



**HAL**  
open science

# Influence du facteur neurotrophique Neurturine dans les cellules nerveuses et immunitaires lors de l'inflammation des voies respiratoires

Marion Mauffray

## ► To cite this version:

Marion Mauffray. Influence du facteur neurotrophique Neurturine dans les cellules nerveuses et immunitaires lors de l'inflammation des voies respiratoires. Pneumologie et système respiratoire. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ069 . tel-01381006

**HAL Id: tel-01381006**

**<https://theses.hal.science/tel-01381006v1>**

Submitted on 13 Oct 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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



**ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTE**

Unité de recherche S949 : Pharmacologie et biologie des plaquettes sanguines – EFS Alsace

Department of Infection and Immunity – Luxembourg Institute of Health

**THÈSE** présentée par :

**Marion MAUFFRAY**

soutenue le : **23 Novembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

**Influence du facteur neurotrophique Neurturine  
dans les cellules nerveuses et immunitaires lors  
de l'inflammation des voies respiratoires**

**THÈSE dirigée par :**

**Monsieur HANAU Daniel**, Professeur à l'Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Monsieur DOMBROWICZ David**, Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Lille

**Monsieur GUTERMUTH Jan**, Professeur à l'Université libre de Bruxelles

**Madame KORGANOW Anne-Sophie**, Professeur à l'Université de Strasbourg

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Madame MICHEL Tatiana**, Chargée de recherche au Luxembourg Institute of Health

**Monsieur OLLERT Markus**, Professeur à l'Université du Danemark du sud et Directeur de recherche au Luxembourg Institute of Health



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Prof. Daniel Hanau pour avoir accepté la direction de cette thèse et pour ses précieux conseils, notamment durant la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également le Dr. Tatiana Michel qui m'a supervisée tout au long de cette thèse. Je lui suis sincèrement reconnaissante pour tout ce qu'elle m'a appris, pour sa motivation sans faille, pour son attention, pour sa confiance et pour son soutien. Merci de m'avoir poussée toujours plus loin tout au long de ces années, je ne serais jamais arrivée là toute seule.

J'exprime toute ma gratitude au Dr. Anne-Sophie Korganow, au Dr. David Dombrowicz et au Dr. Jan Gutermuth, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de juger mon travail.

Je remercie sincèrement le Dr. François Hentges, ancien directeur du LIGA, qui m'a accueillie au sein de ce laboratoire depuis mon stage de Master 2. J'apprécie votre implication et votre soutien.

Je tiens aussi à remercier le Dr Jacques Zimmer pour son aide et ses conseils tout au long de cette thèse ainsi que toutes les personnes de ce laboratoire qui m'ont énormément appris et qui m'ont apporté leur aide pour les manip ou les protos souris des lundis et jeudis matin... Olivia, Caroline, Aurélie, Benjamin, Maud, Delphine, Kyra, Stéphanie, Thorsten, Tanja, Carole, et les autres, merci pour nos discussions, pour vos conseils et votre soutien toutes ces années.

Je remercie également toutes les personnes du CRP-Santé/LIH qui ont participé de près ou de loin à ce projet, pour leur aide, pour leur savoir-faire ou encore pour leurs conseils, qui m'ont permis de réaliser ma thèse dans de formidables conditions.

Je remercie aussi le Dr. Christina Nassenstein et son équipe pour m'avoir accueillie chaleureusement dans leur laboratoire à Giessen en Allemagne pour la partie neurologique de ce projet.

Je remercie également le Fond National de la Recherche – Luxembourg qui a financé ces 4 années de thèse.

Je tiens à remercier mes amis et ma famille pour leur précieux soutien ces quatre dernières années, malgré les absences ou les mauvais jours ! Merci à PP (toujours là quand il faut), Let (toujours au top), Bruno (mon squatteur préféré), Kant, Mangin, Dash, Lolo et Niggaz pour nos soirées mémorables ! Merci à Cassiane et Gégé, Mylène et Lilian, pour nos soirées et nos discussions interminables ! Je remercie aussi mes parents, Anne et Jean-Michel, et mon frère, Romain, pour avoir été présents, en particulier ma Maman, qui m'a aidée à tenir le coup dans les moments les plus difficiles.

Enfin, merci à toi Guigui, qui me soutient et me supporte tous les jours depuis de longues années déjà...

# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Remerciements .....  | 1         |
| Table des matières .....   | 3         |
| Liste des abréviations.....  | 7         |
| Liste des tableaux.....  | 9         |
| Liste des figures.....   | 11        |
| <b>Introduction .....</b>  | <b>15</b> |
| I. Les cellules et les différents mécanismes impliqués dans l'asthme.....              | 21        |
| A. Les cellules impliquées dans l'asthme .....   | 21        |
| 1. Les cellules épithéliales .....   | 21        |
| 2. Les cellules dendritiques .....   | 24        |
| 3. Les lymphocytes Th2 .....   | 26        |
| 4. Les cellules lymphoïdes innées .....  | 28        |
| 5. Les éosinophiles .....  | 30        |
| 6. Les neutrophiles .....  | 31        |
| B. Les mécanismes impliqués dans l'asthme.....   | 32        |
| C. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'asthme .....        | 36        |
| D. Les modèles d'asthme chez la souris .....   | 36        |
| II. Les facteurs neurotrophiques et leur influence dans l'asthme.....                  | 39        |
| A. Les neurotrophines .....  | 39        |
| B. Les facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales .....                     | 41        |
| 1. La Neurturine .....   | 43        |
| 2. Phénotypes des souris NTN <sup>-/-</sup> .....                                      | 43        |
| 3. Expression de la NTN et de son récepteur dans les tissus.....                       | 44        |
| 4. Rôle de la NTN dans différentes pathologies.....                                    | 44        |
| 5. Rôle de la NTN au niveau des cellules immunitaires .....                            | 45        |
| III. Interactions neuro-immunes .....  | 47        |
| A. Innervation des voies respiratoires.....  | 47        |
| 1. Innervation parasympathique des voies respiratoires .....                           | 48        |
| 2. Innervation sympathique des voies respiratoires.....                                | 50        |
| 3. Innervation neuro-sensorielle des voies respiratoires .....                         | 50        |
| B. Interactions neuro-immunes.....   | 51        |
| 1. Interactions spatiales entre les fibres nerveuses et les cellules immunitaires..... | 51        |
| 2. Médiateurs de l'interaction neuro-immune dans les voies respiratoires .....         | 52        |
| 3. Interactions neuro-immunes et remodelage dans l'asthme .....                        | 54        |
| IV. Objectifs de la thèse .....  | 55        |

|   |    |
|---|----|
| Matériel et méthodes .....  | 57 |
| I. Matériel.....  | 59 |
| A. Produits chimiques et biologiques .....  | 59 |
| B. Milieux de culture et solutions.....   | 60 |
| II. Expérimentation animale.....  | 63 |
| A. Induction d'une inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA .....       | 63 |
| B. Induction d'une inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM .....       | 64 |
| C. Induction d'une inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA.....    | 65 |
| D. Transfert de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> dans les souris Rag <sup>-/-</sup> ..... | 65 |
| III. Prélèvement et préparation des échantillons .....                                  | 67 |
| A. Sérum .....  | 67 |
| B. Lavages broncho-alvéolaires et poumons.....  | 67 |
| C. Trachée .....  | 67 |
| D. Ganglions de la racine dorsale .....   | 68 |
| E. Rate et ganglions lymphatiques médiastinaux.....                                     | 68 |
| F. Purification des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....                                | 69 |
| G. Culture primaire de cellules dendritiques issues de la rate.....                     | 69 |
| H. Culture primaire de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse .....        | 69 |
| I. Culture de la lignée cellulaire LA-4 .....   | 70 |
| J. Tests cellulaires .....  | 70 |
| 1. Test de phagocytose .....  | 70 |
| 2. Co-culture de cellules dendritiques et lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....          | 71 |
| IV. Cytométrie en flux .....  | 73 |
| A. Marquage extracellulaire des récepteurs de surface .....                             | 73 |
| B. Marquage intracellulaire du récepteur transmembranaire RET.....                      | 74 |
| C. Dosage des cytokines par « Cytometric Bead Array » (CBA).....                        | 75 |
| V. Histologie .....   | 77 |
| A. Histochimie.....   | 77 |
| 1. Marquage Hématoxyline-Eosine .....   | 77 |
| 2. Marquage trichrome de Masson .....   | 77 |
| B. Immunofluorescence.....  | 78 |
| VI. Biologie moléculaire .....  | 79 |
| A. Dosage de protéines.....   | 79 |
| B. Western Blot.....  | 79 |
| C. Zymographie.....   | 80 |

|   |           |
|---|-----------|
| D. ELISA .....  | 80        |
| 1. Immunoglobulines .....   | 80        |
| 2. TGF- $\beta$ .....   | 81        |
| 3. Substance P .....  | 81        |
| E. Extraction de l'ARN, reverse-transcription et PCR quantitative.....  | 81        |
| VII. Analyses statistiques .....  | 83        |
| <b>Résultats .....</b>  | <b>85</b> |
| I. Implication de la NTN dans l'inflammation neurogène au niveau des voies respiratoires  | 87        |
| A. Densité d'innervation de la trachée chez les souris NTN <sup>-/-</sup> .....   | 87        |
| B. Capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant la trachée chez les souris NTN <sup>-/-</sup><br>.....  | 89        |
| C. Niveau d'activation des cellules des ganglions de la racine dorsale chez les souris NTN <sup>-/-</sup><br>.....  | 91        |
| II. Rôle des cellules dendritiques et lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> NTN <sup>-/-</sup> lors d'un protocole<br>d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA .....   | 93        |
| A. Niveau de la réponse de type Th2 par les splénocytes totaux chez les souris NTN <sup>-/-</sup> ....  | 93        |
| B. Différences phénotypiques entre les cellules dendritiques sauvages et NTN <sup>-/-</sup> .....   | 95        |
| C. Différence fonctionnelle des cellules dendritiques sauvages et NTN <sup>-/-</sup> .....  | 97        |
| D. Influence des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> sur la voie Th2 chez les<br>souris NTN <sup>-/-</sup> .....  | 98        |
| 1. Influence des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> purifiés à partir de la rate issue d'un protocole<br>d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec l'OVA.....                 | 99        |
| 2. Influence des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> purifiés à partir des ganglions médiastinaux issus<br>d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec l'OVA..... | 101       |
| E. Rôle des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> NTN <sup>-/-</sup> après transfert dans les souris immuno-déficientes<br>Rag <sup>-/-</sup> .....                                      | 103       |
| II. Implication de la NTN lors d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires<br>avec de l'HDM .....   | 107       |
| III. Implication de la NTN lors d'un protocole d'inflammation chronique des voies<br>respiratoires avec de l'OVA.....   | 111       |
| A. Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation .....   | 111       |
| B. Influence de la NTN sur le remodelage des tissus.....  | 116       |
| IV. Effet anti-inflammatoire de la NTN <i>in vitro</i> .....  | 119       |
| V. Voies de signalisation de la NTN.....  | 121       |
| A. Expression des récepteurs GFR $\alpha$ 2 et RET .....  | 121       |
| B. Niveau d'expression de l'ATF3 dans les poumons des souris sauvages et NTN <sup>-/-</sup> .....   | 123       |



|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| Discussion .....               | 125 |
| Conclusion - Perspectives..... | 143 |
| Bibliographie .....            | 149 |
| Annexes .....                  | 169 |
| Résumé .....                   | 196 |
| Summary.....                   | 196 |

## Liste des abréviations

|                     |  |
|---------------------|--|
| Al(OH) <sub>3</sub> | Hydroxyde d'aluminium                              |
| APC                 | Allophycocyanine                                   |
| ARN                 | Acide Désoxyribonucléique                          |
| ARTN                | Artémine   |
| ATF                 | Activating Transcription Factor                    |
| BDNF                | Brain Derived Neurotrophic Factor                  |
| BSA                 | Bovine Serum Albumin (Albumine Sérique Bovine)     |
| CBA                 | Cytometric Bead Array                              |
| CD                  | Cluster de différenciation                         |
| CMHII               | Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II  |
| CRE                 | cAMP Responsive Element                            |
| CREB                | CRE Binding protein                                |
| DAMP                | Damage-associated molecular patterns               |
| dNTP                | Déoxynucléoside triphosphate                       |
| DO                  | Densité Optique                                    |
| FITC                | Isothiocyanate de fluorescéine                     |
| FSC                 | Forward Scatter                                    |
| GDNF                | Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor        |
| GFL                 | GDNF Family Ligands                                |
| GFR                 | GDNF Family Receptor                               |
| GM-CSF              | Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor |
| HDM                 | House Dust Mite (Extrait d'acariens)               |
| HRP                 | Horserraddish Peroxydase                           |
| IFN                 | Interféron   |
| Ig                  | Immunoglobuline                                    |
| IL                  | Interleukine                                       |
| ILCs                | Innate lymphoid cells (Cellules lymphoïdes innées) |
| I.N.                | Intra-Nasale                                       |
| I.P.                | Intra-Péritonéale                                  |
| I.V.                | Intra-Veineux                                      |
| LPS                 | Lipopolysaccharide                                 |
| MFI                 | Mean Fluorescence Intensity                        |
| MMP                 | Métalloprotéase matricielle                        |
| NGF                 | Nerve Growth Factor                                |
| NK                  | Neurokinine  |
| NT                  | Neurotrophine                                      |
| NTN                 | Neurturine   |
| NTN <sup>-/-</sup>  | Neurturine knock-out                               |
| OVA                 | Ovalbumine   |

|       |                                       |
|-------|---------------------------------------|
| PAMP  | Pattern-Associated Molecular Patterns |
| PB    | Phosphate Buffer                      |
| PBS   | PhosphateBuffer Saline                |
| PE    | Phycoérythrine                        |
| PFA   | Paraformaldéhyde                      |
| PRR   | Pattern Recognition Receptor          |
| PSPN  | Perséphine                            |
| SDS   | Dodécylsulfate de sodium              |
| SSC   | Side Scatter                          |
| SVF   | Sérum de Veau Foetal                  |
| TBS   | Tris-Buffered Saline                  |
| TBS-T | Tris-Buffered Saline - Tween 0,05%    |
| TCR   | T-cell Receptor                       |
| TGF   | Transforming Growth Factor            |
| TMB   | Tétraméthylbenzidine                  |
| Th    | T helper                              |
| Treg  | T régulateurs                         |
| TLR   | Toll-Like Receptor                    |
| TNF   | Tumor Necrosis Factor                 |
| TSLP  | Thymic Stromal LymphoPoietin          |
| VEGF  | Vascular Endothelial Growth Factor    |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Composition des différents milieux de culture utilisés lors des expériences .....                          | 61 |
| Tableau 2 : Composition des solutions préparées au laboratoire et utilisées lors des expériences .....                 | 62 |
| Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les marquages extracellulaires en fonction de leur couplage aux fluorochromes..... | 73 |
| Tableau 4 : Amorces utilisées dans la réaction de PCR quantitative .....   | 82 |



# Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Les mécanismes de l'allergie .....  | 18 |
| Figure 2 : Activation des cellules épithéliales en interaction avec les cellules dendritiques sous-jacentes suite à l'exposition à un allergène. ....          | 22 |
| Figure 3 : Interaction moléculaire entre une cellule dendritique et un lymphocyte Th0. ....  | 24 |
| Figure 4 : Capacité de différenciation des lymphocytes T helper dans un contexte d'asthme allergique.....  | 27 |
| Figure 5: Les cellules lymphoïdes innées dans le contexte de l'asthme.....   | 29 |
| Figure 6: Mécanismes de l'inflammation des voies respiratoires menant au remodelage des tissus.....  | 33 |
| Figure 7 : La famille des neurotrophines et leurs récepteurs.....  | 40 |
| Figure 8 : La famille du GDNF et leurs récepteurs .....  | 42 |
| Figure 9 : Innervation des voies respiratoires.....  | 48 |
| Figure 10 : Les différentes composantes de l'innervation des voies respiratoires régulant le tonus musculaire, la sécrétion de mucus et la vasodilatation..... | 49 |
| Figure 11 : Interactions neuro-immunes dans l'asthme .....   | 54 |
| Figure 12 : Protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA.....  | 64 |
| Figure 13 : Protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM.....  | 64 |
| Figure 14 : Protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA .....   | 65 |
| Figure 15 : Protocole de transfert de lymphocytes T CD4+ dans les souris immuno-déficientes Rag <sup>-/-</sup> .....   | 66 |
| Figure 16 : Densité d'innervation de la trachée chez les souris sauvages et NTN <sup>-/-</sup> .....   | 88 |
| Figure 17 : Capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant la trachée chez les souris sauvages et NTN <sup>-/-</sup> .....                             | 90 |
| Figure 18 : Sécrétion de cytokines Th1 et Th2 par les splénocytes totaux.....  | 94 |
| Figure 19 : Phénotype des cellules dendritiques issues de la rate. ....  | 96 |
| Figure 20 : Phénotype des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse. ....  | 97 |
| Figure 21 : Test de phagocytose des cellules dendritiques issues de la rate ou dérivées de la moelle osseuse.....  | 98 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 22 : Influence sur la voie Th2 des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate.....  | 100 |
| Figure 23 : Influence sur la voie Th2 des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux. ....  | 102 |
| Figure 24 : Influence des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate de souris sauvages et NTN <sup>-/-</sup> et transférés dans les souris immuno-déficientes Rag <sup>-/-</sup> .....       | 103 |
| Figure 25 : Implication de la NTN suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM (1) .....  | 108 |
| Figure 26 : Implication de la NTN suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM (2). ....  | 110 |
| Figure 27 : Taux de TGF- $\beta$ dans les lavages broncho-alvéolaires des souris sauvages et NTN <sup>-/-</sup> après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA..... | 111 |
| Figure 28 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (1). ....                                 | 112 |
| Figure 29 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (2). ....                                 | 114 |
| Figure 30 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (3) .....                                 | 115 |
| Figure 31 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (4) .....                                 | 117 |
| Figure 32 : Effet anti-inflammatoire de la NTN <i>in vitro</i> .....   | 120 |
| Figure 33 : Voies de signalisation de la NTN (1).....  | 122 |
| Figure 34 : Voies de signalisation de la NTN (2).....  | 123 |
| Figure 35 : Hypothèse du mécanisme d'action de la NTN dans l'inflammation des voies respiratoires. ....  | 145 |

## Liste des annexes

|  |     |
|--|-----|
| Publication 1.....   | 171 |
| « Neurturin influences inflammatory responses and airway remodeling in different mouse asthma models » .....                       | 171 |
| Publication 2.....   | 185 |
| « Mouse Lung and Spleen Natural Killer Cells Have Phenotypic and Functional Differences, in Part Influenced by Macrophages » ..... | 185 |





# Introduction

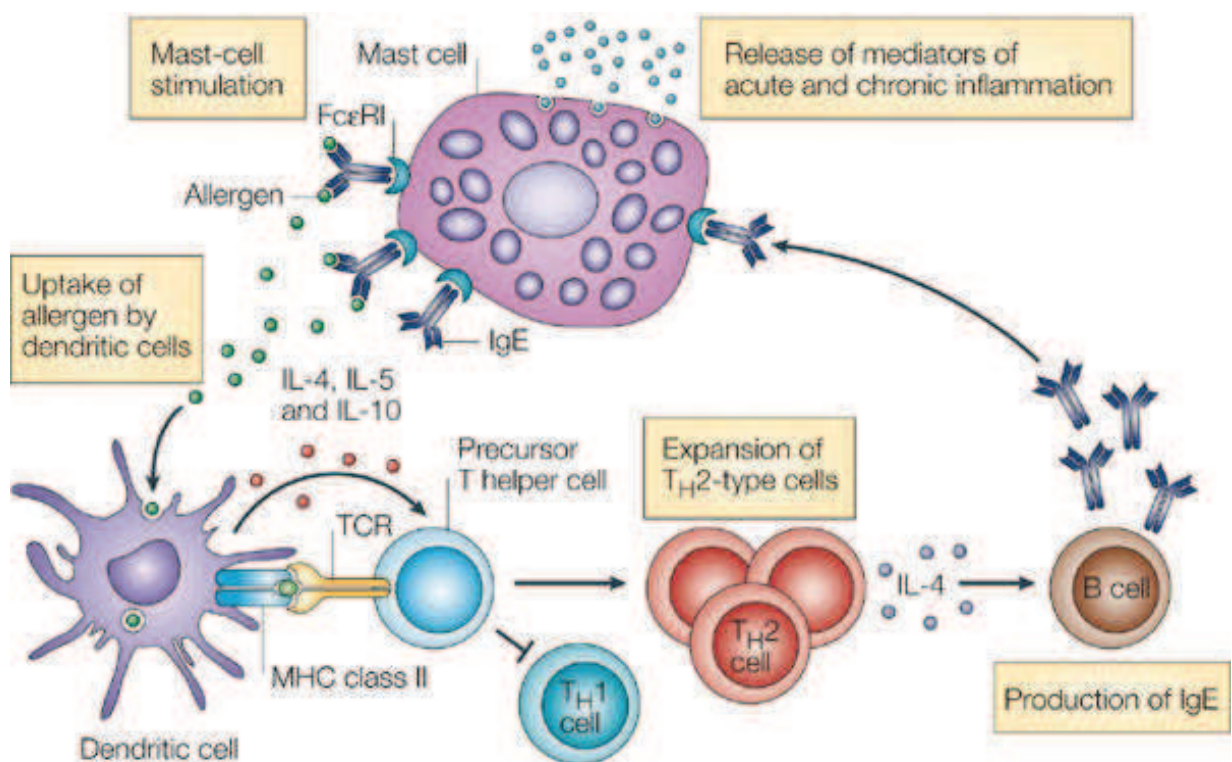
---



Notre système immunitaire est un système de défense contre les différents pathogènes présents dans notre environnement, comme les virus, les bactéries, les champignons ou encore les parasites. La réponse immunitaire s'organise en deux temps, mettant en jeu l'immunité innée, immédiate et non-spécifique, puis l'immunité adaptative, plus tardive et spécifique. L'immunité innée fait intervenir plusieurs types cellulaires : les mastocytes, les granulocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs du non soi appelés « Pattern Recognition Receptors » (PRR), comme les « Toll-like Receptors » (TLR) (Minnicozzi et al., 2011). Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement des motifs conservés appelés « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP), portés par les pathogènes, ou des signaux de danger appelés « Danger-Associated Molecular Patterns » (DAMP), libérés par les cellules lors des réponses immunitaires. Suite à la reconnaissance d'un pathogène par le système immunitaire inné, l'immunité adaptative se met en place. Elle permet d'amplifier la réponse immunitaire afin de lutter contre l'agent pathogène et d'établir une protection à long-terme contre cet agent pathogène. La réponse immunitaire adaptative fait intervenir les lymphocytes T, initiateurs d'une réponse immunitaire cellulaire, et les lymphocytes B, responsables de la production d'anticorps spécifiques contre l'agent pathogène.

Il arrive parfois que notre système immunitaire reconnaisse certains antigènes inoffensifs de notre environnement, présents dans le pollen, les poussières, la nourriture ou des substances toxiques, entraînant une réaction allergique (Figure 1). Lors d'une première rencontre avec un allergène, pendant la phase dite de « sensibilisation », les cellules dendritiques prennent en charge l'allergène pour le présenter aux lymphocytes T « helper » naïfs (Th0) au niveau des ganglions lymphatiques qui drainent le lieu de pénétration de l'antigène (Cookson, 2004). Cette interaction induit alors la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes de type Th2, sécréteurs d'interleukine (IL) 4. Ces lymphocytes Th2 vont ensuite migrer jusqu'aux lymphocytes B où ils vont aider à la commutation de classe des immunoglobulines (Ig) sous l'influence de l'IL-4. Les lymphocytes B produisent alors des IgE spécifiques qui se fixent à un récepteur de haute affinité, le FcεRI, exprimé à la surface des mastocytes, des cellules dendritiques de la peau - les cellules de Langerhans - ainsi qu'à la surface des basophiles. Lors d'une rencontre ultérieure avec le même allergène, les IgE portées par les mastocytes fixent cet allergène et, pour peu qu'il soit di- voire polyvalent, ce

même allergène va s'interconnecter avec au moins deux récepteurs FcεRI. Ce pontage des IgE par l'allergène va induire l'exocytose des granules contenus dans les mastocytes. Ces granules contiennent des substances chimiques comme l'histamine qui, une fois libérées, déclenchent la réaction allergique. Selon sa « localisation », la réaction allergique va se traduire cliniquement par une rhinite allergique (quand les mastocytes activés se situent dans la muqueuse nasale) ou par de l'asthme (quand les mastocytes activés se situent dans la muqueuse des voies aériennes profondes).



Nature Reviews | Immunology

Reproduit avec la permission du groupe « Nature Publishing » (Cookson, 2004)

**Figure 1** : Les mécanismes de l'allergie

Les allergènes sont pris en charge par les cellules dendritiques. Dans les voies de l'endocytose, les allergènes sont dégradés en peptides qui s'associent aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Après avoir gagné la surface cellulaire, les molécules du CMHII interagissent avec les récepteurs des cellules T (TCR) présents sur les précurseurs des cellules T « helper » (Th). Ces derniers se différencient en lymphocytes Th2 sous l'influence de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) et prolifèrent, alors que leur différenciation en lymphocytes de type Th1 est inhibée. Les lymphocytes Th2 participent, via la sécrétion d'IL-4, à l'activation des lymphocytes B qui produisent alors des

IgE spécifiques de l'allergène. Ces IgE se fixent au niveau du récepteur de haute affinité FcεRI portés par les mastocytes. Ils vont reconnaître spécifiquement l'allergène lors d'une seconde exposition et cette reconnaissance va entraîner la dégranulation des mastocytes menant à la libération de médiateurs pro-inflammatoires.

-----

Les maladies allergiques ont atteint des proportions importantes à travers le monde, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (Holgate, 1999). Bien que les individus allergiques aient une prédisposition génétique à réagir aux allergènes qu'ils rencontrent dans leur environnement (von Mutius, 2000), plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, comme les changements de mode de vie, une plus forte exposition à des pollutions environnementales ou encore l'hypothèse d'une hygiène « trop poussée » (Umetsu et al., 2002) (Platts-Mills, 2015). Cette hypothèse propose qu'une exposition accrue à des allergènes sensibilisants et, la diminution des infections durant la petite enfance, participeraient à cette augmentation des maladies allergiques. En effet, dans les pathologies allergiques telle que l'asthme, la réponse immunitaire est polarisée vers une réponse de type Th2, alors que qu'elle est polarisée vers une réponse de type Th1 lors d'infections virales et bactériennes. La diminution des infections durant la petite enfance entraîne ainsi un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur de la voie Th2, créant un environnement favorable au développement des allergies. Cependant, afin d'expliquer comment les infections durant la petite enfance peuvent induire une sensibilisation accrue à des antigènes inoffensifs de notre environnement, il faut tout d'abord comprendre comment la réponse allergique est initiée au niveau des voies respiratoires.

L'asthme est un problème de santé publique majeur. Actuellement, 7 à 10% de la population mondiale souffre d'asthme et la prévalence de cette pathologie ne cesse d'augmenter à travers le monde, notamment dans les pays en voies de développement (Kim et al., 2013). Environ 300 millions de personnes sont atteintes d'asthme à travers le monde et environ 250000 personnes en meurent chaque année (Masoli et al., 2004) (Bousquet et al., 2007). Cette maladie, particulièrement courante dans les pays industrialisés, est devenue une des pathologies chroniques les plus fréquentes chez les enfants (Pearce et al., 2007). Le

coût de l'asthme en Europe est estimé à 19 milliards d'euros par an (comprenant le coût des traitements, les mesures d'accompagnement et les coûts indirects liés au temps perdu à cause de la maladie) dont environ 9,8 milliards d'euros pour les seuls jours non-travaillés (Dominguez-Ortega et al., 2015).

L'équipe du Dr Tatiana Michel du laboratoire d'Immunogénétique et d'Allergologie s'intéresse à l'influence de facteurs neurotrophiques dans l'asthme, notamment la Neurturine (NTN), pour laquelle on dispose d'un modèle d'asthme allergique, basé sur l'utilisation comparative de souris C57BL/6 et NTN knock-out (NTN<sup>-/-</sup>). La NTN est un facteur neurotrophique appartenant à la famille du « Glial cell line-derived Neurotrophic Factor » (GDNF) et est impliquée dans le développement et le maintien du système nerveux. Elle agit via un récepteur spécifique, le « GDNF Family Receptor  $\alpha$  2 » (GFR $\alpha$ 2) et son co-récepteur, la tyrosine kinase RET. Il a été récemment montré que les souris NTN<sup>-/-</sup>, sensibilisées et stimulées avec l'allergène ovalbumine (OVA), développent les principales caractéristiques de l'asthme de façon significativement plus importante que ne le font les souris sauvages (Michel et al., 2011). A partir de ces observations, nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires et humoraux qui entraînent cette hyperréactivité des voies respiratoires chez les souris NTN<sup>-/-</sup>. Cette introduction vous présentera les principaux mécanismes impliqués dans la pathologie de l'asthme, le rôle des facteurs neurotrophiques et leur influence dans cette pathologie ainsi que les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire au cours de l'inflammation des voies respiratoires.

## I. Les cellules et les différents mécanismes impliqués dans l'asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par des symptômes tels que la bronchoconstriction, une production accrue de mucus, l'inflammation et l'hyperréactivité des voies respiratoires. L'asthme peut être initié par différents déclencheurs comme les allergènes, mais aussi les infections virales (rhume, grippe) ou bactériennes, ou les pollutions environnementales (fumée de cigarette, ozone) (Peden and Reed, 2010).

Les mécanismes biologiques sous-jacents font intervenir différents acteurs du système immunitaire : les cellules immunitaires (mastocytes, éosinophiles, neutrophiles, cellules dendritiques et lymphocytes T), les cellules structurales (cellules épithéliales et cellules musculaires lisses) ainsi que des médiateurs inflammatoires solubles (cytokines, chémokines). Ces médiateurs solubles, responsables de l'initiation de la réponse Th2, sont produits par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques sous l'influence d'un signal d'activation (PAMP) portés par les allergènes inhalés.

### A. Les cellules impliquées dans l'asthme

#### 1. Les cellules épithéliales

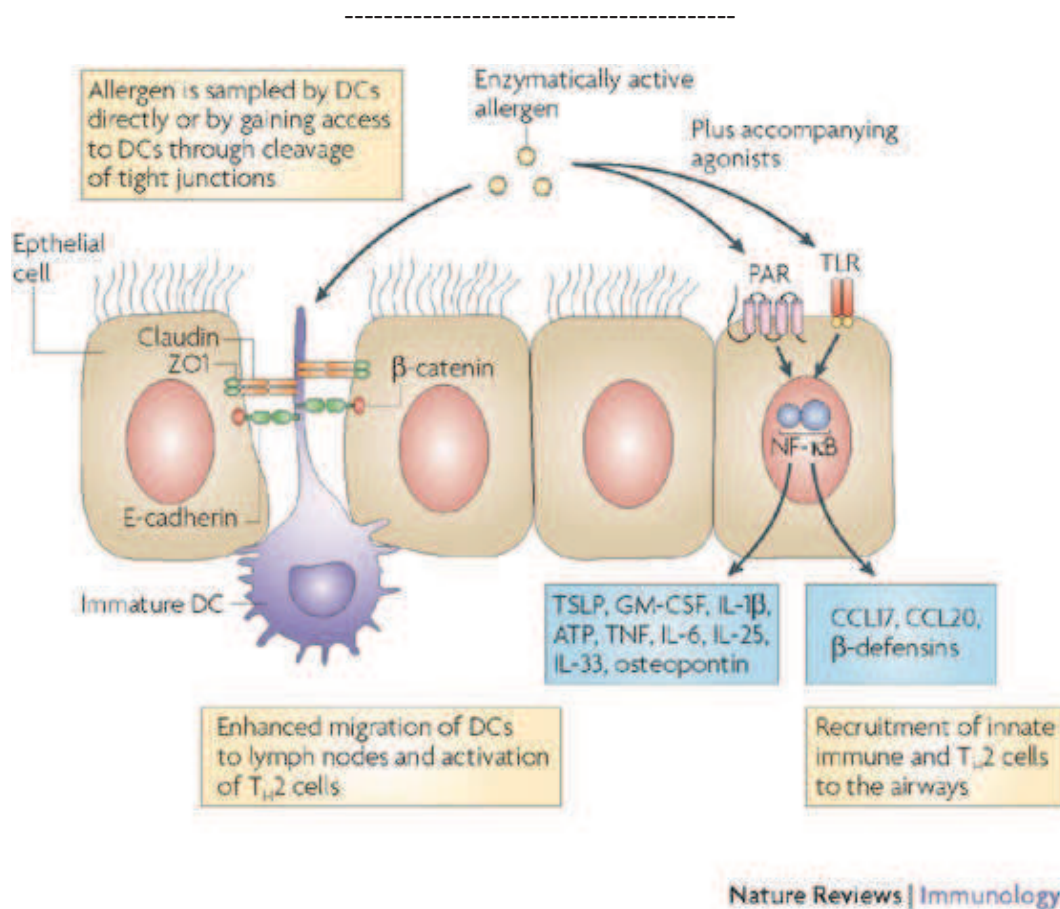
Les cellules épithéliales jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse inflammatoire au niveau des voies respiratoires. Etant directement en contact avec les pathogènes, les allergènes ou certains polluants, elles forment une barrière physique constituant la première ligne de défense du système immunitaire inné (Figure 2).

##### - Etablissement d'une barrière physique

Les cellules épithéliales sont reliées entre elles par des jonctions intercellulaires de différents types : les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions communicantes. Les jonctions serrées sont situées du côté apical des cellules et maintiennent la polarité structurale et fonctionnelle des cellules. Elles assurent également l'étanchéité entre les deux compartiments que les cellules épithéliales séparent tout en ayant une fonction de perméabilité sélective (Schneeberger and Lynch, 1984). Les jonctions serrées sont principalement constituées de protéines membranaires (claudines, occludines, molécules



d'adhérence cellulaire – comme l'E-cadhérine), de protéines cytoplasmiques (protéines ZO,  $\beta$ -Caténine) et de protéines régulatrices (D'Atri and Citi, 2002). Chez les patients asthmatiques, il a été montré que la fonction de barrière physique de l'épithélium au niveau des voies respiratoires est altérée, suite à la formation incomplète des jonctions serrées, facilitant ainsi le passage des allergènes inhalés (Xiao et al., 2011). En parallèle, il a été montré que certains allergènes (extrait d'acariens, cafards, animaux et champignons), possédant une activité protéolytique, sont capables d'altérer les jonctions serrées afin de passer la barrière épithéliale (Jacquet, 2011).



Reproduit avec la permission du groupe « Nature Publishing » d'après (Hammad and Lambrecht, 2008)

**Figure 2** : Activation des cellules épithéliales en interaction avec les cellules dendritiques sous-jacentes suite à l'exposition à un allergène.

Les cellules épithéliales forment une barrière physique grâce à des jonctions intercellulaires composées de protéines membranaires (claudines, E-cadhérine), cytoplasmiques (ZO-1,  $\beta$ -Caténine) et régulatrices. Les cellules dendritiques laissent passer leurs dendrites entre les cellules épithéliales afin d'accéder directement à l'air inhalé chargé de pathogènes. Lors d'une activation par un allergène, les cellules épithéliales sécrètent de nombreux médiateurs

solubles responsables de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques ainsi que du recrutement des cellules du système immunitaire inné de type Th2.

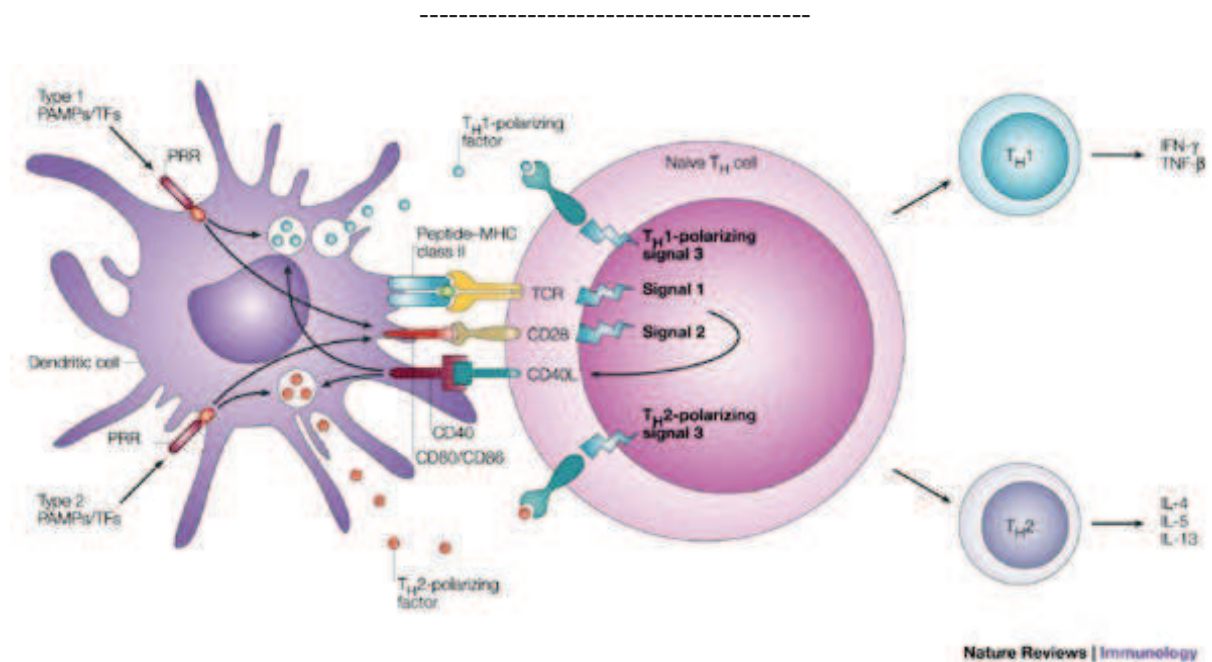
-----

- Production de médiateurs solubles en réponse à un allergène

Suite à la reconnaissance d'un allergène via les PRR, les cellules épithéliales sont capables de produire une grande variété de cytokines, chémokines et facteurs de croissance permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires impliquées dans la réponse allergique (Davies, 2014). D'autres substances environnementales, comme les polluants de l'air (ozone, particules ou fumée de cigarette), participent à l'activation des cellules épithéliales qui se traduit par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, le « Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor » (GM-CSF) ou le « Tumor Necrosis Factor » (TNF)  $\alpha$  (Devalia et al., 1997). En particulier, il a été montré que les cellules épithéliales sont capables de produire l'IL-6, cytokine impliquée dans la différenciation des lymphocytes B et la stimulation des lymphocytes T pour le développement de la réponse inflammatoire de type Th2 (Naka et al., 2002). De plus, l'exposition des cellules épithéliales bronchiales humaines au Der p 1 et Der p 9 (allergènes issus d'extraits d'acariens), entraîne une augmentation de la production d'IL-6 (King et al., 1998) et on retrouve un taux plus élevé de cette cytokine dans les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques (Mattoli et al., 1991). Les cellules épithéliales sont aussi responsables de la production de « Thymic Stromal Lymphopoietin » (TSLP), dont le taux plus élevé dans les lavages broncho-alvéolaires des patients asthmatiques est corrélé avec la sévérité de la maladie (Ying et al., 2005). Le TSLP est une cytokine responsable de la maturation des cellules dendritiques, capables alors d'induire la différenciation des lymphocytes T naifs en lymphocytes Th2. Les cellules épithéliales sont aussi capables de produire les cytokines IL-1, IL-25 et IL-33 en réponse à une stimulation allergénique, trois cytokines responsables de l'initiation de la réponse Th2 (Hammad and Lambrecht, 2015) (Saenz et al., 2008). En présence d'allergènes, les cellules épithéliales sont aussi capables de produire de l'IL-8 (King et al., 1998) (Cromwell et al., 1992), une chémokine responsable de l'attraction des neutrophiles sur le site de l'inflammation.

## 2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques se situent à la frontière entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. En effet, ces cellules expriment tous les récepteurs du système immunitaire inné mais s'avèrent aussi capables de prendre en charge un allergène, et de le dégrader en petits peptides. Ces peptides, après avoir été pris en charge par les molécules du CMHII dans des compartiments intracellulaires, vont finalement être présentés à la surface des cellules dendritiques et interagir avec les TCR des lymphocytes T (Figure 3). Il a été montré que les cellules dendritiques des poumons, présentant les antigènes inhalés aux lymphocytes Th2, sont nécessaires à l'induction d'une inflammation allergique au niveau des voies respiratoires (Lambrecht et al., 1998).



Reproduit avec la permission du groupe « Nature Publishing » d'après (Kapsenberg, 2003)

**Figure 3** : Interaction moléculaire entre une cellule dendritique et un lymphocyte Th0.

Le signal 1 est spécifique de l'antigène. Les lymphocytes T naïfs via leur TCR reconnaissent le peptide antigénique présenté à la surface des cellules dendritiques par le CMH II suite à l'activation des PRR. Le signal 2 est le signal de co-stimulation principalement médié par les molécules CD80 et CD86 portées par les cellules dendritiques, en particulier lors de l'activation de PRR tels que les TLR reconnaissant spécifiquement les PAMP portés par les allergènes. Le signal 3 permet la polarisation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th1 ou Th2 en fonction des cytokines sécrétées dans l'environnement suite à l'activation des PRR via des PAMPs de type 1 ou de type 2.

-----

- Sous-types cellulaires dans les poumons

Il existe différents types de cellules dendritiques au niveau des voies respiratoires. Elles se distinguent les unes des autres par leur localisation (conduits respiratoires ou parenchyme pulmonaire) et par l'expression de différentes combinaisons de marqueurs de surface ou « Cluster de Différentiation » (CD), comme le CD11c et le CD11b. Les cellules dendritiques peuvent ainsi être divisées en 2 groupes distincts : d'une part, les cellules dendritiques conventionnelles exprimant fortement le CD11c (CD11c<sup>high</sup>) et, d'autre part, les cellules dendritiques plasmacytoïdes exprimant faiblement le CD11c (CD11c<sup>dim</sup>) (Lambrecht and Hammad, 2009). Ces 2 catégories de cellules dendritiques peuvent alors être différenciées en sous-groupes selon l'expression du marqueur CD11b (CD11b négatif ou positif). Cette classification prend aussi en compte l'infiltration de cellules dendritiques myéloïdes CD11b positives lors d'une inflammation. Ces cellules dérivent de monocytes (Ly6 positif) et ont une plus forte expression du CD11c à leur surface.

- Reconnaissance des allergènes inhalés dans les poumons

Les cellules dendritiques situées au niveau de la couche baso-latérale de l'épithélium des voies respiratoires (Holt et al., 1990) insinuent leurs dendrites entre les cellules épithéliales pour entrer en contact avec les pathogènes de l'air inhalé (Veres et al., 2011). Les cellules dendritiques se lient même aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de jonctions intercellulaires, afin de préserver l'intégrité structurelle de l'épithélium (Blank et al., 2011). A ce stade, les cellules dendritiques - véritables cellules « sentinelles » - demeurent à un stade dit « immature ». Elles captent certes les allergènes mais, non matures, ne peuvent pas stimuler la prolifération de lymphocytes T (Stumbles et al., 1998). Il a été montré que la reconnaissance de PAMPs via les PRR exprimés à la surface des cellules dendritiques peut induire leur maturation (Medzhitov, 2001). Celle-ci se traduit par l'expression de molécules de co-stimulation à la surface des cellules dendritiques et par leur migration vers les ganglions lymphatiques drainant la zone de rencontre avec l'antigène (Vermaelen et al., 2001). Dans les ganglions lymphatiques régionaux, les cellules dendritiques matures présentent les peptides antigéniques à leur surface via le CMHII et sont alors capables

d'interagir avec les lymphocytes T naïfs et d'induire leur différenciation en lymphocytes Th2, en présence de molécules de co-stimulation telles que le CD80 ou le CD86 (Schwartz, 1992).

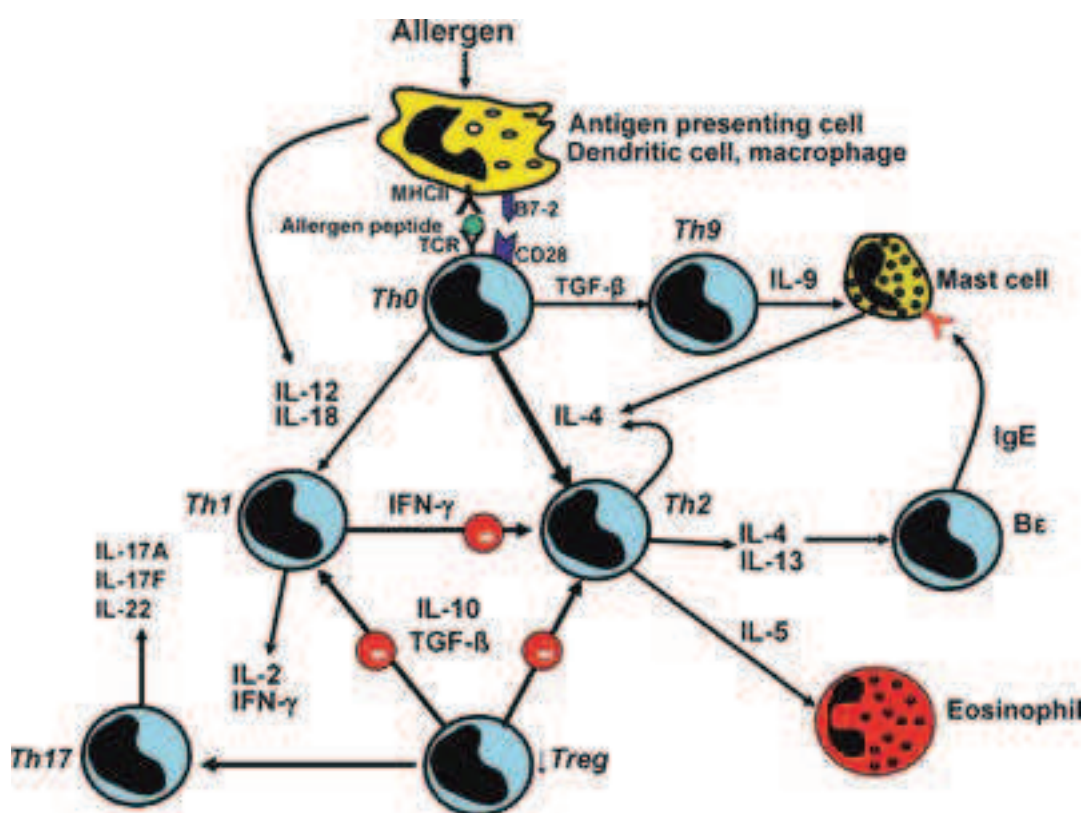
### 3. Les lymphocytes Th2

La pathologie de l'asthme est fortement liée au développement d'une réponse immunitaire de type Th2 médiée par les lymphocytes T CD4+. Ainsi, il a été montré que chez les patients asthmatiques, les lymphocytes T CD4+ présents en grand nombre au niveau des voies respiratoires suite à l'exposition à un allergène (Gerblin et al., 1991), sont majoritairement des lymphocytes de types Th2 (Walker et al., 1992). De plus, l'augmentation du nombre de lymphocytes T activés chez les patients asthmatiques est corrélée avec l'infiltration d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires et la sévérité de la maladie (Robinson et al., 1993).

#### - Différenciation des lymphocytes T CD4+ de type Th2

Les lymphocytes T CD4+ naïfs (Th0) ont la capacité de se différencier en lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17 ou en lymphocytes T régulateurs (T reg) (Figure 4). En réponse à un allergène, les lymphocytes Th2 sont beaucoup plus nombreux par rapport aux lymphocytes Th1. Les lymphocytes Th1 sont responsables de la production d'interféron (IFN)  $\gamma$ , cytokine de type Th1 qui inhibe la voie Th2. Les lymphocytes Treg ont un effet inhibiteur sur les lymphocytes Th2 tandis que les lymphocytes Th17 ont des effets pro-inflammatoires, favorisant la production de cytokines responsables de l'inflammation des tissus. Les lymphocytes Th9 participent au recrutement et à la différenciation des mastocytes (Barnes, 2011). Il a été montré que la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th2 est nécessaire au développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires. En effet, le transfert adoptif de lymphocytes Th2 spécifiques d'un antigène dans les poumons de souris naïves entraîne une infiltration immunitaire riche en éosinophiles et l'hyperréactivité des voies respiratoires (Li et al., 1998). De plus, il a été montré que la présence d'IFN- $\gamma$  inhibant la voie Th2 et stimulant la voie Th1 permet de prévenir le développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires induite par une exposition à un allergène (Li et al., 1996). Enfin, la présence d'IL-4 est nécessaire à la différenciation des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes Th2 (Seder et al., 1992).

Le fait que les lymphocytes Th2 soient prédominants dans un contexte d'asthme allergique pourrait être dû à un défaut de la voie Th1, notamment par une diminution de la production d'IL-12. Le taux de cette cytokine, primordiale pour la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th1 (Trinchieri, 1994), est fortement diminué chez les patients asthmatiques (van der Pouw Kraan et al., 1997). Cette diminution peut s'expliquer par la présence de cytokines de types Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 qui sont des régulateurs négatifs de la production d'IL-12 (D'Andrea et al., 1995).



Reproduit avec la permission du groupe « John Wiley and Sons » d'après (Barnes, 2011)

**Figure 4** : Capacité de différenciation des lymphocytes T helper dans un contexte d'asthme allergique.

Les lymphocytes Th0 ont la capacité de se différencier en différents sous-types sous l'influence de cytokines. L'inflammation allergique est caractérisée par une forte proportion de lymphocytes Th2, par rapport aux lymphocytes Th1, ainsi que par une forte production de cytokines de type Th2, qui vont stimuler la production d'IgE par les lymphocytes B et participer au recrutement de cellules inflammatoires comme des éosinophiles. En parallèle, les lymphocytes Th17 ont des effets pro-inflammatoires et les lymphocytes Th9 participent au recrutement de mastocytes, alors que les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont des effets

inhibiteurs sur les lymphocytes Th2 via la production d'IL-10 et de « Transforming Growth Factor » (TGF)  $\beta$ .

-----

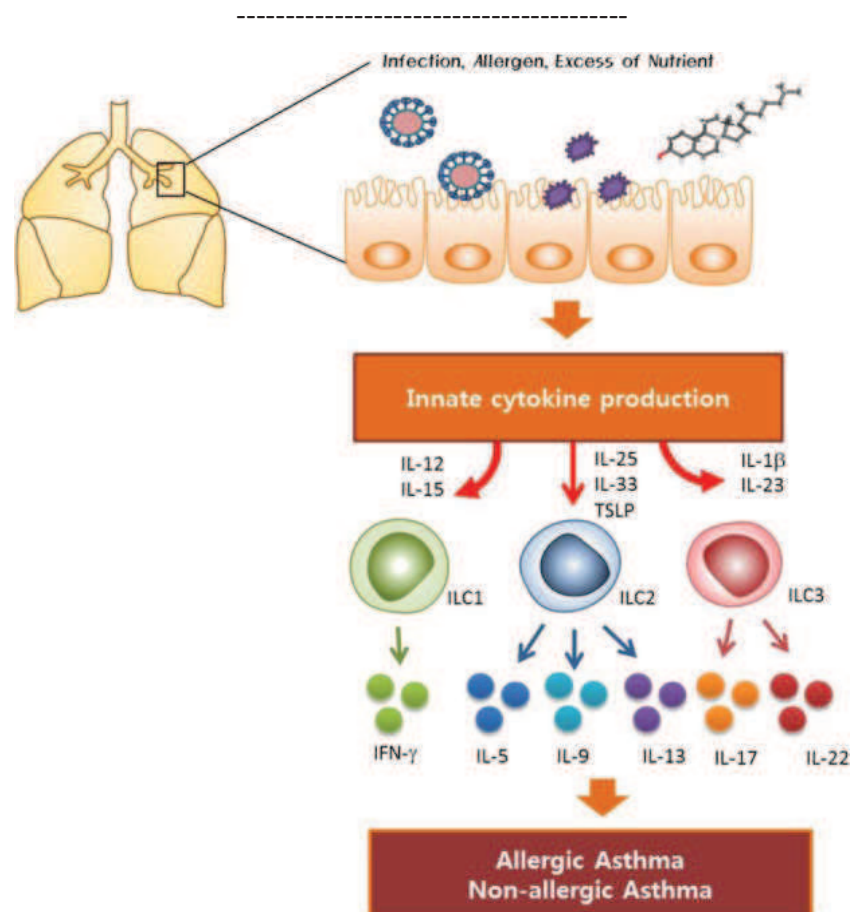
- Sécrétion des cytokines de type Th2

Les lymphocytes Th2 sont caractérisés par leur capacité à sécréter spécifiquement des cytokines de types Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IL-6, l'IL-9 et l'IL-10 (Walker et al., 1992). La production de ces cytokines va induire un grand nombre de mécanismes cellulaires. L'IL-4 joue un rôle important dans : la commutation de classe des lymphocytes B conduisant à la production d'IgE (Coffman et al., 1988; Lebman and Coffman, 1988) (Finkelman et al., 1988), le recrutement des cellules inflammatoires comme des éosinophiles (Schleimer et al., 1992) (O'Byrne et al., 1999) et leur survie (Lopez et al., 1988), ou encore la production de mucus (Whittaker et al., 2002). L'IL-5 est aussi impliquée dans le développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires. Elle intervient dans la différenciation, la migration, le recrutement, l'activation et la survie des éosinophiles (Takatsu and Nakajima, 2008). Quant à l'IL-13, elle agit principalement en association avec l'IL-4 et l'IL-5 dont elle stimule les actions. L'IL-13 participe également au recrutement et à l'activation des cellules impliquées dans l'hyperréactivité des voies respiratoires via sa capacité à stimuler l'expression de gènes codants pour des molécules d'adhésion, des chémokines ou des métalloprotéases, en particulier la métalloprotéase matricielle (MMP) 9 (Wills-Karp, 2004).

#### 4. Les cellules lymphoïdes innées

De récentes études ont mis en évidence l'existence des cellules lymphoïdes innées ou « innate lymphoid cells » (ILCs). Ces cellules dérivent d'un « progéniteur lymphoïde commun » qui donne naissance aux lignées lymphocytaires. Cependant, ces cellules n'expriment pas les différents marqueurs de surface caractérisant les lymphocytes T (CD3, CD4 et  $\alpha\beta/\gamma\delta$  TCR), ou les lymphocytes B (CD19 et CD20), ou encore les autres leucocytes (CD11c, CD14, CD16, CD56, et Fc $\epsilon$ R1) (Karta et al., 2016). Ces cellules sont subdivisées en 3 groupes distincts, selon l'expression de certains facteurs de transcription ou encore la sécrétion de cytokines spécifiques. Ainsi on distingue les cellules lymphoïdes innées du

groupe 1, de celles du groupe 2 ou encore du groupe 3 ; ces 3 groupes étant respectivement dénommés : ILC1s, ILC2s et ILC3s (Figure 5) (Woo et al., 2014). Les ILC1s, sous l'influence du facteur de transcription T-bet, sont responsables de la sécrétion de cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$ ). Les ILC3s sont responsables de la sécrétion de cytokines de type Th17 (IL-17, IL-22), sous l'influence du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Enfin, les ILC2s sont quant à eux responsables de la sécrétion de cytokines de types Th2 telles que l'IL-5, l'IL-9 ou encore l'IL-13 sous l'influence du facteur de transcription GATA-3. Ces ILC2s jouent donc un rôle important dans le développement de l'asthme en favorisant la réponse des cellules immunitaires et les modifications structurales affectant les voies respiratoires après contact avec l'allergène (Doherty, 2015). Soulignons que ce phénomène est indépendant de la sécrétion de cytokines de type Th2 par les lymphocytes T CD4+ (Chang et al., 2013)



Reproduit avec la permission du groupe « The Korean Association of Immunologists » d'après (Woo et al., 2014)

**Figure 5:** Les cellules lymphoïdes innées dans le contexte de l'asthme.



Les cellules lymphoïdes innées sont activées par de nombreuses cytokines sécrétées par les cellules épithéliales, suite à leur activation en présence de virus, d'allergènes ou de polluants. Les ILC1s, activées par l'IL-12 et l'IL-15, sont responsables de la production d'IFN $\gamma$ , cytokine impliquée dans la lutte anti-virale. Les ILC2s, activées par l'IL-25, l'IL-33 et le TSLP, sont responsables d'une forte production de cytokines de type Th2 telles que l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 favorisant l'infiltration d'éosinophiles, l'hyperréactivité des voies respiratoires ainsi que la production de mucus. Les ILC3s, activées par l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23, sont responsables de la production d'IL-17 et d'IL-22, cytokines impliquées dans le déclenchement de la réaction asthmatique. Par leur production de cytokines, les ILCs sont capables d'influencer la réponse immunitaire adaptative mis en place dans le contexte de l'asthme.

-----

Les ILC2s sont activées par les cytokines IL-25, IL-33 ou TSLP sécrétées par les cellules épithéliales en réponse à une exposition à des allergènes, à des virus ou encore des pollutions environnementales (Kabata et al., 2015). Il a été montré que le taux de l'IL-33 ainsi que le nombre d'ILC2s sont augmentés dans les voies respiratoires des patients asthmatiques, en particulier chez ceux atteints par une forme sévère de la maladie (Christianson et al., 2015). Jusqu'à présent, la plupart des travaux de recherches sur les ILC2s ont été réalisés chez la souris, par manque de marqueurs spécifiques aux ILC2s de l'homme. Ainsi, il a été montré que les ILC2s participent au développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires, via la voie de signalisation de l'IL-33 et de son récepteur ST-2, dans un modèle d'asthme allergique murin (Kearley et al., 2009). Ces cellules peuvent également être activées par de nombreux médiateurs issus des différents types de cellules immunitaires impliquées dans l'asthme tels les éosinophiles ou les mastocytes (Doherty, 2015).

## 5. Les éosinophiles

Les éosinophiles représentent un des marqueurs communs de l'inflammation allergique et la sévérité de l'asthme peut être corrélée avec le nombre d'éosinophiles infiltrés au niveau des voies respiratoires (Bousquet et al., 1990).

- Activation des éosinophiles

Les éosinophiles sont recrutés au niveau du site de l'inflammation sous l'influence de différentes cytokines via l'amplification de la réponse Th2, en particulier la sécrétion d'IL-5 par les lymphocytes Th2 (Huang et al., 2009). Ils sont activés directement par le TSLP et l'IL-33 sécrétés par les cellules épithéliales. En effet, il a été montré que le TSLP est capable de retarder l'apoptose des éosinophiles exprimant son récepteur à leur surface et d'induire la production d'IL-6 (Wong et al., 2010). L'IL-33, en présence d'IL-4, est également capable d'activer les éosinophiles et d'induire la sécrétion d'IL-4 créant ainsi une boucle d'auto-amplification de l'IL-4 (Bouffi et al., 2013).

- Production de médiateurs solubles pro-inflammatoires

Les éosinophiles sont capables de produire des médiateurs solubles dont de nombreuses cytokines de type Th1 ou Th2 qui contribuent à la physiopathologie de l'asthme (Shamri, 2011 #106). Les principaux médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les éosinophiles participent au développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires, à la production excessive de mucus et au remodelage des tissus (Kay, 2005). Ainsi, les éosinophiles sont impliqués dans le remodelage des tissus en particulier via leur capacité à sécréter du TGF- $\beta$  et à interagir avec les mastocytes et les cellules épithéliales (Venge, 2010). Les éosinophiles constituent en effet une source majeure de TGF- $\beta$  au niveau des voies respiratoires (Minshall et al., 1997).

## 6. Les neutrophiles

Les éosinophiles ne sont pas toujours retrouvés dans les voies respiratoires dans la pathologie de l'asthme (Turner et al., 1995). Dans plus de 50% des cas, une augmentation du nombre de neutrophiles, associée à une augmentation du taux d'IL-8, peuvent être retrouvées chez les patients asthmatiques (Douwes et al., 2002).

- Recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation

Les neutrophiles recrutés au niveau des voies respiratoires sont caractérisés par une forte expression du récepteur Fc $\epsilon$ RI qui, suite au pontage des IgE fixées à ces récepteurs, entraîne la libération de l'IL-8 contenue dans les granules de ces cellules (Gounni et al., 2001). Il apparaît que l'expression du Fc $\epsilon$ RI par les neutrophiles dépend de la présence de cytokines

de type Th2 libérées par les lymphocytes T (Alphonse et al., 2008). Cependant, le nombre de neutrophiles infiltrés dans les voies respiratoires des patients asthmatiques dépend des concentrations des cytokines chémoattractives IL-8 et TNF- $\alpha$  (Drost and MacNee, 2002) (Casale et al., 1996), produites par d'autres cellules immunitaires et par les neutrophiles eux-mêmes.

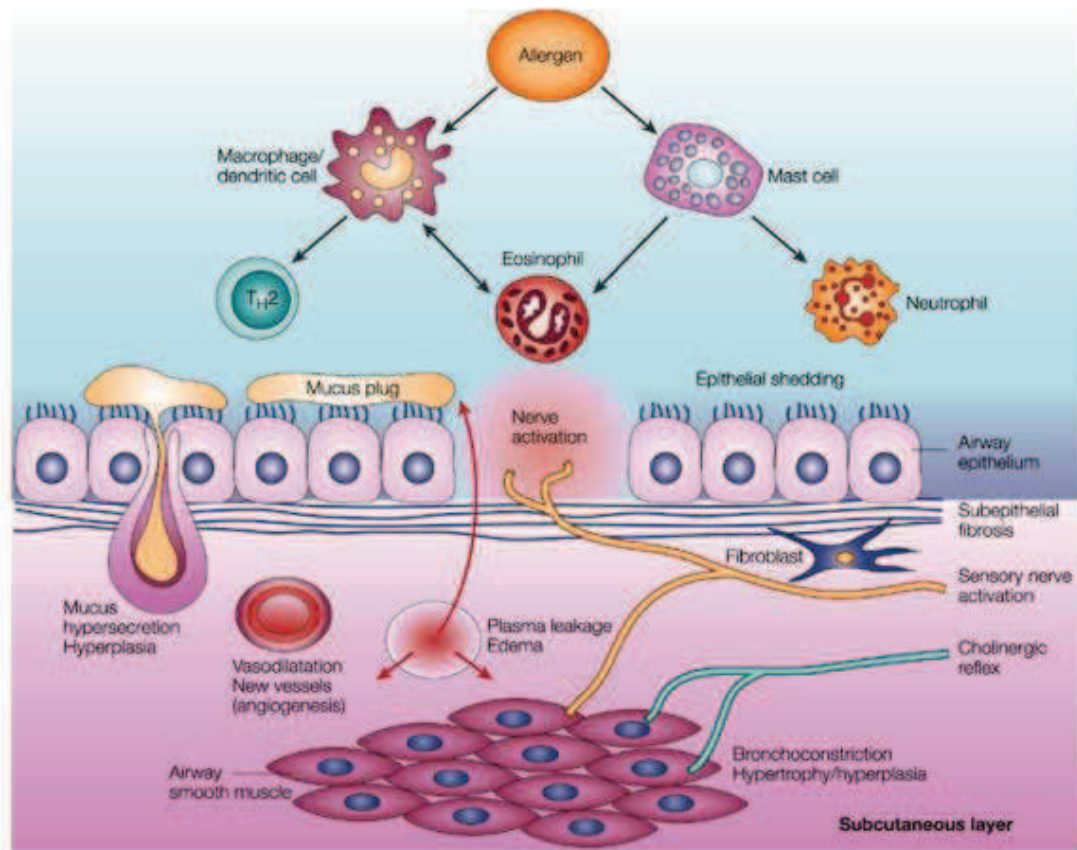
- Production de médiateurs solubles impliqués dans l'asthme

Les neutrophiles sont aussi responsables de la production d'un grand nombre de médiateurs pro-inflammatoires (Cassatella, 1995), menant au développement de l'asthme (Monteseirin, 2009). En particulier, il a été montré que les neutrophiles activés sont responsables de la production de TGF- $\beta$  (Fava et al., 1991) et de la MMP-9 (Ventura et al., 2014), deux médiateurs impliqués dans le remodelage des tissus.

## B. Les mécanismes impliqués dans l'asthme

Le remodelage des voies respiratoires est une des caractéristiques de l'asthme. L'exposition récurrente à un allergène entraîne des changements structuraux au niveau des tissus. Ceux-ci incluent la transition épithélio-mésenchymateuse de l'épithélium respiratoire, l'hyperplasie et la métaplasie des cellules sécrétrices de mucus, une augmentation de la masse de cellules musculaires lisses péribronchiques, une fibrose sous-épithéliale et une angiogénèse. Tous ces mécanismes induisent un épaissement de la paroi des voies aériennes et donc un rétrécissement des voies respiratoires menant à une diminution de la capacité respiratoire. Les médiateurs solubles tels que les cytokines, les chémokines ou les facteurs de croissance sécrétés par les cellules immunitaires et les cellules structurales jouent un rôle crucial dans le développement du remodelage des tissus (Figure 6).

-----



Nature Reviews | Drug Discovery

Reproduit avec la permission du groupe "Nature Publishing" d'après (Barnes, 2012)

**Figure 6:** Mécanismes de l'inflammation des voies respiratoires menant au remodelage des tissus

Dans le contexte de l'asthme allergique, de nombreuses cellules inflammatoires sont recrutées et/ou activées au niveau des voies respiratoires où elles sécrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires responsables du remodelage des voies respiratoires caractérisé par : une augmentation de la sécrétion de mucus, l'augmentation du nombre et de la taille des cellules musculaires lisses, la fibrose sous-épithéliale et une augmentation de la vascularisation.

-----

- Transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse correspond à un processus où les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses. Cette transition se traduit par une perte des jonctions intercellulaires (Holgate et al., 2000).

Même si ce n'est pas une caractéristique spécifique de l'asthme, plusieurs études rapportent l'existence d'un dysfonctionnement de l'épithélium respiratoire chez les patients asthmatiques avec une altération des jonctions serrées intercellulaires. Cette altération permet un passage plus aisé des allergènes au niveau de la paroi des voies aériennes vers les cellules immunitaires (Holgate, 2007).

- Métaplasie des cellules sécrétrices de mucus

La sécrétion de mucus par les cellules caliciformes chez les personnes saines permet d'englober les allergènes inhalés et de les expulser sous l'action mécanique des cellules ciliées et le réflexe de toux. Cependant, chez les patients asthmatiques, un excès de production de mucus entraîne l'obstruction des voies aériennes (Fahy, 2001). Le mucus est principalement composé de mucines, des glycoprotéines qui déterminent sa viscosité et ses propriétés adhésives (Rose and Voynow, 2006). Il a été montré que, sous l'influence des lymphocytes de type Th2 sécrétant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13, il y a davantage de cellules caliciformes chez les patients asthmatiques (hyperplasie) (Fahy and Dickey, 2010) sécrétant davantage les mucines MUC5A et MUC5B, responsables de l'augmentation de la viscosité du mucus (Turner and Jones, 2009) et induisant l'obstruction des voies respiratoires (métaplasie).

- Augmentation de la densité des cellules musculaires lisses péribronchiques

Les cellules des muscles lisses ont un rôle critique dans l'inflammation chronique au niveau des voies respiratoires. Elles sont responsables d'une contraction excessive entraînant le rétrécissement des voies respiratoires menant à une perte progressive de la fonction respiratoire (Kudo et al., 2013). Il a été montré que l'exposition récurrente de rats à un allergène entraîne une augmentation du nombre et de l'épaisseur des cellules musculaires lisses dans les voies respiratoires (Sapienza et al., 1991) (Salmon et al., 1999). Une autre étude a montré que l'hyperplasie des cellules musculaires est stimulée *in vitro* par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6 (De et al., 1995). On retrouve également une augmentation du nombre et de la taille des cellules musculaires lisses au niveau des voies respiratoires chez les patients asthmatiques, influencées par des cytokines ou des facteurs de croissance libérés par les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires (Al-Muhsen et

al., 2011), comme l'histamine (Panettieri et al., 1990) ou le TGF- $\beta$  (Doherty and Broide, 2007).

- Fibrose sous-épithéliale

L'épaississement de la paroi des voies respiratoires est un des processus du remodelage des poumons dans la pathologie de l'asthme. Les patients asthmatiques développent une fibrose sous-épithéliale au niveau de la paroi des voies respiratoires, due à une forte activation des fibroblastes (Roche et al., 1989). Certaines études suggèrent qu'il y a une corrélation entre l'épaississement de la paroi des voies respiratoires et la sévérité de la maladie (Pare et al., 1997), tandis que d'autres affirment qu'il n'y a pas de corrélation (Chu et al., 1998). Il a été montré *in vitro* que des cellules épithéliales altérées produisent de nombreux médiateurs pro-fibrotiques dont le TGF- $\beta$  qui régulent la production de collagène par les fibroblastes et les myofibroblastes (Holgate, 2000). L'augmentation du dépôt de collagène autour des bronches est associée à une augmentation de l'expression de la MMP9 chez les patients asthmatiques (Hoshino et al., 1998). Cette augmentation peut elle-même être liée à l'augmentation du nombre de neutrophiles au niveau des voies respiratoires. En effet, la MMP9 est stockée sous forme de granules intracellulaires lors de la maturation des neutrophiles dans la moelle osseuse. Cependant, lors d'une inflammation des voies respiratoires et sous l'influence de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , la plupart des cellules impliquées dans la réponse à un allergène sont capables de sécréter la MMP9, qui va alors jouer un rôle dans le remodelage des tissus (Atkinson and Senior, 2003).

- Angiogénèse

Une augmentation de la vascularisation au niveau des voies respiratoires est aussi impliquée dans le remodelage de ces tissus. En effet, des taux importants de « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF), un facteur pro-angiogénique, sont retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires des patients asthmatiques (Simcock et al., 2007). De plus, dans un modèle de souris développant une réponse inflammatoire suite à l'exposition à un allergène, le VEGF est produit par les cellules épithéliales, les lymphocytes Th2 (Lee et al., 2004) ou encore par les mastocytes (Chetta et al., 2005). En stimulant la formation de nouveaux

vaisseaux sanguins et en augmentant la perméabilité vasculaire, le VEGF participe au remodelage des voies respiratoires.

### C. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'asthme

L'« activating transcription factor » (ATF) 3 est un facteur de transcription de type « leucine-zipper » appartenant à la famille des « CRE binding protein » (CREB). En tant que tel, il se fixe au niveau des éléments de réponse dépendant de l'AMPc encore appelés CRE pour « cAMP responsive element » (Hai and Hartman, 2001). Dans des macrophages activés par des LPS, via le TLR4, il a été montré que l'ATF3 a un rôle de régulateur négatif. En effet, son site de fixation au niveau du groupe de gènes qu'il régule est situé juste à côté de celui du facteur de transcription NFκB, connu pour son action d'activation des réponses inflammatoires, empêchant ainsi la réponse inflammatoire induite par NFκB (Gilchrist et al., 2006). En utilisant un modèle de souris exposées à l'allergène OVA, les auteurs ont ensuite démontré que l'expression de l'ATF3 est induite au niveau des poumons, en particulier dans les lymphocytes T CD4+, permettant ainsi le contrôle des gènes codant les cytokines de type Th2, réduisant ainsi la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 responsables de l'inflammation des voies respiratoires suite à l'exposition à un allergène (Gilchrist et al., 2008).

### D. Les modèles d'asthme chez la souris

Les mécanismes de l'asthme ainsi que le rôle des différents types de cellules immunitaires impliquées dans cette pathologie ont été largement étudiés grâce à des modèles d'asthme allergique chez la souris. Ces modèles utilisent des allergènes comme l'OVA (Kumar et al., 2008), des extraits d'acariens ou « House Dust Mite » (HDM) (Johnson et al., 2004), des extraits de cafards (Ullah et al., 2015) ou encore des pollens (Jacquet, 2011). Les souris peuvent donc être sensibilisées par une grande variété d'allergènes introduits dans l'organisme par différentes voies d'administration (intra-péritonéale, intra-nasale), en présence d'adjuvants comme l'hydroxyde d'aluminium (Brewer et al., 1999) ou de faibles doses d'endotoxines (ou lipopolysaccharide, LPS) (Piggott et al., 2005). En l'absence d'adjuvant, si l'allergène contient lui-même des endotoxines ou s'il est pourvu d'une activité protéolytique (Chapman et al., 2007), il peut contribuer à l'activation des cellules de l'épithélium respiratoire ou encore à la dégradation de la barrière épithéliale facilitant ainsi

le passage des allergènes. Ces sensibilisations vont aboutir à la mise en place d'une réponse immunitaire (Jacquet, 2011), comportant, en particulier, une réponse de type Th2 et une production d'IgE spécifiques de l'allergène. Suite à cette phase de sensibilisation, une stimulation répétée des souris par le même allergène, administré par voie intranasale, mène au développement de l'asthme aigu, caractérisé par une forte infiltration d'éosinophiles, la sécrétion de mucus, l'hyperplasie des cellules caliciformes ainsi que par l'hyperréactivité des voies respiratoires. Les souris peuvent également être stimulées de façon chronique, sur plusieurs semaines. Une telle stimulation abouti au développement d'un asthme chronique caractérisé par le remodelage des tissus des voies respiratoires (Nials and Uddin, 2008) (Zosky and Sly, 2007).





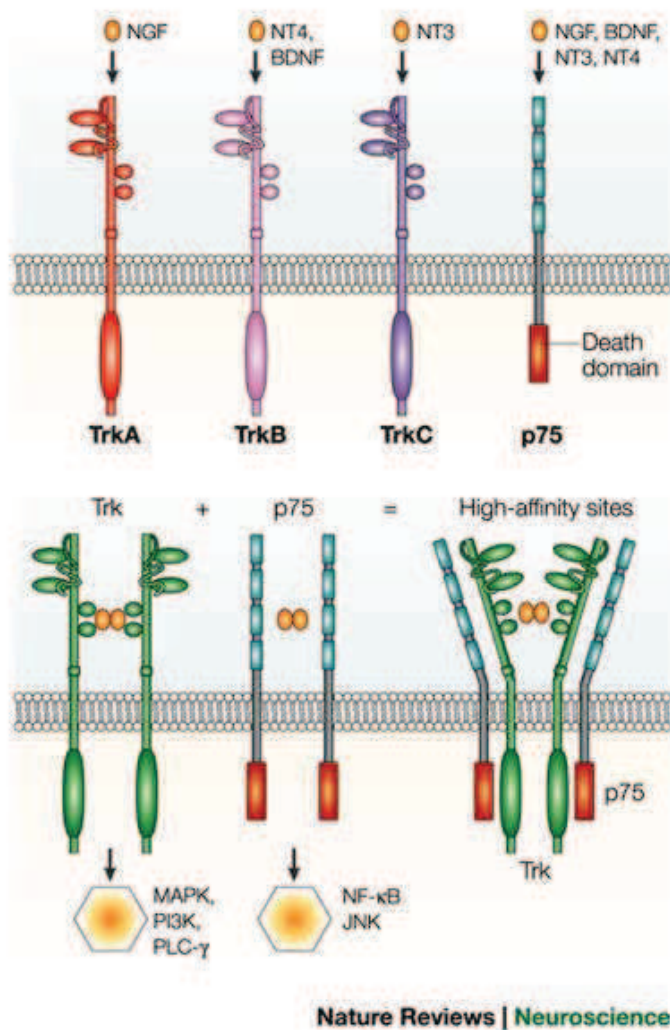
## II. Les facteurs neurotrophiques et leur influence dans l'asthme

Il existe différentes familles de facteurs neurotrophiques dont la famille des neurotrophines et la famille des facteurs neurotrophiques qui dérivent des cellules gliales. Cette famille a tout d'abord été décrite comme étant composée de facteurs ayant la capacité à réguler le développement, la maintenance et la survie des neurones du système nerveux. Cependant, l'expression de ces facteurs neurotrophiques et de leurs récepteurs dans les poumons de l'homme (Ricci et al., 2004) et de la souris (Golden et al., 1999; Widenfalk et al., 1997) (Hikawa et al., 2002), suggère également leur implication dans le développement et la fonction des voies respiratoires.

### A. Les neurotrophines

Les neurotrophines (Figure 7) sont une famille de protéines partageant des similarités de structure, de fonction et d'activités biologiques. Elles sont impliquées dans le développement du système nerveux chez les vertébrés en régulant la survie ou la mort des neurones durant l'embryogénèse et lors des premiers jours de la vie ainsi que la maintenance des neurones à l'état adulte (Lewin and Barde, 1996). Cette famille est composée de 4 membres : le « Nerve Growth Factor » (NGF), le « Brain-Derived Neurotrophic Factor » (BDNF), la Neurotrophine 3 (NT-3) et la Neurotrophine 4/5 (NT-4/5). Les neurotrophines exercent leurs effets en utilisant un récepteur commun de faible affinité, le p75<sup>NTR</sup>, ou des récepteurs spécifiques et de forte affinité appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinase, les TrkA, B et C. Le NGF se fixe préférentiellement au récepteur TrkA, le BDNF et la NT-4/5 au TrkB et la NT-3 au TrkC. La liaison des neurotrophines à leurs récepteurs induit alors l'activation de différentes voies de signalisation (Teng and Hempstead, 2004).

-----



Reproduit avec la permission du groupe "Nature Publishing" à partir de (Chao, 2003)

**Figure 7** : La famille des neurotrophines et leurs récepteurs.

Le NGF, le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5 exercent leur activité en se fixant à un récepteur commun de faible affinité, le p75NTR ou à des récepteurs spécifiques de haute affinité appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinase, les TrkA, B et C. La fixation des neurotrophines entraîne la dimérisation de leur récepteur et induit la transduction du signal via différentes voies de signalisation.

Des études ont montré que les neurotrophines sont impliquées dans la physiopathologie de l'asthme. Des taux plus élevés de NGF, BDNF et NT-3 ont été retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques après exposition à un allergène (Virchow et al., 1998). De plus, il a été montré qu'une augmentation du taux de NGF dans le sérum de

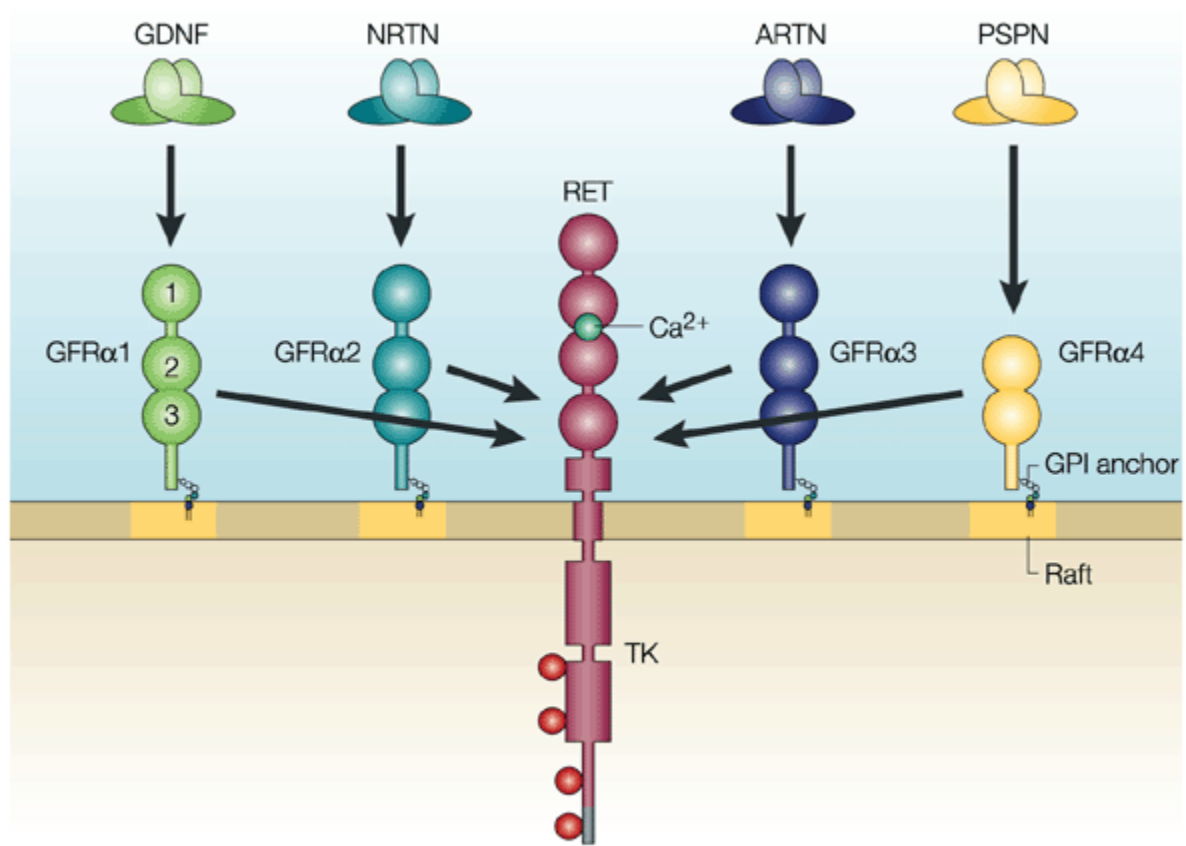
patients asthmatiques est corrélée avec la sévérité de la maladie (Bonini et al., 1996). Il en va de même en ce qui concerne le taux de BDNF (Lommatzsch et al., 2005). Ces observations ont été confirmées dans des modèles d'asthme allergique chez la souris où les taux de NGF et de BDNF sont augmentés dans le sérum et les lavages broncho-alvéolaires de ces souris (Braun et al., 1998) (Braun et al., 1999).

L'utilisation des modèles d'asthme chez la souris a permis d'identifier les cellules capables de produire des neurotrophines et d'identifier les cellules qu'elles ciblent. De nombreuses études ont montré que les neurotrophines sont produites au niveau des voies respiratoires par un grand nombre de cellules structurales (cellules épithéliales, fibroblastes), tout comme par des cellules immunitaires (mastocytes, éosinophiles ou lymphocytes, en particulier lymphocytes Th2 et lymphocytes B). La production de neurotrophines est stimulée en présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 (Rochlitzer et al., 2006).

## B. Les facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales

La famille de facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales (GFL - GDNF Family Ligands) est composée de 4 membres : le GDNF, la NTN, l'Artémine (ARTN) et la Perséphine (PSPN) (Baloh et al., 2000) (Figure 8). Sous forme d'homodimère, ils se lient spécifiquement à leur récepteur, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3 et GFR $\alpha$ 4 respectivement. Ces récepteurs sont attachés à la membrane plasmique par une ancre phosphatidylinositol au niveau des radeaux (« raft ») lipidiques. Les complexes « ligand - récepteur » interagissent alors avec un second récepteur transmembranaire, RET, appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinases. Ce co-récepteur est activé seulement en présence d'ions Ca<sup>2+</sup> fixés au niveau d'un de ses 4 domaines « cadherin-like » extracellulaires. La transmission du signal se fait alors par autophosphorylation au niveau des 4 résidus Tyrosine qui composent sa partie intracellulaire (Airaksinen and Saarma, 2002).

-----



Nature Reviews | Neuroscience

Reproduit avec la permission du groupe "Nature Publishing" d'après (Airaksinen and Saarma, 2002)

### Figure 8 : La famille du GDNF et leurs récepteurs

Le GDNF, la NTN, l'ARTN et la PSPN exercent leur activité en se fixant spécifiquement à leur récepteur GFRα1, GFRα2, GFRα3 et GFRα4 respectivement. Ces complexes interagissent alors avec leur co-récepteur RET, un récepteur à tyrosine kinase transmembranaire, responsable de la transduction du signal.

## 1. La Neurturine

La NTN, identifiée par l'équipe du Dr Jeffrey Milbrandt (Kotzbauer et al., 1996), a été classifiée dans la famille de facteurs neurotrophiques par sa capacité à maintenir en vie des neurones du système sympathique mis en culture *in vitro*. La caractérisation de cette molécule a montré que cette protéine est composée d'un peptide signal de 19 acides aminés et d'une pro-région de 76 acides aminés menant à une protéine mature de 100 acides aminés. Sa masse moléculaire est estimée à 11,5 kDa. La NTN humaine et la NTN murine présentent une homologie de séquence de 91%. Des alignements de séquence ont permis de classer la NTN ainsi que le GDNF comme membre éloigné de la superfamille du TGF- $\beta$ . Cette classification a été établie en tenant compte de l'existence d'un motif conservé de 7 cystéines, que l'on retrouve au niveau d'une région relativement constante parmi les membres de cette famille. Une autre étude a montré que la NTN et le GDNF partagent aussi une même voie de signalisation en empruntant les isoformes ERK-1 et ERK-2, appartenant à la famille des MAP kinases.

## 2. Phénotypes des souris NTN<sup>-/-</sup>

Des souris NTN<sup>-/-</sup> ont été générées par recombinaison homologe dans des cellules souches embryonnaires afin d'étudier leur phénotype (Heuckeroth et al., 1999). La croissance, la fertilité et la survie de ces souris sont comparables à celles de souris sauvages. De plus, leur fonction neurologique, leur odorat et la structure de leur cerveau apparaissent normaux. Cependant, il existe un défaut d'innervation au niveau du tractus digestif, affectant en particulier les fibres nerveuses sensibles au peptide intestinal vasoactif (le « VIP ») et à la substance P. Il en résulte une forte réduction de la sécrétion de ces neuropeptides et de la motilité intestinale. Une absence quasi-totale de l'innervation parasympathique des glandes lacrymales a également été mise en évidence, indiquant que la NTN est fortement impliquée dans le développement et le maintien de ces neurones. Enfin, cette équipe a montré que la proportion de neurones exprimant le GFR $\alpha$ 2 est très réduite chez les souris NTN<sup>-/-</sup> comparées aux souris sauvages, montrant l'existence d'un lien physiologique entre ces deux molécules *in vivo*.

### 3. Expression de la NTN et de son récepteur dans les tissus

Golden et al. ont étudié le niveau d'expression des ARNm de la NTN et du GFR $\alpha$ 2 chez des souris sauvages à différents stades du développement embryonnaire ainsi qu'au stade adulte (Golden et al., 1999). Ainsi, la NTN et le GFR $\alpha$ 2 sont exprimés dans les systèmes nerveux central et périphérique durant l'embryogénèse, au niveau de tissus neuronaux et non-neuronaux. Ces tissus sont innervés par des neurones sensibles à ces facteurs neurotrophiques, comme par exemple au niveau des alvéoles pulmonaires. Au stade adulte, la NTN est principalement exprimée au niveau de l'intestin, des testicules, de la prostate et des oviductes. Elle l'est aussi, mais dans une moindre mesure, au niveau des poumons alors que l'expression du GFR $\alpha$ 2 est restreinte principalement aux testicules et au système nerveux. Il a été montré que la NTN ainsi que son récepteur le GFR $\alpha$ 2, jouent aussi un rôle au niveau de la peau où ils contrôlent l'apoptose des follicules pileux suite à leur involution (Botchkareva et al., 2000), mais aussi dans la transduction du signal via les voies de signalisation MEK/ERK, SAPK et PKB/AKT au niveau des cellules gliales de la rétine (Hauck et al., 2006).

### 4. Rôle de la NTN dans différentes pathologies

Une étude a montré qu'une mutation affectant la NTN, associée à une mutation de son co-récepteur RET, participent au développement de la maladie d'Hirschsprung, caractérisée par l'absence de ganglion au niveau du colon qui est lui-même de taille anormalement élevée (Doray et al., 1998).

D'autre part, il a été montré que la NTN, tout comme le GDNF, peuvent être efficaces dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives, en particulier la maladie de Parkinson (Hegarty et al., 2014), via leur capacité à réguler la survie des neurones dopaminergiques du tractus nigrostrié, voie neuronale allant de la substance noire jusqu'au striatum (Lin et al., 1993) (Herzog et al., 2013).

## 5. Rôle de la NTN au niveau des cellules immunitaires

Il a été montré que la NTN peut être produite par différents types de cellules immunitaires : les lymphocytes T CD4+, T CD8+, les lymphocytes B et les monocytes (Vargas-Leal et al., 2005). Ces mêmes cellules expriment également le récepteur de la NTN, le GFR $\alpha$ 2, ainsi que son co-récepteur RET. Cette étude a également montré que l'addition de NTN, sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) activées, entraîne une diminution de la production de TNF- $\alpha$ . Toutefois, il apparaît que cette régulation est le fait d'un mécanisme post-transcriptionnel. Une autre étude a confirmé la présence des récepteurs de la NTN au niveau des lymphocytes T (Almeida et al., 2014). De plus, ces auteurs ont montré que l'activation de RET, en présence de NTN ou de GDNF, entraîne une diminution de la production d'IL-10 par des lymphocytes T naifs cultivés en conditions Th2.





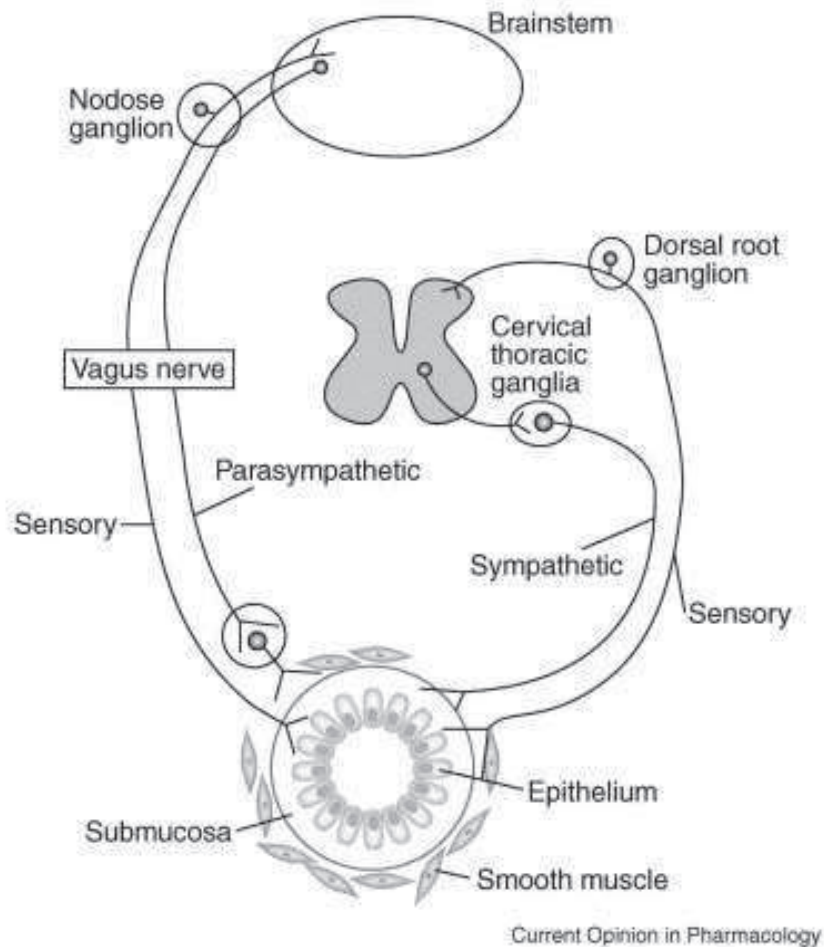
### III. Interactions neuro-immunes

De nombreuses études ont montré qu'il existe un lien entre le système nerveux et le système immunitaire. En effet, il existe des interactions complexes entre les cellules immunitaires de l'inflammation allergique et l'innervation des voies respiratoires. Ainsi il a été mis en évidence que le contrôle neuronal des voies respiratoires est anormal chez des patients asthmatiques, suggérant que des mécanismes neuronaux contribueraient à la physiopathologie de l'asthme (Barnes, 1986).

#### A. Innervation des voies respiratoires

Les voies respiratoires sont sous le contrôle du système nerveux autonome (Figure 9). Les fibres afférentes aboutissent au système nerveux central par le nerf vague. Les fibres efférentes sont constituées de fibres parasympathiques, de fibres sympathiques et de fibres sensorielles. Le nerf vague est à l'origine des efférences parasympathiques et de la plupart des fibres sensorielles, tandis que l'autre partie des fibres sensorielles et les efférences sympathiques sont issues des premiers ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (Belvisi, 2002). Le système nerveux autonome régule de nombreuses fonctions respiratoires impliquées dans la physiopathologie de l'asthme tels que la contraction des muscles lisses, la production de mucus, la sécrétion de différents médiateurs, le flux sanguin, la perméabilité vasculaire ainsi que le recrutement des cellules inflammatoires (Joos, 2001).

-----



Reproduit avec la permission du groupe "Elsevier" d'après (Belvisi, 2002)

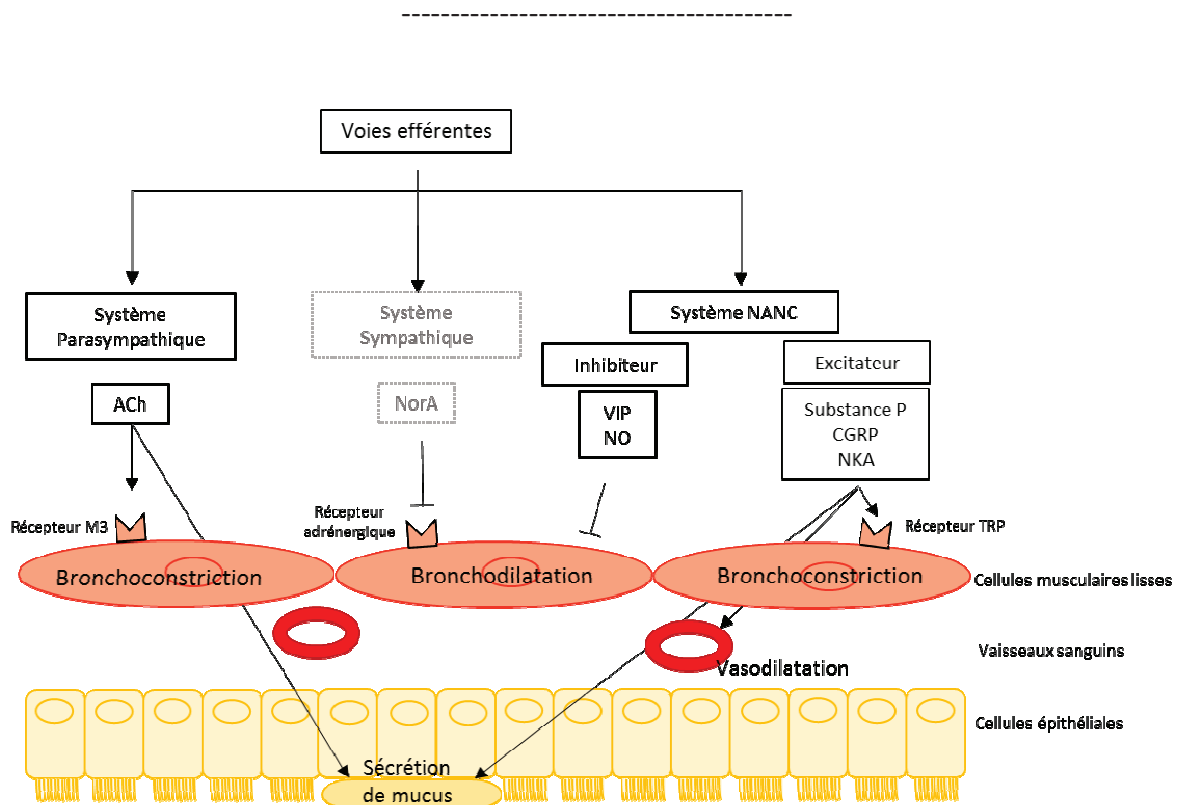
**Figure 9** : Innervation des voies respiratoires.

L'innervation des voies respiratoires comporte des fibres parasympathiques issues du nerf vague et des fibres sensorielles issues du nerf vague pour la plupart. L'autre partie de l'innervation sensorielle est issue de la racine dorsale tout comme les fibres sympathiques.

### 1. Innervation parasympathique des voies respiratoires

Le système nerveux parasympathique est composé de fibres nerveuses cholinergiques dont le principal neuromédiateur est l'acétylcholine (ACh) (Figure 10). Il est responsable du contrôle du tonus des muscles lisses (Barnes, 1987). La transmission nerveuse s'effectue via les fibres post-ganglionnaires dans les ganglions parasympathiques localisés dans la paroi bronchique par la fixation de l'acétylcholine au niveau des récepteurs muscariniques M3 entraînant ainsi une bronchoconstriction et la sécrétion de mucus (Aibara and Akaike, 1991),

(Mak and Barnes, 1990). Cependant, il existe un mécanisme de rétrocontrôle négatif dans lequel la fixation de l'acétylcholine au niveau des récepteurs nicotiques de type M2 permet d'inhiber la libération d'acétylcholine (Kilbinger et al., 1991).



**Figure 10** : Les différentes composantes de l'innervation des voies respiratoires régulant le tonus musculaire, la sécrétion de mucus et la vasodilatation

Le système parasympathique est responsable de la contraction des cellules musculaires lisses via la libération d'acétylcholine alors que le système sympathique n'intervient que très peu dans la régulation du tonus musculaire au niveau des voies respiratoires. C'est le système NANC inhibiteur qui régule cette fonction via la libération de VIP et NO et entraîne une bronchodilatation. Enfin, le système NANC excitateur contribue fortement à la régulation de la fonction pulmonaire suite à l'activation de ces fibres par des médiateurs chimiques et en libérant des neuropeptides (substance P, CGRP ou NKA) agissant sur les cellules musculaires lisses, la sécrétion de mucus ou l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

## 2. Innervation sympathique des voies respiratoires

Le système nerveux sympathique est composé de fibres nerveuses adrénérergique dont le principal neuromédiateur est la noradrénaline (NorA) (Figure 10). Il ne représente qu'une petite composante de l'innervation des voies respiratoires. En effet, les muscles lisses ne sont pas innervés par des fibres sympathiques (Richardson and Beland, 1976). Cependant, les muscles lisses respiratoires expriment des récepteurs  $\beta$ -adrénérergiques qui, lorsqu'ils sont stimulés par des agonistes adrénérergiques (NorA ou neuropeptide Y), provoquent une bronchodilatation (Goldie et al., 1990).

## 3. Innervation neuro-sensorielle des voies respiratoires

En plus des fibres nerveuses cholinergiques excitatrices, il existe des fibres nerveuses non-adrénérergiques non-cholinergiques (NANC) responsable de l'innervation neuro-sensorielle des voies respiratoires, encore appelées nocicepteurs (Figure 10). Ces fibres nerveuses sont responsables de la perception de la douleur au niveau des poumons et intervient dans le contrôle des fonctions respiratoires. Le système NANC est constitué de fibres nerveuses excitatrices issues du nerf vague ou bien inhibitrices issues des ganglions rachidiens de la racine dorsale. On distingue alors les systèmes NANC inhibiteur et excitateur.

### - Le système NANC inhibiteur

C'est le seul mécanisme neuronal permettant une contraction des muscles lisses entraînant une bronchodilatation. Les principaux neuromédiateurs de ce système sont le peptide vasoactif intestinal (VIP) et le monoxyde d'azote (NO). Il a été proposé qu'un défaut du système NANC inhibiteur pourrait être à l'origine de l'asthme (Barnes, 1986). Cependant, il a été montré que chez les patients souffrant d'asthme léger, il n'y a aucune réduction du réflexe bronchodilatateur médié par ce système (Lammers et al., 1989).

### - Le système NANC excitateur

Il est composé de fibres C sensibles à la capsaïcine. Les principaux neuromédiateurs de ce système sont la substance P, le « Calcitonin Gene-Related Peptide » (CGRP) et la neurokinine A (NKA). Ces neuropeptides de la famille des tachykinines sont libérés lorsque les fibres C

sont stimulées par différents activateurs tels que des médiateurs libérés lors de la réaction allergique (histamine) ou des substances environnementales irritantes. Ces substances chimiques sont responsables de l'activation des fibres C par l'intermédiaire de récepteurs à canaux ioniques de la famille « Transient Receptor Potential » (TRP) (Spina and Page, 2002), tels que le TRP Vanilloïde 1 (TRPV1), sensible à la capsaïcine (Caterina et al., 1997), ou le TRPA1, sensible à de nombreuses substances toxiques (Bessac and Jordt, 2010). Ces fibres étant localisées au niveau de l'épithélium des voies respiratoires, autour des vaisseaux sanguins et des glandes à mucus et au niveau des cellules musculaires lisses, la libération de ces neuropeptides entraîne une contraction musculaire similaire à celle entraînée par le système cholinergique induisant une bronchoconstriction ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de mucus (Veres et al., 2009a).

## B. Interactions neuro-immunes

### 1. Interactions spatiales entre les fibres nerveuses et les cellules immunitaires

Une interaction entre les cellules nerveuses et les cellules immunitaires nécessite l'existence d'une communication entre ces cellules soit par contact direct, soit par la libération de médiateurs. Dans le système nerveux, la communication entre cellules s'effectue par contact direct au niveau des synapses. L'existence de structures semblables à des synapses a été mise en évidence entre des terminaisons nerveuses et des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes comme la rate (Felten and Olschowka, 1987). De plus, il a été montré que plusieurs types de cellules immunitaires sont en contact direct avec des fibres nerveuses localisées dans les voies respiratoires. En effet, les mastocytes (Myers et al., 1991) ainsi que les éosinophiles (Costello et al., 1997), sont situés au niveau des fibres nerveuses parasympathiques, en particulier chez les patients asthmatiques ou chez les animaux stimulés par un allergène. Les cellules dendritiques ont été localisées au niveau des terminaisons des fibres C exprimant la substance P (Kradin et al., 1997) et le CGRP (Veres et al., 2007). Enfin, il a été montré que, dans un modèle d'asthme allergique chez la souris, les lymphocytes T peuvent être en relation directe avec des fibres C (Veres et al., 2009a) ou, de façon indirecte, via les extrémités nerveuses associées aux cellules dendritiques (Veres et al., 2009b).

## 2. Médiateurs de l'interaction neuro-immune dans les voies respiratoires

### - Les neuropeptides

Plusieurs études suggèrent que les neuropeptides sont d'importants médiateurs de la communication neuro-immunitaire. La libération de ces neuropeptides par les neurones sensoriels peut conduire à l'inflammation des voies respiratoires, on parle d'inflammation neurogène. En effet, il a été montré qu'en présence d'un inhibiteur de la libération des neuropeptides par les fibres nerveuses comme la capsaïcine, les réponses sont significativement diminuées chez les animaux exposés à un allergène (Helme et al., 1987) (Girolomoni and Tigelaar, 1990) (Kradin et al., 1997). D'autre part, il a été montré que la stimulation *in vitro* de neurones sensoriels, par des facteurs neurotrophiques tels que le GDNF ou la NTN, entraîne une augmentation de la libération de neuropeptides comme la substance P ou le CGRP (Ng et al., 2009). Les cellules immunitaires expriment des récepteurs spécifiques de ces neuropeptides, ainsi leurs activités peuvent être modulées lorsqu'ils sont libérés lors de l'inflammation. En particulier, il a été montré que le signal pro-inflammatoire, induit par l'interaction entre la substance P et son récepteur au niveau des macrophages, permet de stimuler l'activité de ces cellules. L'expression de l'ARNm de ce récepteur dans les macrophages peut également être augmentée en présence de cytokines de type Th1 ou Th2, l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-4, suggérant que la substance P pourrait contribuer à la réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire en fonction de la stimulation antigénique initiale (Marriott and Bost, 2001b).

Les cellules dendritiques expriment aussi à leur surface les récepteurs spécifiques de la substance P (Marriott and Bost, 2001a) ou du CGRP (Carucci et al., 2000). D'une part, il a été montré que la substance P est capable de moduler l'activité des cellules dendritiques via l'induction de l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, connu pour réguler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Marriott et al., 2000). De plus, la substance P est capable de promouvoir la survie de ces cellules, entraînant ainsi une réponse cellulaire effectrice plus longue (Janelsins et al., 2009). Ces résultats, obtenus *in vitro*, ont été confirmés *in vivo* dans un modèle d'asthme allergique chez la souris, dont les lymphocytes T prolifèrent davantage au contact de cellules dendritiques stimulées par les fibres C (Veres et al., 2009a). D'autre part, la voie de signalisation induite par le récepteur du CGRP, exprimé par les cellules

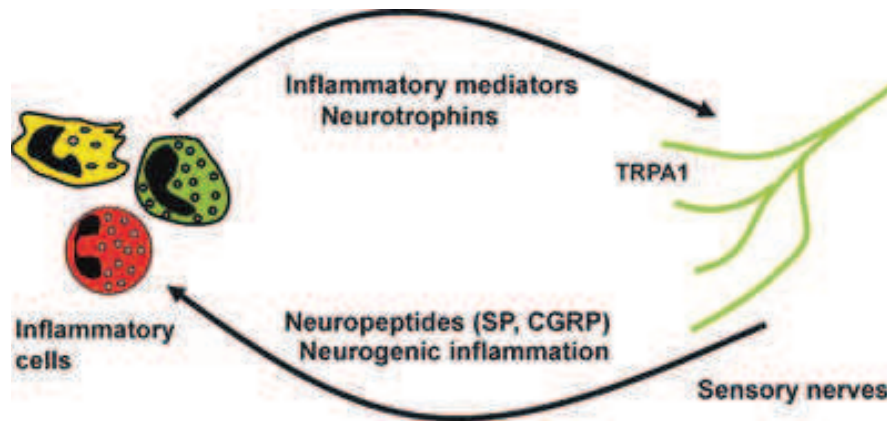
dendritiques, pourrait être responsable d'une diminution de la prolifération des lymphocytes T médiée par les cellules dendritiques, via une diminution de l'expression des marqueurs d'activation CMHII ou de co-stimulation CD86 à la surface des cellules dendritiques (Carucci et al., 2000).

- Les neurotrophines

A l'inverse, d'autres études suggèrent que les cellules immunitaires sont capables de produire des médiateurs influençant l'activité neuronale et impliqués dans la communication neuro-immune, comme les neurotrophines (Figure 11). Les neurotrophines sont produites par les cellules structurales des voies respiratoires comme les cellules épithéliales ou les cellules musculaires lisses (Rochlitzer et al., 2006). Lors d'une inflammation allergique des voies respiratoires, il a été montré que les cellules immunitaires telles que les lymphocytes, les éosinophiles et les macrophages sont aussi responsables de la production de neurotrophines (Nassenstein et al., 2006). Les neurotrophines ainsi libérées, agissent à la fois sur l'activité des fibres nerveuses et sur la réaction inflammatoire des cellules immunitaires au niveau des voies respiratoires (Figure 11). En effet, le NGF influence la synthèse et la libération de neuropeptides, au niveau des fibres efférentes des voies respiratoires (Lindsay and Harmar, 1989), et l'activation des cellules dendritiques par le NGF et le BDNF pourrait initier la réponse inflammatoire provoquée par une sensibilisation allergique. Ainsi, une étude a montré que la stimulation par le NGF et le BDNF de cellules dendritiques issues de patients asthmatiques, entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de la prolifération des lymphocytes T et, par conséquent, l'activation de la voie de type Th2 (Noga et al., 2007).

-----





Reproduit avec la permission du groupe « John Wiley and Sons » d'après (Barnes, 2011)

Figure 11 : Interactions neuro-immunes dans l'asthme

Les cellules inflammatoires activées sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires et des neurotrophines qui agissent directement au niveau des fibres neuro-sensorielles. Ces terminaisons nerveuses sont alors responsables de la production de neuropeptides tels que la substance P ou le CGRP entraînant le processus d'inflammation neurogène qui active davantage les cellules inflammatoires.

### 3. Interactions neuro-immunes et remodelage dans l'asthme

Le remodelage des voies respiratoires dans l'asthme inclut de nombreux changements structuraux comme l'hyperplasie et la métaplasie de l'épithélium, la fibrose sub-épithéliale, l'hyperplasie des cellules musculaires lisses et une augmentation de la vascularisation. Tous ces changements participent à l'épaississement des parois bronchiques et l'hyperréactivité des voies respiratoires entraînant une perte progressive et irréversible de la capacité respiratoire (Tang et al., 2006). Plusieurs études ont montré l'implication des neurotrophines dans le remodelage des voies respiratoires en favorisant la migration des fibroblastes impliqués dans la réparation des tissus (Kohyama et al., 2002), la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses et la sécrétion de MMP (Freund-Michel et al., 2006) (Dagnell et al., 2007), entraînant ainsi l'augmentation de l'hyperréactivité des voies respiratoires (Yao et al., 2005). D'autres études ont aussi montré le rôle des neurotrophines *in vitro*, en particulier le NGF, sur la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Micera et al., 2001) ainsi que sur l'augmentation de la synthèse de collagène par les fibroblastes (Nithya et al., 2003).

## IV. Objectifs de la thèse

Suite à l'inflammation des voies respiratoires, il a été montré que l'absence de NTN chez les souris entraîne une augmentation du nombre d'éosinophiles autour des bronchioles et dans les lavages broncho-alvéolaires (Michel et al., 2011). De plus, une forte sécrétion de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) est retrouvée dans les lavages broncho-alvéolaires, les poumons et les ganglions lymphatiques médiastinaux restimulés *in vitro* avec de l'OVA chez les souris NTN<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages. L'hyperréactivité des voies respiratoires supérieures, en réponse à la métacholine, est également augmentée chez les souris NTN<sup>-/-</sup> comparées aux souris sauvages. Finalement, il a été montré que lors d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires, l'addition de NTN - avant chaque stimulation avec de l'OVA - permet de diminuer l'infiltration d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires ainsi que la sécrétion de cytokines de type Th2 dans les lavages broncho-alvéolaires, les poumons et les ganglions médiastinaux restimulés *in vitro* en présence d'OVA. Ces résultats suggèrent une implication directe de la NTN dans la modulation de la réponse inflammatoire au niveau des voies respiratoires.

A partir de ces observations, nous avons voulu déterminer par quels mécanismes la NTN serait capable de contrôler l'inflammation et l'hyperréactivité des voies respiratoires en étudiant :

(i) l'influence de la NTN dans l'inflammation neurogène des voies respiratoires, suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA.

(ii) l'impact de la NTN au niveau des cellules immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire suite à l'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA.

(iii) l'implication de la NTN dans l'inflammation aiguë des voies respiratoires en utilisant comme allergène l'HDM, plus proche de la pathologie de l'asthme chez l'homme.

(iv) le rôle de la NTN dans l'inflammation chronique des voies respiratoires, notamment au niveau des paramètres de l'inflammation et du remodelage des tissus, dans un modèle d'asthme allergique chronique induit par de l'OVA.

(v) les propriétés anti-inflammatoires de la NTN *in vitro*.

(vi) par quelle(s) voie(s) de signalisation la NTN pourrait agir pour diminuer les paramètres de l'inflammation au niveau des voies respiratoires.



# Matériel et méthodes

---



## I. Matériel

### A. Produits chimiques et biologiques

L'anticorps anti-PGP9.5 provient de la société Abcam (Cambridge, Royaume-Uni). La solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% provient de la société Affymetrix (High Wycombe, Royaume-Uni). Le tampon de réaction « Fast Sybr® Green Mastermix 2X » provient de la société Applied biosystem (Courtaboeuf, France). La xylosine provient de la société Bayer (Loos, France). Les solutions « Cytofix », « Cytofix-Cytoperm » et « Perm/Wash », les kits « Cytometric Bead Array » (CBA), l'anticorps purifié anti-IgE et les anticorps anti-IgE, anti-IgG1 et anti-IgG2a biotinylés proviennent de la société BD Biosciences (Erembodegem, Belgique). L'acrylamide, le bleu de coomassie et le gel de zymographie « 10% Ready Gel® Zymogram Gel » proviennent de la société Bio-Rad (Temse, Belgique). L'anticorps anti-CGRP provient de Biotrend (Köln, Allemagne). L'acide acétique, l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), le chlorure de sodium (NaCl), le dodécylsulfate de sodium (SDS), l'éthanol, la glycine, l'isopentane, le méthanol et le triton X-100 proviennent de la société Carl Roth (Karlsruhe, Allemagne). L'isoflurane provient de la société CP-Pharma (Burgdorf, Allemagne). L'hématoxyline provient de la société Dako (Glostrup, Danemark). Les solutions d'avidine-HRP et de tétraméthylbenzidine (TMB), l'anticorps purifié anti-CD16/CD32 de souris, les plaques ELISA 96 puits « Nunc MaxiSorp® » et le kit « Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go! » proviennent de la société eBiosciences (San Diego, CA). Les amorces utilisées en PCR quantitative proviennent d'Eurofins genomics (Ebersberg, Allemagne). La kétamine provient de la société Eurovet Animal Health (Handelsweg, Pays-Bas). L'HDM provient de la société Greer (Lenoir, NC). Les anticorps « APC AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L) » et « R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) » proviennent de la société Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Royaume-Uni). Les billes « FluoSpheres® Collagen I-Labeled Microspheres », l'eau « RNase-free », la laminine et le sérum de cheval proviennent de la société Life technologies (Europe B. V., Gent, Belgique). Le tampon de lyse ACK, l'HBSS et le PBS stérile proviennent de la société Lonza (Leusden, Pays-Bas). L'anticorps anti-actine, les anticorps secondaires couplés au Cy3 et la benzonase proviennent de la société Merk Millipore (Bruxelles, Belgique). L'« auto MACS running buffer » et le kit « CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse » proviennent de la société Miltenyi Biotec (Leiden, Pays-Bas). L'ultrosor-G provient de la

société Pall Corporation (St-Germain en Laye, France). Les oligo dT et les kits d'extraction d'ARN « RNeasy minikit » et « RNeasy midikit » proviennent de la société Qiagen (Venlo, Pays-Bas). L'IL-2, l'anticorps « Mouse Anti-Human Ret Monoclonal Antibody », la NTN recombinante de souris et le kit ELISA « Substance P Parameter Assay Kit » proviennent de la société R&D Systems (Louvain, Belgique). La dispase II, l'inhibiteur de protéase et le midazolam proviennent de la société Roche (Mannheim, Allemagne). L'albumine sérique bovine (BSA), l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), la capsaïcine, le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), le chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ), le cinnamaldéhyde, le collagène humain de type IV, l'EDTA, l'éosine, l'hépès, l'hydroxyde d'aluminium ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), l'insuline, la laminine, la muscarine, le NP-40, l'OVA (grade V), la poly-L-lysine, le sucrose, le Tris-HCl, le « Trizma Base » (Tris), le Tween-20, le kit « Trichrome stain Masson kit » et le liquide de montage « Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium » proviennent de la société Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). Les déoxynucléoside triphosphate (dNTP), la Reverse Transcriptase et le tampon de réaction 5X sont issus du kit « PrimeScrip Reverse Transcriptase » provenant de la société TAKARA (Shiga, Japon). Le GM-CSF murin, l'IL-4 murine, le TNF- $\alpha$  murin ainsi que le « Lympholyte mammal » proviennent de la société Tebu-bio (Boechout, Belgium). Les solutions « GelCode Blue Stain Reagent », « West femto chemiluminescent kit » et « Restore™ Western Blot Stripping Buffer » proviennent de la société Thermofischer (Erembodegem-Aalst, Belgique).

## B. Milieux de culture et solutions

Le MEM provient de la société Gibco, le DMEM, le RPMI et le PBS stérile proviennent de la société Lonza et les milieux Ham's F-12 et Leibovitz's L-15 proviennent de la société Life technologies.

Les différents milieux de culture utilisés ont été complétés avec une solution de pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich), du sérum de veau fœtal (SVF), du  $\beta$ -mercaptoéthanol, de l'hépès, du Glutamax™-I 100X (Life Technologies). La composition spécifique de ces milieux est détaillée dans le Tableau 1.

| Milieux  | Composition   |
|--|---|
| <b>DMEM (Lonza)</b>  | 10 % de SVF<br>100 U/mL de pénicilline<br>100 µM/mL de streptomycine<br>1 % Hépès<br>1 % Glutamax <sup>TM</sup> -I 100X<br>0,1% β-mercaptoéthanol |
| <b>Ham's F12 (Gibco) complet</b>   | 15 % de SVF<br>100 U/mL de pénicilline<br>100 µM/mL de streptomycine<br>1 % Hépès<br>1 % Glutamax <sup>TM</sup> -I 100X                           |
| <b>Leibovitz's L-15 (Gibco) complet</b>                                  | 10 % de SVF<br>100 U/mL de pénicilline<br>100 µM/mL de streptomycine  |
| <b>RPMI (Lonza) complet</b>  | 10 % de SVF<br>100 U/mL de pénicilline<br>100 µM/mL de streptomycine<br>1 % Hépès<br>1 % Glutamax <sup>TM</sup> -I 100X<br>0,1% β-mercaptoéthanol |
| <b>Milieu de culture complet pour les cellules LA-4 en « transwell »</b> | 1:1 DMEM : Ham's F-12<br>5% SVF<br>100U/mL de pénicilline<br>100µM/mL de streptomycine<br>0,1% Insuline   |
| <b>Milieu USG complet pour les cellules LA-4 en « transwell »</b>        | 1:1 DMEM : Ham's F-12<br>100U/mL de pénicilline<br>100µM/mL de streptomycine<br>2% Ultrosor-G   |

**Tableau 1 :** Composition des différents milieux de culture utilisés lors des expériences

Différentes solutions ont été préparées au laboratoire et utilisées dans les expériences décrites dans ce chapitre. Leur composition est détaillée dans le Tableau 2.



| Solutions                                 | Composition  |
|---|--|
| <b>Phosphate Buffer Saline (PBS)</b>      | NaCl 137 mM<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,76 mM<br>KCl 2,7 mM                             |
| <b>Phosphate Buffer (PB) 0,2M - pH7,4</b> | 230 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O 0,2 M<br>770 mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O 0,2 M |
| <b>Tris-buffered saline (TBS)</b>         | Tris 20 mM<br>NaCl 150 mM  |

Tableau 2: Composition des solutions préparées au laboratoire et utilisées lors des expériences

## II. Expérimentation animale

Toutes les procédures effectuées sur les animaux ont été approuvées par le « National Animal research authority » et réalisées dans le respect des lois Européennes en vigueur.

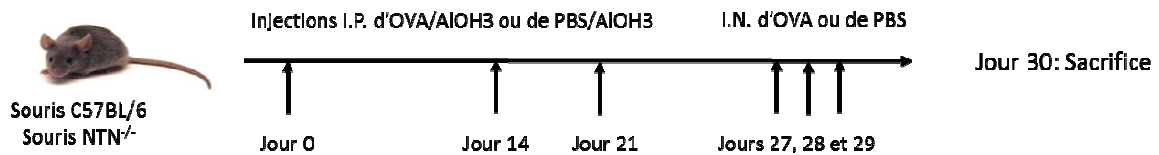
Les souris C57BL/6 (sauvages) proviennent de la société « Harlan » (Horst, The Netherlands) et les souris immuno-déficientes B6.129S7-Rag1tm1Mom/J ( $Rag^{-/-}$ ) des « laboratoires Jackson » (Bar Harbor, ME). Les souris NTN<sup>-/-</sup> (sur fond génétique C57BL/6) proviennent du laboratoire Milbrandt du Professeur Jeffrey Milbrandt de la faculté de médecine de Washington, St Louis, MO.

Les souris ont été hébergées dans l'animalerie du laboratoire et maintenues dans un environnement exempt d'agents pathogènes («specific pathogen-free»), selon un cycle jour/nuit constant, à une température et un taux d'humidité constant. Elles ont reçu à boire et à manger à volonté. Elles ont été utilisées âgées de 6 à 8 semaines pour les différentes expériences.

### A. Induction d'une inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA

Des souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées par injection intra péritonéale (I.P.) à jours 0, 14 et 21 avec 20 µg d'OVA additionné de 2,25 mg d'Al(OH)<sub>3</sub> (utilisé comme adjuvant) dans un volume total de 200 µL (appelées souris OVA par la suite). Elles sont ensuite stimulées par des instillations nasales (I.N.) avec 50 µL d'OVA (10 mg/mL) à jours 27, 28 et 29 après une rapide anesthésie par inhalation d'isoflurane. Les souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> servant de témoins négatifs sont immunisées avec du PBS additionné de 2,25 mg d'Al(OH)<sub>3</sub> et stimulées avec du PBS (souris PBS). Les souris sont sacrifiées à jour 30 sous anesthésie générale (injection I.P. de 100 µL/10 g du mélange Kétamine – 80 mg/kg, Xylazine – 10 mg/kg et Midazolam 2,5 mg/kg) par d'une ponction de sang intracardiaque (Figure 12).

-----

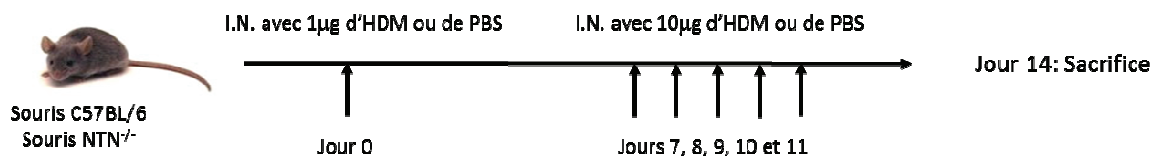


**Figure 12** : Protocole d’inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l’OVA

Des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées par injection I.P. à jours 0, 14 et 21 avec de l’OVA additionné d’Al(OH)<sub>3</sub> puis stimulées par I.N. avec de l’OVA à jours 27, 28 et 29 avant d’être sacrifiées un jour plus tard. Les souris servant de témoins négatifs sont immunisées avec du PBS additionné d’Al(OH)<sub>3</sub> et stimulées avec du PBS.

**B. Induction d’une inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l’HDM**

Des souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées à jour 0 par instillation nasale après une rapide anesthésie par inhalation d’isoflurane avec 1 µg d’HDM dans un volume total de 50 µL de PBS (appelées souris HDM par la suite). Elles sont ensuite stimulées par instillations nasales avec 10 µg d’HDM dans un volume total de 50 µL de PBS de jour 7 à 11. Les souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> servant de témoins négatifs sont sensibilisées et stimulées avec du PBS (souris PBS). Les souris sont ensuite sacrifiées à jour 14 sous anesthésie générale (injection I.P. de 100 µL/10 g du mélange d’anesthésiants) par d’une ponction de sang intracardiaque (Figure 13).



**Figure 13** : Protocole d’inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l’HDM

Des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées par I.N. à jour 0 avec 1 µg d’HDM puis stimulées par I.N. avec 10 µg d’HDM de jours 7 à 11 avant d’être sacrifiées trois jours plus tard. Les souris servant de témoins négatifs sont sensibilisées stimulées avec du PBS.

### C. Induction d'une inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA

Des souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées par injection I.P. à jours 0, 7, 14 et 21 avec 20 µg d'OVA et 2.25 mg d'Al(OH)<sub>3</sub> dans un volume total de 200 µL (souris OVA). Elles sont ensuite stimulées par instillations nasales avec 50 µL d'OVA (10 mg/mL) à jours 27, 29, 30, 34, 37, 41, 44, 48, 51 et 55 après une rapide anesthésie par inhalation d'isoflurane. Les souris servant de témoins négatifs sont sensibilisées et stimulées avec du PBS (souris PBS). Les souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> sont sacrifiées à jour 58 sous anesthésie générale (injection I.P. de 100 µL/10 g du mélange d'anesthésiants) par d'une ponction de sang intracardiaque (Figure 14).

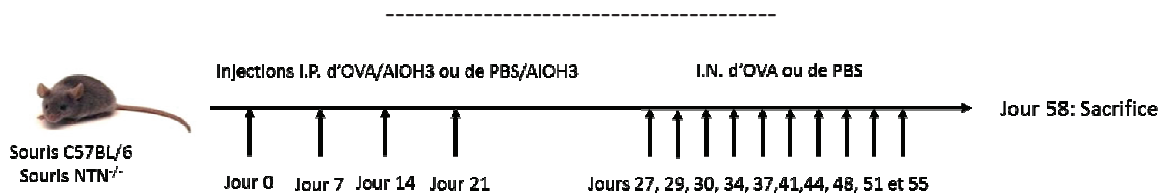


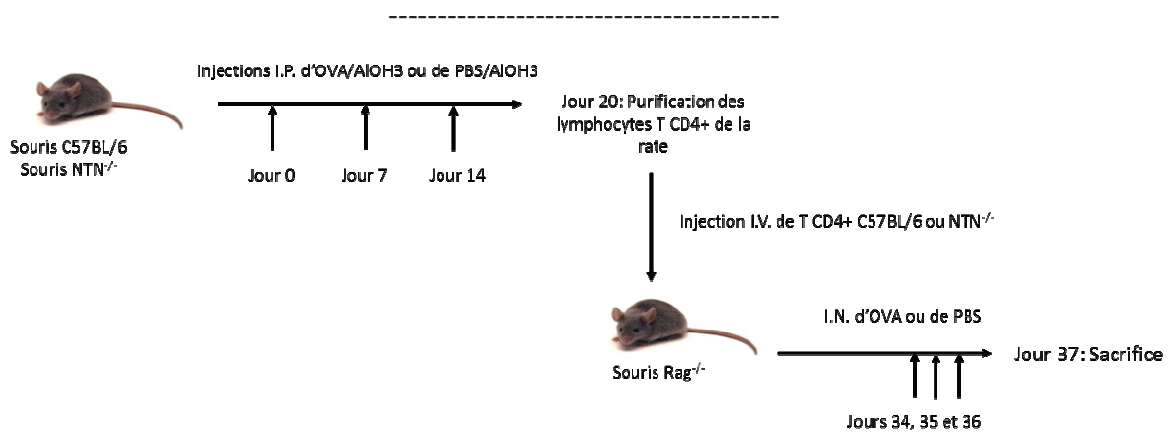
Figure 14 : Protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA

Des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées par injection I.P. à jours 0, 7, 14 et 21 avec de l'OVA additionné d'Al(OH)<sub>3</sub> puis stimulées par I.N. avec de l'OVA à jours 27, 29, 30, 34, 37, 41, 44, 48, 51 et 55 avant d'être sacrifiées trois jours plus tard. Les souris servant de témoins négatifs sont immunisées avec du PBS additionné d'Al(OH)<sub>3</sub> et stimulées avec du PBS.

### D. Transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les souris Rag<sup>-/-</sup>

Des souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> donneuses sont sensibilisées par injection I.P. à jours 0, 7 et 14 avec 20 µg d'OVA et 2.25 mg d'Al(OH)<sub>3</sub> dans un volume total de 200 µL (souris OVA). Les souris C57BL/6 et NTN<sup>-/-</sup> servant de témoins négatifs sont sensibilisées avec du PBS (souris PBS). Les souris sont sacrifiées à jour 20 sous anesthésie générale (injection I.P. de 100 µL/10 g du mélange d'anesthésiants) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de la rate sont purifiés (voir paragraphe 5.c.). Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS avant d'être resuspendues à une concentration de 10<sup>8</sup> cellules/mL dans du DMEM stérile. Un volume de 100 µL de cette suspension cellulaire est alors injectée en intraveineux (I.V.) au niveau de la veine caudale de la queue des souris Rag<sup>-/-</sup> sous anesthésie générale par inhalation

d'isoflurane. Les souris  $Rag^{-/-}$  ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA sont alors stimulées par instillations nasales avec 50  $\mu$ L d'OVA (10 mg/mL) à jour 34, 35 et 36 après une rapide anesthésie par inhalation d'isoflurane. Les souris  $Rag^{-/-}$  servant de témoins négatifs ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris PBS sont stimulées avec du PBS. Les souris sont sacrifiées à jour 37 sous anesthésie générale (injection I.P. de 100  $\mu$ L/10 g du mélange d'anesthésiants) suivie d'une ponction de sang intracardiaque (Figure 15).



**Figure 15** : Protocole de transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les souris immuno-déficientes  $Rag^{-/-}$

Des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> sont sensibilisées par injection I.P. à jours 0, 14 et 21 avec de l'OVA additionné d'Al(OH)<sub>3</sub> puis sacrifiées six jours plus tard. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> OVA sont purifiés puis injectés en I.V. dans des souris  $Rag^{-/-}$ . Ces souris sont alors stimulées par I.N. à jours 34, 35 et 36 avec de l'OVA avant d'être sacrifiées un jour plus tard. Les souris servant de témoins négatifs sont immunisées avec du PBS additionné d'Al(OH)<sub>3</sub>. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> PBS sont alors injectés en I.V. dans des souris  $Rag^{-/-}$ . Ces souris sont alors stimulées par I.N. de PBS.

### III. Prélèvement et préparation des échantillons

#### A. Sérum

Le sang est prélevé par ponction intracardiaque puis centrifugé 20 min à 16000 g à 4°C afin de récupérer le sérum pour mesurer le taux d'Ig spécifiques de l'allergène, en particulier les IgE, IgG1 et IgG2a, par ELISA (voir paragraphe IV. D.).

#### B. Lavages broncho-alvéolaires et poumons

Les lavages broncho-alvéolaires sont réalisés par insertion d'une canule dans la trachée des souris. Le premier lavage est réalisé avec 600 µL de solution de lavage (5% (m/V) BSA, inhibiteur de protéase 1X, PBS) suivi par deux autres lavages avec 600 µL de PBS. Après centrifugation pendant 5 min à 1500 rpm, le surnageant du premier lavage est prélevé et congelé à -80°C pour une analyse ultérieure par CBA du taux de cytokines sécrétées. Les cellules des 3 lavages sont regroupées, comptées et marquées pour une analyse par cytométrie de flux.

Les poumons sont prélevés, coupés en petits morceaux et incubés 1 h à 37°C dans une solution de digestion (3 µL Benzonase, 200 µL Collagénase I, 15 µL MgCl<sub>2</sub> 1 M, PBS qsp 15 mL), avant d'être passés sur un tamis de 40 µm. Les cellules sont alors lavées avec du DMEM complet et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Les globules rouges sont lysés par ajout de la solution ACK pendant 1 min puis les cellules sont lavées avec du DMEM complet et centrifugées 5 min à 1500 rpm avant d'être resuspendues dans le milieu qui convient.

Pour certains protocoles, les poumons ont été prélevés, immédiatement congelés dans de l'isopentane refroidi à -80°C et conservés à -80°C pour les extractions d'ARN, ou fixés dans une solution de PFA 4% pour l'analyse histologique des tissus.

#### C. Trachée

Après dissection des tissus superficiels entourant la trachée, une partie de la trachée est prélevée et conservée sur glace dans du MEM. Le dispositif permet d'installer 4 segments de trachée en parallèle. Chaque section trachéale est reliée de chaque côté à un crochet en acier inoxydable et placé dans une cuve à organe de 15mL perfusée en continu par du MEM aéré (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>) et chauffé à 37°C. Un des deux crochets est relié à un transmetteur de force isométrique (Hugo Basile, Gemonio, Italy) tandis que le second est relié à un poids

permettant d'équilibrer le segment de trachée à une tension initiale de 0,5 g pendant 30 min. Des électrodes raccordées à un stimulateur électrique sont placées de part et d'autre des segments de trachée. Les segments de trachée sont alors stimulés par un courant électrique (10 V, 150 mA pendant 2 ms) de fréquence croissante (4, 10, 40 et 100 Hz) permettant la création d'une courbe de contraction musculaire en réponse à une stimulation électrique. Par la suite, ils sont stimulés par des doses croissantes de muscarine (de  $5 \times 10^{-8}$  M à  $2,5 \times 10^{-7}$  M) permettant la création d'une courbe de contraction musculaire en réponse à l'excitation des fibres nerveuses parasympathiques. Les données sont enregistrées et analysées grâce au logiciel « LabChart 7 » (ADInstruments, Spechbach, Allemagne).

#### D. Ganglions de la racine dorsale

Après avoir découpé délicatement la partie dorsale de la colonne vertébrale, les ganglions sont excisés tout au long de la racine dorsale puis incubés 30 min à 37°C au bain-marie dans une solution de digestion (2mg/mL Collagénase I, 2mg/mL Dispase II, HBSS). La dissociation des ganglions est facilitée par plusieurs cycles d'aspiration-refoulement à l'aide de pipettes Pasteur de diamètres inférieurs à chaque nouveau cycle. Les cellules sont alors lavées deux fois avec du milieu Leibovitz's L-15 complet, centrifugées 3 min à 1000 rpm et resuspendues dans du milieu complet. Un volume de 5  $\mu$ L de cette suspension cellulaire est déposé sur des lamelles en verre préalablement traitées à la poly-L-lysine et à la laminine pour faciliter l'adhésion des cellules. Elles sont ensuite incubées 24 h à 37°C dans une chambre humide sans CO<sub>2</sub> avant d'être activées avec des doses croissantes (10nM, 100nM, 1 $\mu$ M) de capsaïcine, de cinnamaldéhyde ou d'éthanol comme contrôle négatif. Les surnageants de ces cultures sont prélevés et conservés à -80°C pour doser par ELISA le taux de substance P sécrétée.

#### E. Rate et ganglions lymphatiques médiastinaux

La rate et les ganglions lymphatiques médiastinaux des souris PBS/OVA sont récupérés dans du DMEM complet et filtrés sur un tamis de 40  $\mu$ m. Les cellules sont lavées avec du DMEM complet et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Les globules rouges sont lysés par ajout de la solution ACK pendant 1 min. Les cellules sont lavées avec du DMEM complet et centrifugées

5 min à 1500 rpm, puis resuspendues dans du milieu complet et comptées. Elles sont mises en culture dans des plaques 24 puits à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/1mL/puits dans du DMEM complet additionné de 1000 U/mL d'IL-2 et restimulées avec 200 µg/mL d'OVA.

Pour les souris PBS/HDM, les cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux sont cultivées à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans 500µL/puits de DMEM complet additionné de 1000 U/mL d'IL-2 restimulées avec 15 µg/mL d'HDM.

Après 4 jours de culture à 37°C – 5% CO<sub>2</sub>, les surnageants de culture sont récupérés et conservés à -80°C pour doser le taux de cytokines secrétées par CBA.

### F. Purification des lymphocytes T CD4+

Les cellules de rate sont resuspendues dans de l'« autoMACS running buffer ». Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont alors purifiés par sélection négative grâce au « CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse » selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules sont incubées pendant 15 min à 4°C avec un cocktail d'anticorps couplés à la biotine (CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC-class II, Ter-119 and TCRγ/δ), puis 10 min avec des microbilles magnétiques anti-biotine avant d'être passées sur une colonne magnétique MACS. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non retenus sur la colonne sont alors lavés, centrifugés et resuspendus dans le milieu qui convient. La pureté des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est analysée par cytométrie de flux et montre un pourcentage de cellules CD3 positif – CD4 positif supérieur à 90%.

### G. Culture primaire de cellules dendritiques issues de la rate

Les cellules de rate de souris naïves sont resuspendues dans du milieu complet et comptées. Elles sont mises en culture dans des plaques 6 puits à une concentration de  $10^7$  cellules/3mL/puits dans du DMEM complet additionné de 10 ng/mL de GM-CSF murin pendant 14 jours à 37°C – 5% CO<sub>2</sub>. La moitié du milieu est remplacé deux fois par semaine.

### H. Culture primaire de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse

La moelle osseuse des fémurs et tibias de souris C57BL/6 ou NTN<sup>-/-</sup> naïves est récupérée à l'aide d'une seringue dans du RPMI complet puis passée sur tamis de 40 µm. Les monocytes



et granulocytes sont séparés grâce à un gradient de densité « Lympholyte mammal ». L'anneau cellulaire est récupéré et lavé dans du RPMI complet et centrifugé 5 min à 1500 rpm. Les cellules sont resuspendues dans du RPMI complet, comptées, puis mises en culture dans des plaques 6 puits à une concentration de  $10^7$  cellules/3mL/puits dans du RPMI complet. Elles sont incubées pendant 2 h à 37°C – 5% CO<sub>2</sub> avant d'être lavées 2 fois avec du HBSS préchauffé afin d'éliminer les cellules non-adhérentes. Les cellules sont finalement cultivées pendant 5 jours avec du RPMI complet complétementé avec 20 ng/mL de GM-CSF murin et 20 ng/mL d'IL-4 murine. Elles sont ensuite récupérées et lavées avec du RPMI complet. Elles sont centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm puis resuspendues dans du RPMI complet et remises en culture dans le même nombre de puits pendant encore 2 jours avec 20 ng/mL de GM-CSF murin.

### I. Culture de la lignée cellulaire LA-4

La lignée cellulaire LA-4 (European Collection of Cell Cultures - ECAAC, Salisbury, Royaume-Uni) est une lignée de cellules épithéliales issue d'un adénome pulmonaire de souris qui présentent des caractéristiques de pneumocytes de type 2. Elles sont cultivées en flasques dans du milieu Ham's F-12 complet et passées 2 fois par semaine à une dilution de 1/3 à 1/5 selon les recommandations du fournisseur. Afin de mimer l'organisation d'un épithélium respiratoire, les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture et ensemencées à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par « Transwell » préalablement adsorbés avec 100 µL de collagène humain de type IV (0,5 mg/mL). La partie basale est également remplie avec ce milieu de culture. Elles sont ensuite incubées pendant 4 jours à 37°C – 5% CO<sub>2</sub> avant d'être passées dans un système de culture « interface air-liquide ». Le milieu est enlevé du côté apical tandis qu'il est changé du côté basal par du milieu USG.

### J. Tests cellulaires

#### 1. Test de phagocytose

En fin de culture, les cellules dendritiques issues de la moelle osseuse ou de la rate sont récoltées, lavées dans du RPMI complet et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Elles sont resuspendues dans 100 µL de milieu complet à une concentration de  $10^6$  cellules/mL dans une plaque de culture 96 puits. Les cellules sont incubées à 37°C – 5% CO<sub>2</sub> (ou à 4°C pour les

cellules servant de contrôle négatif) pendant 1 h en présence de billes fluorescentes, de 1 µm de diamètre, à un ratio de 20 billes pour 1 cellule dendritique. La phagocytose est stoppée par l'addition de PBS froid. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du tampon FACS froid, centrifugées 5 min à 1500 rpm à 4°C, et resuspendues dans 100 µL de tampon FACS froid avant d'être marquées par des anticorps pour analyser la phagocytose au cytomètre de flux FACS Canto (BD Biosciences).

## 2. Co-culture de cellules dendritiques et lymphocytes T CD4+

Après 8 jours de culture, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse sont récoltées, lavées dans du RPMI complet et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Elles sont resuspendues dans du milieu complet complémenté de 10 ng/mL de TNF-α murin et redistribuées à une concentration de  $3 \times 10^4$  cellules/100 µL dans une plaque de culture 96 puits. Les cellules sont incubées à 37°C – 5% CO<sub>2</sub> en présence de 200 µg/mL d'OVA pendant 2 jours. En parallèle, des lymphocytes T CD4+ sont purifiés à partir de la rate ou des ganglions lymphatiques médiastinaux de souris OVA ayant subi un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires. Ils sont lavés dans du RPMI complet et centrifugés 5 min à 1500 rpm. Les lymphocytes T CD4+ sont resuspendus et  $10^5$  cellules sont alors ajoutées aux  $3 \times 10^4$  cellules dendritiques après 48h d'activation. Cette co-culture est incubée pendant 4 jours à 37°C – 5% CO<sub>2</sub> avant de prélever les surnageants de culture afin de doser le taux de cytokines sécrétées par CBA.



## IV. Cytométrie en flux

### A. Marquage extracellulaire des récