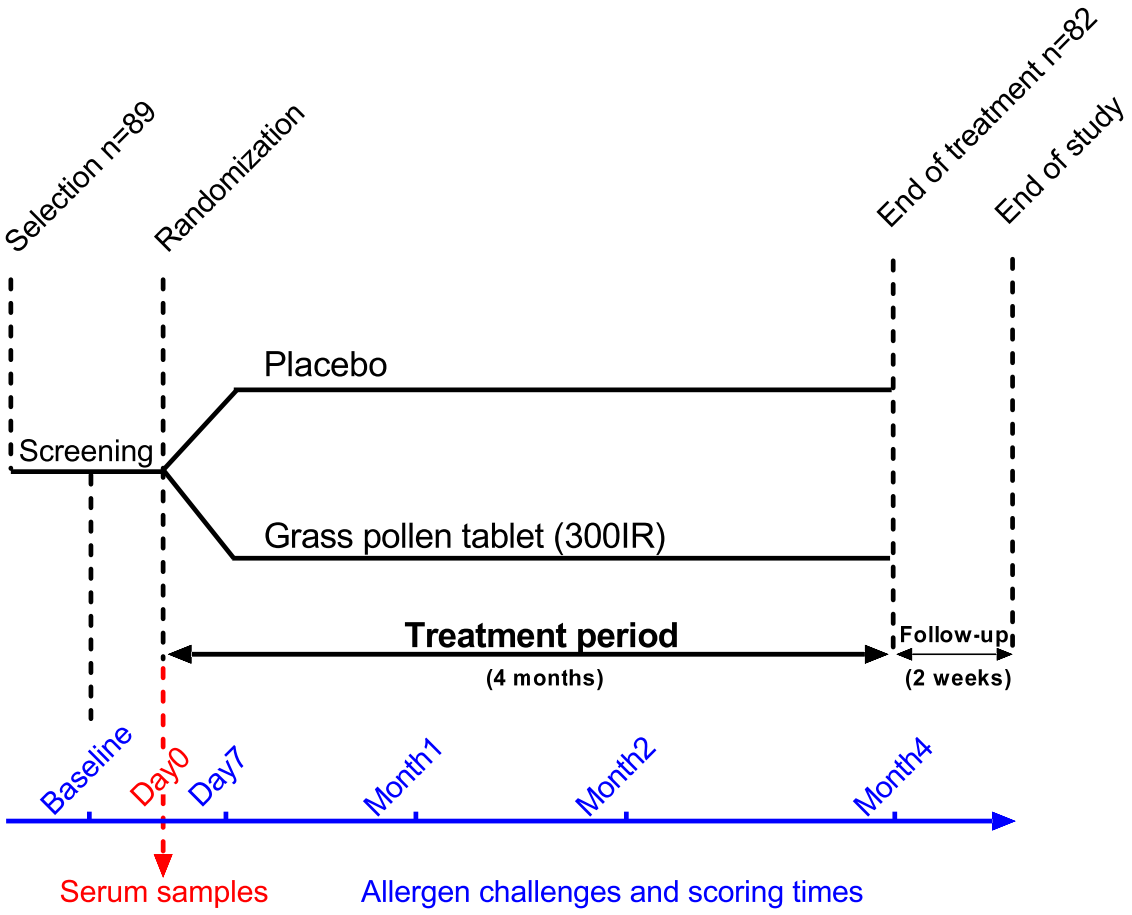
FIGURE 6: *In vivo* silencing of FetA enhances OVA-induced allergic inflammation in BALB/c mice.

a) Experimental design of FetA gene silencing in the OVA-induced model of allergic asthma in BALB/c mice, sensitized by an *i.p.* injection of 10 µg OVA with 2 mg alum (day 0) followed by two aerosol challenges with OVA at days 7 and 8. FetA silencing was achieved by *i.v.* injections of FetA-specific vivo-morpholino at days 1, 2, 5 and 8. Control groups included OVA-sensitized mice treated with a mock vivo-morpholino, untreated OVA-sensitized mice and naïve (unsensitized) mice. b) FetA concentrations were monitored 2 days before (D-2) and throughout the 9-day sensitization protocol by ELISA (Mean percentages vs.

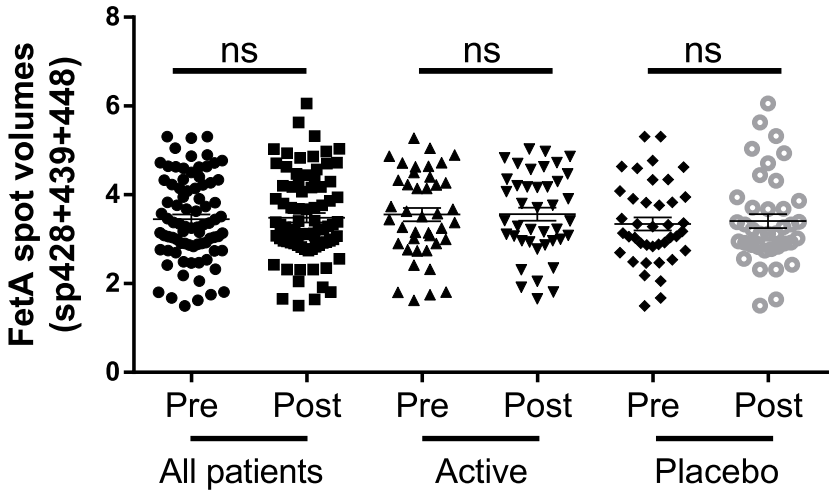
control (D-2), n = 3 mice per group). c) AHR in response to Methacholine was measured by whole body plethysmography at day 9 and expressed as a Penh index (Mean values ± SEM, n = 6 mice per group). d) Lung resistance was assessed by invasive plethysmography following Methacholine challenges (Mean values ± SEM, n = 6 mice per group). In panels c and d, p-values of less than 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) or 0.0001 (****) are considered significant (2-way ANOVA). e) Secretion of IL-5, IL-10 and IL-13 cytokines was assessed by a Luminex assay in splenocytes recovered from OVA-sensitized animals, untreated or treated with control or FetA-specific morpholinos, after 3 days of *in vitro* restimulation with OVA (Mean values ± SEM values, n = 6 mice per group). p-values of less than 0.05 (*), 0.01 (**) are considered significant (Kruskall-Wallis test). Data presented in panels c, d and e are representative of two independent experiments. f) Identification of three sialic acid–containing O-glycopeptides of murine FetA, distinct from the ones present on the human FetA sequence, by LC-MS/MS. Yellow square = N-acetylglucosamine; yellow circle = hexose; white diamond = N-glycolylneuraminic acid (NeuGc, present in most mammals but not humans).

SUPPLEMENTARY FIGURES

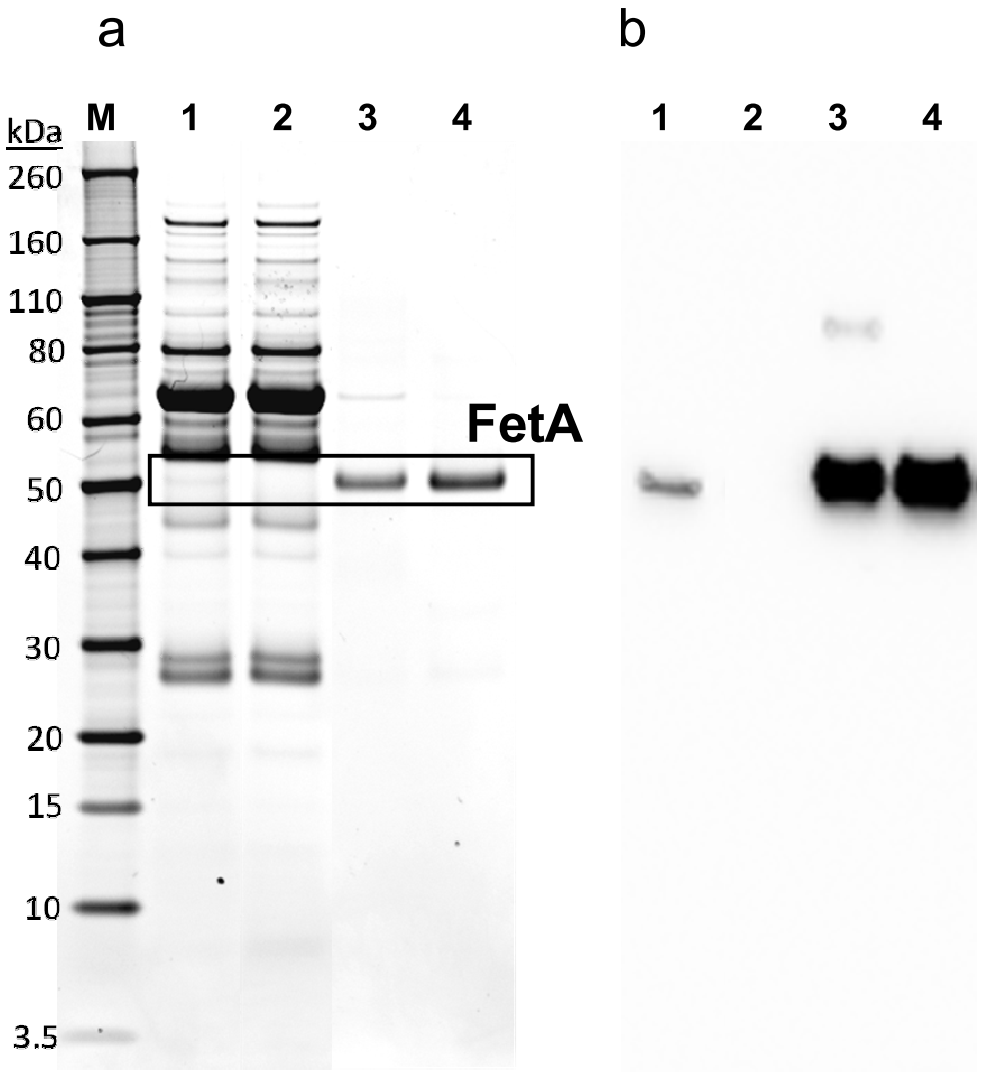
SUPPL FIGURE 1



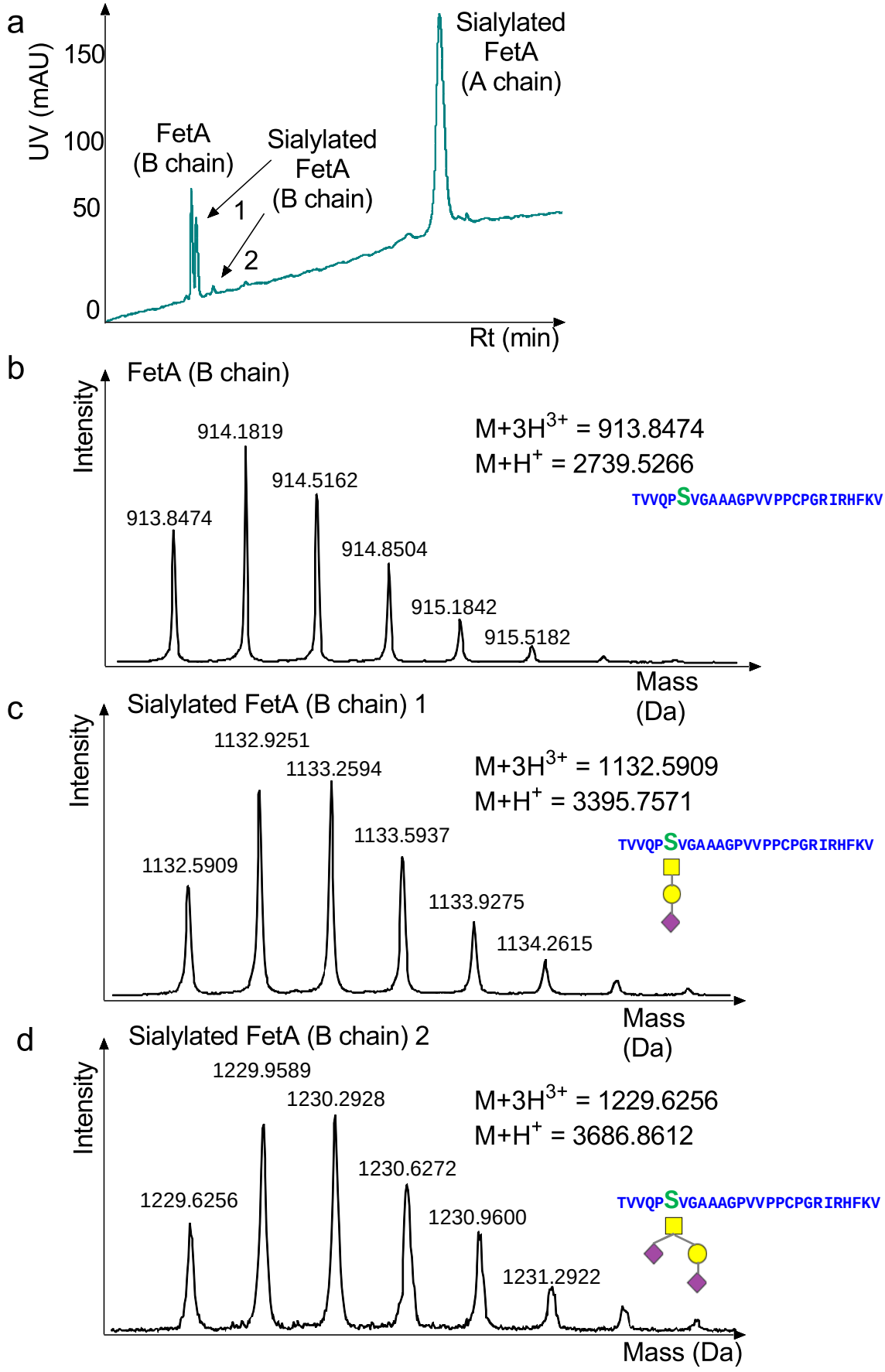
SUPPL FIGURE 2



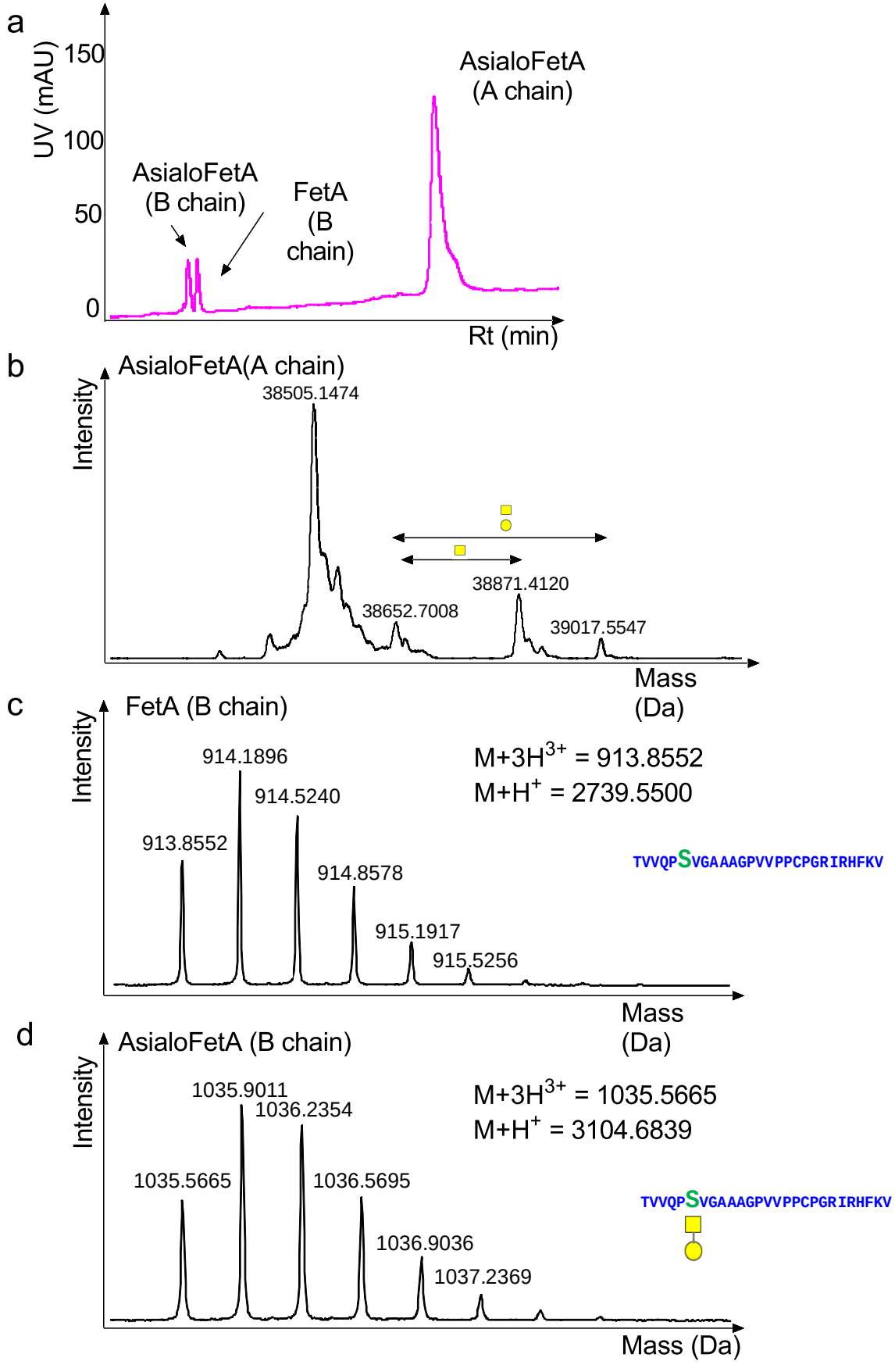
SUPPL FIGURE 3



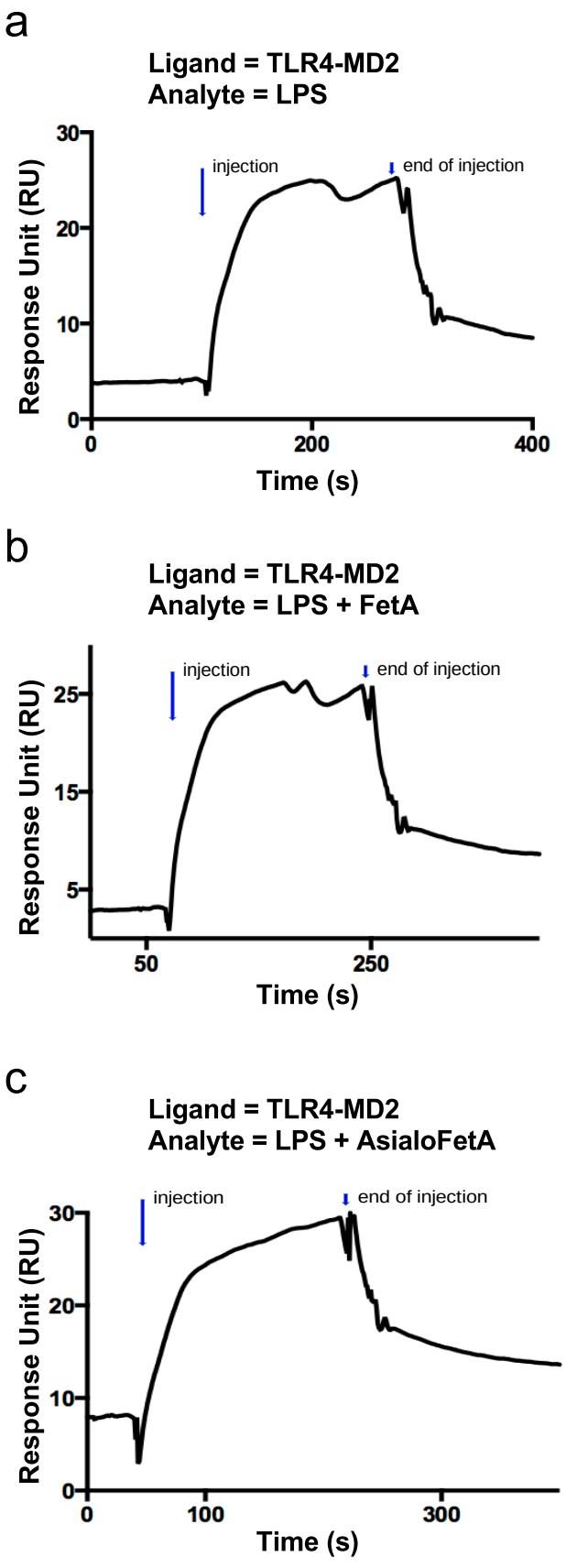
SUPPL FIGURE 4



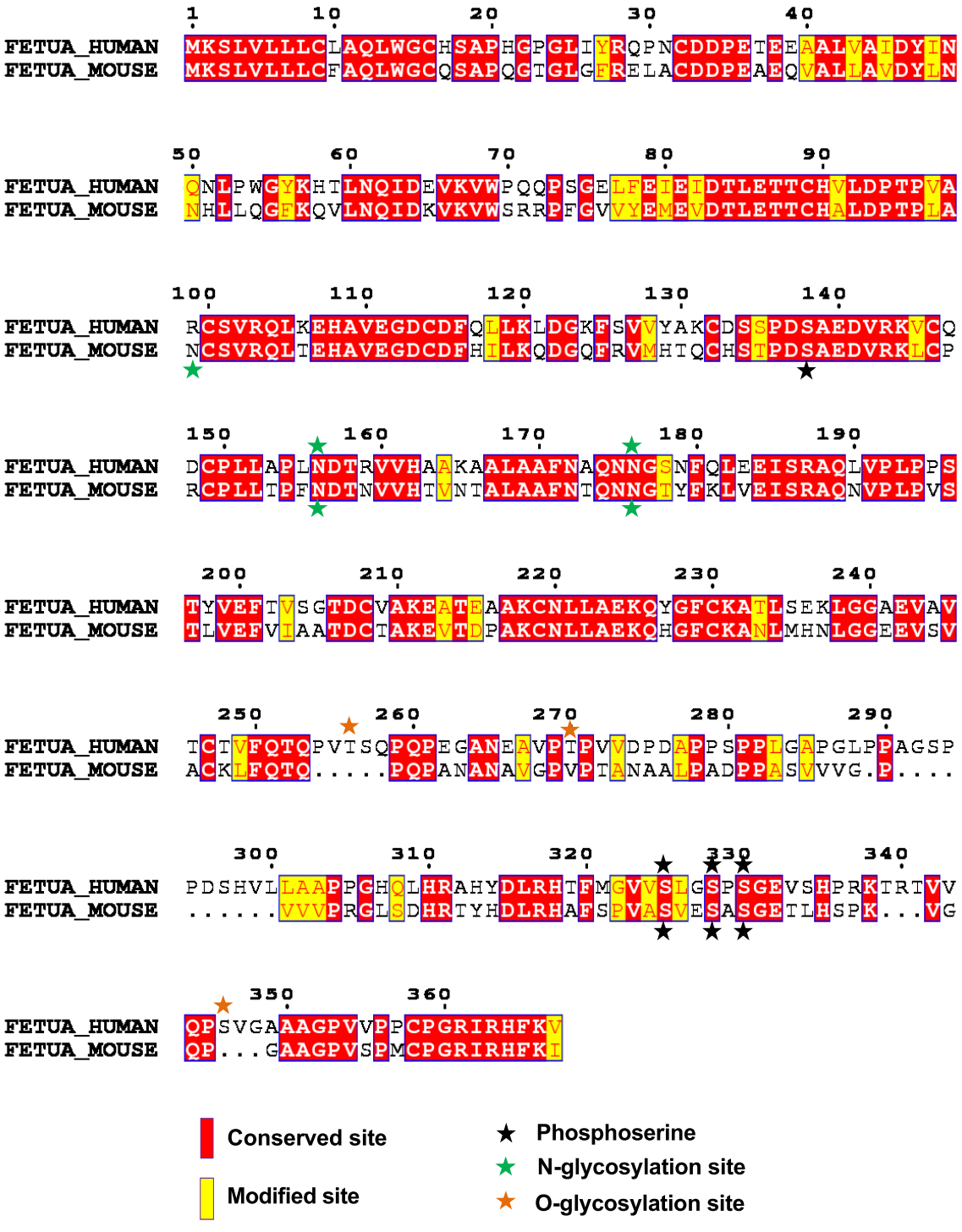
SUPPL FIGURE 5



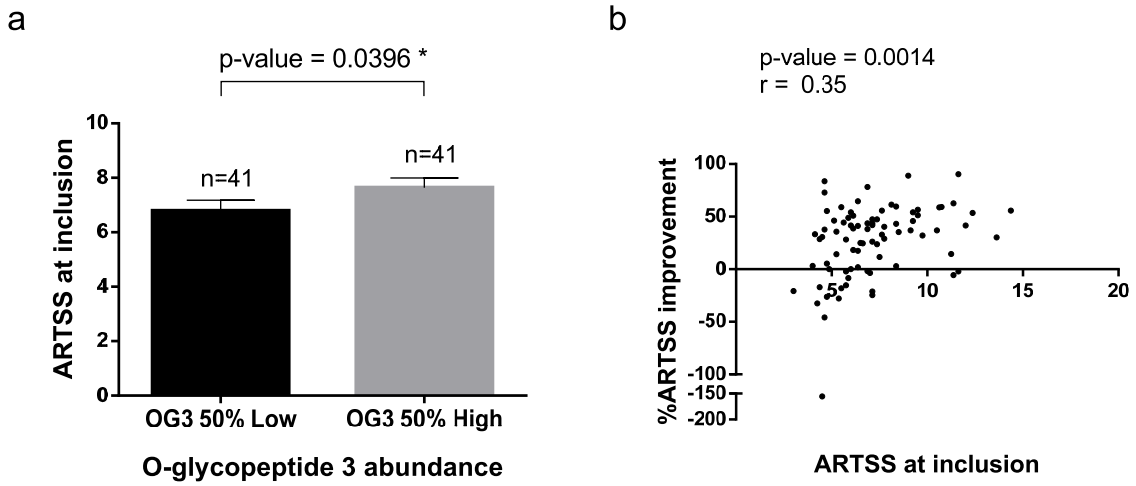
SUPPL FIGURE 6



SUPPL FIGURE 7



SUPPL FIGURE 8



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

SUPPL FIGURE 1: VO56 study design.

Schematic study diagram. Following screening and randomization, patients were treated once daily with either a placebo or a 5-grass pollen tablet for 4 months. Grass pollen challenges were performed at day 7, and at months 1, 2 and 4, concomitantly with evaluation of ARTSS. The search for predictive biomarkers was performed on 82 serum samples collected from patients before treatment initiation.

SUPPL FIGURE 2: FetA acidic variants concentrations are stable during AIT.

Variations in protein spots abundances assessed by 2D-DiGE before and after 4 month AIT in sera from patients treated with placebo or grass pollen (active) tablets.

SUPPL FIGURE 3: Immunoaffinity purification of human FetA.

Visualization of human FetA by SDS-PAGE followed by total protein staining (a) and Western-blot analyses (b). Lanes 1 and 2: 1.5 µg of crude RPMI medium supplemented with 10% human serum, before and after the affinity chromatography, respectively; lane 3: 0.3 µg of commercial FetA; lane 4: 0.6 µg of FetA obtained from immunoaffinity purification. Lane M: molecular marker.

SUPPL FIGURE 4: FetA (B chain) contains sialylated O-linked carbohydrate moieties.

a) LC-UV analysis of the reduced forms of natural FetA. The deconvoluted mass spectrum of A chain is shown in Figure 2. b-d) Mass spectrometry analysis of B chain. Non-glycosylated (b) and sialylated forms (O-linked glycans) can be observed on the mass spectrum (c, d). Yellow square = N-acetylglucosamine; yellow circle = hexose; purple diamond = N-acetylneuraminic acid (sialic acid).

SUPPL FIGURE 5: Assessment of FetA desialylation by mass spectrometry.

a) LC-UV analysis of the reduced forms of natural FetA (20mM DTT). Mass spectrometry analysis of A chain (b) and B chain (c-d). Yellow square = N-acetylglucosamine; yellow circle = hexose; purple diamond = N-acetylneuraminic acid (sialic acid).

SUPPL FIGURE 6: Neither FetA nor AsialoFetA enhance the physical binding between TLR4-MD2 and LPS.

SPR study showing representative sensorgrams obtained from an injection of 100 µM of LPS (a), a combination of 100 µM of LPS with 300 nM of FetA (b) or AsialoFetA (c) over the TLR4-MD2 immobilized CM5 sensor chip. Sensorgrams are represented as response units at specified times (s).

SUPPL FIGURE 7: Protein sequence of murine FetA differs from its human homologue.

Pairwise sequence alignment of murine (UniprotKB entry P02765) and human (UniprotKB entry P29699) FetA.

SUPPL FIGURE 8: Symptoms severity before treatment correlates with clinical efficacy.

a) Comparison of symptoms severity before treatment, between subgroups of patients separated according to the median OG3 serum abundance. Data are shown as means ± SEM (Mann-Whitney test). b) Pearson correlation of symptom severity before treatment, as calculated by the ARTSS at inclusion, with percentages of ARTSS improvement during the treatment.

SUPPLEMENTARY TABLES

SUPPL TABLE E1

Suppplementary Table 1: Fetuin A protein spots identified through the 2D-DiGE approach.
Measured (meas.). Peptide charge state (z). No. of miscleavages (P). Range, numbering according to the pro-protein sequence. The search included cysteine carbamidomethylation as a fixed modification.

Spot no./Picking no.	LC-MS/MS identification data										
	Accession	Protein	No. of identified peptides	m/z meas.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Range	Sequence	Modification (Carbamidomethylation C:)
419/A1	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	3	554.2599	3	0.89	87.1	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
				694.3463	3	0.51	79.4	0	318 - 337	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	
				860.4410	4	0.88	54.5	0	188 - 211	R.AQLVPLPPSTYVEFTVSGTDCVAK.E	C: 21
428/A2	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	3	407.2295	2	1.48	48.5	0	125 - 131	K.FSVVYAK.C	
				409.5649	3	1.79	39.6	1	121 - 131	K.LDGKFSVVYAK.C	
				554.2592	3	-0.30	80.2	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
439/A3	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	7	407.2299	2	2.46	48.4	0	125 - 131	K.FSVVYAK.C	
				521.0115	4	0.37	83.5	0	318 - 337	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	
				554.2599	3	0.96	110.2	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
				613.8432	2	0.96	32.7	1	121 - 131	K.LDGKFSVVYAK.C	
				677.3390	3	0.64	57.3	1	104 - 120	R.QLKEHAVEGDCDFQLLK.L	C: 11
				860.4418	3	1.79	35.6	0	188 - 211	R.AQLVPLPPSTYVEFTVSGTDCVAK.E	C: 21
				1121.8573	3	2.93	101.6	0	29 - 57	R.QPNCDDPETEEAALVAIDYINQNLPWGYK.H	
448/A4	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	5	407.2282	2	-1.71	50.2	0	125 - 131	K.FSVVYAK.C	
				521.0111	4	-0.34	57.6	0	318 - 337	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	
				554.2593	3	-0.12	102.0	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
				613.8428	2	0.30	37.9	1	121 - 131	K.LDGKFSVVYAK.C	
				677.3382	3	-0.54	54.5	1	104 - 120	R.QLKEHAVEGDCDFQLLK.L	C: 11
444/A5	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	5	407.2292	2	0.75	48.4	0	125 - 131	K.FSVVYAK.C	
				409.5634	3	-1.87	39.0	1	121 - 131	K.LDGKFSVVYAK.C	
				508.2552	4	-1.07	34.6	1	104 - 120	R.QLKEHAVEGDCDFQLLK.L	C: 11
				521.0101	4	-2.26	28.3	0	318 - 337	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	
				554.2589	3	-0.84	82.5	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
469/A6	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	2	407.2290	2	0.25	46.4	0	125 - 131	K.FSVVYAK.C	
				554.2594	3	0.06	70.1	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
461/A7	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	5	407.2289	2	0.01	55.7	0	125 - 131	K.FSVVYAK.C	
				521.0106	4	-1.32	66.4	0	318 - 337	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	
				554.2587	3	-1.20	63.3	0	107 - 120	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	C: 8
				860.4416	3	1.62	49.2	0	188 - 211	R.AQLVPLPPSTYVEFTVSGTDCVAK.E	C: 21
				920.2119	4	2.78	43	0	68 - 99	K.VWPQQPSGELFEIEIDTLETTCHVLDPTPVAR.C	C: 22

SUPPL TABLE E2

Supplementary Table 2. Summary of the main FetuinA tryptic-peptides identified by nanoESI-Qq-TOF MS/MS.
Measured. (Meas.). Peptide charge state (z). Carbamidomethyl Cys (CAM). Phosphorylation (Phospho). Hexose (Hex). N-acetylhexosamine (HexNAc). Sialic acid (NeuAc). Range, numbering according to the pro-protein sequence.

Accession	Chain	m/z meas.	z	Δ m/z [ppm]	Sequence	Modifications	Glycosylation type	Sialic acid	Range	Label-free MS	Label-free MS (Anova p-value)
FETUA_HUMAN	A	1107,041	4	4.00	APHGPGLIYRQPNCDDPETEEAALVAIDYINQNLPWGYK.H	CAM: 14			20 - 57		
FETUA_HUMAN	A	1065.0150	4	0.79	P.HGPGLIYRQPNCDDPETEEAALVAIDYINQNLPWGYK.H	CAM: 12			21 - 57		
FETUA_HUMAN	A	1121.8587	3	4.17	R.QPNCDDPETEEAALVAIDYINQNLPWGYK.H	CAM: 4			29 - 57		
FETUA_HUMAN	A	1136.0470	4	2.09	R.QPNCDDPETEEAALVAIDYINQNLPWGYKHTLNQIDEVK.V	CAM: 4			29 - 67		
FETUA_HUMAN	A	1317.6619	2	2.97	D.PETEEAALVAIDYINQNLPWGYK.H				35 - 57		
FETUA_HUMAN	A	971.8927	5	2.02	K.HTLNQIDEVKVWPQQPSGELFEIEIDTLETTCHVLDPTPVAR.C	CAM: 32			58 - 99		
FETUA_HUMAN	A	1098.3058	4	2.35	N.QIDEVKVWPQQPSGELFEIEIDTLETTCHVLDPTPVAR.C	CAM: 28			62 - 99		
FETUA_HUMAN	A	508,2569	4	3.86	R.QLKEHAVEGDCDFQLLK.L	CAM: 11			104 - 120	X	ns
FETUA_HUMAN	A	554.2603	3	1.70	K.EHAVEGDCDFQLLK.L	CAM: 8			107 - 120	X	ns
FETUA_HUMAN	A	519.2541	4	1.81	K.EHAVEGDCDFQLLKLDGK.F	CAM: 8			107 - 124		
FETUA_HUMAN	A	407,2298	2	1.59	K.FSVVYAK.C				125 - 131	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1326,2169	3	4.29	K.VCQDCPLLAPLNDTR.V	CAM: 2, 5; Hex(5)HexNAc(4)NeuAc(2): 14	N-linked glycan	2	145 - 159	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1544,9553	3	1.03	K.VCQDCPLLAPLNDTR.V	CAM: 2, 5; Hex(6)HexNAc(5)NeuAc(3): 14	N-linked glycan	3	145 - 159	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1183,0825	2	2.00	K.AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR.A				166 - 187		
FETUA_HUMAN	A	1523,9822	3		K.AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR.A	Hex(5)HexNAc(4)NeuAc(2): 11	N-linked glycan	2	166 - 187	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1143,2366	4	0.30	K.AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR.A	Hex(5)HexNAc(4)NeuAc(2): 11	N-linked glycan	2	166 - 187	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1742,7277	3		K.AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR.A	Hex(6)HexNAc(5)NeuAc(3): 11	N-linked glycan	3	166 - 187		
FETUA_HUMAN	A	1290.1579	2	0.94	R.AQLVPLPPSTYVEFTVSGTDCVAK.E	CAM: 21			188 - 211	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1093.8886	3	1.83	R.AQLVPLPPSTYVEFTVSGTDCVAKEATEAAK.C	CAM: 21			188 - 218		
FETUA_HUMAN	A	424,2214	2	0.94	K.CNLLAEK.Q	CAM: 1			219 - 225	X	ns
FETUA_HUMAN	A	401,6823	2	1.99	K.QYGFCK.A	CAM: 5			226 - 231	X	p<0,05
FETUA_HUMAN	A	1741,847	5	2.91	LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR	CAM: 10; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1): 19, 33	O-linked glycan	2	238 - 311	X	ns
FETUA_HUMAN	A	1800,0704	5	4.71	LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR	CAM: 10; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1): 19 or 33 ; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(2): 19 or 33	O-linked glycan	3	238 - 311	X	p<0,01
FETUA_HUMAN	A	1858,2795	5	-1.30	LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR	CAM: 10; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(2): 19, 33	O-linked glycan	4	238 - 311	X	p<0,001
FETUA_HUMAN	A	724.3871	5	2.43	D.PDAPPSPPLGAPGLPPAGSPPDSHVLLAAPPGHQLHR.A				275 - 311		
FETUA_HUMAN	A	387,6989	2	0.09	R.AHYDLR.H				312 - 317	X	ns
FETUA_HUMAN	A	568.0879	5	5.50	R.AHYDLRHTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K				312 - 337		
FETUA_HUMAN	A	642.3136	3	2.16	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHP.R				318 - 336		
FETUA_HUMAN	A	694.3468	3	1.16	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K				318 - 337	X	ns
FETUA_HUMAN	A	541.0047	4	3.36	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	Phospho: 13			318 - 337	X	ns
FETUA_HUMAN	A	721.0030	3	2.16	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR.K	Phospho: 13			318 - 337	X	ns
FETUA_HUMAN	A	553.0377	4	5.00	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSHPRK.T				318 - 338		
FETUA_HUMAN	B	1008.5432	2	4.76	R.TVVQPSVGAAAGPVVPPCPGR.I	CAM: 18			341 - 361	X	ns
FETUA_HUMAN	B	1336.6567	2	3.40	R.TVVQPSVGAAAGPVVPPCPGR.I	CAM: 18; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1): 1	O-linked glycan	1	341 - 361	X	ns
FETUA_HUMAN	B	891.4380	3	0.90	R.TVVQPSVGAAAGPVVPPCPGR.I	CAM: 18; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1): 1	O-linked glycan	1	341 - 361	X	ns
FETUA_HUMAN	B	988.4692	3	0.14	R.TVVQPSVGAAAGPVVPPCPGR.I	CAM: 18; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(2): 1	O-linked glycan	2	341 - 361	X	p<0,01
FETUA_HUMAN	B	958.0155	2	0.94	T.VVQPSVGAAAGPVVPPCPGR.I	CAM: 17			342 - 361		
FETUA_HUMAN	B	908.4811	2	0.81	V.VQPSVGAAAGPVVPPCPGR.I	CAM: 16			343 - 361		

2. <u>Résultats supplémentaires</u> : Quantification des O-glycopeptides de fétuine-A au cours de l'immunothérapie au pollen de graminées dans une étude en exposition naturelle

2.1 Contexte

L'étude VO56.07A a permis d'identifier des O-glycopeptides de fétuine-A comme marqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA aux pollens de graminées, dans le cadre d'une étude réalisée en exposition contrôlée (*i.e.* en chambre à pollens) [548]. Afin de valider les candidats marqueurs, la méthode de « label free » MS, permettant la quantification de ces O-glycopeptides, a été appliquée à des échantillons de sérum provenant d'une cohorte plus large de patients allergiques aux pollens de graminées, et exposés de façon naturelle à ces allergènes.

L'étude de phase III VO53.06 a permis de démontrer l'efficacité à long-terme de l'ITA aux pollens de graminées incluant deux schémas d'administration (traitement débutant 2 ou 4 mois avant la saison pollinique, se poursuivant au cours de la saison et ce durant 3 saisons), en évaluant les scores symptomatiques (notés AASS pour *Average Adjusted Symptom Score*) des patients au cours de 5 saisons polliniques consécutives. Les sera de 230 patients inclus dans l'étude VO53.06 ayant reçu pendant 2 mois avant les différentes saisons polliniques soit le comprimé d'extrait de 5 graminées dosé à 300 IR (n=107), soit un placebo (n=123), ont constitué la cohorte destinée à notre étude. Ces sera collectés avant le début du traitement ont donc subi le même protocole d'immunodéplétion des 6 protéines les plus abondantes et d'analyse par spectrométrie de masse que les échantillons de sérum issus de l'étude VO56.07A.

2.2 Résultats

Les abondances sériques des O-glycopeptides de fétuine-A détectés grâce à l'approche de « label free » MS ont été associées aux scores symptomatiques des patients à l'issue de la deuxième année de traitement. Aucune variation significative des scores symptomatiques en fonction de l'abondance des O-glycopeptides de fétuine-A n'est observée, que ce soit dans le groupe des patients traités avec le comprimé actif (n=107 patients) ou dans le groupe placebo (n=113), comme le présente la figure 27. L'abondance sérique de peptides non modifiés de la

fétuine-A n'est pas non plus associée à une variation des scores symptomatiques après 2 années de traitements, dans le groupe des actifs (données non représentées).

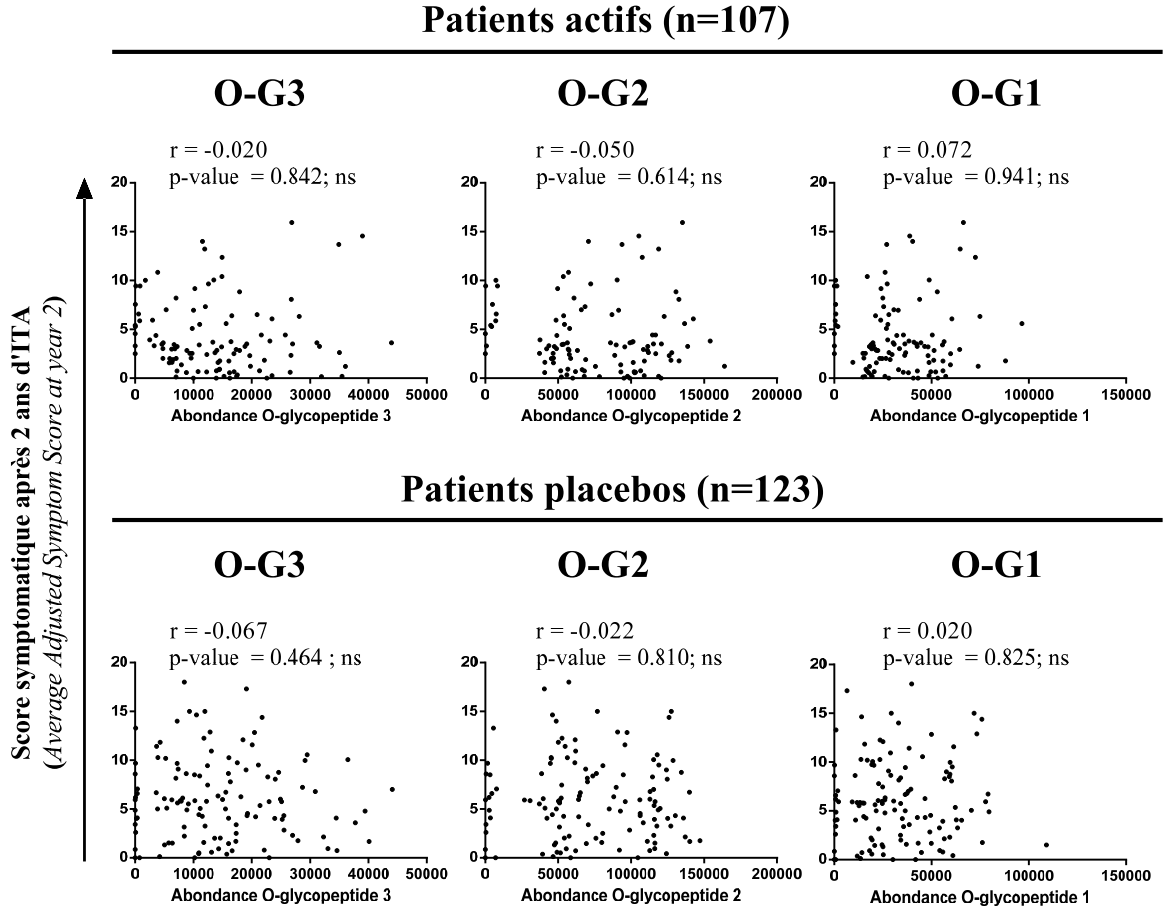


Figure 27 : L'abondance sérique avant traitement des O-glycopeptides de fétuine-A n'est pas corrélée au score symptomatique après 2 années d'ITA aux pollens de graminées.

230 patients échantillons de sérum provenant de patients allergiques aux pollens de graminées ont été immunodéplétés et analysés par une approche « label free » MS, permettant de détecter les niveaux d'abondances de 3 O-glycopeptides de fétuine-A (O-G1, O-G2 et O-G3 portant 2,3 ou 4 acides sialiques, respectivement). Les scores symptomatiques des patients individuellement, évalués après 2 années de traitement, dans les groupes actifs et placebos sont représentés en fonction des niveaux d'abondances des O-glycopeptides de fétuine-A. Le test de corrélation de Pearson est utilisé pour l'analyse statistique (significatif pour une p-value ≤ 0.05).

2.3 Conclusion

La méthode de « label free » MS est adaptée à la quantification à haut-débit des O-glycopeptides de fétuine-A. Dans cette étude d'ITA aux pollens de graminées, l'abondance sérique des O-glycopeptides de fétuine-A n'est pas associée aux scores symptomatiques des patients après 2 années de traitement. Cependant, il est impossible de conclure à une invalidité des O-glycopeptides de fétuine-A en tant que biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA, puisque l'amélioration clinique des patients ne peut être évaluée dans cette étude, contrairement à la VO56.07A. En effet, l'absence de scores cliniques à l'inclusion est liée à l'impossibilité de normaliser un tel score du fait de l'exposition naturelle et individuelle différente d'une année à l'autre. Il n'est donc pas possible de quantifier une amélioration clinique entre le début et la fin du traitement. Les scores symptomatiques, évalués après une durée de traitement donnée, permettent seulement d'accéder à l'indication d'une association éventuelle entre les niveaux d'abondances des O-glycopeptides de fétuine-A et la sévérité des symptômes au temps considéré. La variation dans la voie d'exposition entre l'étude VO56.07A (exposition en chambre à allergènes) et l'étude VO53.06 (exposition naturelle) peut expliquer les différences de résultats obtenus. Enfin, les variations de l'abondance des O-glycopeptides de fétuine-A sont peut-être prédictives de l'effet du traitement à court-terme (étude VO56.07A, portant sur 4 mois), mais pas à long-terme (étude VO53.06, portant dans notre étude sur 2 ans).

3. Résultats supplémentaires : Évaluation des O-glycopeptides de fétuine-A comme marqueurs prédictifs de l'efficacité de l'immunothérapie aux acariens

3.1 Contexte

Les O-glycopeptides de fétuine-A ont été identifiés comme candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA pour une indication d'allergie aux pollens de graminées, dans les échantillons sériques de l'étude VO56.07A. La possibilité que ces O-glycopeptides de fétuine-A constituent des marqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA contre d'autres aéro-allergènes doit être examinée. L'étude clinique VO67.10 a permis d'évaluer l'efficacité du traitement d'ITA par voie sublinguale chez des patients souffrant de rhinite allergique liée aux acariens et soumis à l'allergène (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) dans une chambre d'exposition. Cette étude, menée en double aveugle avec un contrôle placebo, a testé l'effet du traitement administré par une prise quotidienne pendant 6 mois à la dose 100IR, 300IR ou 500IR L'évaluation des scores cliniques (RTSS pour *Rhinitis Total Symptom Score*) individuels est réalisée à l'inclusion et après 6 mois de traitement, au cours de challenges allergénique en chambre d'exposition. Le critère de jugement principal est estimé, en quantifiant le changement par rapport à la ligne de base (Visite finale – Visite initiale) de l'aire sous la courbe représentative des scores symptomatiques, au cours du challenge allergénique d'une durée de quatre heures.

Afin d'étudier le caractère prédictif de l'efficacité de l'ITA sublinguale aux acariens des O-glycopeptides de fétuine-A, une partie des échantillons sériques de l'étude VO67.10 a été soumise au même protocole d'analyse que ceux de la VO56.07A, pour la quantification des peptides de fétuine-A. Les échantillons ont ainsi été soumis à une immunodéplétion des 6 protéines sériques les plus abondantes, suivie d'une analyse par « label free » MS permettant la quantification relative de peptides différentiellement exprimés. L'étude protéomique a été réalisée sur une cohorte incluant 74 patients ayant reçu le comprimé placebo, ainsi que 70 patients traités par le comprimé à la dose 500IR – cette dose ayant montré les pourcentages de réduction de la sévérité des symptômes les plus élevés à l'issue du traitement. Dans notre étude, le score clinique est calculé comme le changement par rapport à la ligne de base (Visite finale – Visite initiale) de l'aire sous la courbe représentative des scores symptomatiques au cours des deux dernières heures du challenge allergénique.

3.2 Résultats

3.2.1 Les niveaux d'abondances sériques des O-glycopeptides de fétuine-A ne sont pas associés à l'amélioration clinique à l'issue de l'ITA aux acariens

Les abondances sériques des O-glycopeptides de fétuine-A détectés grâce à l'approche de « label free » MS ont été associées aux scores d'amélioration clinique des patients entre l'initiation et la fin du traitement (après 6 mois). Les abondances des O-glycopeptides de fétuine-A ne sont pas corrélées aux scores d'amélioration clinique au niveau individuel, comme présenté en figure 28. Cependant dans le groupe des patients traités avec le comprimé actif, un sous-groupe de patients se dessine. En particulier lorsque l'on considère le niveau d'abondance du O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A (O-G3), les niveaux les plus élevés sont obtenus dans les sera issus de patients dont l'amélioration clinique est la plus importante, traduite par les scores cliniques les plus faibles. Cette sous-population de patients n'est pas détectable dans le groupe ayant reçu le comprimé placebo.

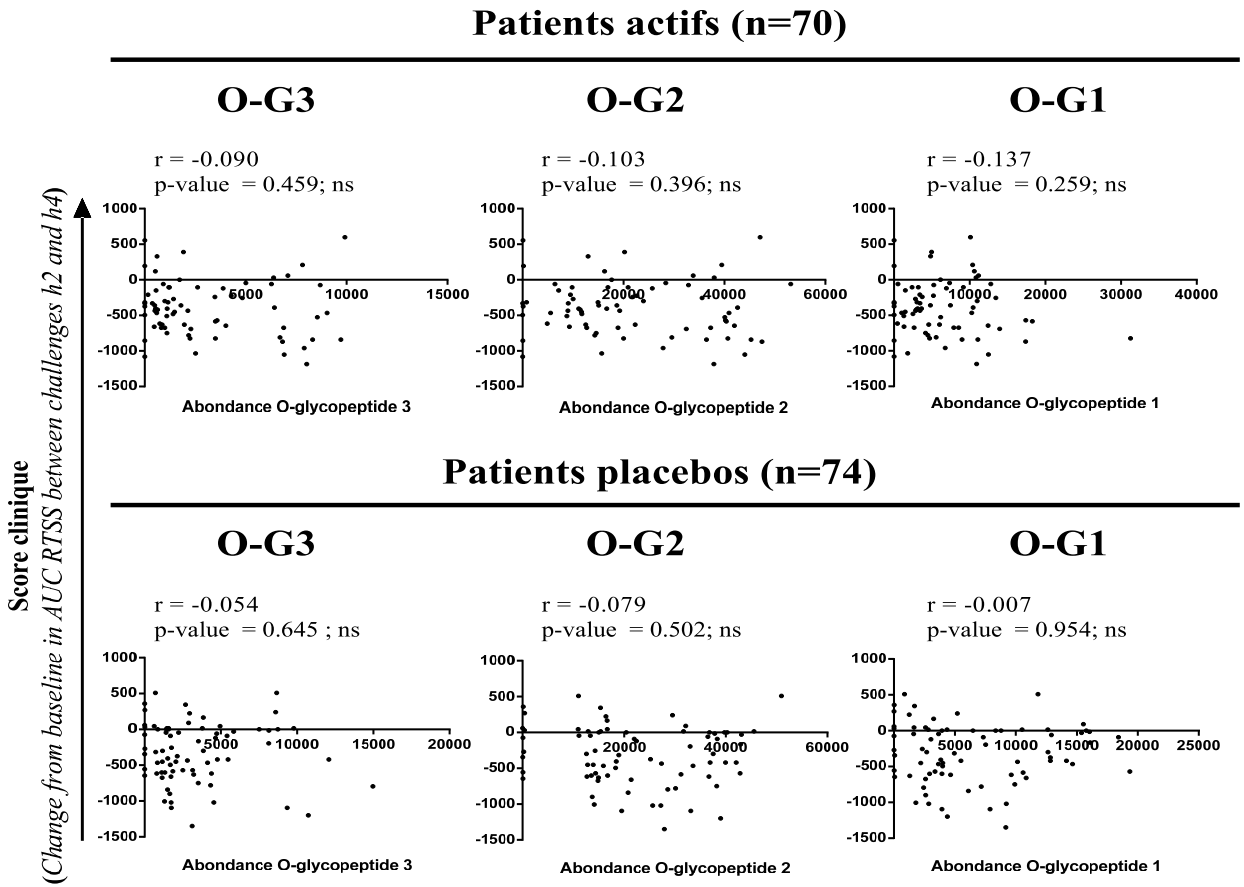


Figure 28 : L'abondance sérique avant traitement des O-glycopeptides de fétuine-A n'est pas corrélée à l'amélioration clinique après 6 mois d'ITA aux acariens.

144 échantillons de sérum provenant de patients allergiques aux acariens ont été immunodéplétés et analysés par une approche « label free » MS, permettant de détecter les niveaux d'abondances de 3 O-glycopeptides de fétuine-A (O-G1, O-G2 et O-G3 portant 2,3 ou 4 acides sialiques, respectivement). Les scores d'améliorations cliniques des patients individuellement, évalués après 6 mois de traitement sont représentés en fonction des niveaux d'abondances des O-glycopeptides de fétuine-A. Le test de corrélation de Pearson est utilisé pour l'analyse statistique (significatif pour une p-value ≤ 0.05).

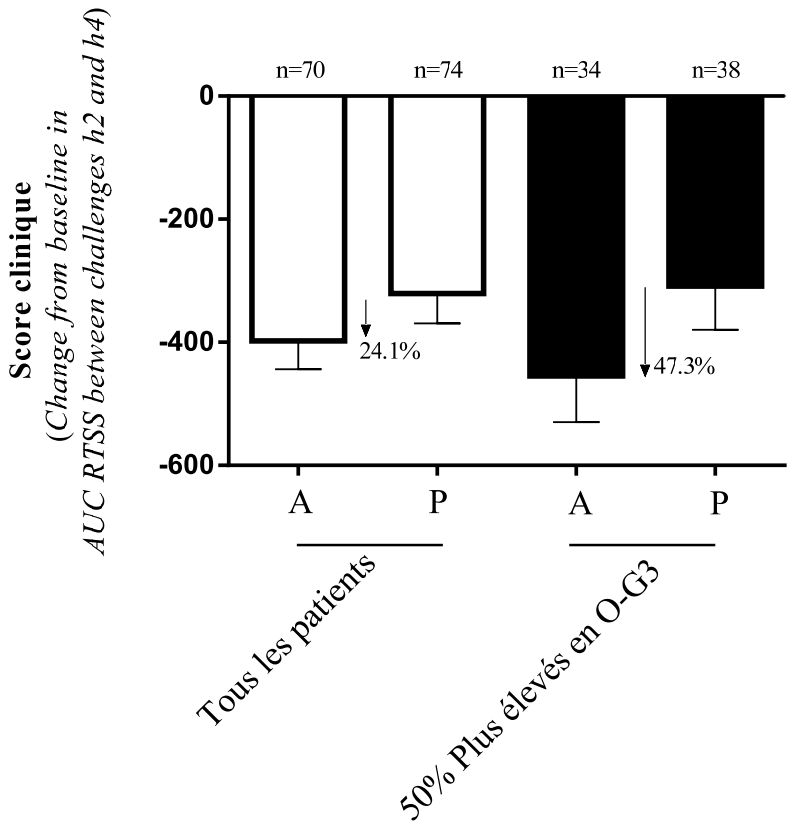


Figure 29 : Dans le cas de l'ITA aux acariens, une concentration sérique élevée en O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A (O-G3) est associée à un écart de scores cliniques accru entre les groupes actif et placebo.

Différences des scores cliniques, entre les groupes actif et placebo, en fonction de l'abondance sérique du peptide O-G3 de fétuine-A. Les scores cliniques sont évalués comme la différence entre les valeurs finale (à la visite n°7) et initiale (à la visite d'inclusion, n°2) de l'aire sous la courbe des scores symptomatiques moyens (ARTSS pour *Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score*), rapportés pendant les 2 dernières heures des challenges allergéniques. Les données sont représentées comme la moyenne +/- ÉT dans chaque groupe.

3.2.2 La sélection des patients en fonction des niveaux d'abondances sériques des O-glycopeptides de fétuine-A accroît la taille d'effet entre les groupes actif et placebo

Après 6 mois de traitement, l'effet de l'ITA aux acariens a été démontré dans cette étude, comme le souligne l'écart de 24.1% entre les scores cliniques des groupes des patients ayant reçu le comprimé actif ou le placebo et dont les séra ont été analysés en « label free » MS (figure 29). Nous avons étudié l'intérêt de l'ajout d'un critère d'abondance en O-glycopeptide tétrasialylé (O-G3) de fétuine-A en termes de gain sur la taille de l'effet entre les groupes actif et placebo. Il apparaît que la sélection de 50% des patients, pour lesquels les valeurs d'abondances du peptide O-G3 sont les plus élevées, entraîne une augmentation de l'écart des scores cliniques entre les groupes actif et placebo, qui atteint ainsi 47.3%. La sélection des patients pour lesquels les valeurs d'abondances sériques de O-G3 sont les plus faibles ne s'accompagne pas d'une variation de l'écart des scores cliniques entre les groupes actif et placebo (données non représentées).

3.3 Conclusion

L'association entre les niveaux d'abondances sériques des O-glycopeptides de fétuine-A et l'amélioration clinique de patients traités par ITA pour leur rhinite allergique aux acariens a été examinée, grâce à une analyse protéomique en « label free » MS réalisée sur les échantillons de l'étude clinique VO67.10. Dans cette étude, les niveaux d'abondances sériques des O-glycopeptides de fétuine-A ne sont pas associés à une amélioration clinique en fin de traitement. Le traitement est de courte durée (6 mois) et le bénéfice clinique mesuré dans cette étude est significatif mais relativement peu marqué, ce qui peut être en lien avec l'absence de corrélation observée. En revanche, la sélection des patients en fonction de leur niveau d'abondance sérique en peptide tétrasialylé de fétuine-A (O-G3) favorise la prévision d'un bénéfice clinique dans le groupe des patients traités par le comprimé actif, mais pas dans celui recevant le placebo.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Diagnostic actuel de la réaction allergique et ses limites

Le diagnostic de l'hypersensibilité de type I repose actuellement sur l'interrogatoire clinique des patients et les prick tests cutanés, complété par le dosage des IgE spécifiques circulantes effectués *in vitro*. Ces paramètres permettent de définir le niveau de sévérité de la réaction allergique et l'intérêt du recours ou non à l'ITA. En particulier, selon la classification ARIA, l'ITA est recommandée pour les patients souffrant d'une rhinite persistante légère ou persistante modérée à sévère. Cependant, la plupart des critères utilisés pour estimer la sévérité de la rhinite sont basés sur des réponses et des évaluations de scores symptomatiques par définition subjectives à des questionnaires *ad hoc*. Des éléments plus objectifs tels que les taux d'IgE spécifiques ont également leurs limites. En effet, certains patients sont sensibilisés et présentent des taux d'IgE spécifiques élevés mais ne développent pas de symptômes. Une des limites de la quantification sérique des IgE spécifiques de l'allergène est due au fait que ces IgE ne sont pas biologiquement actives tant qu'elles ne se lient pas à leurs récepteurs de haute affinité sur les cellules effectrices. Le développement de la réaction allergique résulte en effet d'une multiplicité de facteurs biologiques en interaction [39]. La définition d'un seuil positif de concentration en IgE est également rendue difficile par la variabilité observée entre les différentes techniques utilisées. Le dosage des IgE spécifiques de l'allergène dans le sérum n'est donc pas suffisant pour confirmer ou exclure un cas d'allergie, mais les IgE spécifiques de l'allergène sont néanmoins reconnues comme des marqueurs de sensibilisation. Une étude récente a proposé d'utiliser le taux d'IgE spécifique de l'allergène comme biomarqueur pour prédire l'efficacité clinique de la désensibilisation. Cette étude a montré que les patients ayant un taux d'IgE sériques spécifiques des acariens élevé, dosé avant l'administration du traitement, présentent une meilleure amélioration clinique suite à une évaluation par une échelle visuelle analogue. Néanmoins, il s'agit d'une étude préliminaire portant sur un nombre réduit de patients. De plus, la définition des patients répondeurs est basée sur un critère de choix arbitraire dans l'échelle analogue visuelle [549]. Si des marqueurs de suivi d'efficacité des traitements d'ITA ont récemment été mis en évidence [237, 550], la découverte de marqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA demeure donc un défi. De tels marqueurs sont essentiels pour faciliter l'identification des patients pour lesquels la probabilité d'une réponse positive au traitement est la plus élevée. Puisque les traitements d'ITA sont longs et coûteux, des biomarqueurs prédictifs pourraient ainsi améliorer la sélection des patients.

Méthodologie pour la recherche de biomarqueurs

La recherche de biomarqueurs peut être conduite par différentes méthodes, selon qu'elle vise à mettre en évidence des marqueurs de type génétique, métabolique, ou protéique. L'analyse des protéines par rapport aux autres types de marqueurs présente l'avantage de refléter de façon plus fine les variations physiologiques ou liées à des interventions thérapeutiques. Les analyses protéomiques quantitatives sont donc couramment employées pour mettre en évidence des candidats biomarqueurs. Par rapport à des méthodes basées sur l'immuno-affinité, comme les micropuces à anticorps, les méthodes protéomiques couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse permettent une recherche sans *a priori* de nouveaux marqueurs. Elles sont généralement menées sur des échantillons provenant de fluides biologiques accessibles par des méthodes peu invasives au cours des études cliniques, comme le sérum ou l'urine. La facilité d'obtention de ce type d'échantillons permet également de constituer des bio-banques analysables *a posteriori*. L'analyse de protéines sériques en vue de la découverte de biomarqueurs est cependant complexe, à cause de la gamme dynamique très large des concentrations protéiques, couvrant plus de dix ordres de magnitude. Comme cela a été le cas dans notre étude, des stratégies de déplétion des protéines majoritaires, comme l'albumine, la transférrine ou l'α2-macroglobuline, peuvent être mises en œuvre, afin de permettre l'identification et la quantification de protéines d'abondance plus faible [551]. De façon alternative, des méthodes d'enrichissement spécifiques peuvent être employées, pour se concentrer sur l'analyse d'un groupe précis de protéines. Par exemple, des lectines immobilisées permettent une séparation des glycoprotéines selon leur affinité pour leurs ligands carbohydratés. Nous avons obtenu de bonnes performances à l'issue de ce type de méthode pour l'enrichissement des glycoprotéines, cependant celle-ci demeure peu adaptée à l'étude d'échantillons provenant de larges cohortes cliniques.

Recherche de biomarqueurs prédictifs d'efficacité de l'ITA dans le cadre de l'étude VO56.07A (chambre à pollen de graminées)

Dans le contexte de la recherche de biomarqueurs circulants de l'ITA, nous avons donc étudié les variations d'abondances protéiques dans des échantillons de sérum au sein desquels les six protéines majoritaires ont été déplétées, afin de favoriser l'analyse de protéines d'abondance plus faible. Les échantillons de sérum proviennent de patients inclus dans un protocole clinique d'ITA aux pollens de graminées, réalisé en dehors de la saison pollinique

mais au cours duquel les patients sont régulièrement exposés aux pollens dans une chambre dédiée. Les variations symptomatiques observées sont donc comparables car l'exposition est identique entre les patients et tout au long de l'étude.

À partir des échantillons de sérum déplétés, l'approche de protéomique quantitative menée par électrophorèse différentielle bidimensionnelle a permis d'identifier des candidats biomarqueurs prédictifs d'une réponse positive à l'ITA aux pollens de graminées. En effet, le caractère prédictif des candidats biomarqueurs identifiés est lié au fait que l'analyse a été menée sur des échantillons de sérum provenant de patients n'ayant pas encore reçu le traitement d'ITA. En particulier, cette étude a montré que des isoformes de la protéine fétuine-A étaient différentiellement exprimés entre les patients traités par le comprimé d'extrait allergénique et présentant une amélioration clinique en fin de traitement (définis comme « actifs répondeurs »), et les patients ayant reçu le même traitement et dits « non-répondeurs », pour lesquels l'amélioration clinique est moindre. De plus, l'abondance de l'expression des isoformes de points isoélectriques (pI) les plus acides est associée à l'amélioration clinique en fin de traitement. Cette association n'est pas observée dans le groupe de patients ayant reçu le comprimé placebo, soulignant que la variation d'abondance des isoformes de la fétuine-A est prédictive d'un effet du traitement. Enfin, l'abondance sérique des isoformes de fétuine-A de pI acides n'est pas modulée par l'ITA puisqu'elle ne présente pas de variation significative entre le début et la fin du traitement. Cet élément suggère que les isoformes de la protéine sont en relative homéostasie au cours du traitement.

Des protéoformes de la fétuine-A comme candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA

De façon générale, la diversité protéique découlant d'un gène unique peut avoir une origine au niveau génétique, transcriptionnel ou protéique, selon que des variations alléliques, un épissage variable des séquences d'ARN ou des modifications post-traductionnelles interviennent, respectivement [334]. Il est peu probable que des variants alléliques uniquement soient à l'origine des isoformes observées dans le sérum des patients, puisque de nombreuses formes sont présentes dans le sérum d'un même patient, et que le motif des isoformes est relativement conservé entre les patients. Le terme de « protéoformes » est donc plus adapté pour décrire la variété protéique de la fétuine-A. En effet, il désigne l'ensemble des sources de variation combinatoire, c'est-à-dire les différentes formes moléculaires dans lesquelles le

produit protéique d'un gène peut exister, résultant des variations génétiques, des transcrits d'ARN subissant un épissage alternatif, ou des modifications post-traductionnelles [334]. Les protéoformes de la fétuine-A humaine ont par ailleurs été décrites comme découlant de variations liées à la glycosylation, impliquant à la fois une hétérogénéité dans l'occupation des sites mais aussi dans les structures glycanniques greffées [478, 552]. En particulier, des variations dans les proportions d'acides sialiques ou les phosphorylations variables des isoformes peuvent induire des décalages de pI [553]. L'hypothèse que les isoformes de la fétuine-A varient selon la proportion d'acides sialiques terminaux greffés aux motifs glycanniques a été validée en appliquant une hydrolyse enzymatique spécifique de ces acides sialiques, par la neuraminidase, et en comparant les deux formes de la protéine. La caractérisation de la protéine native et de la fétuine-A ayant subi l'hydrolyse des acides sialiques a été réalisée par des méthodes protéomiques d'électrophorèse bidimensionnelle, ou de digestion trypsique en solution des deux formes de la protéine, suivie d'une analyse LC-MS. L'hydrolyse des acides sialiques de la fétuine-A s'accompagne en électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) d'un décalage et d'une réduction du nombre de spots protéiques correspondant aux isoformes de la protéine. De plus, le courant ionique extrait à 291.09 Da, correspondant à la masse de l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique) n'est plus détecté sur le spectre MS/MS de la fétuine-A ayant subi un traitement par la neuraminidase. Une proportion des isoformes de la fétuine-A est donc due à une sialylation variable de la protéine. Les spots encore observés en 2-DE à l'issue de la désialylation suggèrent que d'autres modifications post-traductionnelles sont impliquées. La phosphorylation variable des isoformes de la fétuine-A, ou l'hétérogénéité des structures glycanniques encore présentes à l'issue du traitement par la neuraminidase, peuvent expliquer un profil électrophorétique sous la forme d'un nombre réduit de spots protéiques. La variation d'abondance des protéoformes de fétuine-A en fonction du bénéfice clinique obtenu par les patients en fin de traitement a été validée par une deuxième approche de protéomique quantitative. L'analyse des échantillons de sérum par spectrométrie de masse sans marquage, dite « label free », permet de quantifier des peptides dont l'abondance varie significativement entre les groupes de patients et d'identifier les protéines dont ces peptides sont issus. L'approche « label free » a permis d'identifier des peptides de fétuine-A différentiellement exprimés entre les groupes de patients. En particulier, des O-glycopeptides de la protéine sont plus abondants dans le sérum des patients actifs répondeurs, par rapport aux échantillons de sérum des patients non-répondeurs. Cette différence statistique présente une plus forte significativité lorsque les peptides O-glycosylés portent le plus d'acides sialiques terminaux. De plus, le niveau d'abondance des peptides O-

glycosylés de fétuine-A est associé à l'amélioration clinique en fin de traitement, dans le groupe des patients actifs. Cette corrélation n'est pas observée dans le groupe des patients ayant reçu le comprimé placebo. Par ailleurs, les niveaux d'abondance du peptide O-glycosylé et tétrasialylé de fétuine-A, dosés avant ITA, sont associés à la sévérité des symptômes évalués avant le traitement. Or l'association entre la sévérité des symptômes cliniques à l'inclusion et le bénéfice clinique d'un traitement d'ITA est connue [181]. Des taux sériques élevés en O-glycopeptides de fétuine-A sont donc associés à des symptômes allergiques accrus, et ainsi indirectement à une probabilité plus importante de réponse clinique favorable à l'ITA. Il est donc possible d'envisager ces peptides modifiés de fétuine-A comme des marqueurs objectifs de la sévérité des symptômes allergiques, avant une ITA. Enfin, l'ensemble des données obtenues par les analyses protéomiques menées sur les échantillons de sérum permettent de considérer les protéoformes sialylées de la fétuine-A, comme des candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du traitement d'ITA aux pollens de graminées.

Suite à ces résultats, deux questions restent en suspens. Le suivi des O-glycopeptides de la fétuine-A en tant que biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA peut-il être appliqué à des études en exposition naturelle ? Enfin, cette découverte peut-elle être étendue à d'autres allergènes que les pollens de graminées ? Dans cette perspective, la méthode de quantification relative en « label free » MS a également été appliquée à des échantillons de sérum provenant de cohortes d'études cliniques plus larges. De façon semblable à l'analyse des échantillons de l'étude ayant permis d'identifier les candidats biomarqueurs, les échantillons des études cliniques utilisés pour la validation sont soumis à une déplétion des 6 protéines les plus abondantes du sérum, avant l'analyse en « label free » MS.

Recherche de biomarqueurs prédictifs d'efficacité dans le cadre de l'étude VO53.06 (allergie aux graminées, exposition naturelle)

Les échantillons de sérum de 230 patients traités par ITA aux pollens de graminées, et recevant soit un comprimé actif soit un placebo, ont ainsi été analysés de façon rétrospective, avant que les patients ne soient traités. Cette étude en exposition naturelle ne comprenant pas de score clinique à l'inclusion, la définition de la notion de patient « répondeur » est impossible. De façon alternative, notre approche a considéré le score clinique médian dans le groupe des actifs après 2 ans de traitement comme un seuil de réponse clinique : en-deçà de cette valeur, les patients sont classés dans le groupe des « répondeurs », tandis qu'au-delà de ce

score clinique médian, les patients appartiennent au groupe des patients « non répondeurs ». Dans cette étude, l'abondance sérique des peptides O-glycosylés de la fétuine-A n'est pas corrélée au score symptomatique évalué après 2 ans de traitement, dans le groupe des patients ayant reçu le comprimé actif. Ce résultat ne permet pas donc pas de valider les peptides O-glycosylés de fétuine-A en tant que marqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA dans ce travail. Cependant, la notion d'amélioration clinique n'est pas réellement applicable dans cette étude, limitant la possibilité de valider les candidats comme des marqueurs prédictifs de l'efficacité clinique. Seule une corrélation entre l'abondance des marqueurs et la sévérité des symptômes après une durée définie de traitement peut être considéré, avec les données cliniques disponibles. Par ailleurs, la précédente étude (en chambre à pollen de graminées) ne montrait pas non plus de corrélation entre le niveau d'abondance sérique des O-glycopeptides de fétuine-A et la sévérité des symptômes en fin de traitement. Enfin, l'étude clinique VO53.06 est multicentrique, et les patients sont exposés naturellement aux allergènes des graminées. Ce facteur compromet la maîtrise des doses d'allergènes inhalés, et représente par conséquent un critère de variabilité important entre les patients au cours du protocole clinique.

Recherche de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA dans l'étude VO67.10

Les sera de 144 patients allergiques aux acariens et inclus dans une troisième étude clinique ont également été analysés par la méthode de quantification relative « label free » MS. Au cours de cette étude, les patients sont exposés aux acariens de façon maîtrisée, par le biais de challenges en chambre à allergène. La valeur de score permettant de définir les « répondeurs » et « non-répondeurs » a pu être fixée, grâce aux données de scores cliniques des patients à l'inclusion, ainsi qu'à la fin du traitement d'une durée de 6 mois. Il est donc possible de considérer un groupe de patients répondeurs : leur amélioration clinique sera meilleure que la valeur médiane du score d'amélioration clinique, dans le groupe des patients actifs. L'analyse protéomique en « label free » MS n'a pas permis d'observer une corrélation entre l'abondance sérique des O-glycopeptides de fétuine-A et l'amélioration clinique au cours du traitement, dans le groupe des patients actifs. Cette troisième étude ne permet pas de valider les candidats biomarqueurs précédemment identifiés. Néanmoins, la sélection des patients en fonction du niveau d'abondance sérique des O-glycopeptides sialylés de fétuine-A permet d'accroître l'écart symptomatique observé en fin de traitement entre le groupe des patients

traités par le comprimé actif et celui des sujets recevant le placebo. Par ailleurs, le système d'attribution des scores symptomatiques est différent de celui employé dans la première étude exploratoire, et des résultats d'efficacité clinique plus modérés sont obtenus à l'issue de cette étude. La réduction du score symptomatique moyen rapporté dans le groupe des patients traités par le comprimé actif par rapport aux patients ayant reçu le placebo est ainsi d'environ 24% après 6 mois de traitement, alors que cet écart était maintenu à près de 30% dans l'étude VO56.07A relative à l'allergie aux pollens de graminées. Il s'agit d'ailleurs d'un protocole clinique de courte durée, qui montrerait sûrement une amélioration clinique plus marquée à l'issue d'une plus longue période de traitement. Les mécanismes immunologiques entre la rhinite allergique saisonnière et perannuelle peuvent être différents. En effet, l'allergie aux pollens est souvent associée à une réponse Th2 tandis que l'allergie aux acariens est plus hétérogène, avec des réponses Th2 associées à des réponses Th1 ou Th17 [554]. Le rôle biologique de la fétuine-A pourrait donc différer selon le type de sensibilisation. Ces différents éléments compliquent la validation des O-glycosylations portées par la fétuine-A comme biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA.

Limites de l'étude

Les différentes études ont montré que les O-glycopeptides de la fétuine-A, et plus particulièrement le peptide tétrasialylé de fétuine-A noté O-G3, étaient les meilleurs candidats biomarqueurs pour prédire l'efficacité de l'ITA (tableau 7, relatif à l'étude VO56.07A). Cependant, plusieurs limites à l'utilisation de ce type de marqueurs apparaissent. D'une part, les résultats positifs n'ont été observés que dans les études en exposition contrôlée. D'autre part, le suivi de peptides O-glycosylés de fétuine-A n'est possible que grâce à une technique complexe.

Méthode d'analyse des échantillons de sérum immunodéplétés		**Test de comparaison multiple de Tukey**	**Corrélation (test Pearson) de l'abondance avec l'amélioration clinique (score)**
ELISA : fétuine-A		AR vs. ANR : p-value = 0.039 * Fold-change = 1.22	Active : r = 0.216 ns Placebo : r = 0.034 ns
DIGE : spot acide de fétuine-A (n°439)		AR vs. ANR : p-value = 0.0016 ** Fold-change = 1.36	Active : r = 0.46 ** Placebo : r = 0.18 ns
« Label free » MS	O-G1 (2 acides sialiques)	AR vs. ANR : p-value = 0.67 ns	Active : r = 0.27 ns Placebo : r = 0.23 ns
	O-G2 (3 acides sialiques)	AR vs. ANR : p-value = 0.06 ns	Active : r = 0.43 ** Placebo : r = 0.17 ns
	O-G3 (4 acides sialiques)	AR vs. ANR : p-value = 0.0011 ** Fold-change = 1.63	Active : r = 0.47 ** Placebo : r = 0.15 ns

Tableau 7 : Comparaison des résultats statistiques obtenus par les méthodes de quantification de la fétuine-A, dans 82 sera issus de patients allergiques aux graminées.

En effet, la fétuine-A détectée simplement dans des échantillons de sérum brut par ELISA ne montre pas de différence significative entre les groupes de patients. Dans le sérum déplété des six protéines les plus abondantes, le dosage de la fétuine-A est suffisant pour observer une différence entre les groupes AR et ANR, mais les différences statistiques sont peu marquées. Il apparaît donc que la protéine dans son intégralité ne peut pas être considérée comme un candidat biomarqueur suffisamment puissant. Par ailleurs, la répétition du dosage de la fétuine-A contenue dans les mêmes échantillons de sérum a montré une grande variabilité dans les résultats. La faible répétabilité et reproductibilité du test commercial utilisé représenterait un obstacle pour des étapes de validation de la fétuine-A en tant que biomarqueur prédictif de l'immunothérapie. Des auteurs ont également souligné des résultats de quantification faiblement corrélés entre différents dispositifs de dosages de la fétuine-A distribués dans le commerce, et suggèrent des spécificités variables selon la glycosylation potentielle de la protéine [555].

Les corrélations observées à l'issue des analyses protéomiques de quantification relative (DIGE et « label free » MS) entre l'amélioration du statut clinique des patients et le

niveau d'expression sérique du candidat biomarqueur fétuine-A (considéré sous la forme de variants acides ou de O-glycopeptides de la protéine, respectivement) sont relativement faibles : le coefficient de corrélation n'excède pas 0.5, pour les deux méthodes d'analyses protéomique, d'après la statistique de Pearson. Ces corrélations modérées peuvent s'expliquer par le fait que les paramètres étudiés et mis en relation dans ces analyses statistiques sont difficiles à quantifier. D'une part, dans le cas des analyses protéomique par DIGE et plus particulièrement par « label free » MS, les quantifications mettent en évidence des variations d'abondance des modifications post-traductionnelles de la fétuine-A. Ces variations fines sont techniquement délicates à quantifier, comme le souligne l'impossibilité de détecter les peptides O-glycosylés de fétuine-A par l'analyse DIGE des échantillons sériques. Il est probable qu'à la suite de la digestion *in gel* des spots de la protéine, les peptides O-glycosylés de fétuine-A ne soient pas extraits du maillage du gel, à cause de leur de forte masse moléculaire et de leur hydrophobicité [556]. Pour ce type de peptides modifiés de fétuine-A, seule une quantification relative en « label free » MS entre les groupes de patients était donc possible, à partir de la connaissance des masses moléculaires des peptides et leur suivi. La reproductibilité du procédé global de quantification par « label free » représente d'ailleurs un paramètre fondamental pour assurer une détection et une quantification non biaisées des peptides d'intérêt. D'autre part, le deuxième critère considéré dans les corrélations est relatif à l'amélioration clinique en fin de traitement. Celle-ci est évaluée par les patients directement, qui attribuent des scores de sévérité variables en fonction des symptômes persistants. Il ne peut donc s'agir que d'une estimation subjective de l'amélioration clinique à l'issue du traitement. De plus, la recherche de biomarqueurs liés à l'efficacité du traitement est compliquée par un effet placébo [557] : la réduction des scores symptomatiques rapportés dans le groupe des patients recevant le comprimé placébo peut atteindre dans cette étude jusqu'à 13%, après un mois de traitement. Enfin, la notion de candidat biomarqueur de l'efficacité de l'ITA s'appuie sur la définition de patients dits « répondeurs » et « non-répondeurs ». Cette séparation des patients est réalisée à partir d'un seuil défini arbitrairement, correspondant dans notre cas à la médiane du pourcentage d'amélioration du score symptomatique obtenu à la fin de la période de traitement dans le groupe des actifs.

Au-delà des difficultés méthodologiques évoquées ci-dessus, les propriétés biologiques mêmes de la fétuine-A peuvent interférer avec son utilisation en tant que biomarqueur de l'ITA. En effet, la fétuine-A est une protéine ubiquitaire, dont la concentration sérique peut être modulée à la suite de processus inflammatoires ou traumatiques. De plus, la

concentration sérique de la protéine peut être dépendante de l'âge des patients [512]. Chez les sujets diabétiques, une association a été observée entre le sexe des patients et la concentration protéique [558]. Certains contextes pathologiques, comme le cancer ou l'auto-immunité, sont également connus pour influencer le glycoprotéome [559-561]. Le statut immunitaire et les pathologies intercurrentes des patients inclus dans les études cliniques d'immunothérapie allergénique devront donc être examinés avec attention. Il s'agit en effet de limiter les facteurs confondants de la concentration en fétuine-A et de l'abondance de ses modifications post-traductionnelles, le plus délicat à considérer étant l'âge des patients.

La validation du peptide O-glycosylé de fétuine-A en tant que biomarqueur de l'efficacité de l'ITA nécessite également d'avoir accès à des échantillons cliniques, dont le traitement avant les analyses protéomiques sera maîtrisé et optimisé pour la recherche de biomarqueurs. Il est souhaitable de s'appuyer sur des échantillons plasmatiques, puisque l'activité protéasique intrinsèque est variable dans les échantillons de sérum. De plus, la variabilité pré-analytique sera normalement réduite dans le cas d'une étude monocentrique, où l'ensemble des prélèvements sanguins subissent plus facilement le même traitement pré-analytique que dans le cas d'une étude multicentrique. Pour la collecte d'échantillons de sérum ou de plasma par exemple, il est en effet recommandé de maîtriser de multiples paramètres. Ces derniers sont relatifs à l'agitation éventuelle de l'échantillon, à la durée de coagulation dans le cas du sérum, au maintien à une température adaptée avant la centrifugation, à la durée et vitesse de centrifugation en elle-même, au volume et au type de tube pour les aliquots obtenus, ainsi qu'au délai jusqu'à leur stockage à -80°C. Dans le cas d'une étude multicentrique, l'effet-centre devra être examiné avec attention, afin de limiter les biais éventuels introduits en lien avec les caractéristiques des centres investigateurs. La maîtrise de l'exposition à l'allergène, de même que la définition de scores cliniques à l'inclusion des patients dans les études, constituent d'autres paramètres qu'il est essentiel de considérer dans les approches de recherche de biomarqueurs prédictifs d'efficacité de l'ITA. L'exposition en chambre à allergènes représente une option adaptée à la maîtrise de la dose et de la durée à laquelle les patients sont soumis à l'allergène [562].

Enfin, la validation de peptides O-glycosylés de fétuine-A en tant que biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'ITA est également très délicate, à cause de l'influence de la glycosylation sur la demi-vie des protéines [563], ainsi que sur leurs interactions [564]. La fétuine-A modifiée peut ainsi interagir avec d'autres protéines, par le biais de ses modifications

post-traductionnelles. Cela représente une limite potentielle pour des études de MS tournées vers la détection et la quantification des peptides modifiés de fétuine-A.

Vraisemblance biologique des marqueurs

Avant une utilisation en pratique clinique, la validation d'un biomarqueur passe en partie par l'évaluation de sa plausibilité biologique, c'est-à-dire la compréhension du rôle éventuel de cette molécule dans la physiopathologie de la maladie ou sa résolution. En effet, un biomarqueur vraisemblable pourra être mis en évidence épidémiologiquement comme un élément caractéristique de la maladie, ou faire partie des éléments mécanistiques de la pathologie. Les variations des valeurs mesurées pour le marqueur seront liées à l'évolution de la maladie [565]. En cancérologie par exemple, l'expression accrue du gène HER2/neu (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) fait partie de la biologie de certaines formes de cancer du sein. Le statut de HER2/neu est donc supposé prédire l'efficacité clinique d'agents thérapeutiques ciblant la voie HER2, comme cela a été confirmé dans plusieurs essais cliniques [566, 567]. En revanche, les biomarqueurs supposés qui ne sont pas intégrés dans les processus pathologiques sont moins susceptibles d'avoir un impact prédictif ou pronostique. Dans certains cas, les marqueurs qui ne représentent pas des éléments caractéristiques de la pathologie peuvent néanmoins être intéressants s'ils prédisent une absence de bénéfice clinique suite à un traitement. Par exemple, les mutations du gène *KRAS* dans le cas du cancer colorectal ne sont pas liées à la mise en place de la pathologie, mais prédisent une absence de bénéfice des traitements basés sur des anticorps monoclonaux anti-EGFR. Ces mutations représentent donc en tant que telles des biomarqueurs prédictifs de grande utilité pour la sélection des patients, étant donnés les effets secondaires importants de ce type de traitement [568]. Les données biologiques ne peuvent cependant pas substituer une validation des candidats biomarqueurs par le biais d'études cliniques et statistiques.

Rôle biologique de la fétuine-A

La fétuine-A est une protéine d'origine hépatique, circulant dans l'organisme. Sa concentration plasmatique chez le fœtus est d'ailleurs très forte, environ 8 fois plus élevée que chez l'adulte, suggérant un rôle de la protéine dans le développement [463]. La protéine est par ailleurs impliquée dans divers contextes inflammatoires, et fait partie de la classe des protéines

de la phase aigüe dont la concentration plasmatique varie en réponse à une inflammation ou un traumatisme [467]. De plus, la fétuine-A a été décrite pour son rôle dans divers contextes pathologiques. Elle est ainsi considérée comme un marqueur de diagnostic pour la sclérose en plaque [531], et sa concentration dans le liquide céphalo-rachidien est plus faible chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à des sujets sains [532]. Récemment, une étude a montré l'implication de la protéine dans la voie de signalisation contrôlée par TLR4, conduisant à la résistance à l'insuline [511]. En particulier, les auteurs présentent certains motifs de glycosylations de la protéine (les résidus Hex-Neu5Ac et les motifs de N-glycosylations) indispensables pour l'interaction avec TLR4. D'autres fonctions biologiques de la protéine, sous la dépendance de ses modifications post-traductionnelles, ont été décrites. En particulier, les phosphorylations [569], ainsi que les sialylations de la protéine ont une influence dans la mise en place de certaines conditions pathologiques. Ainsi, une étude protéomique a mis en évidence que des nouveaux-nés atteints de troubles de croissance intra-utérine possédaient majoritairement des protéoformes de fétuine-A pour lesquelles les acides sialiques terminaux sont manquants [547]. La sialylation de la protéine est également altérée chez des patients souffrant d'arthrite rhumathoïde [490] ou atteints d'un cancer du pancréas [570]. La fonction de la fétuine-A dans des réactions d'inflammations chroniques est donc sous la dépendance, au moins partiellement, de ses résidus carbohydratés.

Résultats fonctionnels obtenus dans les modèles humains

Une éventuelle implication des protéoformes de la fétuine-A dans l'établissement de la réponse allergique, ou sa résolution au cours des traitements d'immunothérapie allergénique, n'a cependant pas été démontrée à ce jour. Dans cette perspective, nous avons étudié l'implication de la protéine dans différents systèmes fonctionnels modélisant l'inflammation allergique ou sa résolution. Un premier modèle *in vitro* a porté sur l'étude de l'effet de la fétuine-A sur des DCs dérivées des monocytes (MoDCs). D'un point de vue pratique, ces cellules présentent l'avantage de pouvoir être générées et différenciées (en présence d'IL-4 et de GM-CSF) dans un milieu de culture synthétique, sans sérum. Le modèle cellulaire n'est donc pas biaisé par l'ajout de FBS (*Fetal Bovine Serum*) contenant environ 20 mg/mL de fétuine-A. En outre, les DCs représentent une population cellulaire essentielle pour l'induction des réponses de type Th2, comme l'ont montré divers modèles expérimentaux animaux [77, 571, 572] ou humains [573, 574]. L'étude de l'effet de la fétuine-A dans un modèle cellulaire

impliquant des DCs, qui par ailleurs expriment le TLR4, est donc pertinente physiologiquement. Les moDCs stimulées par de la fétuine-A montrent une augmentation de la polarisation de type DC1 (pro-Th1) induite par le LPS, *via* le TLR4. Ces expériences suggèrent pour la fétuine-A un rôle d'adaptateur pour les endotoxines. De plus, la fétuine-A favorise l'activation de DCs de type 2, qui orientent vers les réponses lymphocytaires effectrices de type Th2. La réponse des DC2 à des extraits allergéniques est par ailleurs accrue en présence de fétuine-A. Nous avons également mis en évidence que l'effet pro-inflammatoire dans ce modèle cellulaire était abrogé lorsqu'une forme désialylée de la protéine est considérée. La fonction « adaptatrice » de la fétuine-A serait donc partiellement contrôlée par les acides sialiques aux extrémités des motifs glycanniques de la protéine. Ces résultats ont été validés dans un système cellulaire différent : des cellules HEK-hTLR4 rapportrices de l'activité du TLR4 ont été cultivées dans un milieu privé de sérum, et stimulées par du LPS, éventuellement supplémenté de fétuine-A ou d'asialofétuine-A. L'activation de la voie de signalisation du TLR4 lors de la stimulation par du LPS est largement supérieure lorsque de la fétuine-A sialylée est ajoutée, par rapport aux conditions de culture incluant de l'asialofétuine-A.

Résultats fonctionnels obtenus dans les modèles murins

L'implication du candidat biomarqueur fétuine-A a également été étudiée fonctionnellement dans un modèle murin d'asthme allergique. Ce type de modèle comprend une phase d'immunisation systémique, généralement effectuée par l'administration de l'allergène en présence d'un adjuvant par voie intra-péritonéale, suivie d'une exposition respiratoire répétée à l'allergène [575]. Les souris de la souche BALB /c sont couramment utilisées car elles présentent une tendance génétiquement déterminée à développer des réponses de type Th2 [576]. De plus, les asthmes murins et humains montrent d'importantes similitudes. Dans les deux cas, l'inhalation de l'allergène entraîne la sécrétion de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), de même qu'une hyperplasie des cellules caliciformes, une sécrétion accrue de mucus, la dégranulation des mastocytes, ou encore l'hyperréactivité des voies respiratoires ou le recrutement des éosinophiles, lymphocytes et neutrophiles dans les poumons [577]. L'effet de la fétuine-A au cours de la réponse inflammatoire de l'asthme allergique a été étudié, en mettant en œuvre un modèle dans lequel l'expression de la protéine est réprimée. Des séquences d'ARN interférant ont ainsi été administrées de façon répétée aux souris, pour induire la diminution de l'expression de la fétuine-A. Cette stratégie est avantageuse par

rapport au recours à une souche d'animaux génétiquement modifiés pour être déficitaires en fétuine-A. En effet, les souris déficitaires en fétuine-A sont plus fragiles et peuvent développer des troubles systémiques, en lien avec une hypercalcification des tissus mous. Dans nos expériences, le modèle d'asthme allergique a également été optimisé pour que la dose d'allergène administrée n'entraîne pas d'effets trop marqués, qui masqueraient un effet positif ou négatif de la fétuine-A sur l'hyperréactivité bronchique. *In vivo*, l'ensemble des analyses et la répétition du modèle expérimental ont montré que la répression de l'expression de la fétuine-A est associée à une exacerbation de la réponse allergique. Par ailleurs, des BMDCs (*Bone Marrow-derived Dendritic Cells*) de souris stimulées par du LPS montrent bien une réponse pro-Th2, mais la supplémentation avec de la fétuine-A (humaine) n'accroît pas cette réponse. Ces expériences *in vitro* sur des BMDCs murines n'ont donc pas permis de retrouver l'effet synergique de la fétuine-A et du LPS sur l'activation du TLR4, observé dans les modèles cellulaires humains.

Confrontation des résultats fonctionnels

Les résultats obtenus à l'issue des modèles fonctionnels *in vitro* chez l'Homme et *in vivo* chez la souris ne sont pas concordants, comme le résume la figure 30. En effet dans les modèles cellulaires humains, la stimulation des moDCs par de la fétuine-A contribue à activer des mécanismes pro-inflammatoires en présence d'allergènes. À l'inverse, la déplétion de 50% de la fétuine-A du sang périphérique de souris entraîne une exacerbation de l'hyperréactivité bronchique et des réponses Th2, dans un modèle d'asthme allergique. Néanmoins, les modèles fonctionnels ne peuvent pas être directement comparés : les modèles cellulaires *in vitro* ne portent que sur une partie du mécanisme de la réaction allergique, tandis que les modèles *in vivo* peuvent refléter des phénomènes plus larges et complexes, impliquant différents types cellulaires.

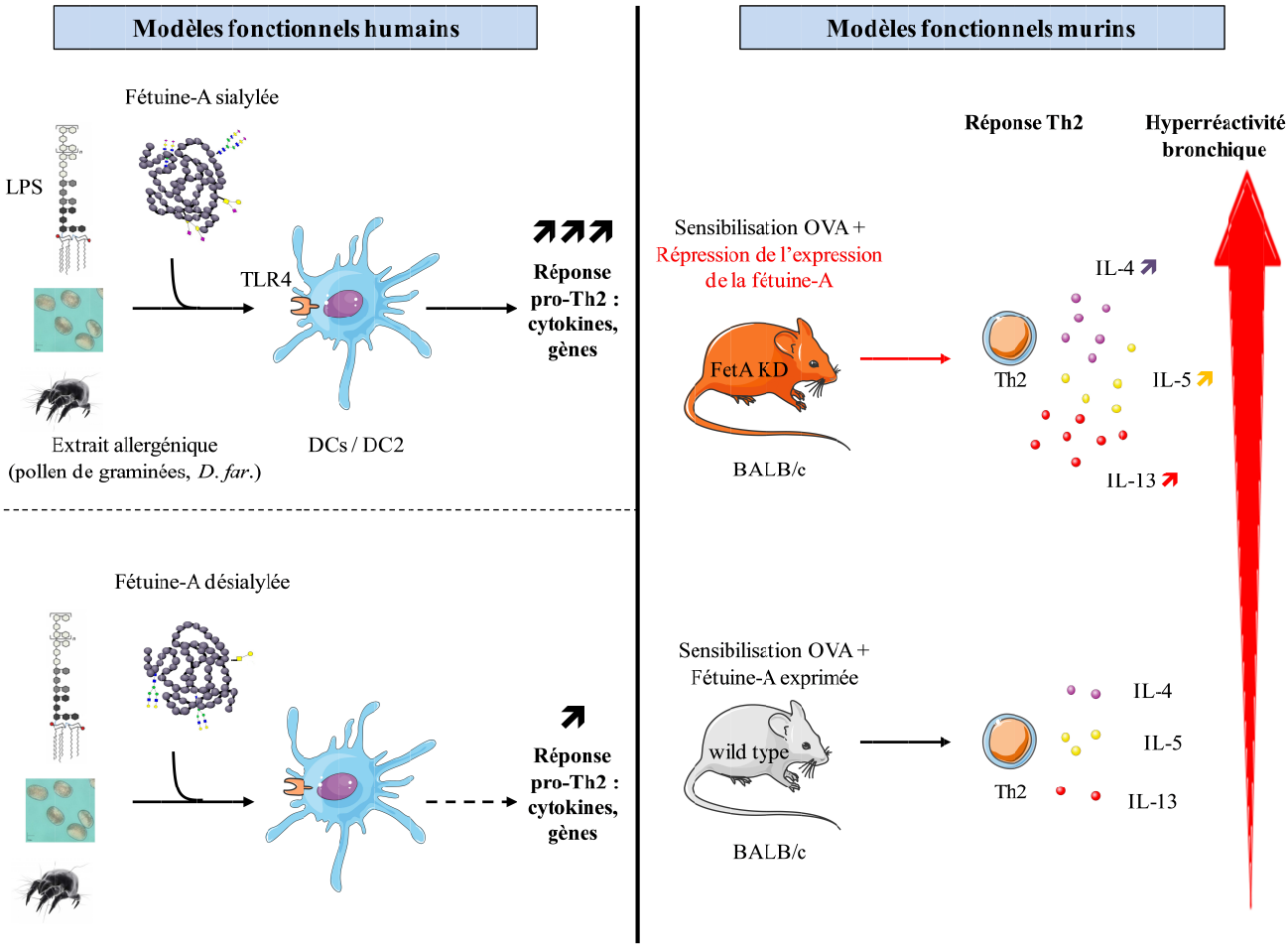


Figure 30 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les études fonctionnelles.

Il est cependant possible d'émettre des hypothèses pour expliquer ces résultats *a priori* contradictoires. L'alignement des séquences protéiques des formes humaine et murine de la fétuine-A montre en effet que les protéines ne partagent que 59% d'identité de séquence. De plus, certains résidus de la séquence humaine sont connus pour porter des modifications post-traductionnelles, et ne sont pas conservés au sein de la séquence murine : seuls 3 sites de N-glycosylation sont décrits chez la souris [578, 579]. Les différences de fonctions de la fétuine-A dans les modèles fonctionnels peuvent donc être en partie liées aux variations dans les structures primaires des protéines. Par ailleurs, le modèle murin considère l'effet de la fétuine-A dans son intégralité, par le biais de la répression de son expression, sans examiner l'implication des modifications post-traductionnelles de la protéine. Les modèles *in vitro* chez l'Homme ont cependant montré que la fétuine-A module l'activation des cellules présentatrices d'antigène par TLR4 *via* des modifications post-traductionnelles spécifiques, à savoir ses acides sialiques terminaux. Les effets variables dus à la fétuine-A humaine ou murine peuvent donc aussi être liés à des modifications post-traductionnelles différentes entre les deux

homologues de la protéine. Afin de mieux comprendre les différences fonctionnelles observées dans les modèles, la caractérisation fine des motifs de glycosylation de la fétuine-A murine a été réalisée. L'analyse en spectrométrie de masse d'un échantillon de sérum de souris BALB/c enrichi par immunocapture en fétuine-A a permis d'identifier et caractériser deux sites de O-glycosylation non décrits jusqu'à présent. Les motifs glycanniques présents sur un site de la séquence protéique ont été mis en évidence : l'acide sialique terminal éventuellement présent sur ce site de O-glycosylation correspond à un motif d'acide N-glycolylneuraminique, qui ne peut être synthétisé chez l'Homme. En revanche, l'acide N-acétylneuraminique, qui avait été observé sur les O-glycosylations de la fétuine-A humaine, n'est pas observé chez la souris. Par ailleurs, le deuxième site de O-glycosylation identifié sur la séquence de la fétuine-A murine n'est pas sialylé. Les différences constatées au niveau des modifications post-traductionnelles (en particulier les O-glycosylations) portées par la fétuine-A humaine et son homologue murin, constituent un degré de variabilité supplémentaire entre les protéines, pouvant contribuer aux variations fonctionnelles observées entre les modèles humain et murin.

Étude des interactions physiques entre la fétuine-A, le LPS et TLR4

Les mécanismes d'interactions entre les composés impliqués dans l'induction de la réponse Th2 demeurent à clarifier. En effet, si fonctionnellement un lien a été observé entre l'augmentation de l'activation de la voie de signalisation du TLR4 et la présence de fétuine-A sialylée en supplément d'endotoxines, l'interaction physique entre les différents composés est difficile à établir. Par des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR pour *Surface Plasmon Resonance*), l'interaction couramment décrite [580] entre le LPS et le complexe TLR4-MD2 a été vérifiée. De plus, nous avons constaté une liaison de la fétuine-A ou de l'asialofétuine-A au LPS. Cependant, de façon étonnante, la présence de fétuine-A lors de l'injection de LPS sur le complexe TLR4-MD2 immobilisé n'entraîne pas d'augmentation de la réponse associée à la liaison entre le LPS et TLR4-MD2. La synergie constatée dans les modèles fonctionnels n'est donc pas observée dans les études d'interaction physique. Par ailleurs, les expériences de SPR ont montré que la fétuine-A (ou l'asialofétuine-A) ne se liait pas au TLR4-MD2 dans nos conditions expérimentales. Ceci est en adéquation avec les résultats fonctionnels obtenus, mais en contradiction avec des données récentes de la littérature [511]. De plus, le lien entre la fétuine-A et la mise en place de réactions de l'immunité innée a également été étudié dans d'autres systèmes cellulaires. Ainsi, des macrophages primaires,

connus pour exprimer le TLR4, ont été cultivés dans un milieu sans sérum et stimulés par du LPS en présence éventuelle de fétuine-A. Contrairement aux observations attendues, la fétuine-A n'entraîne pas d'accroissement de la réponse inflammatoire des macrophages stimulés par du LPS. Ces différents résultats nous conduisent à supposer que la protéine n'interagit pas directement avec le TLR4, et que l'activation accrue de la voie de signalisation par le LPS, lorsque la fétuine-A est présente dans les conditions de culture, requiert d'autres intervenants cellulaires. L'induction d'une réponse inflammatoire par des endotoxines est en effet connue pour résulter de l'action coordonnée et séquencée de quatre protéines principales liant les endotoxines : la LBP (*LPS-binding protein*), CD14, MD-2, et enfin TLR4 [581]. La cinétique de liaison de la fétuine-A à l'une ou l'autre de ces quatre protéines demeure à déterminer.

Hypothèses formulées à l'issue des études fonctionnelles

Les résultats obtenus dans les différents modèles et l'étude de la bibliographie nous permettent de proposer certaines hypothèses relatives aux mécanismes d'action de la fétuine-A.

À l'issue des études *in vitro* chez l'Homme, nous pouvons faire la supposition suivante : la fétuine-A agirait de façon analogue à la LBP, en se liant au LPS, et en le présentant éventuellement à CD14, déclenchant ainsi la voie de signalisation de TLR4 induite par le LPS. En effet, la voie d'activation du TLR4 par le LPS n'est pas nécessairement dépendante de CD14 [582], qui est par ailleurs absent dans nos modèles *in vitro* relatifs aux DCs. Le mécanisme proposé est représenté en figure 31. La fétuine-A, rendue hydrophile par ses unités oligosaccharides, présenterait une affinité pour les sucres de cœur et la partie du LPS appelée O-antigène, qui correspond à la répétition d'unités oligosaccharides. La fétuine-A présente dans le sérum pourrait ainsi, par le biais de ses modifications post-traductionnelles et plus particulièrement les acides sialiques terminaux, réduire l'énergie de liaison des monomères de LPS, ou se lier aux endotoxines présentes avec les extraits allergéniques. Dans les modèles ou CD14 est présent, cela pourrait favoriser la présentation de l'unité lipidique (lipide A) du LPS à CD14 ainsi que sa protection. Dans une étape consécutive classique, le lipide A subit une translocation dans la cavité hydrophobe de MD-2. Les extrémités polaires du lipide A sont également stabilisées par des interactions électrostatiques avec la partie terminale de MD-2 [583]. Enfin, l'interaction de MD-2 avec le TLR4 par un réseau de liaisons hydrogène conduit à un réarrangement de ce dernier, ainsi qu'à l'association de ses domaines intracellulaires. Le recrutement de protéines adaptatrices se met alors en place, par les voies de signalisation

dépendant ou non de MyD88. L'activation consécutive du facteur de transcription NF-κB entraîne la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, et la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse mécanistique en analysant la voie de signalisation de NF-κB et sa modulation éventuelle à la suite de stimulations des cellules par la fétuine-A, notamment en Western-Blot.

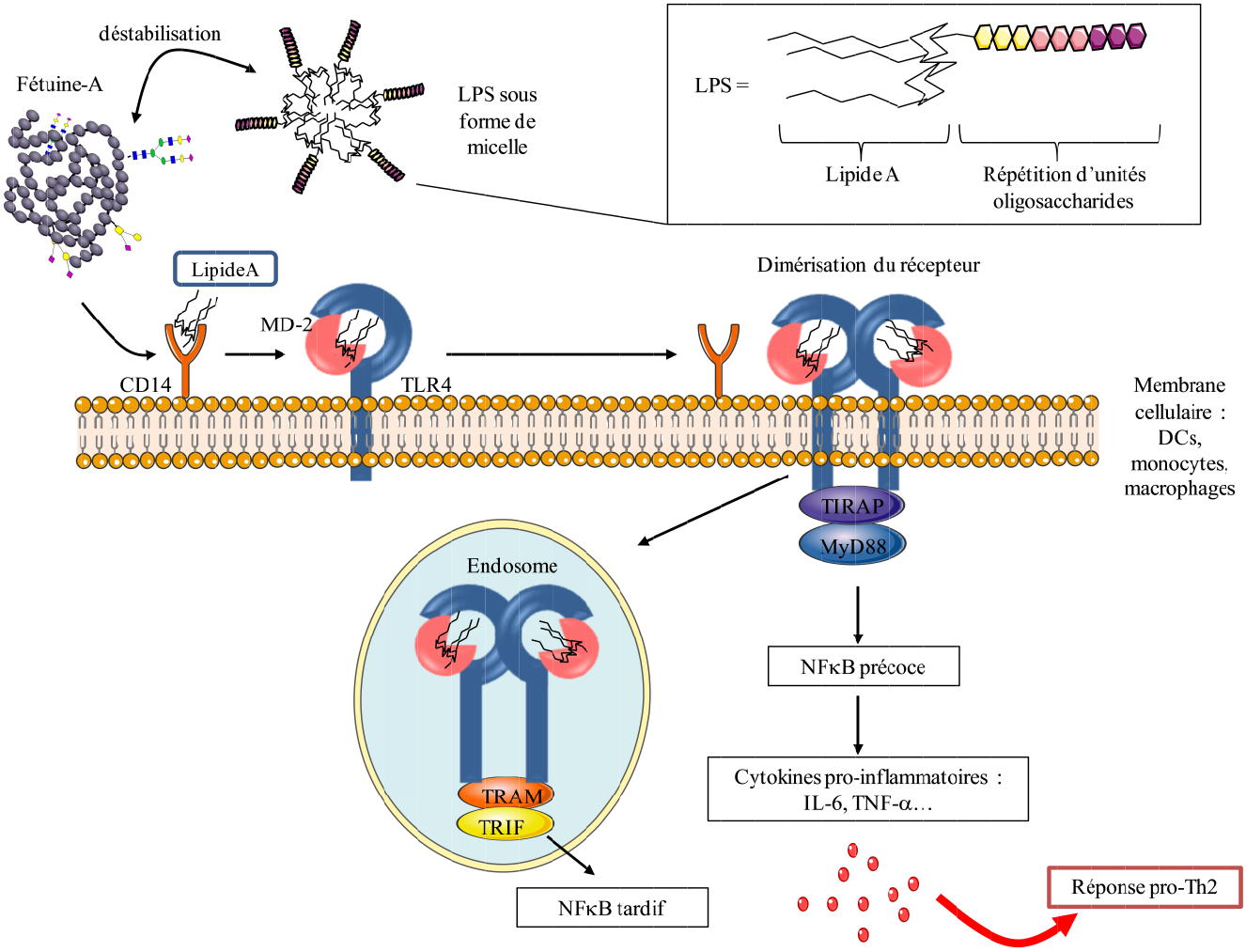


Figure 31 : La fétuine-A favoriserait l'activation du récepteur TLR4 par le LPS.

La déstabilisation des monomères de LPS par les glycosylations de la fétuine-A favoriserait la présentation de la partie lipidique du LPS à CD14, puis sa translocation dans la cavité hydrophobe du co-récepteur MD-2. L'interaction entre MD-2 et TLR4 conduit à une dimérisation de ce dernier et l'activation du facteur de transcription NF-κB. Les signaux pro-inflammatoires induits favoriseraient le maintien et l'amplification d'une réponse Th2.

À l'issue des études fonctionnelles chez la souris, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'effet anti-inflammatoire observé de la fétuine-A serait lié à une interaction entre cette dernière et la protéine HM-GB1, au cours de la sensibilisation allergique. En effet, dans des modèles murins d'inflammation systémique létale, des auteurs ont montré que la supplémentation en fétuine-A réprimait la sécrétion d'HM-GB1 par des macrophages, et entraînait un taux de survie des animaux accru [487]. De plus, une étude récente a mis en évidence que la neutralisation de la protéine HM-GB1entraînait la réduction de l'inflammation allergique induite par les acariens [584]. D'autres auteurs ont souligné le rôle de la protéine HM-GB1, sécrétée par des DCs en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, pour le maintien de l'expansion clonale et la survie des LTs CD4+, ainsi que pour leur polarisation [585]. Il serait intéressant pour vérifier cette hypothèse de doser la protéine HM-GB1 dans les sera et les surnageants de culture de BMDCs provenant de souris sensibilisées et pour lesquelles l'expression de la fétuine-A est réprimée. Le lien proposé entre la fétuine-A et la protéine HM-GB1 est schématisé en figure 32.

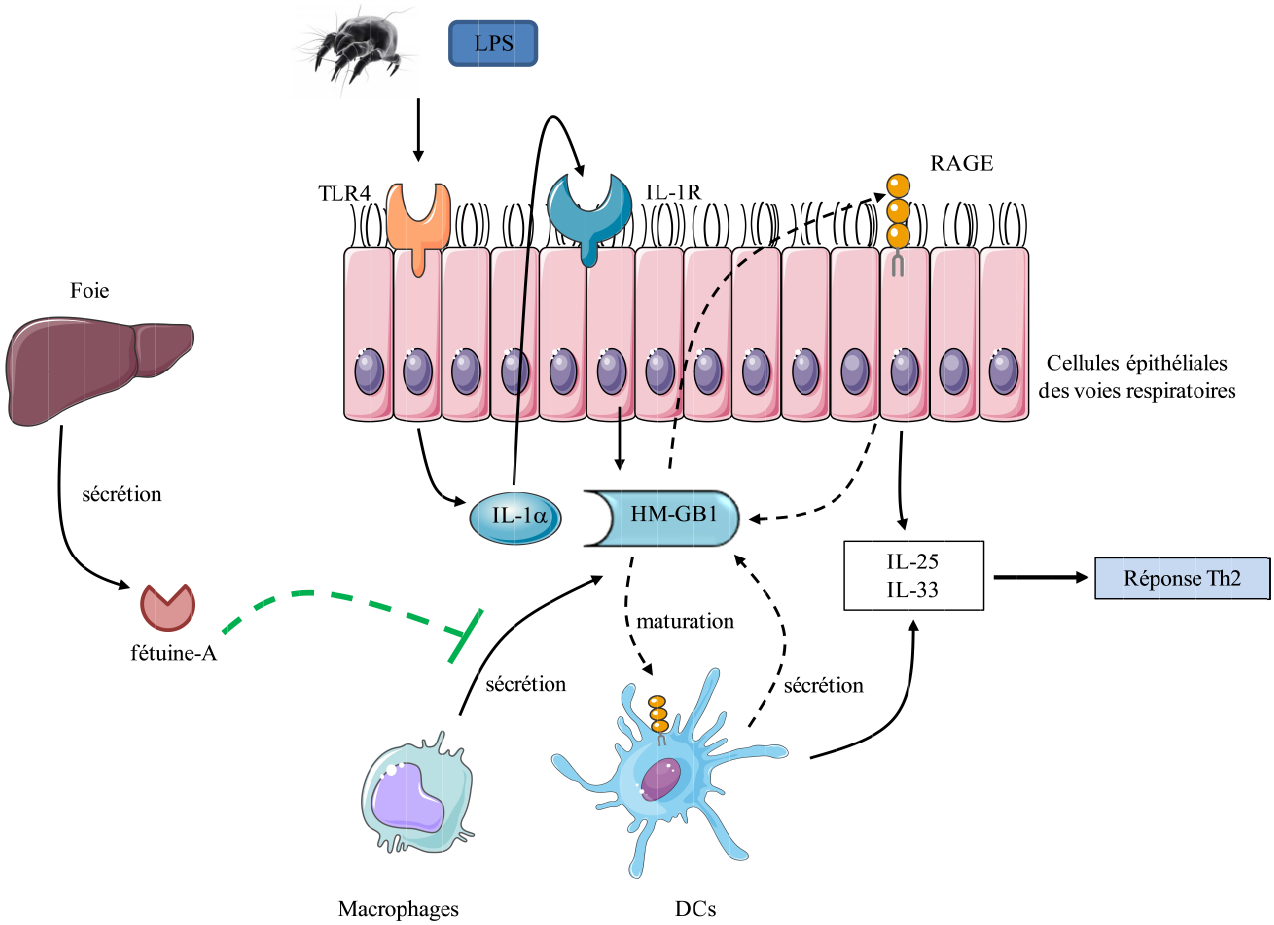


Figure 32 : Proposition d'un mécanisme protecteur de la fétuine-A au cours de la sensibilisation allergique chez la souris (adapté de [356] et [487]).

L'activation de TLR4 par des aéro-allergènes entraîne la sécrétion de l'IL-1α, l'activation de la voie de signalisation du récepteur à l'IL-1 (IL-1 R) et la sécrétion de la protéine HM-GB1. HM-GB1 induit la sécrétion des cytokines Il-25 et IL-33 par les cellules épithéliales. L'activation du récepteur RAGE à la surface des cellules épithéliales dans ce mécanisme demeure à démontrer. L'activation de la voie de signalisation de RAGE maintient et amplifie l'expression d'HM-GB1 au niveau des cellules épithéliales, active les DCs et met en place des réponses Th2. L'engagement de RAGE au niveau des DCS, sous le contrôle de HM-GB1 dérivant des cellules épithéliales, n'est pas démontré à ce jour. Les DCs et les cellules épithéliales peuvent entraîner une boucle positive d'activation, dans la voie de signalisation liée au couple HM-GB1 – RAGE, et contribuer à la propagation de la réponse allergique. La fétuine-A pourrait exercer un rôle protecteur, en réprimant l'expression de la protéine HM-GB1 par les macrophages.

Futures études envisagées pour la validation et la recherche de nouveaux biomarqueurs

La validation des peptides O-glycosylés de fétuine-A en tant que biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA demeure donc l'enjeu principal du devenir des candidats. Il est essentiel pour cela de disposer d'échantillons cliniques traités dans des conditions optimales pour une analyse protéomique consécutive. Dans cette optique, le design d'études cliniques adaptées à la recherche de biomarqueurs peut être envisagé. De telles études incluent une évaluation des symptômes avant et après traitement, puisque l'établissement d'un état basal des symptômes permet d'estimer l'amélioration clinique de chaque patient à l'issue du traitement. De plus idéalement, le traitement dans ce type d'étude est suivi pendant une durée suffisamment longue pour observer une importante efficacité clinique. Celle-ci pourra d'ailleurs être établie par des paramètres cliniques (interrogatoires des patients) et immunologiques (comme des marqueurs de tolérance accrus en fin de traitement). La chambre d'exposition présente l'avantage de permettre la maîtrise et l'uniformisation de la dose et la qualité d'allergène auxquelles les patients sont exposés. D'autres protocoles cliniques peuvent être envisagés, incluant par exemple un challenge allergénique avant et après traitement et une exposition naturelle à l'allergène entre ces deux challenges. De tels protocoles permettraient en effet d'obtenir une quantification des symptômes suite à une exposition maîtrisée aux bornes du traitement, qui évolueraient au cours de la thérapie mise en place de façon concomitante à une exposition naturelle.

Les laboratoires Stallergenes mettront en œuvre rapidement une étude quantitative des O-glycopeptides de fétuine-A à partir d'échantillons de sérum provenant de patients allergiques aux acariens, et inclus dans une étude de phase II/III dont l'efficacité clinique a été démontrée. La spectrométrie de masse ciblée, sur des appareils incluant un triple-quadripôle, constitue la méthode de référence pour la validation de candidats biomarqueurs peptidiques. En effet, la spectrométrie de masse ciblée apporte une solution adaptée en termes de sensibilité et de débit d'analyse, et les perfomances de sélectivité se sont considérablement améliorées. Dans ces approches, l'utilisation de peptides synthétiques, marqués par des isotopes, représente une stratégie courante pour la quantification absolue de candidats biomarqueurs. Il est théoriquement possible de synthétiser les peptides O-glycosylés d'intérêt de la fétuine-A. Cependant en pratique, la longueur du peptide considéré, la spécificité des modifications et de leurs sites d'attachement rendraient cette synthèse très délicate, avec un rendement probablement très faible. À défaut de pouvoir détecter et quantifier de manière absolue les O-

glycopeptides de fétuine-A par ce type d'approche, la méthode « label free » MS devra être optimisée pour favoriser la détection des peptides O-glycosylés de fétuine-A, de poids moléculaires élevés. Nous avons considéré le développement de méthodes de quantification des O-glycopeptides de fétuine-A après des méthodes d'enrichissement des sera en glycoprotéines. Un traitement du sérum par des billes sur lesquelles sont greffées de la Concanavaline-A – une lectine dont l'affinité est spécifique des résidus mannose et hexose – permet d'enrichir spécifiquement les échantillons en glycoprotéines. Le milieu analytique est donc moins complexe et l'analyse MS concentrée sur les glycoprotéines. Cette approche d'enrichissement en glycoprotéines avant l'analyse en « label free » MS a montré de bonnes performances en termes de sensibilité, de spécificité, ainsi que de linéarité pour la détection des O-glycopeptides de fétuine-A. Cependant, les étapes pré-analytiques nécessaires limitent le débit de cette méthode de préparation des échantillons, qui est donc peu transposable à grande échelle pour la validation des candidats biomarqueurs. La déplétion des protéines majoritaires du sérum demeure donc une approche de choix pour la préparation des échantillons de sérum, en vue de la validation de candidats marqueurs peptidiques. En effet, une très bonne répétabilité, ainsi que la possibilité d'automatiser partiellement la déplétion, représentent des avantages majeurs dans une perspective de recherche ou de validation de biomarqueurs sur de larges cohortes cliniques.

Techniques alternatives pour la recherche de biomarqueurs associés à l'ITA

Il serait également intéressant que les analyses protéomiques mises en œuvre sur une nouvelle cohorte clinique permettent d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA. La robustesse d'un test compagnon développé à partir de plusieurs marqueurs est en effet meilleure que celle d'un test s'appuyant sur un marqueur unique. La combinaison de plusieurs marqueurs apporte un gain en termes de sensibilité, puisque les phénotypes pathologiques peuvent être caractérisés par une « signature » moléculaire. Dans ce sens, la recherche de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des traitements d'ITA peut également s'accompagner d'une étude *in silico* à l'aide de logiciels spécifiques, comme IPA développé par la société Ingenuity. Ces approches permettent de mettre en évidence des mécanismes, des interactions entre des composés, et ainsi de suggérer de nouvelles pistes exploratoires [586, 587]. Les autres méthodes des « Omics », à savoir la génomique, la transcriptomique et la métabolomique, constituent également d'autres approches de recherche de marqueurs largement déployées, du fait des technologies de pointe associées et

des larges jeux de données générés, permettant d'accéder à des combinaisons de marqueurs potentiels. Par ailleurs, le recours à des marqueurs de suivi de l'efficacité de l'ITA permet d'accéder à une estimation plus objective de l'amélioration clinique en fin de traitement que l'évaluation symptomatique par les patients. Il est donc intéressant d'étudier l'association éventuelle entre des candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA et des marqueurs de suivi d'efficacité. Dans l'étude VO56.07A relative à l'allergie aux graminées (exposition en chambre), nous constatons par exemple que l'abondance sérique du O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A (O-glycopeptide 3) avant traitement est corrélée de façon significative avec l'expression du marqueur de suivi d'efficacité C1Q [237] à l'issue du traitement. Cette association est observée uniquement dans le groupe des patients traités par le comprimé actif, comme représenté dans la figure 33.

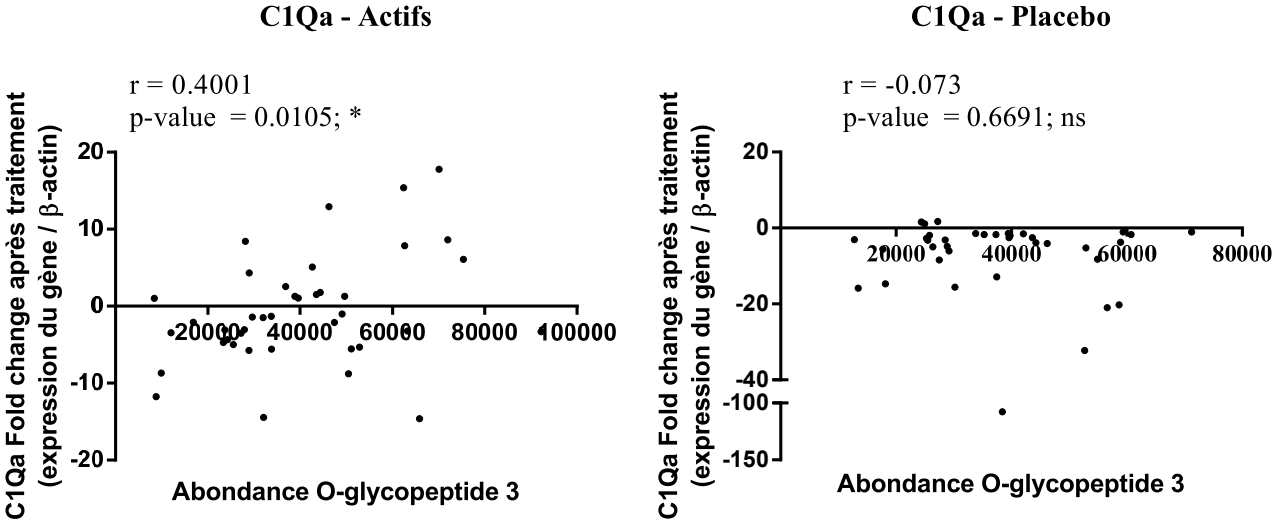


Figure 33 : L'abondance sérique avant traitement du O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A est corrélée à l'expression génique du marqueur d'efficacité C1Qa à l'issue de 4 mois d'ITA aux pollens de graminées.

La variation du niveau d'expression du marqueur génique d'efficacité C1Qa entre le début et la fin du traitement d'ITA (après 4 mois) est estimée par qPCR et représentée en fonction du niveau d'abondance sérique du O-glycopeptide tétrasialylé de fétuine-A (O-glycopeptide 3), quantifié en « label free » MS dans les échantillons prélevés avant ITA. Le test de corrélation de Pearson est utilisé pour l'analyse statistique (significatif pour une p-value ≤ 0.05).

Dans notre étude, si les peptides O-glycosylés de fétuine-A sont validés cliniquement dans une nouvelle étude comme biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA, des étapes de développement de tests compagnons associés à une détection de ces marqueurs pourront être

envisagées. Des tests préliminaires ont été mis en oeuvre au laboratoire, par analogie à ceux développés pour la quantification de la sialylation de la transférrine [588]. Ces tests sont nommés ABELLA pour décrire leur principe : *Antibody Based Enzyme Linked Lectin Assay*. Ils s'appuient sur une capture de la protéine d'intérêt par immunoaffinité, suivie d'une détection du signal émis par un lectine, couplée à l'enzyme HRP. La lectine sélectionnée pour le développement de ce test, la SNA, est spécifique de la liaison en α2,6 des acides sialiques avec un groupement N-acétylgalactosamide (GalNAc). Or la caractérisation analytique des peptides O-glycosylés de fétuine-A a montré que ce type de liaison entre les acides sialiques terminaux et le reste du motif glycannique n'était présent que sur les peptides notés O-G2 et O-G3, dont les niveaux d'abondances sériques sont corrélés à l'amélioration clinique, chez les patients actifs. Le dosage par la méthode ABELLA des échantillons de sérum provenant de patients allergiques aux graminées et ayant permis d'identifier les candidats biomarqueurs n'a cependant pas permis d'observer de différences de signal statistiquement significatives entre les groupes de patients. En particulier, les densités optiques liées à la liaison de la lectine SNA aux acides sialiques greffés à la fétuine-A ne sont pas associées à l'amélioration clinique en fin de traitement. Si la spécificité de la lectine est élevée pour les liaisons en α2,6 entre les acides sialiques et les groupements GalNAc, il est fort probable que la lectine se lie à la fois aux acides sialiques présents sur les motifs de O-glycosylation de la protéine, mais aussi sur les motifs de N-glycosylation. Cette liaison aux acides sialiques des motifs de N-glycosylation peut masquer les différences liées aux variations d'abondances des sialylations portées par les O-glycopeptides de la fétuine-A, entre les groupes de patients traités. Le dosage ABELLA n'est donc pas adapté à la quantification des niveaux d'abondances des sialylations des O-glycopeptides de fétuine-A, mais peut être utilisé comme test de contrôle lors de préparations de réactifs protéiques désialylés.

Développement d'un test compagnon pour l'ITA

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse ciblée représente donc la méthode de choix pour la validation de candidats biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA. Si l'équipement de pointe requis peut constituer une limite au déploiement d'un dosage en routine des biomarqueurs, les appareils sont néanmoins de plus en plus répandus en milieu hospitalier, du fait des nombreuses applications en biologie médicale. La spectrométrie de masse est ainsi couramment utilisée pour l'analyse de la vitamine D [589], ou permet de diagnostiquer

certaines pathologies héréditaires du métabolisme comme les aminoacidopathies [590, 591], les déficits du cycle de l'urée [592] ou les déficits de la β-oxydation des acides gras [593]. La spectrométrie de masse est également répandue pour son application en clinique, pour l'identification de micro-organismes par leurs empreintes moléculaires, dans l'approche appelée « biotyping » [594]. Des couplages entre les systèmes de MS et d'imagerie se sont par ailleurs développés, avec des applications importantes dans la recherche biomédicale, et notamment pour le diagnostic et la découverte de marqueurs pronostics ou liés aux traitements [595]. La validation clinique de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA, ainsi que le développement d'une méthode de détection associée, permettrait aux allergologues de s'appuyer sur un « test compagnon » pour améliorer la sélection des patients pour lesquels le traitement serait le plus efficace. L'ITA comprend en effet de longues périodes de traitement, qui peuvent décourager des patients pour lesquels le bénéfice clinique serait réel. L'utilisation de biomarqueurs prédictifs permettrait donc indirectement d'accroître la confiance dans les traitements, et ainsi le taux de pénétration de même que l'observance au traitement. Il est cependant délicat de définir un seuil de sélection des patients pour les traitements d'ITA, en fonction de la quantification d'une combinaison idéale de biomarqueurs prédictifs d'efficacité (incluant par exemple le niveau d'abondance sérique en peptides O-glycosylés de fétuine-A). Une telle valeur seuil doit en effet inciter à inclure dans les protocoles d'ITA les patients pour lesquels un bénéfice clinique est net, sans pour autant être trop sélective, puisque les effets secondaires de l'ITA sont limités et que le traitement peut néanmoins être bénéfique à des patients dont les symptômes sont peu marqués. Le développement de tests compagnons s'appuyant sur des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA représente également un enjeu économique, puisque l'augmentation du taux de pénétration du traitement serait associée à une diminution des coûts liés à la prise en charge des traitements symptomatiques [596]. La validation de tels biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de l'ITA représenterait donc un réel bénéfice pour les allergologues, en tant qu'outils d'aide à la décision, mais surtout pour les patients sélectionnés pour l'ITA sur la base d'un critère objectif, qui trouveraient alors l'assurance d'un traitement adapté et efficace.

CONCLUSION

Le présent travail a permis d'identifier par spectrométrie de masse les modifications post-traductionnelles (PTMs) portées par la fétuine-A liées aux différents isoformes de la protéine, et associées à une réponse clinique positive à l'ITA. Une analyse en spectrométrie de masse « label free » a ensuite été réalisée sur les mêmes échantillons cliniques de sérum collectés avant le traitement. Cette étude a confirmé que certaines PTMs portées par des O-glycopeptides de la fétuine-A sont surexprimées chez les patients pour lesquels l'amélioration clinique est la plus marquée au cours du traitement d'ITA.

La deuxième partie du travail a consisté à étudier les implications du candidat biomarqueur fétuine-A au cours de l'inflammation allergique ou sa résolution. Pour cela, les effets de la forme native et d'une forme modifiée de la protéine, ayant subi l'hydrolyse des acides sialiques terminaux portés par les PTMs, ont été comparés dans différents modèles cellulaires humains. Ces expériences ont montré que la fétuine-A agit de manière synergique avec le LPS, en engageant le récepteur TLR4 *via* ses acides sialiques, et accroît par cette voie l'inflammation Th2. *In vivo* cependant, la répression de l'expression de la protéine exacerbe l'hyperréactivité bronchique et la réponse pro-inflammatoire, dans un modèle murin d'asthme allergique. Ces résultats fonctionnels controversés peuvent être en partie dus aux différences dans les structures primaires des protéines homologues, et éventuellement aux variations des modifications post-traductionnelles.

Les formes O-glycosylées sialylées de la fétuine-A constituent donc d'intéressants candidats biomarqueurs pour prédire le bénéfice clinique à la suite d'une ITA. Il est essentiel de valider les candidats biomarqueurs identifiés dans de plus larges cohortes cliniques, ainsi que d'évaluer leur pertinence dans d'autres types d'allergies, comme au pollen de bouleau ou aux acariens. Si les candidats biomarqueurs sont validés, ils constitueront de nouveaux outils décisionnels pour les allergologues, pour faciliter l'orientation des patients vers une stratégie thérapeutique dont la probabilité de succès sera meilleure.

Cette étude représente une véritable preuve de concept, montrant qu'il est possible d'identifier des biomarqueurs déterminant avant l'ITA le bénéfice clinique apporté par un tel traitement aux patients.

PUBLICATION – BREVET – COMMUNICATIONS ORALES

1. Publication

Sialylated glycoforms of FetA in the blood of allergic patients predict their likelihood to benefit from allergen immunotherapy

Caillot N., Bouley J., Jain K., Mariano S., Chenau J., Horiot S., Beauvallet C., Devillier P., Chollet-Martin S., Kellenberger C., Lombardi V., Nony E., Chabre H., Batard T., Baron-Bodo V., Moingeon P.

En préparation.

2. Brevet

Sialylated Fetuin-A as a marker of immunotherapy efficacy

Caillot N., Bouley J., Lombardi V., Nony E., Batard T., Baron-Bodo V., Moingeon P.

European patent application No.14306857.5

3. Communications orales

- Identification of a candidate biomarker predicting clinical benefit during allergen immunotherapy.
  Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 10 juin 2014, Copenhague, Danemark.

- Identification d'un candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie allergénique.
  Journées de l'École Doctorale 425, Innovation thérapeutique, 17 juin 2014, Châtenay-Malabry, France.

- Predicting efficacy of allergy vaccines using a serum biomarker.
  Poster présenté au Colloque du Club de Vaccinologie, 21 janvier 2013, Paris, France.

ANNEXES

1. Résultats cliniques de l'étude VO56.07A

Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber

F. Horak, P. Zieglmayer, R. Zieglmayer, P. Lemell, P. Devillier, A. Montagut, M. Mélac, S. Galvain, S. Jean-Alphonse, L. Van Overtvelt, P. Moingeon, M. Le Gall

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, 124, 471-477

Rhinitis, sinusitis, and upper airway disease

Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber

Friedrich Horak, MD,[a] Petra Zieglmayer, MD,[b] Rene´ Zieglmayer, Dipl Ing,[b] Patrick Lemell, PhD,[b] Philippe Devillier, MD, PhD,[c] Armelle Montagut,[d] Michel Me´lac, MD,[e] Sylvie Galvain, PharmD,[e] Ste´phanie Jean-Alphonse, PhD,[e] Laurence Van Overtvelt, PhD,[e] Philippe Moingeon, PhD,[e] and Martine Le Gall[e] Vienna, Austria, and Suresnes, Meylan, and Antony, France

Background: The efficacy and safety of a 5-grass-pollen sublingual immunotherapy (SLIT) tablet (Stallerge`nes SA, Antony, France) have been evaluated in clinical studies during the pollen season. The allergen challenge chamber (ACC) has been developed as a pharmacodynamic assessment tool to control the environmental allergens and to avoid all problems associated with unpredictable pollen seasons.

Objective: We sought to evaluate the onset of action and efficacy of 300-IR (index of reactivity) SLIT tablets by using an ACC.

Methods: Patients with grass pollen–induced rhinoconjunctivitis were randomized into the active or placebo groups. A standardized allergen challenge with grass pollen and symptom evaluation every 15 minutes was performed at baseline, 1 week, and 1, 2, and 4 months of treatment. The primary end point was the average rhinoconjunctivitis total symptom score (ARTSS). Allergen-specific basophil activation, T-cell proliferation, and plasmatic IgE and IgG responses were assessed before and after treatment.

Results: In the intention-to-treat population (n = 89) a significant treatment effect was achieved after the first month (P = .0042) and second month (P 5 .0203) and was maintained through to the fourth month (P=.0007). In the active group the ARTSS (means ± SDs) decreased at each challenge: week 1, 7.40 ± 2.682; month 1, 5.89 ± 2.431; month 2, 5.09 6 2.088; and month 4, 4.85 ± 1.999. An improvement (vs placebo) of 29.3% for the mean ARTSS (median, 33.3%) was observed at end point. Furthermore, the induction of grass pollen allergen– specific IgGs was associated with clinical response. The most frequent adverse reactions were local: oral pruritus, ear pruritus, and throat irritation.

Conclusions: In this ACC study the 300-IR 5-grass-pollen SLIT tablets had a significant effect on rhinoconjunctivitis symptoms (vs placebo) from the first month of treatment onward.

(J Allergy Clin Immunol 2009;124:471-7.)

Key words: Grass pollen, tablets, sublingual immunotherapy, allergen challenge chamber, Vienna Challenge Chamber

A 5-grass-pollen 300-IR (index of reactivity) sublingual immunotherapy (SLIT) tablet (Stallergenes` SA, Antony, France) has demonstrated its efficacy and safety in a series of multicenter clinical trials in adult and pediatric populations with seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) triggered by grass pollen.[1-3] These standard outdoor clinical trials evaluated the symptoms of SAR during the pollen season and, as such, were inevitably influenced by unpredictable variations in pollen levels, antigenic-ity, and exposure. In fact, variations in the patients degree of pol-len exposure occur through both local variations in pollen counts and differences in individuals daily routines and pollen-avoid-ance strategies (eg, staying indoors during the pollen peak). The lack of standardized exposure and natural year-to-year variations in the dates of pollen season onset and peaks makes it difficult to perform outdoor studies designed to measure the onset of action of SLIT and thus determine the optimal preseasonal treatment duration required for efficacy.

In Europe the main pollination period covers about half the year, from spring to autumn. For grasses, the flowering period starts at the beginning of May for countries in which pollination is early and finishes at the end of July for the latest countries. In Mediterranean areas flowering usually starts and ends 1 month earlier compared with other European areas. Pollination occurs about 2 to 3 weeks earlier at sea level than in mountainous regions. On the whole, in Europe grass flowering notably peaks in June. The pollen season tends to vary from year to year because of fluctuations in climatic factors, but the maximum atmospheric concentration of grass pollen usually occurs 1 to 2 months after the start of the main flowering season.[4,5] The current study as-sessed the efficacy and onset of action of 5-grass-pollen tablets under controlled conditions provided by an allergen challenge chamber (ACC; also known as an environmental exposure unit) to overcome these variations. An ACC is a specially designed room used to expose study participants to a fixed, predetermined allergen concentration for a set period of time.[6] ACCs also allow identical repeated exposures and thus assessment of changes over time in an individual's response.

From [a]the ENT Department, Medical University Vienna; [b]the Department Vienna Challenge Chamber, Allergy Centre Vienna West; [c]UPRES EA 220, Foch Hospital, University Versailles Saint-Quentin, Suresnes; [d]Delta Consultants, Meylan; and [e]Stallerge`nes SA, Antony.

Disclosure of potential conflict of interest: F. Horak has received honoraria for lectures from Allergy Therapeutics, UCB, Schering-Plough, and Stallerge`nes and has received research support from GlaxoSmithKline, Oxagen, and Allergy Therapeutics. P. Devillier has received consulting fees from Stallerge`nes and has received research grants from Altana-Nycomed, Boehringer-Ingelheim, Schering-Plough, Pierre Fabre, Servier, and Novartis. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication December 12, 2008; revised May 26, 2009; accepted for publication June 2, 2009.

Available online August 3, 2009.

Reprint requests: Friedrich Horak, MD, HNO Universita¨tsklinik, AKH, Wa¨hringer G€urtel 18-20, A-1090 Vienna, Austria. E-mail: friedrich.horak@vienna.at.

0091-6749/$36.00

2009 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2009.06.006

Abbreviations used
ACC: Allergen challenge chamber
AE: Adverse event
ARTSS: Average rhinoconjunctivitis total symptom score
IR: Index of reactivity
ITT: Intention-to-treat
PP: Per-protocol
RTSS: Rhinoconjunctivitis total symptom score
SAR: Seasonal allergic rhinoconjunctivitis
SLIT: Sublingual immunotherapy
TEAE: Treatment-emergent adverse event
VCC: Vienna Challenge Chamber

In recent years, ACCs have been used in a variety of studies evaluating different aspects of SAR therapeutics, such as the onset of action of antiallergic treatments[7-9] and the efficacy and safety of drug candidates.[6,10,11] The current draft guideline on the clinical development of specific immunotherapy products for the treatment of allergic diseases published by the European Medicines Agency's Committee for Medicinal Products in Human Use cites the ACC as a pharmacodynamic assessment tool that can potentially be used to provide supportive evidence of clinical efficacy.[12] ACC studies investigating the effect of various antihistamines (desloratadine, cetirizine, azelastine, and fexofenadine) have shown that symptom scores with placebo and active treatments are similar to those obtained in outdoor clinical trials. Additional information from ACC trials might significantly contribute to a better determination of a medication's clinical pro-file, especially in terms of onset and duration of action.[12-14]

A Cochrane collaboration meta-analysis of SLIT in patients with rhinitis demonstrated evidence of efficacy with reduction in symptoms and use of symptomatic medication.[15] It has been previously shown that a preseasonal and coseasonal treatment with sublingual grass pollen tablets is effective and safe in the treatment of grass pollen SAR.[1,2,16,17] The aim of this study was to demonstrate the placebo-controlled efficacy of a 5-grass-pollen 300-IR SLIT tablet and provide the first ever determination of the onset of action of SLIT tablets under the controlled, stable conditions found within an ACC.

METHODS

Patients

Eligible patients were men and women aged between 18 and 50 years with a documented history of moderate-to-severe seasonal grass pollen–related allergic rhinoconjunctivitis for at least the 2 previous pollen seasons. At screening, patients were required to demonstrate grass pollen sensitization through a positive specific skin prick test response (wheal diameter >3 mm) to a 5-grass pollen extract (Stallerge`nes SA) and a specific serum IgE level of at least 0.70 kU/L for timothy grass (assayed with the UniCAP system; Phadia, Uppsala, Sweden). In addition, patients had to show a symptomatic reaction to an allergen challenge test at baseline (ie, before the administration of any study treatment), which was defined as a rhinoconjunctivitis total symptom score (RTSS) of at least 7 (of 18) within the 2-hour challenge (see the ''Efficacy variables'' section for more details of the RTSS). The main exclusion criteria were as follows: allergic rhinoconjunctivitis caused by a cosensitization likely to significantly influence symptoms throughout the study and asthma requiring treatment other than rarely a short-acting inhaled b_2-agonist. All patients pro-vided written informed consent before study entry. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (1964, as amended in 2004) and good clinical practice (CPM/ICH/135/95) and was approved by the appro-priate independent ethics committee and regulatory authorities.

Study design

This was a randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, single-center trial performed between the 2007 and 2008 grass pollen seasons. After an initial screening visit and a baseline allergen challenge, eligible patients were randomized 1:1 to receive either a 300-IR SLIT tablet or placebo. Patients underwent an allergen challenge in the chamber with grass pollen before treatment (the baseline challenge). A 2-hour baseline challenge was chosen, which was sufficient for qualification, to avoid unnecessary priming and to keep the patients burdens as low as possible (no rescue medication was allowed). Additional challenges were performed after 1 week and 1, 2, and 4 months of treatment (each lasting 4 hours, Fig 1).

Immunotherapy

The investigational product was a 300-IR 5-grass-pollen SLIT tablet, (orchard, meadow, perennial rye, sweet vernal, and timothy grasses; Stallerge`nes SA) taken once daily. The IR is a measure of the biologic potency of an allergen extract assessed based on skin reactivity. The dosage of the 300-IR tablet corresponded to approximately 20 mg of group 5 major allergens.

Patients were told to take the sublingual pollen extract or placebo tablets once a day before eating or drinking and, preferably, at the same time of day throughout the 4-month treatment period. The patients were further instructed to leave the tablet under the tongue and not to swallow until the tablet had completely dissolved. Treatment was taken daily at the dose of 300 IR from day 1 and for 4 months. The doses were administered under medical supervision on every scheduled visit in the study. Patients were observed for 30 minutes to check for any local or systemic reactions. Antihistamines, decongestants, antileukotrienes, cromones, corticosteroids, and topical nasal or ocular treatments were prohibited during the treatment period. There was no necessity for rescue medication because the trial was performed out of season.

Allergen challenge and study measurements

The allergen challenge was carried out in the validated Vienna Challenge Chamber (VCC) at the department of the Allergy Center of Vienna West (Vienna, Austria). The methods for the VCC are described in this article's Methods section in the Online Repository at www.jacionline.org.

During the challenge the patients scored the 6 individual rhinitis and conjunctivitis symptoms every 15 minutes on computer keypads. Nasal airflow was measured every 30 minutes by means of active anterior rhinoma-nometry. Nasal secretion was determined every 30 minutes by collecting and weighing used tissues; patients were given preweighed packs of paper tissues, which they used to blow their noses as necessary. FEV_1 was measured every hour by using standard spirometric procedures (with reference values given by the European Community for Coal and Steel).

Initial measurements (except nasal secretion weight) were performed before patients entered the chamber. Blood was taken before treatment initiation and after 2 and 4 months of treatment. This biologic sample was subjected to a range of prespecified immunologic analyses (see the ''Assess-ment of immunologic changes'' section in the Methods section of this article's Online Repository).

Efficacy variables

The RTSS includes the 6 most common symptoms of allergic rhinoconjunctivitis: sneezing, rhinorrhea, nasal pruritus, nasal congestion, ocular pruritus, and tearing. Each symptom was evaluated by the patient with a score ranging from 0 to 3, as follows: 0, absent symptoms (no sign/symptom evident); 1, mild symptom (sign/symptom is clearly present/minimal aware-ness and easily tolerated); 2, moderate symptom (definite awareness of sign/ symptom that is bothersome but tolerable); and 3, severe symptom (sign/ symptom that is hard to tolerate and causes interference with daily activities). The RTSS is the sum of the 6 individual symptom scores and thus varies from 0 to 18. The RTSS was recorded every 15 minutes during the 4-hour allergen exposure challenge (2 hours at baseline). The average rhinoconjunctivitis total symptom score (ARTSS) for each patient was calculated for each challenge as

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 124, NUMBER 3

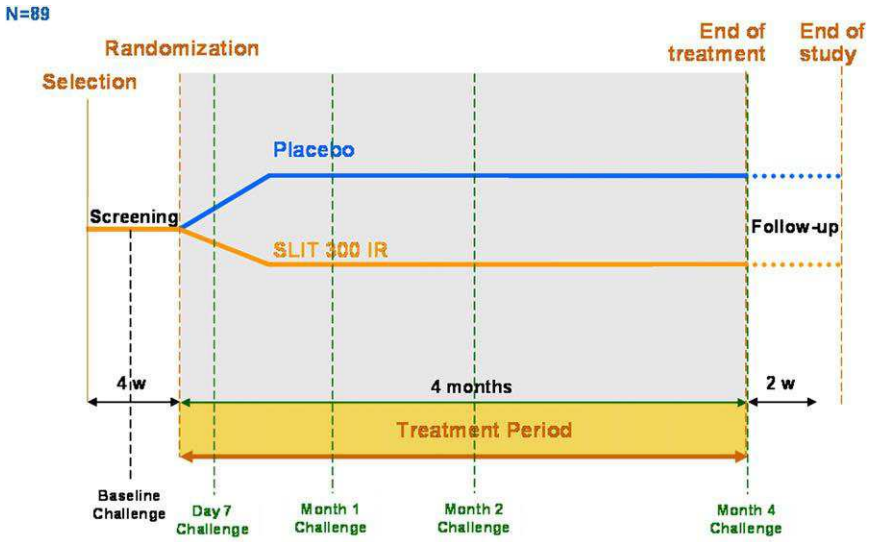


FIG 1. Study design.

the average of the RTSSs across the challenge's 16 time points (8 time points for baseline challenge). The primary efficacy variable was the ARTSS during the allergen challenge after 4 months of treatment or at end point. The secondary efficacy variables were nasal airflow, nasal secretion weight, and cutaneous reactivity. Immunologic parameters were exploratory variables.

Safety

Subjects were questioned about the occurrence, onset, severity (mild, moderate, and severe) and outcome of all adverse events (AEs) during the study. AEs were monitored throughout the study and coded according to the MedDRA dictionary (version 10.1, http://meddramsso.com). AEs were classified according to severity and their relationship to the study medication.

The safety population included all patients who were randomized and had received at least 1 dose of investigational product.

Statistical analysis and study populations

Analysis of the primary efficacy variable was performed for both the intention-to-treat (ITT) and per-protocol (PP) populations, with the ITT analysis considered primary. An analysis of covariance was performed on the primary efficacy variable (ARTSS at 4 months or at end point), with treatment as the main factor and baseline ARTSS as the covariate (see the ''Assessment of the statistical analysis and study populations'' section in the Methods section of this article's Online Repository).

RESULTS

Population

Of a total of 97 screened patients, 89 were randomized into either the 300-IR (n = 45) SLIT tablet group or the placebo group (n = 44). Eighty-two patients completed the treatment phase. In all, 7 patients discontinued the study before completion: 3 in the SLIT arm (2 consent withdrawals and 1 unrelated AE [ie, oral inflammation in the context of dental surgery]) and 4 in the placebo arm (2 consent withdrawals and 2 AEs). The flow of patients through the study is summarized in Fig 2.

Demographic data in the 2 study arms are presented in Table I, and baseline ARTSSs are presented in Table III. There were no between-group differences in terms of age, BMI, and mean

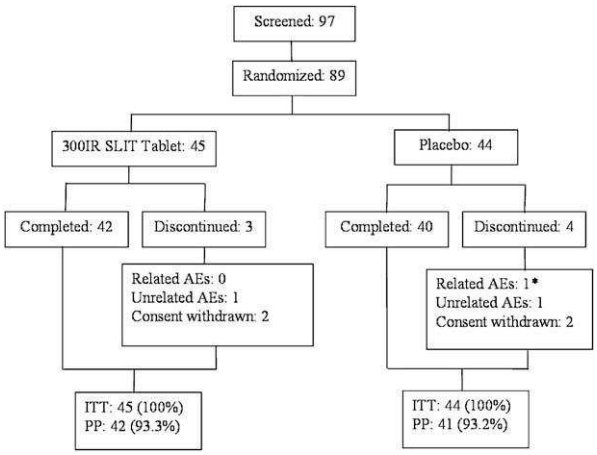


FIG 2. Patient distribution. AEs leading to patient withdrawal: 300-IR group, oral inflammation after dental surgery; placebo group, headache* (in-cluded in the PP population) and pneumonia.

ARTSS at the baseline allergen challenge. There was a higher proportion of women in the placebo group than in the SLIT group (63.6% vs 53.3%, respectively). The mean treatment duration was close to 4 months in both treatment groups (Table I).

Primary efficacy variable (ARTSS at 4 months)

In the course of the baseline challenge, individuals started free of symptoms and reached the worst symptoms after 90 to 120 minutes. Both groups reacted to the same amount (Fig 3, A). For the ITT population, the 300-IR group had a significantly lower ARTSS (means ± SDs) during allergen challenge after 4 months of treatment (or at end point) than the placebo group (4.85 ± 1.967 vs 6.87 ± 3.114). The difference in adjusted means for the 300-IR group versus the placebo group was 21.97, with a 95% CI of 22.99 to 20.94 (P = .0003); this represents a relative mean improvement of 29.3% (median, 33.3%) compared with placebo. This SLIT versus placebo difference in

TABLE I. Demographic data and treatment duration: ITT population

	300-IR SLIT tablets (n = 45)	Placebo (n = 44)	Overall (n = 89)
Sex (F/M)	53.3%/46.7%	63.6%/36.4%	58.4%/41.6%
Age (y), mean ± SD (minimum-maximum)	27.5 ± 6.58 (19.7-49.8)	27.1 ± 5.81 (18.6-46.6)	27.3 ± 6.18 (18.6-49.8)
BMI (kg/m^2), mean ±SD (minimum-maximum)	22.3 ± 2.82 (17.6-28.2)	22.5 ± 3.26 (17.3-32.0)	22.4 ± 3.03 (17.3-32.0)
Treatment duration (d), mean ± SD (minimum-maximum)	115.2 ± 23.17 (25-128)	116.9 ± 18.85 (46-133)	

F, Female; M, male.

TABLE II. Comparison of treatment groups for ARTSSs after 4 months of treatment (or at end point): ITT population

	300-IR SLIT tablets (n = 45)	Placebo (n = 44)
Baseline ARTSS (mean SD)	7.14 (2.254)	7.26 (2.537)
ARTSS at end point (LOCF method, n = 89)		
Mean ± SD	4.85 ± 1.967	6.87 ± 3.114
Median	4.25	6.38
Min-max	1.1-9.5	1.3-14.8
Difference in adjusted means vs placebo (95% CI), P value (ANCOVA)	-1.97 (22.99 to 20.94), .0003	
Relative mean improvement compared with placebo	29.3% (33.3% median)	
Sensitivity analysis (completed subjects, n = 82; 95% CI), P value	-1.87 (22.91 to 20.83), .0006	
Confirmatory analysis for the PP population (n = 83), P value	-1.81 (22.84 to 20.77), .0008	

LOCF, Last observation carried forward; ANCOVA, analysis of covariance.

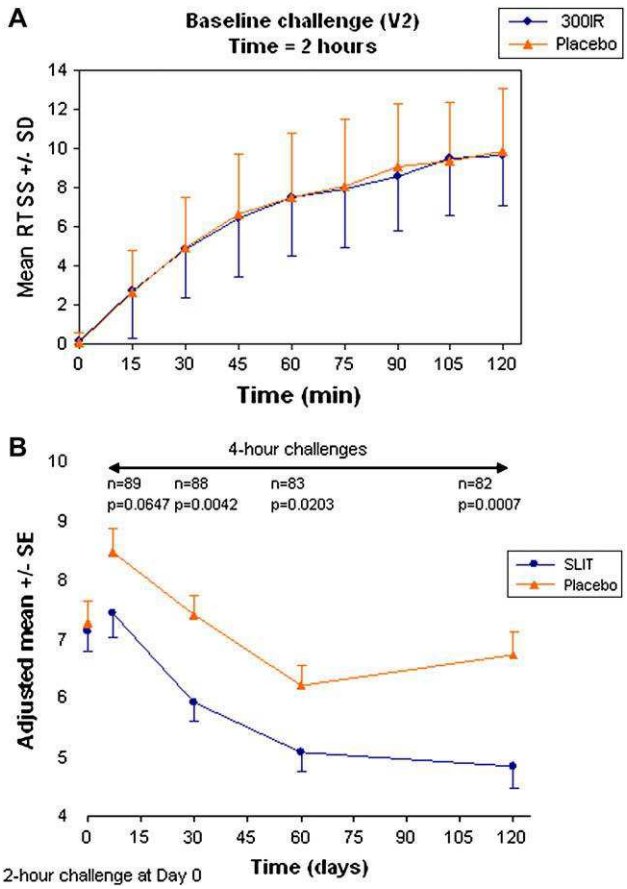


FIG 3. Mean RTSS at baseline and mean ARTSS at each challenge. Adjusted means for baseline covariate and SE: A, baseline challenge, mean RTSS ITT population; B, All allergen challenges mean ARTSS-ITT population.

the adjusted mean ARTSS was confirmed (P = .0008) in the PP population (n = 83) and in a sensitivity analysis (P = .0006) performed for the completed patients (n = 82, Table II).

Because all the following allergen challenges during the treatment period lasted 4 hours when patients had maximum symptoms during the last 2 hours of challenges, the mean values during the 4-hour challenges were higher than the mean values observed during baseline challenge.

A complementary analysis of ARTSSs was performed taking into account the 2 first hours of each challenge; thus ARTSSs (0-2 hours) after 1 week and 1, 2, and 4 months of treatment could be compared with baseline ARTSSs. Thus the percentage of im-provement at the end point (compared with baseline) could be calculated only for the first 2 hours of challenge. It was 41.8% in the 300-IR group and 18.5% in the placebo group.

Onset of action

For the ITT population (n = 89), a significant treatment effect was achieved after the first month (P = .0042) and maintained at 2 (P = .0203) and 4 (P = .0007) months. In the active group the ARTSS decreased at each challenge (ie, 7.40 ± 2.682 at week 1, 5.89 ± 2.431 at month 1, 5.09 ± 2.088 at month 2, and 4.85 ± 1.995 at month 4), whereas the lowest mean ARTSS was observed at month 2 in the placebo group (6.21 ± 2.939; Fig 3, B).

Nasal airflow and nasal secretion weight

There was no significant difference between the 300-IR and placebo groups in the mean change in nasal airflow or nasal secretion weight after 4 months of treatment.

Cutaneous reactivity

Skin prick tests for the 5 grass pollens were performed at screening and after 1, 2, and 4 months of treatment. The reduction in wheal size at the end point (mean ± SD) was small: 21.11 ± 2.724 mm in the 300-IR group and 20.40 ± 2.340 mm in the placebo group. The intergroup difference did not reach statistical significance. However, the sample size was not calculated in terms of this parameter.

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 124, NUMBER 3

TABLE III. Most common TEAEs (incidence >5% in at least 1 group)

	300-IR SLIT tablets (n = 45)			Placebo (n = 44)		
	nAE	No.	Percentage	nAE	No.	Percentage
Oral pruritus	21	16	35.6	0	0	
Headache	17	8	17.8	14	8	18.2
Throat irritation	19	16	35.6	0	0	
Nasopharyngitis	2	2	4.4	5	4	9.1
Ear pruritus	3	3	6.7	0	0	

nAE, Number of TEAEs. No: Number of patients, Percentage of patients.

Immunologic analyses

Immunologic changes were assessed in peripheral blood before (visit 3) and after (visit 7) 4 months of SLIT by using the 5-grass-pollen extract. There was no difference in basophil activation (determined on the basis of CD203c expression) in response to grass pollen allergens between patients receiving the active treatment and those receiving placebo. Likewise, no changes in basophil activation were noticed for the 2 groups of patients before or after treatment. No significant changes in T-cell proliferation were observed in response to grass pollen allergens before (visit 3) and after (visit 7) 4 months of treatment. Lastly, patients exposed to active treatment (but not placebo) displayed a substantial increase in allergen-specific plasma IgE (Fig 4, A) and IgG (Fig 4, B) responses after immu-notherapy. Interestingly, specific IgG (but not IgE) values were found to be higher in patients exhibiting the best clinical re-sponse to treatment. Defining clinical responders as the 25% of patients with the highest relative improvement in ARTSSs from baseline, the median titers of IgG were 1.700 and 2.060 mg/L at visit 3 and 3.680 and 2.915 mg/L at visit 7 for SLIT responders versus nonresponders.

Safety

A total of 73 treatment-emergent adverse events (TEAEs) were reported by 27 (60.0%) patients in the active group, and 39 TEAEs were reported by 14 (31.8%) patients in the placebo group. No AEs occurred during the allergen chal-lenges. All treatment-related AEs were mild in the 300-IR group, and there were no serious AEs. These events generally appeared in the first few days of treatment and lasted less than 2 weeks. The most commonly observed TEAEs are summa-rized in Table III and consisted of oral pruritus, throat irrita-tion, and headache, each of which was reported by 16 of the 89 subjects in the safety population. According to the Euro-pean Academy of Allergology and Clinical Immunology rec-ommendations,[18] no systemic related possible, probable, or certain TEAEs were observed in the 300-IR group, and 1 epi-sode of mild rhinoconjunctivitis was experienced by a patient in the placebo group.

Three patients withdrew from the study because of TEAEs: 1 in the SLIT group (oral inflammation after dental surgery not related to treatment) and 2 in the placebo group (pneumonia and headache). Pulmonary function, as assessed based on FEV_1 at each allergen challenge, was not modified in either group.

Overall, the safety results were consistent with those reported in previous studies of the same grass pollen SLIT tablet.

DISCUSSION

This double-blind, placebo-controlled study provides new and important information about the onset of action of the 300-IR 5-grass-pollen SLIT tablet. To the best of our knowl-edge, no other data on this key SLIT parameter have been published. Previous studies have shown that SLIT is effective but were not designed to clarify the optimal period for which it should be administered before the beginning of the pollen season (ie, the preseasonal treatment period). This study is the first to document the onset of action of SLIT under controlled conditions and shows that 300-IR SLIT tablets can provide a statistically significant improvement in SAR symptoms after as little as 1 month of treatment. Interestingly, a nonsignificant trend toward superiority over placebo (P = .0647) was apparent after just 1 week of treatment.

Our current study showed that treatment with a 5-grass-pollen SLIT tablet was associated with less intense symptoms (relative to placebo) after a controlled, out-of-season grass pollen challenge in individuals with a history of SAR and a previous positive challenge result with grass pollen. Because no rescue medications were allowed during the study, the symptom score is a pure assessment of efficacy. This study supports previous findings that a 300-IR 5-grass-pollen SLIT tablet improved symptoms of pollen-related rhinoconjunctivitis significantly in patients treated 4 months before the pollen season.[1-3] The relative mean improve-ment was 29.3% (median, 33.3%) compared with placebo. For the first time, an evaluation of grass pollen SLIT tablets in the absence of any rescue medication in either the placebo or active treatment groups has been carried out. This was possible because the study was performed (1) outside the pollen season and (2) in an ACC under closely monitored conditions. We observed a placebo effect over time, which we ascribe to interactions between the VCC trial subjects and a potential influence of their experience on reporting of symptoms.[19]

Some mild local AEs were observed after direct, once-daily administration of 300-IR SLIT tablets. These local irritations occurred in 35.6% of the actively treated patients and lasted only for a few days. These results completed the assessment of the safety of the 5-grass-pollen SLIT tablets, which has already been demon-strated in previous clinical trials in adults and children with SAR.[1-3]

Before our study, only 2 other studies had investigated immu-notherapy outcome with controlled environmental exposures (to ragweed[13] and birch[14] pollen). Ragweed pollen exposure in a con-trolled setting demonstrated that specific immunotherapy signifi-cantly reduced symptoms of ragweed-induced allergic rhinitis.[13] Evaluation was made after at least 2 years of subcutaneous immu-notherapy and featured a positive control group of immunother-apy-naive subjects with ragweed allergy. In a double-blind,

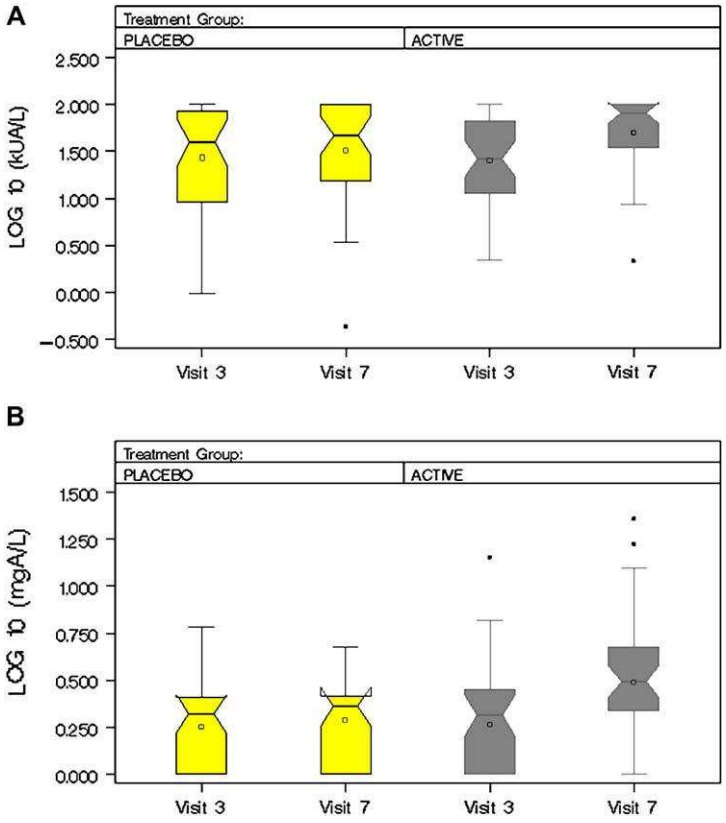


FIG 4. Assessment of antibody responses: 5-grass-pollen extract–specific IgEs (upper panel) and IgGs (lower panel) before (visit 3) and after (visit 7) 4 months of treatment.

placebo-controlled study a short (4 months) course of birch pollen SLIT was found to be efficacious and safe.[14]

The main advantage of the ACC is a defined, constant, and reproducible allergen concentration[18] under a definable, stable climatic condition. ACC studies have typically been designed to evaluate the onset and duration of action of antiallergic treatments.

These results are essential for determining the optimal administration regimen for this immunotherapy. Indeed, the symptom score improves from the first week of treatment with grass pollen SLIT tablets, with a significant effect at 1 month, a plateau after 2 months, and maintenance of the effect at 4 months. However, these challenges do not exactly represent real-life conditions, with their multiple and fluctuating sources of allergen and changing climatic parameters. The single allergen source, the lack of seasonal priming, subject demographics closed by the ACC area, trial context, and short duration are also critical points of ACC studies.[6] They might not reflect the natural pathologic process and environmental factors contributing to an individual's development of allergic rhinoconjunctivitis.

The absence of statistical differences between the 2 groups on objective measurements (nasal airflow and secretions) differs with the finding of symptom improvement. In a previous publi-cation assessing the efficacy of birch immunotherapy during allergen exposure,[14] nasal airflow was significantly different be-tween the active and placebo groups, although the difference did not reach significance for secretions. Several clinical studies have previously shown that nasal peak inspiratory flow and clinical scoring are weakly correlated and are complementary tools to evaluate allergic rhinitis.[20,21] Nasal secretion measure-ments are weakly correlated with objective and subjective mea-surements of rhinorrhea and congestion.[22] Nasal symptom scoring remains the most relevant way to assess the efficacy of a treatment for allergic rhinitis and might yield highly significant differences versus placebo without differences in complementary objectives (eg, peak nasal inspiratory flow and secretion weight).

Although detailed analyses of the concomitant immunologic changes are currently being performed by using a battery of purified grass pollen allergens, we have only reported herein on immune responses to the 5-grass-pollen extract. No significant changes in either basophil activation or T-cell proliferation were noticed within the 4-month treatment period. As reported previously,[1] allergen-specific IgEs and IgGs were clearly induced in patients receiving the active treatment but not in those receiving placebo. Although not further discussed here, our results also suggest that some specific IgGs might be relevant for clinical efficacy.

In conclusion, for the first time ever, the efficacy and onset of action of a 5-grass-pollen SLIT tablet has been assessed (vs placebo) in an ACC. The effect of this 300-IR 5-grass-pollen SLIT tablet versus placebo on rhinoconjunctivitis symptoms is statistically significant from the first month of treatment onward.

We thank the nurses and participants who made this study possible. We thank Drs Anne-Sophie Rimaniol (Spibio, France), Anita Kober (Phadia, Sweden), and Ve´ronique Bodo (Stallerge`nes, France) for their contribution to

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 124, NUMBER 3

immunologic studies and Mrs Catherine Bos and Nadia Bouaffi for their assistance in coordinating article drafts.

Clinical implications: In this ACC trial the effect of a 5-grass-pollen 300-IR SLIT tablet on rhinoconjunctivitis symptoms was statistically significant (vs placebo) from the first month of treatment onward.

REFERENCES

1. Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, Ja¨ger S, Montagut A, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2007;120:1338-45.
2. Wahn U, Tabar A, Kuna P, Halken S, Montagut A, de Beaumont O, et al. Efficacy and safety of five grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2009;123:160-6.
3. Didier A, Melac M, Montagut A, Lhe´ritier-Barrand M, Tabar A, Worm M. Agree-ment of efficacy assessments for five-grass pollen sublingual tablet immunother-apy. Allergy 2009;64:166-71.
4. Horak F, Jaeger S, Worm M, Melac M, Didier A. Implementation of pre-seasonal sublingual immunotherapy with a five-grass pollen tablet during optimal dosage assessment. Clin Exp Allergy 2009;39:394-400.
5. Jaeger S. Exposure to grass pollen in Europe. Clin Exp Allergy Rev 2008;8:2-6.
6. Day JH, Horak F, Briscoe MP, Canonica GW, Fineman SM, Krug N, et al. The role of allergen challenge chambers in the evaluation of anti-allergic medication: an international consensus paper. Clin Exp Allergy Rev 2006;6:31-59.
7. Horak F, Stubner P, Zieglmeyer R, Harris AG. Comparison of the effects of deslor-atadine 5-mg daily and placebo on nasal airflow and seasonal allergic rhinitis symptoms induced by grass pollen exposure. Allergy 2003;58:481-5.
8. Zieglmayer P, Zieglmayer R, Bareille P, Rousell V, Salmon E, Horak F. Fluticasone furoate versus placebo in symptoms of grass-pollen allergic rhinitis induced by exposure in the Vienna Challenge Chamber. Curr Med Res Opin 2008;24:1833-40.
9. Krug N, Hohlfeld JM, Larbig M, Buckendahl A, Badorrek P, Geldmacher H, et al. Validation of an environmental exposure unit for controlled human inhalation stud-ies with grass pollen in patients with seasonal allergic rhinitis. Clin Exp Allergy 2003;33:1667-74.
10. Stuebner P, Horak F, Zieglmayer R, Arna´iz E, Leuratti C, Pe´rez I, et al. Effects of rupatadine vs placebo on allergen-induced symptoms in patients exposed to aeroallergens in the Vienna Challenge Chamber. Ann Allergy Asthma Immunol 2006;96:37-44.
11. Zieglmayer P, Zieglmayer R, Bareille P, Rousell V, Salmon E, Horak F. Fluticasone furoate vs. placebo in symptoms of grass-pollen allergic rhinitis induced by exposure in the Vienna Challenge Chamber. Curr Med Res Opin 2008;24: 1833-40.
12. European Medicines Agency. Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases. Available at: Ref.CHMP/EWP/18504/2006. www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/1850406enfindraft.pdf. Accessed November 20, 2008.
13. Donovan JP, Buckeridge DL, Briscoe MP, Clark RH, Day JH. Efficacy of immuno-therapy to ragweed antigen tested by controlled antigen exposure. Ann Allergy Asthma Immunol 1996;77:74-80.
14. Horak F, St€ubner P, Berger UE, Marks B, Toth J, Ja¨ger S. Immunotherapy with sub-lingual birch pollen extract. A short-term double-blind placebo study. J Invest Al-lergol Clin Immunol 1998;8:165-71.
15. Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. Allergy 2005;60:4-12.
16. Durham SR, Yang WH, Pedersen MR, Johansen N, Rak S. Sublingual immunother-apy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2006;117:802-9.
17. Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W, et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2006;118:434-40.
18. Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling H-J, Valovirta E. EAACI practice parameters for immunotherapy. Allergy 2006;61(suppl 82): S1-20.
19. Horak F, Ja¨ger S. Die Wiener Provokations-Kammer (Vienna Challenge Chamber).-Eine neue Methode des Allergenexpositionstests. Wien Klin Wochenschr 1987;99:509-10.
20. Nathan RA, Eccles R, Howarth PH, Steinsvag SK, Togias A. Objective monitoring of nasal patency and nasal physiology in rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(suppl):S442-59.
21. Gomes Dde L, Camargos PA. Ibiapina C da C, de Andrade CR. Nasal peak inspiratory flow and clinical score in children and adolescents with allergic rhinitis. Rhinology 2008;46:276-80.
22. Doyle WJ, Skoner DP, Seroky JT, Fireman P. Reproducibility of the effects of intranasal ragweed challenges in allergic subjects. Ann Allergy Asthma Immunol 1995;74:171-6.

METHODS

ACC

The allergen challenge was carried out in the validated VCC, a department of the Allergy Center Vienna West, Vienna, Austria. The VCC is a specially designed sealed room in which a precisely defined and monitored airborne concentration of allergen (145021500 pollen grains/m^3, the level typically found in the Austrian countryside at a height of 1.5 m during pollen peaks) can be administered to subjects continuously and maintained over a period of hours. The volume of the VCC was approximately 37.2 m^3.

The pollen was a standardized mixture consisting of equal proportions of pollen from 4 grass species: orchard (Dactylis glomerata), meadow (Poa pratensis), perennial rye (Lolium perenne), and timothy (Phleum pratense) grasses. No placebo challenge was performed because we focused on the differences between the 2 groups of patients (treated or not). Distribution of allergen within the VCC was kept constant by means of an automatic, turbulent airflow supply unit; the pollen concentration was measured every 5 minutes with a modified Burkard pollen trap (Burkard Manufacturing Co, Ltd, Hertfordshire, England). All patients thus inhaled similar amounts of allergen during each allergen session. Frequent cleaning between challenge sessions decreased the possibility of allergen adhesion with irregular exposure concen-trations. The air temperature was maintained at approximately 248C 6 0.78C, and the relative humidity was approximately 40% 6 1%.

Patients were observed through 4 windows during exposure, and supervising personnel were accessible to patients through an intercom system. In the VCC up to 20 subjects can be challenged at a time and during the study. The number of subjects varied between 15 and a maximum of 20 subjects belonging to the 2 groups in different daily sessions.

Statistical analysis and study populations

Analysis of the primary efficacy variable was performed for both the ITT and PP populations, with the ITT analysis considered as primary. The secondary efficacy variables were analyzed for the ITT population only. The ITT population consisted of all patients who had been randomized and taken at least 1 dose of the investigational product or placebo. The PP population included all subjects who completed the study according to the protocol and did not display any major protocol deviation, as well as patients who withdrew for a related AE.

A sample size of 34 subjects per treatment group would have a power of 81% to detect a difference in ARTSS (mean of the sums of the 6 individual symptom scores at each time point during the allergen exposure) of 2.4 between the 300-IR and placebo treatments (mean score with placebo, 8; mean score with 300 IR, 5.6 [ie, an improvement of 30%]), assuming an overall a value of .05 and a common SD of 3.4.

Assuming a 20% screening failure rate and a 15% dropout rate, 100 subjects had to be screened to have 40 randomized subjects in each group at the start of the study.

Unless otherwise stated, all statistical tests were 2-sided and performed at the 5% level of significance. In cases of premature withdrawal during the treatment period, the last observation carried forward method was applied. The treatment effect was expressed as the difference in least-square means between the 2 treatment groups, together with the corresponding 95% CI.

The onset of action was defined (by using a repeated-measures analysis of covariance mixed model) as the first allergen challenge at which (1) the mean ARTSS in the SLIT group became significantly different from that in the placebo group and (2) a significant difference was maintained in the subsequent challenges. Results of immunologic parameters were summarized descriptively and graphically with notched box plots.

Assessment of immunologic changes

Basophil activation tests were performed with an Allergenicity Kit (Beckman Coulter, Roissy, France). Briefly, whole blood was incubated for 15 minutes at 378C with fluorescein isothiocyanate–labeled anti-CRTH2), phycoerythrin-labeled anti-CD203c, and phycoerythrin2cyanin 72labeled anti-CD3 mAbs in the presence of serial dilutions of 5-grass-pollen extract (120.0001 mg/mL total protein; Stallerge`nes SA). PBS and anti-IgE were used as negative and positive controls, respectively. Nonactivated and acti-vated basophils were identified with a FC500 flow cytometer chemoattractant receptor-homologous molecule (Beckman Coulter, Fullerton, Calif) as $CRTH2^1CD203c^{dim}$ and $CRTH2^1CD203c^{bright}$ cells, respectively.

Allergen-specific plasma IgE and IgG antibodies were analyzed by using the ImmunoCAP 1000 system (Phadia) with the 5-grass-pollen extract as the allergen. Plasma samples were tested undiluted for specific IgE and at 1:100 dilution for

2. Résultats cliniques de l'étude VO53.06

Sustained 3-year efficacy of pre- and coseasonal 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in patients with grass pollen–induced rhinoconjunctivitis

A. Didier, M. Worm, F. Horak, G. Sussman, O. de Beaumont, M. Le Gall, M. Mélac, H.-J. Malling

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011, 128, 559-566

Rhinitis, sinusitis, and upper airway disease

Sustained 3-year efficacy of pre- and coseasonal 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in patients with grass pollen–induced rhinoconjunctivitis

Alain Didier, MD,[a] Margitta Worm, MD,[c] Friedrich Horak, MD,[d] Gordon Sussman, MD,[e] Olivier de Beaumont, MD,[f] Martine Le Gall,[f] Michel Melac, MD,[f] and Hans-Jorgen Malling, MD[b] Toulouse and Antony, France, Copenhagen, Denmark, Berlin, Germany, Vienna, Austria, and Toronto, Ontario, Canada

Background: Seasonal allergic rhinoconjunctivitis affects millions of persons. The efficacy of allergen sublingual immunotherapy (SLIT) was demonstrated in previous short-term studies.

Objectives: We sought to evaluate the sustained efficacy of 2 dosing regimens of a pre- and coseasonal treatment with 300 IR (index of reactivity) 5-grass-pollen SLIT tablets (Oralair) compared with placebo assessed by using the average adjusted symptom score (AAdSS) at season 3 in adults with grass pollen– induced rhinoconjunctivitis.

Methods: Six hundred thirty-three patients were treated for either 2 or 4 months before and then during the grass pollen season with active or placebo treatment for 3 consecutive seasons. The primary outcome was the AAdSS, a symptom score adjusted for rescue medication use, after 3 consecutive treatment seasons. Secondary outcomes were symptoms and rescue medication score, quality-of-life, and safety assessments. Results: The mean AAdSS was reduced by 36.0% and 34.5% at season 3 in the 2- and 4-month pre- and coseasonal active treatment groups, respectively, compared with that in the placebo group ($P < .0001$ for both). Reductions were observed in total symptom scores and ISSs and the medication score, with a marked improvement in quality of life for both active groups compared with the placebo group at season 3. Most treatment-emergent adverse events were local reactions expected with SLIT, decreasing in number and intensity in each treatment season.

Conclusions: Sustained efficacy of 2- and 4-month pre- and coseasonal treatment with the 300 IR tablet over 3 pollen seasons was demonstrated, with reduction in symptoms and rescue medication use. The treatment was well tolerated. Adverse events decreased in number and intensity over the 3 seasons. (J Allergy Clin Immunol 2011;128:559-66.)

Key words: Rhinoconjunctivitis, sublingual immunotherapy, grass pollen, allergen, pre- and coseasonal treatment

Respiratory allergy occurs in more than 500 million persons around the world.[1,2] In developed countries allergic rhinitis af-fects between 10% and 25% of the general population,[3] with an average of 23% in European countries.[4] The risk of asthma is higher in patients with rhinitis.[5] Allergies to grass, weed, and tree pollen characteristically result in seasonal rhinitis symptoms, which correlate with the presence of allergen exposure in the environment. The primary approach to the control of symptoms is the identification and avoidance of the causal allergens, which is often impossible for pollen. Pharmacotherapy and immunother-apy are the main treatment modalities.

Allergen immunotherapy is considered appropriate when allergic rhinitis symptoms cannot be controlled sufficiently by avoidance of the allergen or an optimal symptomatic medication regimen. Allergen immunotherapy acts on the main cause of the allergic reaction by modifying or downregulating the immune response. Sublingual immunotherapy (SLIT) tablets containing freeze-dried allergen extracts of 5 grasses (cocksfoot [Dactylis glomerata], meadow grass [Poa pratensis], rye grass [Lolium perenne], sweet vernal grass [Anthoxanthum odoratum], and timothy grass [Phleum pratense]) have been developed by Stallergenes S.A. (Antony, France) and approved for use in 23 European countries under the trade name Oralair.

Short-term studies in adult and pediatric patients demonstrated the efficacy in the first pollen season after starting therapy with Oralair.[6,7] This study evaluated the sustained efficacy and the safety of pre- and coseasonal treatments with a 300 IR (index of reactivity) 5-grass SLIT tablet in patients with grass pollen– induced rhinoconjunctivitis compared with that of placebo, as as-sessed by the average adjusted symptom score (AAdSS)[8,9] over 3 consecutive pollen seasons. Efficacy parameters were reported at each season.

From [a]Rangueil-Larrey Hospital, Respiratory Diseases Department, Toulouse; [b]National University Hospital, Copenhagen; [c]Charit_e, Centre for Allergy, Universitaetsmedizin Berlin, Berlin; [d]Allergy Centre Vienna West, Vienna; [e]the University of Toronto; and [f]Stallergenes S.A., Antony.

Supported by Stallergenes S.A.

Disclosure of potential conflict of interest: A. Didier is a consultant for AstraZeneca, Stallergenes, ALK-Abell_o, MSD, and GlaxoSmithKline. M. Worm is a consultant for and has received lecture honoraria from Stallergenes. F. Horak has received research support from Venti RX, Calistoga, and Stallergenes. G. Sussman is a medical advisor for King Pharma; has received research support from Mast Cell Pharma, Novartis, Schering-Plough, and Stallergenes; has provided legal consultation/expert witness tes-timony for the Canadian Transportation Agency on food allergies in commercial air-line cabins; is an expert advisor for the Canadian Medical Protective Association regarding specific allergy legal claims; is a medical advisor for Anaphylaxis Canada and the Ontario Allergy Society; and is a professional partner of Discovery Research International. H.-J. Malling is a consultant for and has received research support from Stallergenes. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication October 5, 2010; revised June 10, 2011; accepted for publication June 22, 2011.

Available online July 29, 2011.

Reprint requests: Alain Didier, MD, Rangueil-Larrey Hospital, Respiratory Diseases De-partment, 24 chemin de Pouvourville–TSA 30030, 31059 Toulouse Cedex 9, France. E-mail: didier.a@chu-toulouse.fr.

0091-6749/$36.00

2011 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi: 10.1016/j.jaci.2011.06.022

Abbreviations used
AAdSS: Average adjusted symptom score
AdSS: Adjusted symptom score
AE: Adverse event
ANCOVA: Analysis of covariance
ARMS: Average rescue medication score
ARTSS: Average rhinoconjunctivitis total symptom score
ISS: Individual symptom score
LS: Least squares
RMS: Rescue medication score
RTSS: Rhinoconjunctivitis total symptom score
SLIT: Sublingual immunotherapy
TEAE: Treatment-emergent adverse event

METHODS

Study design

We performed a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled, 5-year, ongoing phase III study with 3-season treatment and 2-year follow-up phases. Six hundred thirty-three men and women 18 to 50 years of age with seasonal grass pollen–induced allergic rhinoconjunctivitis for at least the 2 previous pollen seasons were enrolled. The study was conducted in Austria, Canada, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Italy, Poland, Russia, and Slovakia. The use of antihistamines, nasal corticosteroids, and oral corticosteroids as rescue medication was allowed by using a stepwise regimen defined in the study protocol. The protocol was reviewed and approved by local regulatory authorities and independent ethics committees in each country and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice–International Conference on Harmonisation guidelines. Written informed consent was obtained from all patients before starting any study procedure.

Treatment was initiated 4 months before the expected start of the pollen season. Patients received either placebo or 300 IR 5-grass-pollen tablets (Oralair) sublingually once daily for 2 months or 4 months before and then during the pollen season (the 2-month and 4-month groups, respectively) for 3 consecutive pollen seasons in years 1 to 3 (2007, 2008, and 2009 seasons). The 2-month group also received placebo for 2 months before the start of active treatment during the time that the 4-month group was receiving active treatment to maintain the blinding. The primary end point was the AAdSS assessed for the third pollen season. The fourth and fifth pollen seasons (years 4 and 5) are treatment free, with follow-up periods currently ongoing (Fig 1). The secondary end points discussed in this publication were symptom and medication scores, individual symptom scores (ISSs), symptom and medication-free days, quality of life, and safety.

Baseline characteristics

Sensitization status to either 5-grass-pollen allergens only (monosensitization) or to 5-grass-pollen allergens and at least another allergen (polysensitization) was derived from a skin prick test at screening. Asthma status and severity were recorded at every visit. A retrospective rhinoconjunctivitis total symptom score (RTSS) was calculated from the most severe rhinoconjuncti-vitis symptoms of the previous pollen season, as reported by the patient.

Symptom and medication scores

Symptom and medication scores have been discussed previously.[8,10] The following 6 rhinoconjunctivitis symptoms were assessed daily by the patient over each pollen season: sneezing, rhinorrhea, nasal pruritus, nasal congestion, ocular pruritus, and watery eyes. The severity of these symptoms was evaluated by using a 4-level descriptive scale: 0, absent (no sign/symptom ev-ident); 1, mild (sign/symptom clearly present but minimal awareness and eas-ily tolerated); 2, moderate (definite awareness of sign/symptom, bothersome but tolerable); and 3, severe (sign/symptom hard to tolerate and causes inter-ference with daily activities, sleeping, or both).

For each of the 6 ISSs, an average for each pollen season was calculated, resulting in ISSs per pollen season. The sum of the daily 6 ISSs provided the daily RTSSs, which ranged from 0 to 18. The average rhinoconjunctivitis total symptom score (ARTSS) was defined as the average of the daily RTSSs for the considered pollen period during treatment (for study years 1, 2, and 3).

The rescue medication score (RMS) was recorded daily by the patients. The following scale was used: 0, no rescue medication; 1, antihistamine (oral and/or eye drops); 2, nasal corticosteroid; and 3, oral corticosteroid. If a patient took 2 or more categories on the same day, the higher score was used for the RMS. The RMS on a particular day was only valid if the RTSS was valid for that same day. Daily RMSs were summarized as the average rescue medication score (ARMS) during a pollen season while receiving treatment (for study years 1, 2, and 3).

The daily adjusted symptom score (AdSS) corresponds to adjustment of the daily RTSS for rescue medication use. When a patient takes rescue medication on a particular day, the observed symptom severity is biased. To adjust for rescue medication use, we assume that the true severity of the symptoms is at least as high as on the preceding rescue medication–free day. Because rescue medication can be taken early in the morning or late in the evening on a particular day, the adjustment applies to the day of rescue medication use and the following day. The AdSS is defined by using the following algorithm:

1. On the first day, AdSS and RTSS are equal:

$$AdSS = RTSS_1:$$

2. If a patient did not take rescue medication on day (d-1) and day d, then:

$$AdSS_{=} RTSS_d.$$

3. If a patient took rescue medication on day d, then:

$$AdSS_d = \text{maximum } (RTSS_d; AdSS_{d_1}) \text{ and } AdSS_{d11}$$

$$= \text{maximum } (RTSS_{d11}; AdSS_d).$$

If $RTSS_d$ was missing, $AdSS_d$ was missing. If a patient took rescue medi-cation at day d and $RTSS_{d-1}$ was missing, then:

$$AdSS_d = RTSS_d.$$

The AAdSS is the average of the nonmissing daily AdSSs over the pollen sea-son and ranges from 0 to 18.

The proportion of symptom and medication-free days, defined as days on which the patient had no symptoms and did not take any symptomatic medication, was calculated as follows:

$$100 \times (\text{number of symptom - and medication - free days})/$$
$$(\text{number of days in the considered pollen period}).$$

The patient's quality of life was assessed by using the self-administered disease-specific Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire.[11]

Pollen season measurements

The expected site-specific start and end dates of the 2007, 2008, and 2009 grass pollen seasons were determined before the study's start by Dr S. J€ager (ENT University Clinic, Vienna, Austria), taking into account historical pollen data, pollen counts, and pollen graphs during the previous pollen seasons for the various study sites. The expected dates were used to define when to start and end treatment at the site level. The actual start and end dates for the grass pollen period of each study year were established based on the pollen counts measured at pollen traps in the regions where sites were located during each pollen season.

The pollen period for statistical analysis was defined as starting on the first of 3 consecutive days with a grass pollen count of at least 30 grass pollen grains per cubic meter of air and the end as the last day of 3 consecutive days with a grass pollen count of 30 grass pollen grains or above per cubic meter of air. The daily pollen counts were available at the end of each grass pollen season during the study in all 3 years, so that the start, end, duration, and intensity of the various pollen seasons at each site could be discriminated according to the definition detailed above.

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 128, NUMBER 3

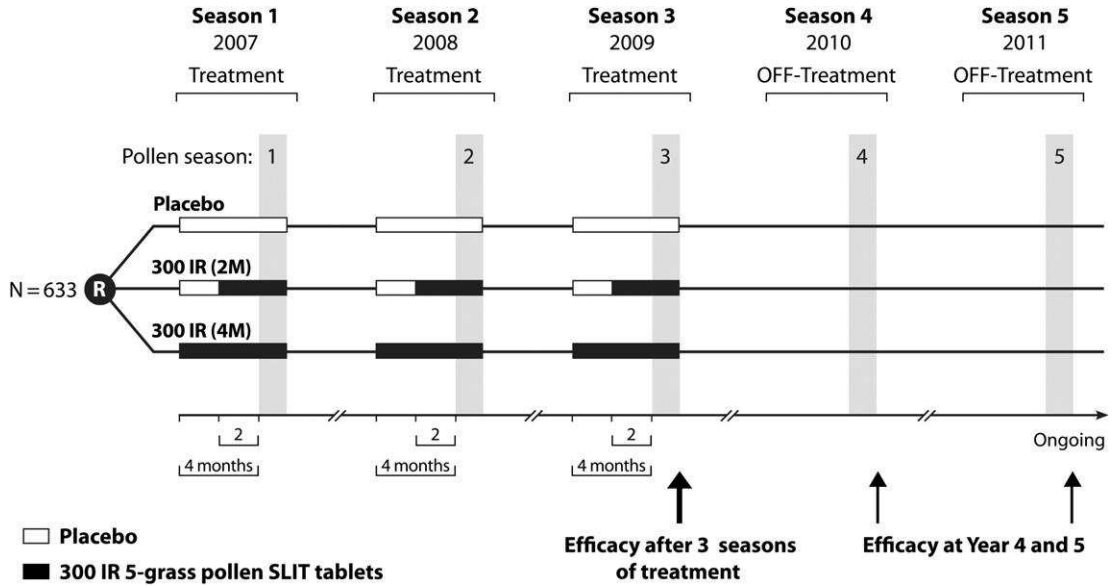


FIG 1. Study design. The circled R represents randomization to the 3 treatment arms. The actual time of the pollen season in each year is represented by the shaded bar.

Multinational multiple-center studies allow an overall balance between those with high and low pollen counts, and because the 3 treatment groups were randomized within each center, this ensured that the grass pollen levels were comparable.

Safety measurements

Adverse events, physical examination, and vital signs were recorded throughout the study. Blood specimens for routine laboratory safety testing were taken at screening and at the end of each pollen season. Treatment-emergent adverse events (TEAEs) were defined as starting on or after the first administration at each treatment period (seasons 1, 2, and 3), including the days of first and last administration of the investigational product. Adverse events are presented separately for the groups having received 2 or 4 months of active treatment and the placebo group. The 2-month treatment group had a shorter preseasonal treatment period, and these patients received placebo for the 2 months before the start of their active treatment; they are presented separately as the 2-month placebo period and 2-month active period. The placebo group used for efficacy comparisons received placebo during the entire 4 months before and then during the pollen season and is indicated for safety as the 4-month placebo group.

Statistical analysis

All efficacy analyses were performed on the corresponding full analysis set, which was defined as all patients who received at least 1 dose of investigational product and had at least 1 AdSS measurement during the pollen period while receiving treatment (for each treatment season). For all analyses, the prob-ability of a type I error was set at 5% (a 5 .05). All inferential tests were 2-sided. All statistical analyses were performed with SAS software, version 9.1.3 (SAS Institute, Inc, Cary, NC).

The primary efficacy variable, the AAdSS during the third pollen period, was analyzed by using an analysis of covariance (ANCOVA) with treatment and pooled centers (the number of centers was 47, and they were grouped into 20 pools) as main effects and age, sex, sensitization and asthma status as covariates. A point estimate and 95% CI for the difference in the adjusted means between the active treatment group and the placebo group were calculated from the ANCOVA. For the analysis of the AAdSS, a step-down approach (the 4-month group vs the placebo group and then the 2-month group vs the placebo group) was used to control the overall type I error rate at 5%.

Step 1: If the 300 IR (4-month) treatment group and the placebo treatment group were significantly different by using a 5% level of significance, then move to step 2. If there was no significance, no further statistical significance was declared.

Step 2: If the 300 IR (2-month) treatment group and the placebo treatment group were significantly different by using a 5% level of significance, then move to step 3. If there was no significance, no further statistical significance was declared.

Step 3: Declare statistical significance between the 300 IR (4-month) treatment group and the 300 IR (2-month) treatment group if the P value was .05 or less. P values are from the ANCOVA and correspond to the pairwise comparisons between the 300 IR (4-month) and placebo groups and then between the 300 IR (2-month) and placebo groups by using the appropriate contrasts.

The ARTSSs, ARMSs, the 6 ISSs were analyzed as for the primary efficacy variable. Descriptive statistics were used for the proportion of symptom- and medication-free days.

With an a value of .05 and a common SD of 3.6, the results of a previous study[6] suggested that a sample size of 144 patients per group would have a power of 80% to detect a mean difference of 1.2 (ie, an average difference of 0.20 per symptom [1.2/6] between placebo and 300 IR treatment in the AAdSS during the third pollen period). On the basis of the first 2 years of this study, the screening failure rate was 13%, and the dropout rate for each of the 3 treatment years was 12%. With these data, the 729 screened patients allowed having 633 randomized patients and at least 144 patients per group for the sustained clinical effect. The retention rate was higher than expected, re-sulting in a 98% power to detect the expected difference of 21.2 between the 300 IR and placebo groups.

RESULTS

Population and baseline characteristics

Of 633 patients randomized in the study, 219 received placebo, 207 received 300 IR tablets for a pre- and coseasonal treatment of 4 months before and then during the pollen season, and 207 received 300 IR tablets for a pre- and coseasonal treatment of 2 months before and then during the pollen season. The full analysis set of the first year comprises 581 patients. At study year 3, 465 patients entered the treatment period (Fig 2). Discontinuations from the study were uncommon and decreased steadily over the

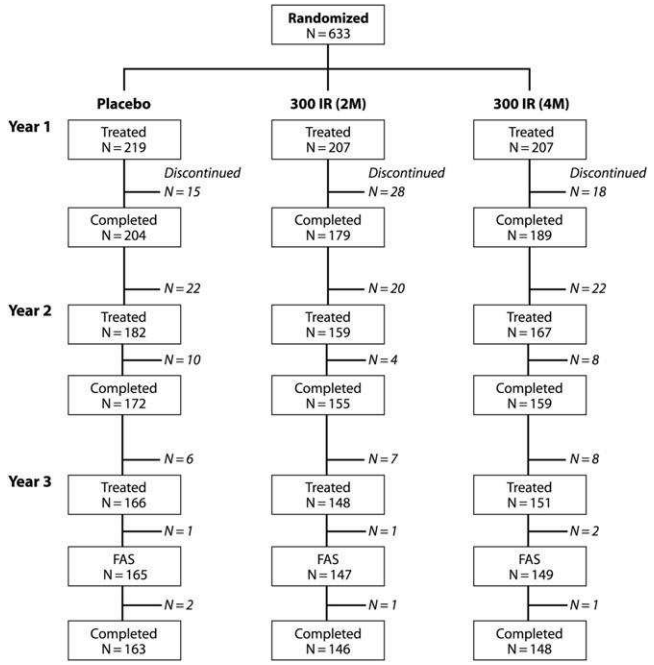


FIG 2. Subject disposition during the 3 treatment years. FAS, Full analysis set (only for year 3).

first 3 years of the study from 61 patients during the first treatment period to 22 during the second and only 8 in the third periods. The main reasons for discontinuation were adverse events (4.3%, 1.6%, and 0% in years 1, 2, and 3, respectively) and withdrawn consent (3.2%, 1.0%, and 0.9% in years 1, 2, and 3, respectively). The frequency of patient discontinuations was similar in the 3 treatment groups. Patients dropped out because of adverse events more frequently in the 2 active arms and because of other reasons more frequently in the placebo arm. The overall treatment dura-tion was 166, 172, and 171 days (average of 5.5 months per year) for study years 1, 2, and 3, respectively. Overall, the compli-ance was 97% or greater in years 1 to 3. Of the 64 discontinued patients after completion of the first treatment period, 18 were from 1 study center in the Czech Republic, where the investigator chose not to continue.

Demographic and baseline characteristics were well balanced among the 3 treatment groups (Table I). Asthma and sensitization status did not change during the 3 years, with an average of 13.7% of patients having asthma and the majority of patients expressing polysensitization to grass pollen and another allergen (59.2%). The mean retrospective RTSS was 14.0 (95% CI, 13.9-14.2), con-firming the severity of the patient's disease.

On the basis of the actual pollen data recorded, the second grass pollen season (2008) was the highest and the third (2009) was the lowest of the 3 years.

AAdSS (primary efficacy result) over the third pollen season

After 3 seasons of treatment, the mean AAdSS over the third pollen season (primary efficacy end point) was reduced by 34.8% (4-month group) and 37.7% (2-month group; relative least-squares [LS] mean differences) compared with that seen in the placebo group. The absolute differences of each active group

TABLE I. Demographic and baseline characteristics of the FAS population

	Placebo (n = 205)	300 IR tablets (2-month group [n = 188])	300 IR tablets (4-month group [n = 188])	Total (n = 581)
Sex (%)				
Men	59.5	59.0	64.9	61.1
Women	40.5	41.0	35.1	38.9
Age (y)				
Mean (SD)	30.2 (8.56)	30.4 (7.57)	30.9 (8.25)	30.5 (8.14)
Range	18-49	18-51	18-49	18-51
BMI (kg/m^2)				
Mean (SD)	23.99 (4.11)	24.20 (3.62)	24.28 (3.75)	24.15 (3.84)
Range	15.6-42.4	17.3-35.1	17.2-39.0	15.6-42.4
Patients with asthma (%)	15.6	11.7	14.9	14.1
Sensitization status (%)				
Monosensitized	39.5	41.5	39.4	40.1
Polysensitized	60.5	58.5	60.6	59.9
RRTSS				
Mean (SD)	14.1 (1.76)	13.9 (1.75)	14.1 (1.67)	14.0 (1.73)

BMI, Body mass index; FAS, full analysis set; RRTSS, retrospective rhinoconjunctivitis total symptom score.

TABLE II. Primary efficacy end point: AAdSS over the third pollen season in the FAS population

	Placebo (n = 165)	300 IR tablets (4-month group [n = 149])	300 IR tablets (2-month group [n = 147])
Mean (SD)	5.28 (3.942)	3.46 (3.625)	3.38 (3.210)
LS means*	5.21	3.39	3.24
Comparison with placebo group			
Point estimate		-1.81	-1.96
95% CI	—	-2.61 to -1.02	-2.76 to -1.16
P value	—	<.0001	<.0001
Relative LS mean difference	—	-34.8	-37.7

FAS, Full analysis set.
*Based on ANCOVA.

compared with the placebo group were as follows: -1.81 [95% CI, -2.61 to -1.02] for the 4-month group and -1.96 [95% CI, -2.79 to -1.16] for the 2-month group. They were statisti-cally significant (P < .0001, Table II). Over the 3 treatment pe-riods, the treatment effect was similar in monosensitized and polysensitized patients independent of treatment schedule (data not shown).

Secondary efficacy results at season 3

All symptom and medication scores were also lower in the third pollen season in patients receiving 300 IR tablets compared with those receiving placebo. The relative LS mean differences for ARTSS were reduced by 33.9% (4-month group) and 36.6% (2-month group) and for ARMS by 33.4% (4-month group) and 34.8% (2-month) compared with that seen in the placebo group

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 128, NUMBER 3

TABLE III. Secondary efficacy end points: ARTSSs, ARMSs, and average ISSs over the third pollen season in the FAS population

Measure	Group	LS mean (SE)	Difference to placebo in LS means			
			Point estimate	95% CI	P value	Relative difference
ARTSS	Placebo	4.03 (0.289)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	2.67 (0.297)	-1.37	-2.03 to -0.71	<.0001	-33.9%
	300 IR tablets (2-month group)	2.56 (0.307)	-1.48	-2.14 to -0.81	<.0001	-36.6%
ARMS	Placebo	0.47 (0.041)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.31 (0.042)	-0.16	-0.25 to -0.06	.0011	-33.4%
	300 IR tablets (2-month group)	0.31 (0.043)	-0.16	-0.26 to -0.07	.0007	-34.8%
Sneezing	Placebo	0.78 (0.060)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.62 (0.062)	-0.16	-0.30 to -0.02	.0207	-20.8%
	300 IR tablets (2-month group)	0.56 (0.064)	-0.22	-0.36 to -0.08	.0020	-27.9%
Rhinorrhea	Placebo	0.76 (0.059)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.51 (0.061)	-0.25	-0.38 to -0.11	.0004	-32.3%
	300 IR tablets (2-month group)	0.43 (0.063)	-0.33	-0.47 to -0.20	<.0001	-43.9%
Nasal pruritus	Placebo	0.68 (0.056)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.44 (0.057)	-0.24	-0.36 to -0.11	.0003	-35.0%
	300 IR tablets (2-month group)	0.44 (0.059)	-0.24	-0.37 to -0.11	.0003	-35.3%
Nasal congestion	Placebo	0.65 (0.061)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.37 (0.063)	-0.28	-0.42 to -0.14	.0001	-42.9%
	300 IR tablets (2-month group)	0.42 (0.065)	-0.24	-0.38 to -0.09	.0011	-36.2%
Ocular pruritus	Placebo	0.76 (0.061)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.50 (0.063)	-0.26	-0.40 to -0.12	.0002	-34.5%
	300 IR tablets (2-month group)	0.50 (0.065)	-0.26	-0.40 to -0.12	.0003	-34.0%
Watery eyes	Placebo	0.41 (0.048)	—	—	—	—
	300 IR tablets (4-month group)	0.23 (0.050)	-0.18	-0.29 to -0.07	.0014	-44.3%
	300 IR tablets (2-month group)	0.21 (0.051)	-0.19	-0.30 to -0.08	.0007	-47.4%

(Table III). Results were similar for both the 4-month and 2-month groups. The mean proportion of symptom- and medication-free days was higher in both active groups compared with that seen in the placebo group (4-month group, 37.9%; 2-month group, 36.9%; and placebo group, 26.4%).

The improvement in efficacy with 300 IR tablets was demonstrated for each of the 6 ISSs. The means of all 6 ISSs were significantly reduced versus placebo over the third pollen season by values ranging from 21% (sneezing) to 47% (watery eyes) in patients receiving active treatment, irrespective of the preseasonal schedule (Table III).

AAdSS over time

AAdSSs were assessed over each pollen season and demonstrated a progressively greater reduction compared with placebo for the 3 pollen seasons. Compared with the placebo group, the mean AAdSS was reduced by 20% at season 1, 34% at season 2, and 37% at season 3. There was no significant difference between the 2 active groups.

Quality of life

The Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire showed an improvement in the 2 active arms compared with the placebo arm for the 3 pollen seasons. The LS means difference showed significant changes for the 4-month and 2-month groups versus the placebo group: -0.31 (95% CI, -0.50 to -0.12; P =.0015) in the 4-month group and -0.46 (95% CI, -0.64 to -0.27; P < .0001) in the 2-month group at study year 1; -0.39 (95% CI, -0.61 to -0.17; P = .0005) in the 4-month group and -0.45 (95% CI, -0.67 to -0.22; P <.0001) in the 2-month group at study year 2; and 20.43 (95% CI, -0.64 to -0.19; P =.0003) in the 4-month group and -0.41 (95% CI, -0.63 to -0.18; P = .0004) in the 2-month group at study year 3.

Safety

Treatment with 300 IR tablets administered 4 or 2 months before and during the pollen season for 3 consecutive years was safe, and tolerability improved over the 3 years. In general, the incidence and severity of TEAEs decreased each year in all 3 treatment groups (Table IV). In the first study year the percentages of patients reporting a TEAE was greater than 80% for all 3 groups but had decreased to values of greater than 62% at year 2 to greater than 54% by year 3.

Most of the differences in TEAEs between the active and placebo treatment groups were due to local events related to the study treatment intake, with the most frequently reported at year 1 being the following: oral pruritus (>30% in the active groups vs 11.4% in the placebo group), throat irritation (>15% in the active groups vs 3.7% in the placebo group), and mouth edema (>6% in the active groups vs 1.4% in the placebo group). The incidence and severity of these local reactions decreased in consecutive treatment years in patients receiving active treatment (>57% in year 1, >43% in year 2, and >36% in year 3; Fig 3).

A total of 35 patients discontinued from the study because of TEAEs. During the first study year, the number of discontinuations from the study because of TEAEs was higher in the active groups compared with that seen in the placebo group (7.2% vs 1.4%). In contrast, there were no discontinuations caused by TEAEs in the third study year. Overall, serious TEAEs occurred in 11 subjects in the first study year (1 in the placebo group, 3 in

TABLE IV. Overview of TEAEs during the first 3 study years in the safety population

	No. (%) of subjects			
	300 IR tablets		300 IR tablets (2-month group)	
Description	(4-month group)	Placebo	Placebo period	Active period
Year 1	n = 207	n = 219	n = 207	n = 207
≥1 TEAE	183 (88.4)	174 (79.5)	62 (30.0)	158 (76.3)
>1 Application-site TEAE	149 (72.0)	89 (40.6)	23 (11.1)	119 (57.5)
≥1 Serious TEAE	7 (3.4)	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (1.0)
>1 Drug-related TEAE	147 (71.0)	55 (25.1)	22 (10.6)	118 (57.0)
≥1 Serious drug-related TEAE	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A TEAE leading to discontinuation	13 (6.3)	2 (0.9)	2 (1.0)	12 (5.8)
Year 2	n = 167	n = 182	n = 159	n = 159
>1 TEAE	123 (73.7)	94 (51.6)	39 (24.5)	101 (63.5)
≥1 Application-site TEAE	99 (59.3)	32 (17.6)	20 (12.6)	79 (49.7)
>1 Serious TEAE	1 (0.6)	1 (0.5)	2 (1.3)	0 (0)
≥1 Drug-related TEAE	98 (58.7)	17 (9.3)	16 (10.1)	75 (47.2)
>1 Serious drug-related TEAE	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
An AE leading to discontinuation	5 (3.0)	1 (0.5)	1 (0.6)	1 (0.6)
Year 3	n = 151	n = 166	n = 148	n = 148
≥1 TEAE	95 (62.9)	77 (46.4)	31 (20.9)	81 (54.7)
>1 Application-site TEAE	75 (49.7)	30 (18.1)	11 (7.4)	58 (39.2)
≥1 Serious TEAE	1 (0.7)	3 (1.8)	1 (0.7)	1 (0.7)
>1 Drug-related TEAE	68 (45.0)	6 (3.6)	6 (4.1)	55 (37.2)
≥1 Serious drug-related TEAE	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
An AE leading to discontinuation	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

AE, Adverse event.

the 2-month group, and 7 in the 4-month group), with 3 (all in the 4-month group) considered related to the study treatment by the investigator (1 severe local allergic reaction and 1 because of angioedema, both leading to permanent discontinuation from the study, and 1 case of diarrhea, which did not), all of which resolved. There were no serious TEAEs related to study medica-tion in the third study year. There were no relevant differences in any of the safety laboratory tests, physical examinations, or vital sign measurements between the treatment groups.

DISCUSSION

This is the first study of a pollen allergy immunotherapy to be specifically designed and statistically powered as a 3-season treatment study with a long-term follow-up. It demonstrated the efficacy and safety of 300 IR tablets for grass pollen–induced rhinoconjunctivitis over 3 seasons of therapy. Active treatment was started 2 or 4 months before the pollen season and continued during the pollen season for 3 consecutive years. AAdSSs were lower in both active groups in the third pollen season compared with those in the placebo group, and the differences were statistically signif-icant. The 300 IR tablets demonstrated efficacy from the first pollen season onward in both active groups. The higher efficacy compared with that seen in the previous pollen season was supported by a reduction in all symptom-related scores and RMSs. Likewise, the proportion of symptom- and medication-free days was higher in the active groups compared with that in the placebo group. There was no significant difference between the 2-month and 4-month groups for any of the efficacy parameters.

The AAdSS has been accepted by the European Medicines Agency as a suitable primary end point to be used in allergen immunotherapy studies.[8] The AAdSS refines the RTSS by adjusting for rescue medication use, and thus symptom severity and treatment effect are described more accurately. The AAdSS adjustment is performed when unadjusted data are considered to underestimate symptom severity (ie, the score on the day preceding a day with rescue medication use is only carried forward if the RTSS on the day with rescue med-ication use was lower).[9] This avoids speculation as to the mag-nitude of effect of the rescue medication on symptom severity. Biased data are only replaced by values actually observed on the preceding day, thus reducing the subjectivity and increas-ing robustness.

The pre- and coseasonal treatment concept has previously been shown to be efficacious from the first treatment season onward,[6,7] and follow-up results in a study with SLIT drops were indicative of a disease-modifying effect on seasonal allergic rhinitis.[12] These results support the current findings and pro-vide additional evidence that the efficacy of treatment with the 300 IR tablets is in the same range, as reported with another grass tablet administered in a year-long treatment,[13-15] but the preseasonal and coseasonal treatment have the advantage of being shorter. A positive effect on adherence can be expected. The decrease in the ARTSS at season 3 in the active groups versus the placebo group of 36.6% and 33.7% (relative LS mean differ-ences) for the 2-month and 4-month groups, respectively, com-pares favorably with the 29% observed by Durham at al.[15] Although the assessment methods in our study are different than those used in that study, in both studies a decrease in res-cue medication use was seen (relative LS mean differences of about 35% for the 2-month and 4-month groups and 40% in the other study). The improvement versus placebo in quality of life of 30% for the 2-month and 4-month groups and of 23% as reported by Durham et al shows that grass tablet immunotherapy has a positive effect on the patient's life. The current study is still ongoing and will assess the posttreatment efficacy and disease-modifying effect during the fourth and fifth pollen seasons (treatment-free years). The discontinuation rate was low (around 10% across all treatment groups in the first year and lower in years 2 and 3) and marginally lower than what has been reported (13%) for the other grass tablet immunother-apy study.[13-15]

Safety findings were those generally expected for this study population over the time period studied. The incidence and severity of TEAEs decreased with each treatment year. Another study with grass tablet immunotherapy also showed a generally good safety profile, although the safety at each separate year was not reported.[14]

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 128, NUMBER 3

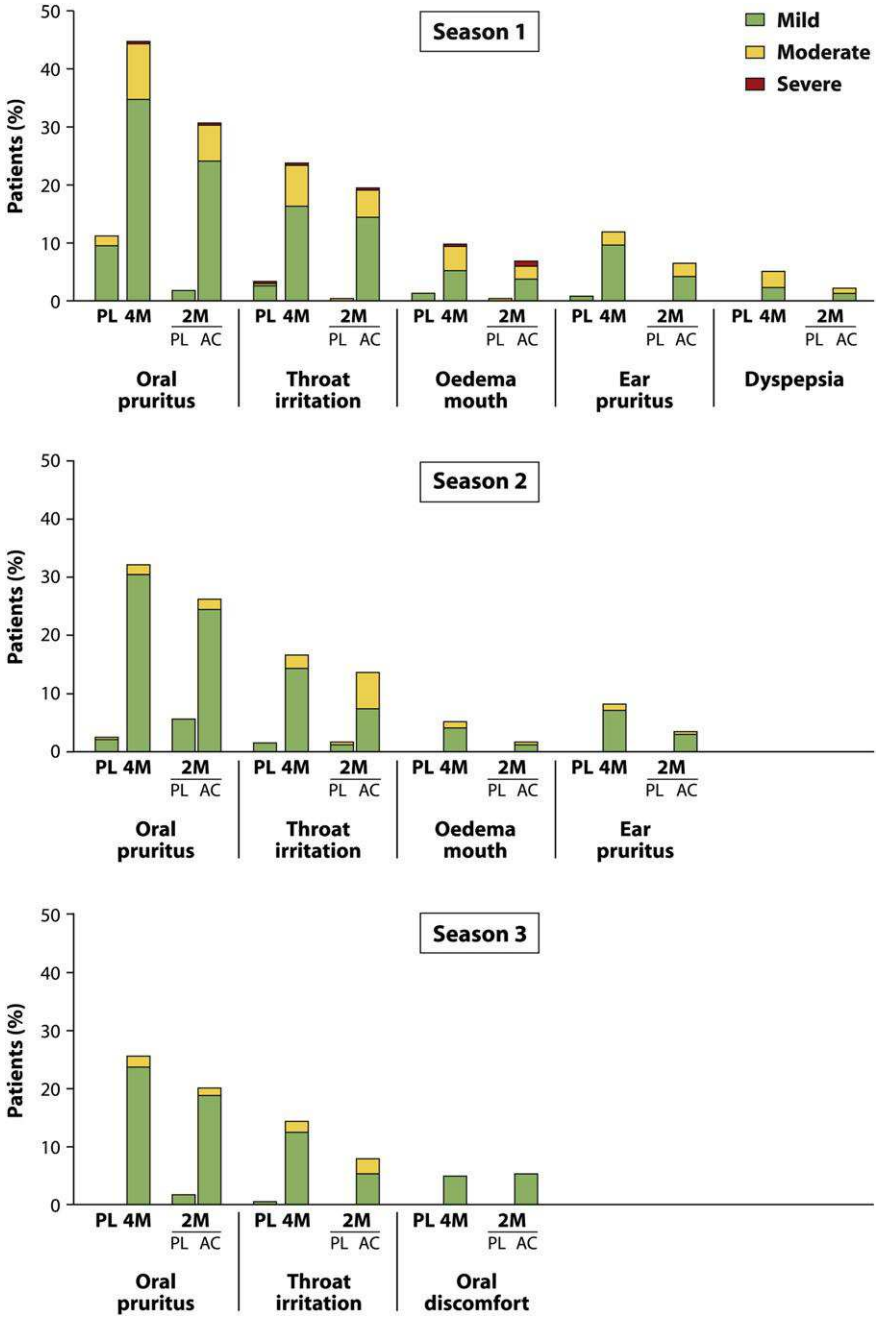


FIG 3. Most common (≥5%) treatment-related adverse events by intensity: incidence for seasons 1 to 3. Treatment-related adverse events are those considered by the investigator to be at least possibly related to the study treatment. TEAEs are events starting on or after the first administration at each treatment period, including the days of first and last administration of the investigational product. Adverse events are presented separately for the groups having received 2 or 4 months of active treatment and the placebo group. The 2-month treatment group had a shorter preseasonal treatment period, and these patients received placebo for the 2 months before the start of their active treatment; therefore they are presented separately as a 2-month placebo period and a 2-month active period. The placebo group used for efficacy comparisons received placebo during the entire 4 months before and then during the pollen season and is indicated for safety as 4 months of placebo. AC, Active treatment; PL, placebo.

In conclusion, treatment with the 300 IR 5-grass-pollen tablets was well tolerated and effective in reducing rhinoconjunctivitis symptoms and symptomatic medication use at each year up to season 3. These results suggest that there is no need for a continuous year-long therapy. The sustained clinical efficacy of treatment was supported by the reduction in other symptom-related scores and the marked increase in symptom- and medication-free days.

We thank all of the investigators for their commitment to this study.

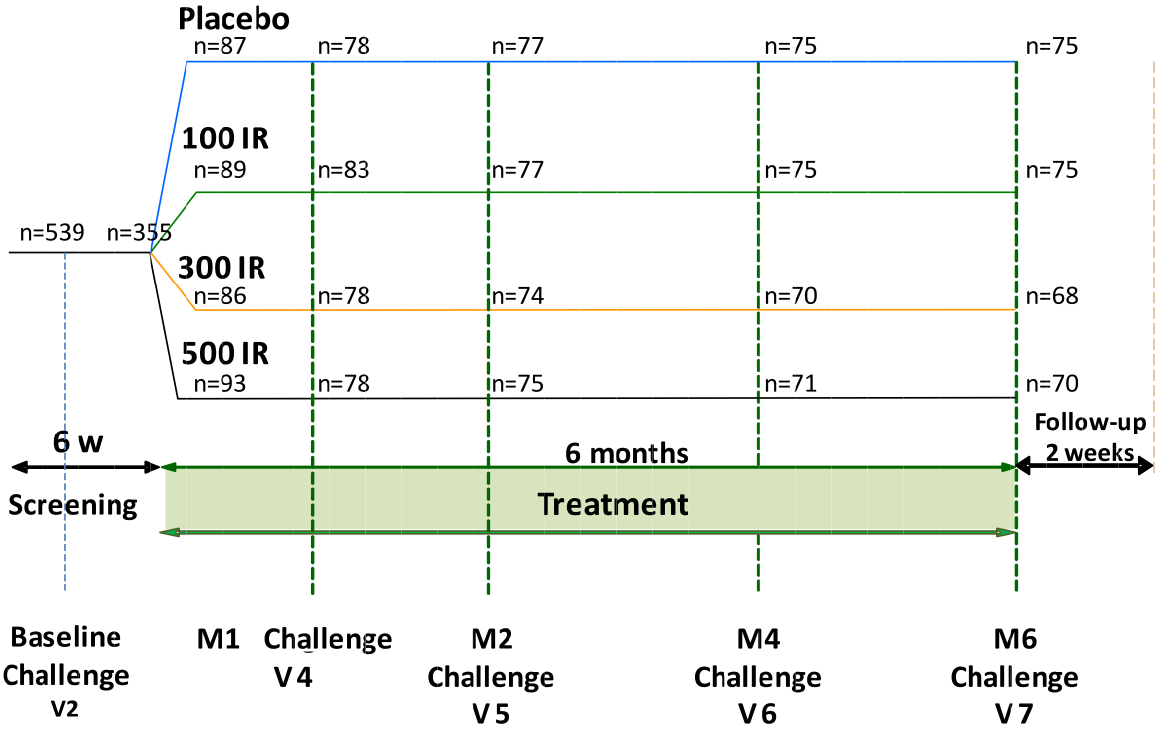
Clinical implications: The 5-grass-pollen 300 IR tablets admin-istered in a discontinued, seasonal treatment schedule showed sustained efficacy after 3 treatment seasons. In patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis, a continued treatment schedule is not necessary.

REFERENCES

1. Warner JO, Kaliner MA, Crisci CD, Del Giacco S, Frew AJ, Liu GH, et al. Allergy practice worldwide: a report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council. Int Arch Allergy Immunol 2006;139:166-74.
2. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). Allergy 2008; 63(suppl 86):8-160.
3. Van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Position Paper. Allergy 2000; 55:116-34.
4. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Eu-rope. Eur Respir J 2004;24:758-64.
5. Rachelefsky GS. National guidelines needed to manage rhinitis and prevent complications. Ann Allergy Asthma Immunol 1999;82:296-305.
6. Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, J€ager S, Montagut A, et al. Optimal dose, efficacy and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2007;120:1338-45.
7. Wahn U, Tabar A, Kuna P, Halken S, Montagut A, de Beaumont O, et al. Efficacy and safety of 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2009;123:160-6, e3.
8. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases CHMP/EWP/18504/2006. London: European Medicines Agency; 2008.
9. Grouin JM, Vicaut E, Jean-Alphonse S, Demoly P, Wahn U, Didier A, et al. The average adjusted symptom score, a new primary efficacy end-point for specific im-munotherapy trials. Clin Exp Allergy 2011[Epub ahead of print].
10. Canonica GW, Bousquet J, Casale T, Lockey RF, Baena-Cagnani CE, Pawankar R, et al. Sub-lingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009. Allergy 2009;64(suppl 91):1-59.
11. Juniper EF, Guyatt GH, Griffith LE, Ferrie PJ. Interpretation of rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire data. J Allergy Clin Immunol 1996;98:843-5.
12. Ott H, Sieber J, Brehler R, F€olster-Holst R, Kapp A, Klimek L, et al. Efficacy of grass pollen sublingual immunotherapy for three consecutive seasons and after ces-sation of treatment: the ECRIT study. Allergy 2009;64:179-86.
13. Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JGR, Rak S, Emminger W, et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal al-lergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2006;118:434-40.
14. Dahl R, Kapp A, Emminger W, Riis B, Colombo G, de Monchy JGR, et al. Sub-lingual grass allergen tablet immunotherapy provides sustained clinical benefit with progressive immunologic changes over 2 years. J Allergy Clin Immunol 2008;121:512-8.
15. Durham SR, Emminger W, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, et al. Long-term clinical efficacy in grass pollen rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. J Allergy Clin Immunol 2010;125:131-8, e7.

3. Étude VO67.10

3.1 Design de l'étude



3.2 Communication orale lors du congrès *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*, Milan, 2013

Efficacy of house dust mite sublingual tablets in an environmental exposure chamber study of patients with house dust mite-associated allergic rhinitis

M. Roux, W.H. Yang, A. Viatte, V. Cadic, R.K. Zeldin

9

Generation of a safe and efficacious allergy vaccine for birch pollen and associated food allergies

Hofer, H[1]; Hauser, M[1]; Pichler, U[1]; Asam, C[1]; Himly, M[2]; Ebner, C[3]; Briza, P[2]; Ferreira, F[1]; Wallner, M[1]
[1]University of Salzburg, Christian Doppler Laboratory for Allergy Diagnosis and Therapy, Salzburg, Austria; [2]Department of Molecular Biology, University of Salzburg, Salzburg, Austria; [3]Allergieambulatorium Reumannplatz, Vienna, Austria

Background: In the Northern Hemisphere, Bet v 1 from birch pollen is the main sensi-tiser for tree pollen allergy. People allergic to birch pollen also often develop adverse reactions to structurally related allergens from fruits, nuts, and vegetables, resulting in the oral allergy syndrome (OAS). Spe-cific immunotherapy (SIT) is the only cura-tive approach to meet the disease. Therapy-induced IgE-mediated side-effects in conventional SIT can be diminished by replacing pollen extracts with hypoaller-genic recombinant molecules.

Method: With the intention of simulta-neously curing birch pollen allergy and related adverse reactions to apple and hazelnut, a hybrid hypoallergen was designed by combining parts of the three parental allergens. Further, a mutation to alter the structure of the molecule (MBC4) was introduced. The hybrid protein, as well as parental allergens were produced rec-ombinantly, purified to homogeneity, and characterised physico-chemically. To exam-ine the IgE-binding properties of MBC4, ELISA and mediator release assays were performed with sera of allergic patients. Moreover, a mouse model was established to monitor the immunologic behavior of MBC4 in vivo.

Results: The new hybrid molecule showed alternation in secondary structural ele-ments characteristic for Bet v 1 -like aller-gens. Moreover, it was less reactive with human IgE than its parental allergens but still able to induce a strong cross-reactive IgG response in mice. Upon restimulation of spleenocytes of MBC4 immunised ani-mals with parental allergens, high numbers of IFN-c secreting cells were induced indic-ative for a strong cross-reactive Th1 immune response. However, IL-4 or IL-5 producing cells induced by MBC4 immuni-sation did not cross-react upon restimula-tion with parental allergens.

Conclusion: MBC4 was proven to react as hypoallergen as determined by ELISA as well as mediator release assays. Significant changes in the protein structure of MBC4 had no negative influence on its immuno-genicity. The hybrid molecule induced high levels of cross-reactive IgG antibodies in a mouse model. Therefore, MBC4 represents a promising candidate for a protein-based vaccine to simultaneously treat birch pollen and associated food allergies.

10

Sublingual immunotherapy with a five grass allergen extract on reduces local inflammation as measured by exhaled breath temperature in grass pollen allergic patients

Kralimarkova, TZ[1]; Staevska, M[1]; Rankova, L[2]; Lazarova, T[1]; Racheva, R[1]; Mustakov, T[1]; Rasheva, M[1]; Filipova, V[1]; Koleva, M[1]; Mincheva, R[1]; Dimitrov, VD[1]; Popov, TA[1]
[1]Medical University Sofia, Clinic of Allergy and Asthma, Sofia, Bulgaria; [2]National Hospital of Transport – Sofia, Sofia, Bulgaria

Background: Pollinosis is a classical atopic condition in which allergen immunother-apy has been proven to decrease in-season complaints and to change the natural course of the disease. However, clinical studies rely on assessment of subjective symptoms and substantial placebo effect has been documented in double blind stud-ies. Our previous data suggest that exhaled breath temperature (EBT) increases during the pollen season in subjects with pollino-sis. The aim of our study was to explore whether sublingual immunotherapy (SLIT) would influence the increase of EBT during the grass pollen season.

Method: We recruited 56 subjects (33 men, mean age 30 12 years) with grass pollen allergy for this double-blind placebo-con-trolled clinical trial. All subjects had posi-tive skin prick tests restricted to grass pollen allergen extracts. Spirometry was performed using Schiller SP 10 equipment (Switzerlznd). EBT was assessed with por-table hand-held device at controlled (22– 23°C) indoor temperature (X-halo, Del-medica Investments Ltd, Singapore). Blood samples were collected to measure eosino-phil counts. Evaluations were performed before the grass pollen season, at the peak of it and about 2 months after the pollen counts have subsided. Subjects were rando-mised to be treated with five component grass allergen solution or with placebo applied sublingually for at least 3 months before, and during the pollen season.

Results: Out of 56 recruited patients, 51 completed the study visits before and dur-ing the pollen season, 45 returned for the post-seasonal control visit. Overall, EBT increased from 34.32 0.08°C to 34.71 0.05°C, $P < 0.001$. In placebo group EBT changed from 34.26 0.10°C to 34.80 0.07°C (increase of 0.54°C, $P < 0.001$) and in the SLIT group, the EBT changed from 34.40 0.12°C to 34.61 0.71°C (increase of 0.21°C, $P = 0.052$). The difference between active (0.54 0.09°C) and placebo (0.21 0.10°C) was statistically significant ($P = 0.03$). EBT of all subjects returned to pre-seasonal levels after the grass pollen season. Spirometry values and blood eosin-ophil counts did not change significantly at any of the visits, nor between the treatment arms.

Conclusion: Our study provides evidence for the effectiveness of SLIT with grass pollen allergen extracts on the basis of EBT, an objective measure allegedly reflecting the level of airway inflammation.

11

Efficacy of house dust mite sublingual tablets in an environmental exposure chamber study of patients with house dust mite-associated allergic rhinitis

Roux, M[1]; Yang, WH[2]; Viatte, A[1]; Cadic, V[1]; Zeldin, RK[1]
[1]Stallergenes, Antony, France; [2]Allergy and Asthama Research Centre, Ottawa, ON, Canada

Background: House dust mite (HDM) sub-lingual immunotherapy (SLIT) tablets have proven efficacious in treating HDM-associ-ated allergic rhinitis in a natural field study. This phase II study assessed the dose-response relationship by testing sev-eral doses in an environmental exposure chamber (EEC).

Methods: In this DBPC study, adults with HDM-associated allergic rhinitis for at least 1 year, a positive prick skin test, and mites-specific IgE antibodies ≥0.7 kU/l were randomised 1:1:1:1 to receive a daily sublingual tablet containing either placebo or HDM allergens at a dose of 100IR, 300IR or 500IR (IR = Index of Reactivity) for 6 months. Participant selection and efficacy evaluation were based on rhinitis total symptom scores (RTSS) upon expo-sure to D. pteronyssinus over 4 h in the EEC during screening and after 6 months, respectively. The areas under the curve of RTSS corresponding to all time points ($RTSS_AUC_{0–4\ h}$) and the last 2 h ($RTSS_AUC_{2–4\ h}$) of each EEC were deter-mined. Changes from baseline (ChBl) to the end of treatment in these values served as the primary ($ChBl_RTSS_AUC_{0–4\ h}$) and secondary ($ChBl_RTSS_AUC_{2–4\ h}$) efficacy endpoints. Differences between placebo and active groups were analyzed by ANCOVA. Safety was assessed by means of adverse event (AE) reporting.

Results: Three hundred and fifty-five par-ticipants were randomised: Placebo (n = 87), 100IR (n = 89), 300IR (n = 86), and 500IR (n = 93). The least squares mean differences vs placebo for the 100IR, 300IR and 500IR groups on the primary efficacy endpoint indicated reductions in symptom severity of 20%, 29% and 33%, respectively. The corresponding relative

© 2013 The Authors

reductions over the last 2 h of the 6 month challenge were 31%, 41%, and 42%, respectively. The incidences of AEs were similar across the active treatment groups with throat irritation, oral pruritus, and mouth oedema the most frequent treat-ment-related AEs.

Conclusion: After 6 months of treatment, a dose effect of sublingual tablets of HDM allergen extract was observed in this aller-gen challenge study. The 500IR dose was associated with the greatest reduction in symptom score. The efficacy observed over the last two hours of exposure reinforces the robustness of the effect. All doses were well-tolerated.

12

Grass pollen carbamylated monomeric allergoid sublingual tablets for the treatment of allergic rhino-conjunctivitis: a prospective, randomised, controlled, double-blind dose-finding study in 155 patients

Eichel, A[1]; Schmalz, P[2]; Mosges,€ R[1]
[1]University of Cologne, IMSIE, Cologne, Germany;
[2]University of Cologne, ZKS, Cologne, Germany

Background: The efficacy, the safety, and tolerability of sublingually administered, monomeric carbamylated allergoids have been documented in several DBPC trials. Purpose of this study was to confirm the optimal dose of the current marketed product in a conjunctival provocation test (CPT).

Method: Patients 18–70 year-old with a history of 2 or more years of moderate to severe allergic rhino-conjunctivitis due to grass pollen with/without controlled asthma and a positive skin test were recruited to receive tablets containing grass carbamylated allergoid with a daily dose of 300UA, 600UA, 1000UA or 2000UA for 84 consecutive days between January and April 2012. Primary endpoint of this pro-spective, randomised, double-blind, con-trolled trial was the improvement of the reaction to CPT challenge with grass-pol-len concentrations of 100 SQ, 1000 SQ and 10000 SQ evaluated by the investigators on a rating-scale according to Riechelmann. Secondary endpoints were patients' rating of treatment satisfaction and investigators' rating of efficacy (0–3), their rating of tol-erability (0–3), and frequency of adverse reactions.

Results: Data of 151 of the 155 patients included in the treatment phase were analyzed in the ITT population (mean age 40.3 year, 54% males, mean disease duration 21 year). Their reaction to conjunctival challenge significantly improved after 3 months of treatment in all four treatment groups (70.4%, 62.9%, 76.7%, and 66.7% of patients resp.), consistent with investigators' judgement of efficacy (mean scores 2.11, 1.95, 2.37, 2.03). Improvement under 1000 UA daily dose was rated significantly better ($P < 0.03$) as compared to that of the other doses. Thirty-eight treatment-emergent adverse events occurred in 27 of the patients (17.4%) again with the lowest incidence in the 1000 UA group. All these were classified as mild or moderate with an equal distribu-tion of local and systemic side-effects. Only one patient experienced a local side effect after the first application. Of 98.7% of patients rated the tolerability 'very good' or 'good'. No serious adverse events nor drop-outs due to safety-reasons occurred.

Conclusion: Carbamylated monomeric allergoid tablets of grass pollen are well tolerated and effective in improving the allergic condition when taken sublingually for 3 months. Of 1000 UA daily dose demonstrated the best results in the efficacy and safety analysis.

Tableau 8 : Familles d'allergènes et exemples d'allergènes majeurs associés.

Famille d'allergènes	Source d'allergènes	Espèce	Exemples d'allergènes majeurs
Pneumallergènes	Acariens (corps/fécès)	*Dermatogoides pteronyssinus*	**Der p 1** **Der p 2**
		Dermatophagoides farinae	**Der f 1** **Der f 2**
	Pollen de graminées	*Dactylis glomerata* (dactyle)	**Dac g 1 / Dac g 5**
		Phleum pratense (phléole)	**Phl p 1 / Phl p 5**
		Anthoxanthum odoratum (flouve)	**Ant o 1 / Ant o 5**
		Lolium perenne (ivraie)	**Lol p 1 / Lol p 5**
		Poa pratensis (pâturin)	**Poa p 1 / Poa p 5**
	Pollen d'arbres	*Betula pendula* (bouleau)	**Bet v 1**
		Cupressus sempervirens (cyprès)	**Cup a 1**
		Olea europea (olivier)	**Ole e 1**
	Pollens d'herbacées	*Ambrosia artemisifolia* (ambroisie)	**Amb a 1**
		Artemisia vulgaris (armoise)	**Art v 1**
		Parietaria officinalis (pariétaire)	**Par j 1**
	Phanères de chien, chat	*Canis familiaris*	**Can f 1**
		Felix domesticus	**Fel d 1**
	Insectes	*Blattella germanica* (Blatte)	**Bla g 1**
	Moisissures	*Alternaria alternata*	**Alt a 1**
		Aspergillus fumigatus	**Asp f 1**
Trophallergènes	Arachide	*Arachis hypogea*	**Ara h 1**
	Pomme	*Malus domestica*	**Mal d 1**
	Pêche	*Prunus persica*	**Pru p 1**
Venins	Guêpe	*Vespula vulgaris*	**Ves v 1**
		Polistes dominula	**Pol d 5**
	Abeille	*Apis mellifera*	**Api m 1**

Tableau 9 : Classification générale des biomarqueurs.

Biomarqueur		**Définitions, commentaires**
Biomarqueur associé à une pathologie	Biomarqueur de risque	Associé au risque de développer une pathologie
	Biomarqueur diagnostic	Indicateur de l'atteinte d'un patient par une pathologie
	Biomarqueur du stade pathologique	Evaluation de la sévérité d'une pathologie
	Biomarqueur pronostic	Indicateur du cours et/ou de l'issue probable d'une pathologie pour un individu non traité, également utilisé pour définir le risque initial de l'issue pathologique, indépendamment d'un traitement
Biomarqueur lié à une thérapie : Apporte des informations sur la réponse du patient suite à une intervention thérapeutique	Biomarqueur de toxicité	Détermination de la susceptibilité d'un patient à développer des effets secondaires
	Biomarqueur prédictif	Mesure réalisée avant traitement ou à l'inclusion, utilisée pour prédire la réponse du patient à un traitement particulier
	Biomarqueur d'activité / d'efficacité à court terme	Suivi de l'effet d'une intervention thérapeutique, en fonction de son mécanisme d'action
	Biomarqueur "réprésentant" / d'efficacité à long terme	Destiné à substituer une mesure clinique finale dans les études cliniques, et indicateur du bénéfice clinique
	Biomarqueur pharmacogénomique	Permet l'étude des mécanismes génétiques et des variations individuelles de la réponse aux thérapies, par la pharmacogénétique (étude de l'influence génétique sur la réponse médicamenteuse) et la pharmacogénomique (étude de l'influence des variations génomiques sur la réponse médicamenteuse)
	Biomarqueur pharmacodynamique	Mesure de l'effet d'un traitement sur une pathologie, détermination de la dose adaptée (semblable au biomarqueur d'efficacité)
	Biomarqueur mécanistique	Evaluation, dans les études cliniques, de l'atteinte de sa cible par la molécule d'intérêt thérapeutique

Tableau 10 : Modifications post-traductionnelles typiques, détectées en spectrométrie de masse.

Modification post traductionnelle	Résidus portant la modification	Groupe chimique	Δ masse (Da) induit	Remarque
Phosphorylation	Ser, Thr, Tyr	HPO_3	79,9663	
N-glycosylation	Asn	Glycane	≥ 132,0432 (-0,9840 et 2,9890)	La mono- ou polyglycosylation induisent des Δ de masses variables. Plus petite augmentation de masse : monoglycosylation par un pentose (132,0432). Autres monoglycosylations : Déoxyhexose (146,0579), Héxose (162,0528), N-acétylhexosamine (203,0794), N-acétyl-neuraminic acid (291,0954), N-glycolyl-neuraminic acid (307,0903). La polyglycosylation créée l'addition de combinaisons de ces masses. La présence et la localisation d'un motif de N-glycosylation peut être déterminée par un traitement par PNGase, et l'observation d'une perte de masse de 0,9840. L'utilisation d'eau lourde $H_2{}^{18}O$ pendant le traitement à PNGase génère une augmentation de masse de 2,9890 Da, plus facilement détectable, qui peut être distinguée de la perte de masse liée à la déamidation des asparagines (-0,9840 Da)
O-glycosylation	Ser, Thr	Glycane	≥ 132,0432	
Oxydation	Met	O	15,9949	
Méthylation	N- et C-terminus, Lys, Ser, Thr, Asn, Gln, (Iso)Asp = acide aspartique racémisé	CH_2	14,0156	
Diméthylation	Arg, Lys	CH_2CH_2	28,0313	
Triméthylation	Arg, Lys	$CH_2CH_2CH_2$	42,0470	
S-Nitrosylation	Cys	NO	28,9902	
Citrullination	Arg	O	0,9840	
Ubiquitination	Lys	Ubiquitin	≥ 8564,8448 (114,0429)	L'ubiquitination ou la polyubiquitination entraînent un Δ de masse supérieur ou égal à 8564,8448 Da, respectivement. La digestion trypsique clive une majeure partie de la molécule d'ubiquitine gréffée au résidu lysine, créant un dipeptide signature Gly-Gly sur la chaîne latérale de la lysine, avec un décalage de masse détectable, de 114,0429 Da.
Acétylation	N-terminus, Lys, Ser	CH_3CO	42,0106	
Carbamylation	N-terminus, Lys, Arg	$CONH_2$	43,0058	
Biotynylation	N-terminus, Lys	Biotine	226,0776	

BIBLIOGRAPHIE

1. Goldsby, R.A., et al., *Kuby immunology*. 4th ed. 2000, New York: W.H. Freeman. xxv, 670 p.
2. Ozdoganoglu, T. and M. Songu, *The burden of allergic rhinitis and asthma.* Ther Adv Respir Dis, 2012. **6**(1): p. 11-23.
3. Platts-Mills, T.A., et al., *Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma?* Allergy, 2005. **60 Suppl 79**: p. 25-31.
4. Holloway, J.W. and G.H. Koppelman, *Identifying novel genes contributing to asthma pathogenesis.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007. **7**(1): p. 69-74.
5. Vercelli, D., *Discovering susceptibility genes for asthma and allergy.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 169-82.
6. Ober, C. and T.C. Yao, *The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective.* Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 10-30.
7. Yang, I.A. and J.W. Holloway, *Asthma: advancing gene-environment studies.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(9): p. 1264-6.
8. Welch, J.S., et al., *TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism.* J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42821-9.
9. Corren, J., *Role of interleukin-13 in asthma.* Curr Allergy Asthma Rep, 2013. **13**(5): p. 415-20.
10. Eifan, A.O., et al., *Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses.* Clin Exp Allergy, 2012. **42**(6): p. 891-900.
11. Martino, D. and S. Prescott, *Epigenetics and prenatal influences on asthma and allergic airways disease.* Chest, 2011. **139**(3): p. 640-7.
12. Beck, I., et al., *High environmental ozone levels lead to enhanced allergenicity of birch pollen.* PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80147.
13. Morgenstern, V., et al., *Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(12): p. 1331-7.
14. Bonisch, U., et al., *Volatile organic compounds enhance allergic airway inflammation in an experimental mouse model.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39817.

15. Weisse, K., et al., *The LINA cohort: indoor chemical exposure, circulating eosinophil/basophil (Eo/B) progenitors and early life skin manifestations.* Clin Exp Allergy, 2012. **42**(9): p. 1337-46.
16. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size.* BMJ, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
17. Matricardi, P.M., G.R. Bouygue, and S. Tripodi, *Inner-city asthma and the hygiene hypothesis.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **89**(6 Suppl 1): p. 69-74.
18. Lluis, A., et al., *Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood.* J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 551-9.
19. Fuchs, O., et al., *Farming environments and childhood atopy, wheeze, lung function, and exhaled nitric oxide.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(2): p. 382-8 e6.
20. Platts-Mills, T., et al., *Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study.* Lancet, 2001. **357**(9258): p. 752-6.
21. Illi, S., et al., *The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(5): p. 925-31.
22. Rochat, M.K., et al., *Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school-aged children.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(6): p. 1170-5 e2.
23. Illi, S., et al., *The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5): p. 709-14.
24. Greiner, A.N., et al., *Allergic rhinitis.* Lancet, 2011. **378**(9809): p. 2112-22.
25. Bousquet, J., et al., *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen).* Allergy, 2008. **63 Suppl 86**: p. 8-160.
26. Wenzel, S.E., *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches.* Nat Med, 2012. **18**(5): p. 716-25.
27. Bateman, E.D., et al., *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.* Eur Respir J, 2008. **31**(1): p. 143-78.
28. Wang, J. and H.A. Sampson, *Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment.* Allergy Asthma Immunol Res, 2009. **1**(1): p. 19-29.
29. Bieber, T., *Atopic dermatitis.* N Engl J Med, 2008. **358**(14): p. 1483-94.
30. Simons, F.E., et al., *World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: summary.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 587-93 e1-22.

31. Radauer, C., et al., *Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 847-52 e7.
32. Jahn-Schmid, B., et al., *Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(1): p. 213-9.
33. Thomas, W.R., *Geography of house dust mite allergens.* Asian Pac J Allergy Immunol, 2010. **28**(4): p. 211-24.
34. Moingeon, P., *Progress in the development of specific immunotherapies for house dust mite allergies.* Expert Rev Vaccines, 2014: p. 1-11.
35. Thomas, W.R., B.J. Hales, and W.A. Smith, *House dust mite allergens in asthma and allergy.* Trends Mol Med, 2010. **16**(7): p. 321-8.
36. Niederberger, V., et al., *IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE.* J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(2 Pt 1): p. 258-64.
37. Bousquet, J., et al., *Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens.* Allergy, 2012. **67**(1): p. 18-24.
38. Giangrieco, I., et al., *Allergens in allergy diagnosis: a glimpse at emerging new concepts and methodologies.* Transl Med UniSa, 2012. **4**: p. 27-33.
39. Bousquet, J., et al., *Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens. A GA2LEN project.* Allergy, 2006. **61**(6): p. 671-80.
40. Green, R.H., et al., *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial.* Lancet, 2002. **360**(9347): p. 1715-21.
41. Wan, H., et al., *Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions.* J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 123-33.
42. Lackie, P.M., et al., *Expression of CD44 isoforms is increased in the airway epithelium of asthmatic subjects.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(1): p. 14-22.
43. Xiao, C., et al., *Defective epithelial barrier function in asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 549-56 e1-12.
44. Hackett, T.L., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(2): p. 122-33.

45. Nawijn, M.C., et al., *E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization.* Trends Immunol, 2011. **32**(6): p. 248-55.
46. Jiang, A., et al., *Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation.* Immunity, 2007. **27**(4): p. 610-24.
47. Heijink, I.H., et al., *Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity.* J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7678-85.
48. Jacquet, A., *Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response.* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(3): p. 305-11.
49. Herbert, C.A., et al., *Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p1.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(4): p. 369-78.
50. Antony, A.B., R.S. Tepper, and K.A. Mohammed, *Cockroach extract antigen increases bronchial airway epithelial permeability.* J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(4): p. 589-95.
51. Runswick, S., et al., *Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions.* Respirology, 2007. **12**(6): p. 834-42.
52. Chen, J.C., et al., *The protease allergen Pen c 13 induces allergic airway inflammation and changes in epithelial barrier integrity and function in a murine model.* J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26667-79.
53. Olivera, D.S., et al., *Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro.* Inhal Toxicol, 2007. **19**(1): p. 13-22.
54. Sajjan, U., et al., *Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(12): p. 1271-81.
55. Heijink, I.H., A. van Oosterhout, and A. Kapus, *Epidermal growth factor receptor signalling contributes to house dust mite-induced epithelial barrier dysfunction.* Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 1016-26.
56. Sidhaye, V.K., et al., *Septin-2 mediates airway epithelial barrier function in physiologic and pathologic conditions.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(1): p. 120-6.
57. Ahdieh, M., T. Vandenbos, and A. Youakim, *Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma.* Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(6): p. C2029-38.
58. Groschwitz, K.R. and S.P. Hogan, *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(1): p. 3-20; quiz 21-2.

59. Tieu, D.D., et al., *Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(3): p. 667-75.
60. Hughes, J.L., et al., *Reduced structural proteins in the conjunctival epithelium in allergic eye disease.* Allergy, 2006. **61**(11): p. 1268-74.
61. Carson, C.G., et al., *Clinical presentation of atopic dermatitis by filaggrin gene mutation status during the first 7 years of life in a prospective cohort study.* PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48678.
62. Mjosberg, J., et al., *Transcriptional control of innate lymphoid cells.* Eur J Immunol, 2012. **42**(8): p. 1916-23.
63. Walker, J.A., J.L. Barlow, and A.N. McKenzie, *Innate lymphoid cells--how did we miss them?* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 75-87.
64. Roediger, B., et al., *Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells.* Nat Immunol, 2013. **14**(6): p. 564-73.
65. Qiu, J., et al., *Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora.* Immunity, 2013. **39**(2): p. 386-99.
66. Steinke, J.W. and M.G. Lawrence, *T-cell biology in immunotherapy.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2014. **112**(3): p. 195-9.
67. Barlow, J.L., et al., *Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(1): p. 191-8 e1-4.
68. Halim, T.Y., et al., *Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation.* Immunity, 2012. **36**(3): p. 451-63.
69. Klein Wolterink, R.G., 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**(5): p. 1106-16.
70. Kim, H.Y., et al., *Innate lymphoid cells responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(1): p. 216-27 e1-6.
71. Mjosberg, J.M., et al., *Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161.* Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1055-62.

72. Veres, T.Z., et al., *Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy.* Am J Pathol, 2011. **179**(2): p. 603-9.
73. Blank, F., et al., *Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall.* Immunobiology, 2011. **216**(1-2): p. 86-95.
74. Kassianos, A.J., et al., *Isolation of human blood DC subtypes.* Methods Mol Biol, 2010. **595**: p. 45-54.
75. Dua, B., et al., *Myeloid and plasmacytoid dendritic cells in induced sputum after allergen inhalation in subjects with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(1): p. 133-9.
76. Sha, Q., et al., *Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(3): p. 358-64.
77. Plantinga, M., et al., *Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen.* Immunity, 2013. **38**(2): p. 322-35.
78. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 243-70.
79. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.* Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
80. Willart, M.A. and B.N. Lambrecht, *The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(1): p. 12-9.
81. Piggott, D.A., et al., *MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen.* J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 459-67.
82. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.* N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.
83. Carlsten, C., et al., *Association between endotoxin and mite allergen exposure with asthma and specific sensitization at age 7 in high-risk children.* Pediatr Allergy Immunol, 2011. **22**(3): p. 320-6.
84. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization.* J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 627-36.

85. Boldogh, I., et al., *ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation.* J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2169-79.

86. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen.* J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1645-51.

87. Rodriguez, D., et al., *Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity.* J Immunol, 2003. **171**(2): p. 1001-8.

88. Lam, D., et al., *Airway house dust extract exposures modify allergen-induced airway hypersensitivity responses by TLR4-dependent and independent pathways.* J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2925-32.

89. Soumelis, V., et al., *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP.* Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 673-80.

90. Ito, T., et al., *TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.* J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1213-23.

91. Hurst, S.D., et al., *New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25.* J Immunol, 2002. **169**(1): p. 443-53.

92. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.* Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.

93. Perros, F., et al., *Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation.* Allergy, 2009. **64**(7): p. 995-1002.

94. Holgate, S.T., *Innate and adaptive immune responses in asthma.* Nat Med, 2012. **18**(5): p. 673-83.

95. Romagnani, S., *Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 395-400.

96. Akdis, M., et al., *T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells.* FASEB J, 2003. **17**(9): p. 1026-35.

97. Sallmann, E., et al., *High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate Th2-dependent inflammation.* J Immunol, 2011. **187**(1): p. 164-71.

98. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 721-32.

99. Coeffier, M., et al., *Epsilon germ-line and IL-4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy.* Allergy, 2005. **60**(6): p. 822-7.

100. KleinJan, A., et al., *Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients.* Eur Respir J, 2000. **15**(3): p. 491-7.

101. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease.* Nat Med, 2012. **18**(5): p. 693-704.

102. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 193-204.

103. Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta, *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 761-71.

104. Moon, T.C., et al., *Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function.* Mucosal Immunol, 2010. **3**(2): p. 111-28.

105. Queto, T., et al., *G-CSF suppresses allergic pulmonary inflammation, downmodulating cytokine, chemokine and eosinophil production.* Life Sci, 2011. **88**(19-20): p. 830-8.

106. Nussbaum, J.C., et al., *Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis.* Nature, 2013. **502**(7470): p. 245-8.

107. Tachdjian, R., et al., *In vivo regulation of the allergic response by the IL-4 receptor alpha chain immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 1128-1136 e8.

108. Webb, D.C., et al., *Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 cell function.* J Immunol, 2007. **178**(1): p. 219-27.

109. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The airway epithelium in asthma.* Nat Med, 2012. **18**(5): p. 684-92.

110. Hammad, H., et al., *House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells.* Nat Med, 2009. **15**(4): p. 410-6.

111. Nathan, A.T., et al., *Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(3): p. 612-8.

112. Dombrowicz, D., et al., *Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene.* Cell, 1993. **75**(5): p. 969-76.

113. Tsujimura, Y., et al., *Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis.* Immunity, 2008. **28**(4): p. 581-9.

114. Mukai, K., et al., *New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy.* Allergol Int, 2009. **58**(1): p. 11-9.

115. Jonsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis.* J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1484-96.

116. Mancardi, D.A., et al., *FcgammaRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcepsilonRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation.* J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3738-50.

117. Barnes, P.J., *Pathophysiology of allergic inflammation.* Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 31-50.

118. van Rensen, E.L., et al., *Eosinophils in bronchial mucosa of asthmatics after allergen challenge: effect of anti-IgE treatment.* Allergy, 2009. **64**(1): p. 72-80.

119. Choi, J.S., et al., *Role of neutrophils in persistent airway obstruction due to refractory asthma.* Respirology, 2012. **17**(2): p. 322-9.

120. Uddin, M., et al., *Prosurvival activity for airway neutrophils in severe asthma.* Thorax, 2010. **65**(8): p. 684-9.

121. Wang, Y.H., et al., *A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma.* J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2479-91.

122. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.

123. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state.* Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.

124. Jutel, M. and C.A. Akdis, *T-cell subset regulation in atopy.* Curr Allergy Asthma Rep, 2011. **11**(2): p. 139-45.

125. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity.* Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2076-82.

126. Akkoc, T., et al., *Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(3): p. 652-658 e1.

127. Solarewicz-Madejek, K., et al., *T cells and eosinophils in bronchial smooth muscle cell death in asthma.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(6): p. 845-55.

128. Trautmann, A., et al., *T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(2): p. 329-37.

129. Meyer, N., et al., *IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(4): p. 858-865 e10.

130. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.* Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-45.

131. Henness, S., et al., *IL-17A augments TNF-alpha-induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(4): p. 958-64.

132. Toda, M., et al., *Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(4): p. 875-81.

133. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset.* Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1341-6.

134. Souwer, Y., et al., *IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease.* Curr Opin Immunol, 2010. **22**(6): p. 821-6.

135. Nograles, K.E., et al., *IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(6): p. 1244-52 e2.

136. Palomares, O., et al., *Role of Treg in immune regulation of allergic diseases.* Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1232-40.

137. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.* J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.

138. Ling, E.M., et al., *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease.* Lancet, 2004. **363**(9409): p. 608-15.

139. Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi, *Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease.* Int Rev Immunol, 2005. **24**(3-4): p. 211-26.

140. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.* J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.

141. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation.* J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1499-505.

142. Gorelik, L., P.E. Fields, and R.A. Flavell, *Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression.* J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4773-7.

143. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7.* J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5149-53.

144. Oida, T., et al., *TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling.* J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2331-9.

145. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.* J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.

146. Pepper, M. and M.K. Jenkins, *Origins of CD4(+) effector and central memory T cells.* Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 467-71.

147. Larche, M., *Regulatory T cells in allergy and asthma.* Chest, 2007. **132**(3): p. 1007-14.

148. Bacchetta, R., E. Gambineri, and M.G. Roncarolo, *Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 227-35; quiz 236-7.

149. Meiler, F., et al., *Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors.* Allergy, 2008. **63**(11): p. 1455-63.

150. Kearley, J., et al., *Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent.* J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1539-47.

151. Kearley, J., D.S. Robinson, and C.M. Lloyd, *CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(3): p. 617-24 e6.

152. Gri, G., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction.* Immunity, 2008. **29**(5): p. 771-81.

153. Schaerli, P., et al., *CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function.* J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1553-62.

154. Kim, C.H., et al., *Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells.* J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1373-81.

155. Chtanova, T., et al., *T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells.* J Immunol, 2004. **173**(1): p. 68-78.

156. Ehnert, B., et al., *Reducing domestic exposure to dust mite allergen reduces bronchial hyperreactivity in sensitive children with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(1): p. 135-8.

157. Boyle, R.J., et al., *Nocturnal temperature controlled laminar airflow for treating atopic asthma: a randomised controlled trial.* Thorax, 2012. **67**(3): p. 215-21.

158. Brozek, J.L., et al., *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(3): p. 466-76.

159. Warner, J.O., *A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis: 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(6): p. 929-37.

160. Fernandes, A.L., et al., *Bronchodilator response as a hallmark of uncontrolled asthma: a randomised clinical trial.* J Asthma, 2014. **51**(4): p. 405-10.

161. Wilson, A.M., P.M. O'Byrne, and K. Parameswaran, *Leukotriene receptor antagonists for allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis.* Am J Med, 2004. **116**(5): p. 338-44.

162. Novelli, F., et al., *Efficacy of anticholinergic drugs in asthma.* Expert Rev Respir Med, 2012. **6**(3): p. 309-19.

163. Zhang, F., et al., *A soluble thymic stromal lymphopoietin (TSLP) antagonist, TSLPR-immunoglobulin, reduces the severity of allergic disease by regulating pulmonary dendritic cells.* Clin Exp Immunol, 2011. **164**(2): p. 256-64.

164. Kearley, J., et al., *Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(9): p. 772-81.

165. Liu, X., et al., *Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(1): p. 181-5.

166. Petersen, B.C. and N.W. Lukacs, *IL-17A and IL-25: therapeutic targets for allergic and exacerbated asthmatic disease.* Future Med Chem, 2012. **4**(7): p. 833-6.

167. Ruckert, R., et al., *Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo.* J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5507-15.

168. Pavord, I.D., et al., *Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial.* Lancet, 2012. **380**(9842): p. 651-9.

169. Corren, J., et al., *Lebrikizumab treatment in adults with asthma.* N Engl J Med, 2011. **365**(12): p. 1088-98.

170. Agrawal, S. and R.G. Townley, *Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma.* Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(2): p. 165-81.

171. Thomson, N.C., M. Patel, and A.D. Smith, *Lebrikizumab in the personalized management of asthma.* Biologics, 2012. **6**: p. 329-35.

172. Chang, T.W., *The pharmacological basis of anti-IgE therapy.* Nat Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 157-62.

173. Nopp, A., et al., *After 6 years with Xolair; a 3-year withdrawal follow-up.* Allergy, 2010. **65**(1): p. 56-60.

174. Casale, T.B., et al., *Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial.* JAMA, 2001. **286**(23): p. 2956-67.

175. Rodrigo, G.J., H. Neffen, and J.A. Castro-Rodriguez, *Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab vs placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review.* Chest, 2011. **139**(1): p. 28-35.

176. Lieberman, J.A. and M. Chehade, *Use of omalizumab in the treatment of food allergy and anaphylaxis.* Curr Allergy Asthma Rep, 2013. **13**(1): p. 78-84.

177. Bousquet, J., et al., *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology.* Ann Allergy Asthma Immunol, 1998. **81**(5 Pt 1): p. 401-5.

178. Calderon, M.A., et al., *Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis.* Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. CD001936.

179. Durham, S.R., et al., *SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(3): p. 717-725 e5.

180. Lin, S.Y., et al., *Sublingual immunotherapy for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and asthma: a systematic review.* JAMA, 2013. **309**(12): p. 1278-88.

181. Howarth, P., et al., *Analysis of allergen immunotherapy studies shows increased clinical efficacy in highly symptomatic patients.* Allergy, 2012. **67**(3): p. 321-7.

182. Burks, A.W., et al., *Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(5): p. 1288-96 e3.

183. Abramson, M.J., R.M. Puy, and J.M. Weiner, *Injection allergen immunotherapy for asthma.* Cochrane Database Syst Rev, 2010(8): p. CD001186.

184. Worm, M., et al., *Development and preliminary clinical evaluation of a peptide immunotherapy vaccine for cat allergy.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(1): p. 89-97, 97 e1-14.

185. Valenta, R., et al., *Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens.* Allergy, 2011. **66**(6): p. 775-83.

186. Henmar, H., et al., *Allergenicity, immunogenicity and dose-relationship of three intact allergen vaccines and four allergoid vaccines for subcutaneous grass pollen immunotherapy.* Clin Exp Immunol, 2008. **153**(3): p. 316-23.

187. De Souza Reboucas, J., et al., *Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy.* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 474605.

188. Senti, G., et al., *Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: a randomized controlled trial.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(46): p. 17908-12.

189. Senti, G., et al., *Epicutaneous allergen-specific immunotherapy ameliorates grass pollen-induced rhinoconjunctivitis: A double-blind, placebo-controlled dose escalation study.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(1): p. 128-35.

190. Lechler, R., et al., *The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance.* Immunology, 2001. **103**(3): p. 262-9.

191. Taams, L.S. and A.N. Akbar, *Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.* Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **293**: p. 115-31.

192. Mueller, D.L., *Mechanisms maintaining peripheral tolerance.* Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 21-7.

193. Kuklina, E.M., *Molecular mechanisms of T-cell anergy.* Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(2): p. 144-56.

194. Oderup, C., et al., *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression.* Immunology, 2006. **118**(2): p. 240-9.

195. Izawa, T., et al., *Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e48798.
196. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 271-83.
197. Joetham, A., et al., *Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1433-42.
198. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.* Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
199. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.* J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
200. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function.* Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
201. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo.* J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 505-11.
202. Qureshi, O.S., et al., *Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4.* Science, 2011. **332**(6029): p. 600-3.
203. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
204. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells.* Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.
205. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
206. Holgate, S.T. and R. Polosa, *Treatment strategies for allergy and asthma.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 218-30.
207. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(1): p. 18-27; quiz 28-9.
208. Plewako, H., et al., *Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy.* Int Arch Allergy Immunol, 2006. **141**(4): p. 346-53.
209. Romano, A., et al., *Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3 Suppl): p. S67-73.

210. Eberlein-Konig, B., et al., *Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization.* Clin Exp Allergy, 1995. **25**(8): p. 704-12.

211. Novak, N., et al., *Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(5): p. 1153-1158 e2.

212. Haas, K.M., et al., *Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice.* J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4789-800.

213. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses.* Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.

214. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells.* Blood, 2011. **117**(2): p. 530-41.

215. Noh, J., et al., *Allergen-specific responses of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions.* Cell Immunol, 2012. **274**(1-2): p. 109-14.

216. van de Veen, W., et al., *IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 1204-12.

217. Van Ree, R., et al., *Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy.* Clin Exp Allergy, 1997. **27**(1): p. 68-74.

218. Jutel, M., et al., *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(3): p. 608-13.

219. Pilette, C., et al., *Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4658-66.

220. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.

221. James, L.K., et al., *Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(2): p. 509-516 e1-5.

222. van der Zee, J.S., P. van Swieten, and R.C. Aalberse, *Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies.* Clin Exp Immunol, 1986. **64**(2): p. 415-22.

223. Golden, D.B., et al., *Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 1982. **69**(6): p. 489-93.

224. Muller, U., A. Helbling, and M. Bischof, *Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom.* Allergy, 1989. **44**(6): p. 412-8.

225. Marcucci, F., et al., *Lack of inflammatory cells in the oral mucosa of subjects undergoing sublingual immunotherapy.* Int J Immunopathol Pharmacol, 2008. **21**(3): p. 609-13.

226. Allam, J.P., et al., *Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy?* Allergy, 2008. **63**(6): p. 720-7.

227. Allam, J.P., et al., *Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(1): p. 141-8.

228. Allam, J.P., et al., *Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(2): p. 368-374 e1.

229. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.* J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.

230. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells.* J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.

231. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand.* J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.

232. Chen, W., et al., *The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation.* J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5396-404.

233. Li, X., et al., *Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(2): p. 190-9.

234. Bellinghausen, I., et al., *Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(2): p. 242-9.

235. Tversky, J.R., et al., *Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function.* Clin Exp Allergy, 2010. **40**(1): p. 94-102.

236. Angelini, F., et al., *Dendritic cells modification during sublingual immunotherapy in children with allergic symptoms to house dust mites.* World J Pediatr, 2011. **7**(1): p. 24-30.

237. Zimmer, A., et al., *A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(4): p. 1020-30.

238. Jutel, M., et al., *IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy.* Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1205-14.

239. Akdis, C.A., et al., *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy.* J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 98-106.

240. Radulovic, S., et al., *Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1467-72, 1472 e1.

241. Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, *T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 961-8; quiz 969.

242. Bohle, B., et al., *Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 707-13.

243. Francis, J.N., S.J. Till, and S.R. Durham, *Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1255-61.

244. Mobs, C., et al., *Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation.* J Immunol, 2010. **184**(4): p. 2194-203.

245. Francis, J.N., et al., *Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): p. 1120-1125 e2.

246. Royer, B., et al., *Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10.* Clin Exp Allergy, 2001. **31**(5): p. 694-704.

247. Akdis, C.A., et al., *A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding.* FASEB J, 2000. **14**(12): p. 1666-8.

248. Borish, L., et al., *Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(6): p. 1288-96.

249. Koning, H., et al., *T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production.* Cytokine, 1997. **9**(6): p. 427-36.

250. Nouri-Aria, K.T., et al., *Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3252-9.

251. Syed, A., et al., *Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3).* J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 500-10.

252. Scadding, G.W., et al., *Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells.* Clin Exp Allergy, 2010. **40**(4): p. 598-606.

253. Taylor, A., et al., *Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells.* Immunology, 2006. **117**(4): p. 433-42.

254. Guillaume, P., D. Dojcinovic, and I.F. Luescher, *Soluble MHC-peptide complexes: tools for the monitoring of T cell responses in clinical trials and basic research.* Cancer Immun, 2009. **9**: p. 7.

255. Wambre, E., et al., *Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(2): p. 544-51, 551 e1-7.

256. Wambre, E., et al., *Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4(+) T-cell responses in an epitope-dependent manner.* J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(3): p. 872-9 e7.

257. Bonvalet, M., et al., *Allergen-specific CD4+ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy.* Clin Exp Allergy, 2012. **42**(12): p. 1745-55.

258. Neill, D.R., et al., *Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity.* Nature, 2010. **464**(7293): p. 1367-70.

259. Spits, H., et al., *Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 145-9.

260. Salimi, M., et al., *A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis.* J Exp Med, 2013. **210**(13): p. 2939-50.

261. Mirchandani, A.S., et al., *Type 2 innate lymphoid cells drive CD4+ Th2 cell responses.* J Immunol, 2014. **192**(5): p. 2442-8.

262. Lao-Araya, M., et al., *Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2014.

263. Van Bever, H.P. and W.J. Stevens, *Suppression of the late asthmatic reaction by hyposensitization in asthmatic children allergic to house dust mite (Dermatophagoides pteronyssinus).* Clin Exp Allergy, 1989. **19**(4): p. 399-404.

264. Treter, S. and M. Luqman, *Antigen-specific T cell tolerance down-regulates mast cell responses in vivo.* Cell Immunol, 2000. **206**(2): p. 116-24.

265. Shim, J.Y., et al., *Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability.* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(1): p. 52-7.

266. Varney, V.A., et al., *Clinical efficacy of specific immunotherapy to cat dander: a double-blind placebo-controlled trial.* Clin Exp Allergy, 1997. **27**(8): p. 860-7.

267. Rak, S., O. Lowhagen, and P. Venge, *The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients.* J Allergy Clin Immunol, 1988. **82**(3 Pt 1): p. 470-80.

268. Chen, W.Y., J. Yu, and J.Y. Wang, *Decreased production of endothelin-1 in asthmatic children after immunotherapy.* J Asthma, 1995. **32**(1): p. 29-35.

269. Shamji, M.H. and S.R. Durham, *Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens.* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(9): p. 1235-46.

270. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.* Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 89-95.

271. Karami, F. and P. Mehdipour, *A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 928562.

272. Dubois, B., et al., *Alzheimer disease: from biomarkers to diagnosis.* Rev Neurol (Paris), 2013. **169**(10): p. 744-51.

273. Plesec, T.P. and J.L. Hunt, *KRAS mutation testing in colorectal cancer.* Adv Anat Pathol, 2009. **16**(4): p. 196-203.

274. La Thangue, N.B. and D.J. Kerr, *Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine.* Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(10): p. 587-96.

275. Wang, W.Y., et al., *Comparison of biomarkers between allergic rhinitis only and allergic rhinitis with concomitant asthma.* Allergy, 2009. **64**(7): p. 1102-3.

276. Wadsworth, S.J. and A.J. Sandford, *Personalised medicine and asthma diagnostics/management.* Curr Allergy Asthma Rep, 2013. **13**(1): p. 118-29.

277. Bossley, C.J., et al., *Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(4): p. 974-82 e13.

278. Brightling, C.E., et al., *TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis.* J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6): p. 899-905.

279. Petsky, H.L., et al., *Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults.* Cochrane Database Syst Rev, 2007(2): p. CD005603.

280. Kharitonov, S.A., et al., *Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients.* Lancet, 1994. **343**(8890): p. 133-5.

281. Pijnenburg, M.W. and J.C. De Jongste, *Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review.* Clin Exp Allergy, 2008. **38**(2): p. 246-59.

282. Payne, D.N., et al., *Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1376-81.

283. Lemiere, C., et al., *Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(5): p. 1033-9.

284. Robroeks, C.M., et al., *Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(9): p. 1303-11.

285. Macedo, P., et al., *Inflammatory biomarkers in airways of patients with severe asthma compared with non-severe asthma.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(11): p. 1668-76.

286. Louis, R., et al., *The relationship between airways inflammation and asthma severity.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(1): p. 9-16.

287. Jansen, D.F., et al., *The relationship of skin test positivity, high serum total IgE levels, and peripheral blood eosinophilia to symptomatic and asymptomatic airway hyperresponsiveness.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(3): p. 924-31.

288. Platts-Mills, T.A., *The role of immunoglobulin E in allergy and asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 2): p. S1-5.

289. Jia, G., et al., *Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(3): p. 647-654 e10.

290. Kim, C.K., et al., *Eosinophil-derived neurotoxin in childhood asthma: correlation with disease severity.* J Asthma, 2010. **47**(5): p. 568-73.

291. Verrills, N.M., et al., *Identification of novel diagnostic biomarkers for asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(12): p. 1633-43.

292. Holgate, S.T., P. Bradding, and A.P. Sampson, *Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: new directions in asthma therapy.* J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(1): p. 1-13.

293. Severien, C., et al., *Urinary excretion of leukotriene E4 and eosinophil protein X in children with atopic asthma.* Eur Respir J, 2000. **16**(4): p. 588-92.

294. Suzuki, N., et al., *Difference in urinary LTE4 and 11-dehydro-TXB2 excretion in asthmatic patients.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **62**(4): p. 395-403.

295. O'Sullivan, S., et al., *Increased urinary excretion of the prostaglandin D2 metabolite 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2 after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction.* J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(2): p. 421-32.

296. Baek, H.S., et al., *Leptin and urinary leukotriene E4 and 9alpha,11beta-prostaglandin F2 release after exercise challenge.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2013. **111**(2): p. 112-7.

297. Vijverberg, S.J., et al., *Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside.* Biologics, 2013. **7**: p. 199-210.

298. Naclerio, R.M., et al., *Mediator release after nasal airway challenge with allergen.* Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(4): p. 597-602.

299. de Graaf-in't Veld, C., et al., *Effect of intranasal fluticasone proprionate on the immediate and late allergic reaction and nasal hyperreactivity in patients with a house dust mite allergy.* Clin Exp Allergy, 1995. **25**(10): p. 966-73.

300. Boot, J.D., et al., *Applicability and reproducibility of biomarkers for the evaluation of anti-inflammatory therapy in allergic rhinitis.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2008. **18**(6): p. 433-42.

301. Naclerio, R.M., et al., *Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis.* N Engl J Med, 1985. **313**(2): p. 65-70.

302. van Wijk, R.G., et al., *Isolated early response after nasal allergen challenge is sufficient to induce nasal hyperreactivity.* Ann Allergy, 1992. **69**(1): p. 43-7.

303. Terada, N., et al., *The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid: its key role in eosinophil recruitment in nasal mucosa.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(4): p. 575-9.

304. Di Lorenzo, G., et al., *Allergic rhinitis to grass pollen: measurement of inflammatory mediators of mast cell and eosinophils in native nasal fluid lavage and in serum out of and during pollen season.* J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(6 Pt 1): p. 832-7.

305. Howarth, P.H., et al., *Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3 Suppl 1): p. S414-41.

306. *ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(8): p. 912-30.

307. Lundberg, J.O., *Nitric oxide and the paranasal sinuses.* Anat Rec (Hoboken), 2008. **291**(11): p. 1479-84.

308. Gehring, U., et al., *The impact of ambient NO on online measurements of exhaled and nasal NO: the PIAMA study.* Pediatr Allergy Immunol, 2009. **20**(7): p. 665-72.

309. Arnal, J.F., et al., *Nasal nitric oxide is increased in allergic rhinitis.* Clin Exp Allergy, 1997. **27**(4): p. 358-62.

310. Kharitonov, S.A., et al., *Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids.* J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(1 Pt 1): p. 58-64.

311. Wilson, A.M., et al., *Subjective and objective markers of treatment response in patients with seasonal allergic rhinitis.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(2): p. 111-4.

312. Di Lorenzo, G., et al., *Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1103-10, 1110 e1-4.

313. Ciprandi, G. and M. Sivestri, *Serum specific IgE: a biomarker of response to allergen immunotherapy.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2014. **24**(1): p. 35-9.

314. Ciprandi, G., M.A. Tosca, and M. Silvestri, *The practical role of serum allergen-specific IgE as potential biomarker for predicting responder to allergen immunotherapy.* Expert Rev Clin Immunol, 2014. **10**(3): p. 321-4.

315. Eifan, A.O., et al., *Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial.* Clin Exp Allergy, 2010. **40**(6): p. 922-32.

316. Gehlhar, K., et al., *Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome.* Clin Exp Allergy, 1999. **29**(4): p. 497-506.

317. La Rosa, M., et al., *Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized Parietaria judaica extract in children with allergic rhinoconjunctivitis.* J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(2 Pt 1): p. 425-32.

318. Baron-Bodo, V., et al., *Heterogeneity of antibody responses among clinical responders during grass pollen sublingual immunotherapy.* Clin Exp Allergy, 2013. **43**(12): p. 1362-73.

319. Shamji, M.H., et al., *Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy.* Allergy, 2012. **67**(2): p. 217-26.

320. Wolthers, O.D., *Component-resolved diagnosis in pediatrics.* ISRN Pediatr, 2012. **2012**: p. 806920.

321. Wurtzen, P.A., et al., *A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation.* Clin Exp Allergy, 2008. **38**(8): p. 1290-301.

322. Shamji, M.H., et al., *The IgE-facilitated allergen binding (FAB) assay: validation of a novel flow-cytometric based method for the detection of inhibitory antibody responses.* J Immunol Methods, 2006. **317**(1-2): p. 71-9.

323. Yalcin, A.D., et al., *Soluble trail as a marker of efficacy of allergen-specific immunotherapy in patients with allergic rhinoconjunctivitis.* Med Sci Monit, 2012. **18**(10): p. CR617-21.

324. Kanai, T., et al., *Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture.* Mol Hum Reprod, 2001. **7**(2): p. 195-200.

325. Pistoia, V., et al., *Soluble HLA-G: Are they clinically relevant?* Semin Cancer Biol, 2007. **17**(6): p. 469-79.

326. Ciprandi, G., et al., *Sublingual immunotherapy reduces soluble HLA-G and HLA-A,-B,-C serum levels in patients with allergic rhinitis.* Int Immunopharmacol, 2009. **9**(2): p. 253-7.

327. Swamy, R.S., et al., *Epigenetic modifications and improved regulatory T-cell function in subjects undergoing dual sublingual immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(1): p. 215-24 e7.

328. Van Overtvelt, L., et al., *Changes in basophil activation during grass-pollen sublingual immunotherapy do not correlate with clinical efficacy.* Allergy, 2011. **66**(12): p. 1530-7.

329. Pastorello, E.A., et al., *Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens.* J Allergy Clin Immunol, 1995. **96**(5 Pt 1): p. 580-7.

330. Wilkins, M.R., et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.* Biotechnol Genet Eng Rev, 1996. **13**: p. 19-50.

331. Harrow, J., et al., *GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project.* Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1760-74.

332. Liumbruno, G., et al., *Blood-related proteomics.* J Proteomics, 2010. **73**(3): p. 483-507.

333. Hipkiss, A.R., *Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects.* Exp Gerontol, 2006. **41**(5): p. 464-73.

334. Smith, L.M. and N.L. Kelleher, *Proteoform: a single term describing protein complexity.* Nat Methods, 2013. **10**(3): p. 186-7.

335. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.

336. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.* Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.

337. MacGillivray, A.J. and D. Rickwood, *The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography.* Eur J Biochem, 1974. **41**(1): p. 181-90.

338. Anderson, L. and N.G. Anderson, *High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5421-5.

339. Aebersold, R.H., et al., *Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 6970-4.

340. Cunningham, R., D. Ma, and L. Li, *Mass Spectrometry-based Proteomics and Peptidomics for Systems Biology and Biomarker Discovery.* Front Biol (Beijing), 2012. **7**(4): p. 313-335.

341. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics.* Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.

342. Altelaar, A.F., J. Munoz, and A.J. Heck, *Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics.* Nat Rev Genet, 2013. **14**(1): p. 35-48.

343. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.* Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.

344. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.* Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.

345. Chait, B.T. and S.B. Kent, *Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins.* Science, 1992. **257**(5078): p. 1885-94.

346. Dreisewerd, K., *The desorption process in MALDI.* Chem Rev, 2003. **103**(2): p. 395-426.

347. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization.* Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.

348. Spengler, B. and R.J. Cotter, *Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis.* Anal Chem, 1990. **62**(8): p. 793-6.

349. Wysocki, V.H., et al., *Mass spectrometry of peptides and proteins.* Methods, 2005. **35**(3): p. 211-22.

350. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations.* Anal Chem, 1998. **70**(5): p. 882-9.

351. Cotter, R.J., *Peer Reviewed: The New Time-of-Flight Mass Spectrometry.* Anal Chem, 1999. **71**(13): p. 445A-51A.

352. Zubarev, R.A. and A. Makarov, *Orbitrap mass spectrometry.* Anal Chem, 2013. **85**(11): p. 5288-96.

353. Guan, S., et al., *Determination of ion magnetron radial distribution in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.* Rapid Commun Mass Spectrom, 1996. **10**(14): p. 1855-9.

354. Yates, J.R., et al., *Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis.* Anal Chem, 2006. **78**(2): p. 493-500.

355. Senko, M.W., J.P. Speir, and F.W. McLafferty, *Collisional activation of large multiply charged ions using Fourier transform mass spectrometry.* Anal Chem, 1994. **66**(18): p. 2801-8.

356. Domon, B. and R. Aebersold, *Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy.* Nat Biotechnol, 2010. **28**(7): p. 710-21.

357. Omenn, G.S., *The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses.* Proteomics, 2004. **4**(5): p. 1235-40.

358. Buhrman, D.L., P.I. Price, and P.J. Rudewiczcor, *Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression.* J Am Soc Mass Spectrom, 1996. **7**(11): p. 1099-105.

359. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects.* Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-67.

360. Wetie, A.G., D.A. Shipp, and C.C. Darie, *Bottlenecks in proteomics.* Adv Exp Med Biol, 2014. **806**: p. 581-93.

361. Shevchenko, G., et al., *Comparison of extraction methods for the comprehensive analysis of mouse brain proteome using shotgun-based mass spectrometry.* J Proteome Res, 2012. **11**(4): p. 2441-51.

362. Doucette, A.A., et al., *Intact proteome fractionation strategies compatible with mass spectrometry.* Expert Rev Proteomics, 2011. **8**(6): p. 787-800.

363. Deterding, L.J., et al., *Nanoscale separations combined with tandem mass spectrometry.* J Chromatogr, 1991. **554**(1-2): p. 73-82.

364. Fortin, T., et al., *Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum.* Anal Chem, 2009. **81**(22): p. 9343-52.

365. Keshishian, H., et al., *Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution.* Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2212-29.

366. Tu, C., et al., *Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics.* J Proteome Res, 2010. **9**(10): p. 4982-91.

367. Patel, B.B., et al., *Assessment of two immunodepletion methods: off-target effects and variations in immunodepletion efficiency may confound plasma proteomics.* J Proteome Res, 2012. **11**(12): p. 5947-58.

368. Thulasiraman, V., et al., *Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands.* Electrophoresis, 2005. **26**(18): p. 3561-71.

369. Fonslow, B.R., et al., *Improvements in proteomic metrics of low abundance proteins through proteome equalization using ProteoMiner prior to MudPIT.* J Proteome Res, 2011. **10**(8): p. 3690-700.

370. Qiu, R. and F.E. Regnier, *Comparative glycoproteomics of N-linked complex-type glycoforms containing sialic acid in human serum.* Anal Chem, 2005. **77**(22): p. 7225-31.

371. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease.* Cell, 2006. **126**(5): p. 855-67.

372. Cantagrel, V., et al., *SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder.* Cell, 2010. **142**(2): p. 203-17.

373. Kobata, A. and J. Amano, *Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours.* Immunol Cell Biol, 2005. **83**(4): p. 429-39.

374. Rudd, P.M., et al., *Glycosylation and the immune system.* Science, 2001. **291**(5512): p. 2370-6.

375. Gavel, Y. and G. von Heijne, *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering.* Protein Eng, 1990. **3**(5): p. 433-42.

376. Hansen, J.E., et al., *Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase.* Biochem J, 1995. **308 (Pt 3)**: p. 801-13.

377. Hofsteenge, J., et al., *New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us.* Biochemistry, 1994. **33**(46): p. 13524-30.

378. Chait, B.T., *Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down?* Science, 2006. **314**(5796): p. 65-6.

379. McDonald, W.H. and J.R. Yates, 3rd, *Shotgun proteomics: integrating technologies to answer biological questions.* Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(3): p. 302-9.

380. Henzel, W.J., C. Watanabe, and J.T. Stults, *Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting.* J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(9): p. 931-42.

381. Mann, M., P. Hojrup, and P. Roepstorff, *Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases.* Biol Mass Spectrom, 1993. **22**(6): p. 338-45.

382. Pappin, D.J., P. Hojrup, and A.J. Bleasby, *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting.* Curr Biol, 1993. **3**(6): p. 327-32.

383. James, P., et al., *Protein identification by mass profile fingerprinting.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 58-64.

384. Henzel, W.J., et al., *Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5011-5.

385. O'Donovan, C. and R. Apweiler, *A guide to UniProt for protein scientists.* Methods Mol Biol, 2011. **694**: p. 25-35.

386. Pruitt, K.D., T. Tatusova, and D.R. Maglott, *NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D61-5.

387. Yates, J.R., 3rd, *Mass spectrometry and the age of the proteome.* J Mass Spectrom, 1998. **33**(1): p. 1-19.

388. Yates, J.R., 3rd, *Mass spectral analysis in proteomics.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2004. **33**: p. 297-316.

389. Cagney, G., et al., *In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry.* Proteome Sci, 2003. **1**(1): p. 5.

390. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.* Electrophoresis, 1999. **20**(18): p. 3551-67.

391. Razumovskaya, J., et al., *A computational method for assessing peptide- identification reliability in tandem mass spectrometry analysis with SEQUEST.* Proteomics, 2004. **4**(4): p. 961-9.

392. Akhtar, M.N., et al., *Evaluation of database search programs for accurate detection of neuropeptides in tandem mass spectrometry experiments.* J Proteome Res, 2012. **11**(12): p. 6044-55.

393. Nesvizhskii, A.I., O. Vitek, and R. Aebersold, *Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry.* Nat Methods, 2007. **4**(10): p. 787-97.

394. Elias, J.E. and S.P. Gygi, *Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry.* Nat Methods, 2007. **4**(3): p. 207-14.

395. Kuster, B., et al., *Scoring proteomes with proteotypic peptide probes.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(7): p. 577-83.

396. Sze, S.K., et al., *Top-down mass spectrometry of a 29-kDa protein for characterization of any posttranslational modification to within one residue.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1774-9.

397. Ge, Y., et al., *Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(4): p. 672-8.

398. Han, X., et al., *Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons.* Science, 2006. **314**(5796): p. 109-12.

399. Adamson, J.T. and K. Hakansson, *Infrared multiphoton dissociation and electron capture dissociation of high-mannose type glycopeptides.* J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 493-501.

400. Jiang, H., et al., *Glycoprotein profiling by electrospray mass spectrometry.* J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(5): p. 750-8.

401. Sandra, K., et al., *The Q-Trap mass spectrometer, a novel tool in the study of protein glycosylation.* J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(3): p. 413-23.

402. Renfrow, M.B., et al., *Determination of aberrant O-glycosylation in the IgA1 hinge region by electron capture dissociation fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry.* J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19136-45.

403. Clowers, B.H., et al., *Site determination of protein glycosylation based on digestion with immobilized nonspecific proteases and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.* J Proteome Res, 2007. **6**(10): p. 4032-40.

404. Vosseller, K., et al., *O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry.* Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(5): p. 923-34.

405. Rifai, N., M.A. Gillette, and S.A. Carr, *Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility.* Nat Biotechnol, 2006. **24**(8): p. 971-83.

406. Ray, S., et al., *Differential expression of serum/plasma proteins in various infectious diseases: specific or nonspecific signatures.* Proteomics Clin Appl, 2014. **8**(1-2): p. 53-72.

407. Marouga, R., S. David, and E. Hawkins, *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology.* Anal Bioanal Chem, 2005. **382**(3): p. 669-78.

408. Lilley, K.S. and D.B. Friedman, *All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics.* Expert Rev Proteomics, 2004. **1**(4): p. 401-9.

409. Taneja, S., et al., *Plasma and urine biomarkers in acute viral hepatitis E.* Proteome Sci, 2009. **7**: p. 39.

410. Brechlin, P., et al., *Cerebrospinal fluid-optimized two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) facilitates the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease.* Proteomics, 2008. **8**(20): p. 4357-66.

411. Tung, C.L., et al., *Proteomics-based identification of plasma biomarkers in oral squamous cell carcinoma.* J Pharm Biomed Anal, 2013. **75**: p. 7-17.

412. Gandhi, K.S., et al., *Novel approaches to detect serum biomarkers for clinical response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis.* PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10484.

413. Jorge, I., et al., *Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells.* Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(5): p. 1130-49.

414. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.* Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.

415. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.* Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.

416. Zhang, G. and T.A. Neubert, *Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for phosphotyrosine protein identification and quantitation.* Methods Mol Biol, 2009. **527**: p. 79-92, xi.

417. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks.* Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.

418. Li, Z., et al., *Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos.* J Proteome Res, 2012. **11**(3): p. 1582-90.

419. Liu, H., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, 3rd, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.* Anal Chem, 2004. **76**(14): p. 4193-201.

420. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review.* Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(4): p. 1017-31.

421. Braisted, J.C., et al., *The APEX Quantitative Proteomics Tool: generating protein quantitation estimates from LC-MS/MS proteomics results.* BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 529.

422. Lu, P., et al., *Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 117-24.

423. Old, W.M., et al., *Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1487-502.

424. Neilson, K.A., et al., *Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry.* Proteomics, 2011. **11**(4): p. 535-53.

425. Chelius, D. and P.V. Bondarenko, *Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry.* J Proteome Res, 2002. **1**(4): p. 317-23.

426. Burkhart, J.M., T. Premsler, and A. Sickmann, *Quality control of nano-LC-MS systems using stable isotope-coded peptides.* Proteomics, 2011. **11**(6): p. 1049-57.

427. Mueller, L.N., et al., *An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data.* J Proteome Res, 2008. **7**(1): p. 51-61.

428. Matthiesen, R. and A.S. Carvalho, *Methods and algorithms for relative quantitative proteomics by mass spectrometry.* Methods Mol Biol, 2010. **593**: p. 187-204.

429. Podwojski, K., et al., *Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics.* Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(2): p. 249-61.

430. Nahnsen, S., et al., *Tools for label-free peptide quantification.* Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(3): p. 549-56.

431. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.* Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.

432. Malik, R., et al., *From proteome lists to biological impact--tools and strategies for the analysis of large MS data sets.* Proteomics, 2010. **10**(6): p. 1270-83.

433. Mannello, F., *Serum or plasma samples? The "Cinderella" role of blood collection procedures: preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 611-4.

434. Hengel, S.M., et al., *Evaluation of SDS depletion using an affinity spin column and IMS-MS detection.* Proteomics, 2012. **12**(21): p. 3138-42.

435. Helle, M., et al., *Sensitive ELISA for interleukin-6. Detection of IL-6 in biological fluids: synovial fluids and sera.* J Immunol Methods, 1991. **138**(1): p. 47-56.

436. Doucet, J., et al., *Development and validation of an ELISA at acidic pH for the quantitative determination of IL-13 in human plasma and serum.* Dis Markers, 2013. **35**(5): p. 465-74.

437. Hoofnagle, A.N. and M.H. Wener, *The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry.* J Immunol Methods, 2009. **347**(1-2): p. 3-11.

438. Barr, J.R., et al., *Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I.* Clin Chem, 1996. **42**(10): p. 1676-82.

439. Beynon, R.J., et al., *Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides.* Nat Methods, 2005. **2**(8): p. 587-9.

440. Zeiler, M., et al., *A Protein Epitope Signature Tag (PrEST) library allows SILAC-based absolute quantification and multiplexed determination of protein copy numbers in cell lines.* Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(3): p. O111 009613.

441. Picard, G., et al., *PSAQ standards for accurate MS-based quantification of proteins: from the concept to biomedical applications.* J Mass Spectrom, 2012. **47**(10): p. 1353-63.

442. Shi, T., et al., *Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics.* Proteomics, 2012. **12**(8): p. 1074-92.

443. Percy, A.J., et al., *Method and platform standardization in MRM-based quantitative plasma proteomics.* J Proteomics, 2013. **95**: p. 66-76.

444. Stahl-Zeng, J., et al., *High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites.* Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(10): p. 1809-17.

445. Addona, T.A., et al., *Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(7): p. 633-41.

446. Kuhn, E., et al., *Developing multiplexed assays for troponin I and interleukin-33 in plasma by peptide immunoaffinity enrichment and targeted mass spectrometry.* Clin Chem, 2009. **55**(6): p. 1108-17.

447. Kuzyk, M.A., et al., *Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma.* Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(8): p. 1860-77.

448. Liu, H., L. Lam, and P.K. Dasgupta, *Expanding the linear dynamic range for multiple reaction monitoring in quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing natural isotopologue transitions.* Talanta, 2011. **87**: p. 307-10.

449. Berna, M. and B. Ackermann, *Increased throughput for low-abundance protein biomarker verification by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* Anal Chem, 2009. **81**(10): p. 3950-6.

450. Ahn, Y.H., et al., *Quantitative analysis of an aberrant glycoform of TIMP1 from colon cancer serum by L-PHA-enrichment and SISCAPA with MRM mass spectrometry.* J Proteome Res, 2009. **8**(9): p. 4216-24.

451. Gillet, L.C., et al., *Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis.* Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(6): p. O111 016717.

452. Gallien, S., et al., *Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer.* Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(12): p. 1709-23.

453. Ohnishi, T., et al., *Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for a 59 kD bone sialoprotein of the rat: demonstration that it is a counterpart of human alpha 2-HS glycoprotein and bovine fetuin.* J Bone Miner Res, 1993. **8**(3): p. 367-77.

454. Mizuno, M., et al., *Identification of the rat bone 60K acidic glycoprotein as alpha 2HS-glycoprotein.* Bone Miner, 1991. **13**(1): p. 1-21.

455. Le Cam, A., et al., *Secretion of a major phosphorylated glycoprotein by hepatocytes. Characterization of specific antibodies and investigations of the processing, excretion kinetics, and phosphorylation.* J Biol Chem, 1985. **260**(29): p. 15965-71.

456. Yamamoto, K. and H. Sinohara, *Isolation and characterization of mouse countertrypin, a new trypsin inhibitor belonging to the mammalian fetuin family.* J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 17750-3.

457. Olivier, E., et al., *Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals.* Biochem J, 2000. **350 Pt 2**: p. 589-97.

458. Denecke, B., et al., *Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A.* Biochem J, 2003. **376**(Pt 1): p. 135-45.

459. Terkelsen, O.B., et al., *Rat fetuin: distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues.* Anat Embryol (Berl), 1998. **197**(2): p. 125-33.

460. Dziegielewska, K.M., et al., *Fetuin in the developing neocortex of the rat: distribution and origin.* J Comp Neurol, 2000. **423**(3): p. 373-88.

461. Ohnishi, T., et al., *Purification, characterization, and studies on biosynthesis of a 59-kDa bone sialic acid-containing protein (BSP) from rat mandible using a monoclonal antibody. Evidence that 59-kDa BSP may be the rat counterpart of human alpha 2-HS glycoprotein and is synthesized by both hepatocytes and osteoblasts.* J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14636-45.

462. Arnaud, P. and L. Kalabay, *Alpha2-HS glycoprotein: a protein in search of a function.* Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18**(4): p. 311-4.

463. Dziegielewska, K.M., N.A. Andersen, and N.R. Saunders, *Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin.* Immunol Lett, 1998. **60**(1): p. 31-5.

464. Triffitt, J.T., et al., *Origin of plasma alpha2HS-glycoprotein and its accumulation in bone.* Nature, 1976. **262**(5565): p. 226-7.

465. Schinke, T., et al., *The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis.* J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20789-96.

466. Coen, G., et al., *Immunohistochemical localization and mRNA expression of matrix Gla protein and fetuin-A in bone biopsies of hemodialysis patients.* Virchows Arch, 2009. **454**(3): p. 263-71.

467. Wang, H. and A.E. Sama, *Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection.* Curr Mol Med, 2012. **12**(5): p. 625-33.

468. Lee, C.C., B.H. Bowman, and F.M. Yang, *Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(13): p. 4403-7.

469. Lee, C., et al., *Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein.* Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 2911-22.

470. Elzanowski, A., et al., *Cystatin domains in alpha-2-HS-glycoprotein and fetuin.* FEBS Lett, 1988. **227**(2): p. 167-70.

471. Brown, W.M., et al., *The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. Common structural features of the mammalian fetuin family.* Eur J Biochem, 1992. **205**(1): p. 321-31.

472. Boutin, B., S.H. Feng, and P. Arnaud, *The genetic polymorphism of alpha 2-HS glycoprotein: study by ultrathin-layer isoelectric focusing and immunoblot.* Am J Hum Genet, 1985. **37**(6): p. 1098-105.

473. Dickson, I.R., et al., *Lumbar vertebral and femoral neck bone mineral density are higher in postmenopausal women with the alpha 2HS-glycoprotein 2 phenotype.* Bone Miner, 1994. **24**(3): p. 181-8.

474. Andersen, G., et al., *AHSG tag single nucleotide polymorphisms associate with type 2 diabetes and dyslipidemia: studies of metabolic traits in 7,683 white Danish subjects.* Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1427-32.

475. Stenvinkel, P., et al., *Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin.* Kidney Int, 2005. **67**(6): p. 2383-92.

476. Kellermann, J., et al., *The arrangement of disulfide loops in human alpha 2-HS glycoprotein. Similarity to the disulfide bridge structures of cystatins and kininogens.* J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 14121-8.

477. Huang, J., et al., *Glycomic analysis of high density lipoprotein shows a highly sialylated particle.* J Proteome Res, 2014. **13**(2): p. 681-91.

478. Packer, N.H., et al., *Characterization of human plasma glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis.* Biotechnology (N Y), 1996. **14**(1): p. 66-70.

479. Shah, P., et al., *Mass spectrometric analysis of sialylated glycans with use of solid-phase labeling of sialic acids.* Anal Chem, 2013. **85**(7): p. 3606-13.

480. Ramachandran, P., et al., *Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry.* J Proteome Res, 2006. **5**(6): p. 1493-503.

481. Bunkenborg, J., et al., *Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry.* Proteomics, 2004. **4**(2): p. 454-65.

482. Halim, A., et al., *Human urinary glycoproteomics; attachment site specific analysis of N- and O-linked glycosylations by CID and ECD.* Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(4): p. M111 013649.

483. Haglund, A.C., B. Ek, and P. Ek, *Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo.* Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 437-45.

484. Han, G., et al., *Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography.* Proteomics, 2008. **8**(7): p. 1346-61.

485. Mathews, S.T., et al., *Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase.* Life Sci, 1997. **61**(16): p. 1583-92.

486. Daveau, M., et al., *The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells.* FEBS Lett, 1988. **241**(1-2): p. 191-4.

487. Li, W., et al., *A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16945.

488. Tsung, A., et al., *The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion.* J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1135-43.

489. Sato, H., et al., *Decreased levels of circulating alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A (AHSG) in patients with rheumatoid arthritis.* Intern Med, 2007. **46**(20): p. 1685-91.

490. Saroha, A., et al., *Jacalin bound plasma O-glycoproteome and reduced sialylation of alpha 2-HS glycoprotein (A2HSG) in rheumatoid arthritis patients.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46374.

491. Kusnierz-Cabala, B., et al., *Serum fetuin A concentrations in patients with acute pancreatitis.* Clin Lab, 2010. **56**(5-6): p. 191-5.

492. Metry, G., et al., *Low serum fetuin-A concentration predicts poor outcome only in the presence of inflammation in prevalent haemodialysis patients.* Eur J Clin Invest, 2008. **38**(11): p. 804-11.

493. Wang, H., et al., *Peripheral administration of fetuin-A attenuates early cerebral ischemic injury in rats.* J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(3): p. 493-504.

494. Belayev, L., et al., *Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats.* Brain Res, 1996. **739**(1-2): p. 88-96.

495. Weikert, C., et al., *Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke.* Circulation, 2008. **118**(24): p. 2555-62.

496. Tuttolomondo, A., et al., *Fetuin-A and CD40 L plasma levels in acute ischemic stroke: differences in relation to TOAST subtype and correlation with clinical and laboratory variables.* Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 290-6.

497. Jensen, M.K., et al., *Fetuin-A, type 2 diabetes, and risk of cardiovascular disease in older adults: the cardiovascular health study.* Diabetes Care, 2013. **36**(5): p. 1222-8.

498. Jahnen-Dechent, W., et al., *Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene.* J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31496-503.

499. Schafer, C., et al., *The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification.* J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 357-66.

500. Matsui, I., et al., *Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure.* Kidney Int, 2009. **75**(9): p. 915-28.

501. Binkert, C., et al., *Regulation of osteogenesis by fetuin.* J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28514-20.

502. Szweras, M., et al., *alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling.* J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19991-7.

503. Srinivas, P.R., et al., *Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level.* Mol Endocrinol, 1993. **7**(11): p. 1445-55.

504. Mathews, S.T., et al., *Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor.* Mol Cell Endocrinol, 2000. **164**(1-2): p. 87-98.

505. Hennige, A.M., et al., *Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production.* PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1765.

506. Mori, K., et al., *Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects.* Diabetes Care, 2006. **29**(2): p. 468.

507. Ishibashi, A., et al., *Serum fetuin-A is an independent marker of insulin resistance in Japanese men.* J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(9): p. 925-33.

508. Stefan, N., et al., *Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans.* Diabetes Care, 2006. **29**(4): p. 853-7.

509. Yilmaz, Y., et al., *Serum fetuin A/alpha2HS-glycoprotein levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease: relation with liver fibrosis.* Ann Clin Biochem, 2010. **47**(Pt 6): p. 549-53.

510. Brix, J.M., et al., *Elevated Fetuin-A concentrations in morbid obesity decrease after dramatic weight loss.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. 4877-81.

511. Pal, D., et al., *Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance.* Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1279-85.

512. Stefan, N. and H.U. Haring, *Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans.* Nat Med, 2013. **19**(4): p. 394-5.

513. Ix, J.H., et al., *Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons.* JAMA, 2008. **300**(2): p. 182-8.

514. Stefan, N., et al., *Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes.* Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2762-7.

515. Heinrichsdorff, J. and J.M. Olefsky, *Fetuin-A: the missing link in lipid-induced inflammation.* Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1182-3.

516. Ketteler, M., *Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005. **14**(4): p. 337-42.

517. Fiore, C.E., et al., *Association of high alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass.* Atherosclerosis, 2007. **195**(1): p. 110-5.

518. Rittig, K., et al., *High plasma fetuin-A is associated with increased carotid intima-media thickness in a middle-aged population.* Atherosclerosis, 2009. **207**(2): p. 341-2.

519. Mori, K., et al., *Association of serum fetuin-A with carotid arterial stiffness.* Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(2): p. 246-50.

520. Roos, M., et al., *Fetuin-A and arterial stiffness in patients with normal kidney function.* Regul Pept, 2009. **154**(1-3): p. 39-43.

521. Ketteler, M., et al., *Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study.* Lancet, 2003. **361**(9360): p. 827-33.

522. Pecovnik Balon, B., et al., *Fetuin-A as a risk factor for mortality in hemodialysis patients.* Wien Klin Wochenschr, 2010. **122 Suppl 2**: p. 63-7.

523. Hermans, M.M., et al., *Association of serum fetuin-A levels with mortality in dialysis patients.* Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 202-7.

524. Ix, J.H., et al., *Fetuin-A and kidney function in persons with coronary artery disease--data from the Heart and Soul Study.* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(8): p. 2144-51.

525. Cottone, S., et al., *Relationship of fetuin-A with glomerular filtration rate and endothelial dysfunction in moderate-severe chronic kidney disease.* J Nephrol, 2010. **23**(1): p. 62-9.

526. Mori, K., M. Emoto, and M. Inaba, *Fetuin-A: a multifunctional protein.* Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2011. **5**(2): p. 124-46.

527. Dziegielewska, K.M., et al., *alpha 2HS-glycoprotein is expressed at high concentration in human fetal plasma and cerebrospinal fluid.* Fetal Diagn Ther, 1993. **8**(1): p. 22-7.

528. Brown, W.M., et al., *Fetuin--an old friend revisited.* Bioessays, 1992. **14**(11): p. 749-55.

529. Dziegielewska, K.M., et al., *A fetuin-related glycoprotein (alpha 2HS) in human embryonic and fetal development.* Cell Tissue Res, 1987. **248**(1): p. 33-41.

530. Harris, V.K. and S.A. Sadiq, *Biomarkers of Therapeutic Response in Multiple Sclerosis: Current Status.* Mol Diagn Ther, 2014.

531. Harris, V.K., et al., *Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis.* Mult Scler, 2013. **19**(11): p. 1462-72.

532. Puchades, M., et al., *Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease.* Brain Res Mol Brain Res, 2003. **118**(1-2): p. 140-6.

533. Smith, E.R., et al., *Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2011. **24**(2): p. 327-33.

534. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 4-8.

535. Varki, A., *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.* Glycobiology, 1993. **3**(2): p. 97-130.

536. Creus, S., et al., *Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity.* Mol Cell Endocrinol, 2001. **174**(1-2): p. 41-9.

537. Janosi, J.B., et al., *N-Linked glycosylation and sialylation of the acid-labile subunit. Role in complex formation with insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and the IGFs.* J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5292-8.

538. Seales, E.C., et al., *A protein kinase C/Ras/ERK signaling pathway activates myeloid fibronectin receptors by altering beta1 integrin sialylation.* J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37610-5.

539. Crocker, P.R. and A. Varki, *Siglecs, sialic acids and innate immunity.* Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 337-42.

540. Tolleshaug, H., *Intracellular segregation of asialo-transferrin and asialo-fetuin following uptake by the same receptor system in suspended hepatocytes.* Biochim Biophys Acta, 1984. **803**(3): p. 182-90.

541. Auberger, P., et al., *Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity.* Cell, 1989. **58**(4): p. 631-40.

542. Herrmann, M., A. Kinkeldey, and W. Jahnen-Dechent, *Fetuin-A function in systemic mineral metabolism.* Trends Cardiovasc Med, 2012. **22**(8): p. 197-201.

543. Smith, E.R., et al., *Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage.* PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60904.

544. Kundranda, M.N., et al., *The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumorigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms.* Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 499-506.

545. Wang, H., et al., *Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophagedeactivating molecules.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14429-34.

546. Kuwamoto, K., et al., *Identification of various types of alpha2-HS glycoprotein in sera of patients with pancreatic cancer: Possible implication in resistance to protease treatment.* Mol Med Rep, 2010. **3**(4): p. 651-6.

547. Karamessinis, P.M., et al., *Marked defects in the expression and glycosylation of alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction: proteomics screening and potential clinical implications.* Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(3): p. 591-9.

548. Didier, A., et al., *Sustained 3-year efficacy of pre- and coseasonal 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in patients with grass pollen-induced rhinoconjunctivitis.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 559-66.

549. Tosca, M., et al., *Serum-specific IgE and allergen immunotherapy in allergic children.* Immunotherapy, 2014. **6**(1): p. 29-33.

550. Kositz, C., et al., *High serum tryptophan concentration in pollinosis patients is associated with unresponsiveness to pollen extract therapy.* Int Arch Allergy Immunol, 2008. **147**(1): p. 35-40.

551. Ray, S., et al., *Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: advances and challenges ahead.* Proteomics, 2011. **11**(11): p. 2139-61.

552. Packer, N.H., et al., *Analyzing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis.* Electrophoresis, 1998. **19**(6): p. 981-8.

553. Holland, J.W., H.C. Deeth, and P.F. Alewood, *Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine kappa-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy.* Proteomics, 2006. **6**(10): p. 3087-95.

554. Wambre, E., et al., *Distinct characteristics of seasonal (Bet v 1) vs. perennial (Der p 1/Der p 2) allergen-specific CD4(+) T cell responses.* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(2): p. 192-203.

555. Smith, E.R., et al., *Poor agreement between commercial ELISAs for plasma fetuin-A: An effect of protein glycosylation?* Clin Chim Acta, 2010. **411**(17-18): p. 1367-70.

556. Saveliev, S.V., et al., *Mass spectrometry compatible surfactant for optimized in-gel protein digestion.* Anal Chem, 2013. **85**(2): p. 907-14.

557. Narkus, A., et al., *The placebo effect in allergen-specific immunotherapy trials.* Clin Transl Allergy, 2013. **3**(1): p. 42.

558. Laughlin, G.A., et al., *Sex-specific association of fetuin-A with type 2 diabetes in older community-dwelling adults: the Rancho Bernardo study.* Diabetes Care, 2013. **36**(7): p. 1994-2000.

559. Adamczyk, B., T. Tharmalingam, and P.M. Rudd, *Glycans as cancer biomarkers.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(9): p. 1347-53.

560. Gornik, O. and G. Lauc, *Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases.* Dis Markers, 2008. **25**(4-5): p. 267-78.

561. Rabinovich, G.A., Y. van Kooyk, and B.A. Cobb, *Glycobiology of immune responses.* Ann N Y Acad Sci, 2012. **1253**: p. 1-15.

562. Devillier, P., M. Le Gall, and F. Horak, *The allergen challenge chamber: a valuable tool for optimizing the clinical development of pollen immunotherapy.* Allergy, 2011. **66**(2): p. 163-9.

563. Oberg, F., et al., *Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein.* J Biol Chem, 2011. **286**(36): p. 31915-23.

564. Kanda, Y., et al., *Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types.* Glycobiology, 2007. **17**(1): p. 104-18.

565. Buyse, M., et al., *Biomarkers and surrogate end points--the challenge of statistical validation.* Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(6): p. 309-17.

566. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1659-72.

567. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.

568. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1626-34.

569. Herrmann, M., et al., *Clearance of fetuin-A--containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A.* Circ Res, 2012. **111**(5): p. 575-84.

570. Sarrats, A., et al., *Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis.* Proteomics Clin Appl, 2010. **4**(4): p. 432-48.

571. Hammad, H., et al., *Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen.* J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2097-111.

572. Zhou, Q., et al., *GM-CSF-licensed CD11b+ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to Blomia tropicalis.* J Immunol, 2014. **193**(2): p. 496-509.

573. Shen, C., et al., *Impaired ICOSL in human myeloid dendritic cells promotes Th2 responses in patients with allergic rhinitis and asthma.* Clin Exp Allergy, 2014. **44**(6): p. 831-41.

574. KleinJan, A., et al., *An essential role for dendritic cells in human and experimental allergic rhinitis.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(5): p. 1117-25.

575. Corazza, N. and T. Kaufmann, *Novel insights into mechanisms of food allergy and allergic airway inflammation using experimental mouse models.* Allergy, 2012. **67**(12): p. 1483-90.

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

577. Gelfand, E.W., *Pro: mice are a good model of human airway disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(1): p. 5-6; discussion 7-8.

578. Bernhard, O.K., E.A. Kapp, and R.J. Simpson, *Enhanced analysis of the mouse plasma proteome using cysteine-containing tryptic glycopeptides.* J Proteome Res, 2007. **6**(3): p. 987-95.

579. Ghesquiere, B., et al., *Proteome-wide characterization of N-glycosylation events by diagonal chromatography.* J Proteome Res, 2006. **5**(9): p. 2438-47.

580. Park, B.S. and J.O. Lee, *Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes.* Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e66.

581. Jerala, R., *Structural biology of the LPS recognition.* Int J Med Microbiol, 2007. **297**(5): p. 353-63.

582. Godowski, P.J., *A smooth operator for LPS responses.* Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 544-6.

583. Park, B.S., et al., *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.* Nature, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.

584. Ullah, M.A., et al., *Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(2): p. 440-50.

585. Dumitriu, I.E., et al., *Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products.* J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7506-15.

586. Dorsam, G.P., et al., *Gene expression profiling and network analysis of peripheral blood monocytes in a chronic model of allergic asthma.* Microbiol Immunol, 2010. **54**(9): p. 558-63.

587. O'Neil, S.E., et al., *Network analysis of quantitative proteomics on asthmatic bronchi: effects of inhaled glucocorticoid treatment.* Respir Res, 2011. **12**: p. 124.

588. Gornik, O. and G. Lauc, *Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferrin sialylation in serum samples.* Clin Biochem, 2007. **40**(9-10): p. 718-23.

589. Gathungu, R.M., et al., *The role of mass spectrometry in the analysis of vitamin D compounds.* Mass Spectrom Rev, 2013. **32**(1): p. 72-86.

590. Rebollido-Fernandez, M.M., et al., *Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2012. **26**(18): p. 2131-44.

591. Sun, W., et al., *The screening of inborn errors of metabolism in sick Chinese infants by tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry.* Clin Chim Acta, 2011. **412**(13-14): p. 1270-4.

592. Kuhara, T., et al., *Urinary 2-hydroxy-5-oxoproline, the lactam form of alpha-ketoglutaramate, is markedly increased in urea cycle disorders.* Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(7): p. 1843-51.

593. Jones, P.M., et al., *Improved stable isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry method for serum or plasma free 3-hydroxy-fatty acids and its utility for the study of disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation.* Clin Chem, 2000. **46**(2): p. 149-55.

594. Chalupova, J., et al., *Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry.* Biotechnol Adv, 2014. **32**(1): p. 230-41.

595. Minerva, L., et al., *MALDI MS imaging as a tool for biomarker discovery: methodological challenges in a clinical setting.* Proteomics Clin Appl, 2012. **6**(11-12): p. 581-95.

596. Hankin, C.S. and L. Cox, *Allergy immunotherapy: what is the evidence for cost saving?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014. **14**(4): p. 363-70.

RÉSUMÉ

Cette thèse a pour objectif d'identifier et caractériser des biomarqueurs liés aux traitements d'immunothérapie allergénique (ITA). En particulier, le travail s'est porté sur les biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du traitement : leur estimation avant la prise médicamenteuse permettrait d'évaluer les bénéfices cliniques à l'issue de l'ITA. À partir d'échantillons de sérum collectés avant ITA et provenant de patients inclus dans une étude clinique contrôlée, randomisée et dirigée contre les pollens de graminées, une méthode d'analyse protéomique différentielle (la 2D-DIGE) a permis d'identifier une protéine comme candidat biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'ITA.

Dans un premier temps, les variants moléculaires de la protéine identifiée ont été caractérisés. L'analyse en spectrométrie de masse de la protéine a permis d'identifier les modifications post-traductionnelles associées aux isoformes plus abondants dans le sérum des patients pour lesquels une réponse positive à l'ITA est observée. Une approche protéomique de quantification relative a été mise en œuvre par LC-MS/MS sans marquage, et a permis d'identifier des peptides de la protéine d'intérêt, portant des modifications post-traductionnelles spécifiques, associés à un bénéfice clinique accru en fin d'ITA.

Dans un deuxième temps, l'implication de la fétuine-A dans la physiopathologie de l'allergie a été étudiée. Des modèles cellulaires humains ont mis en évidence le caractère essentiel des acides sialiques portés par la protéine pour l'activation de la voie TLR4, dans les mécanismes de l'immunité innée initiant la réaction allergique. *In vivo*, les modèles murins d'asthme allergique développés ont en revanche montré la fonction anti-inflammatoire de la protéine. La fétuine-A a donc un rôle ambivalent, mais est indubitablement liée à la régulation de l'inflammation allergique. La validation des candidats biomarqueurs peptidiques de la protéine dans d'autres cohortes cliniques représente une future étape clé, qui permettrait d'envisager l'usage de ces marqueurs en clinique, pour améliorer la sélection des patients les plus susceptibles de répondre à l'ITA.

ABSTRACT

This thesis aimed at identifying and characterizing predictive biomarkers associated with allergen-specific immunotherapy (AIT) efficacy. In particular, we were focused on biomarkers predictive of AIT efficacy: quantifying such markers before treatment would allow estimating the final clinical benefit. For this purpose, serum samples were collected before AIT from patients included in a double-blind, placebo controlled clinical study against grass pollen allergy. Their analysis by means of differential proteomics (2D-DIGE) pointed out a protein, named fetuin-A, as a candidate biomarker predictive of AIT efficacy.

First, the protein fetuin-A isoforms were extensively characterized by mass spectrometry, and specific post-translational modifications (PTMs) were associated to the isoforms more abundant in sera from patients positively responding to AIT. A second proteomic approach allowed identifying fetuin-A peptides, differentially expressed among groups of patients. Some peptides from the candidate protein, bearing specific post-translational modifications (PTMs), are associated with an increased clinical benefit at the end of the treatment.

In a second part, we studied the involvement of the fetuin-A during the course of allergic inflammation. Human cellular assays highlighted that sialic acids on the protein PTMs are essential to activate the TLR4 pathway, and inducing innate immune mechanisms linked to allergy. *In vivo*, murine models of allergic asthma showed an opposite anti-inflammatory function of the protein. Thus, the protein fetuin-A is still ambivalent, but is undoubtedly linked to the regulation of allergic inflammation. Validation of peptides candidate biomarkers in larger clinical cohorts is of utmost interest, since using such biomarkers in clinics would improve patients' selection and therefore clinical benefit from the treatment.

Résumé de la thèse : Ce travail de thèse a consisté à caractériser un candidat biomarqueur protéique associé à l'efficacité de l'immunothérapie allergénique. Cette protéine, la Fétuine-A, présente de multiples isoformes, dont l'abondance sérique est prédictive de la réponse clinique à l'immunothérapie. La caractérisation fonctionnelle de la Fétuine-A a été mise en œuvre, dans des modèles *in vitro* humains et *in vivo* murin, afin de comprendre l'implication de la protéine au cours de l'inflammation allergique.

Mots clés : Biomarqueurs, Fétuine-A, immunothérapie allergénique, protéomique

Stallergenes, Recherche et Développement Pharmaceutique

6, rue Alexis de Tocqueville

92183 Antony Cedex

&

INSERM UMR 996

Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie

Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11

5, rue Jean-Baptiste Clément

92296 Châtenay-Malabry

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex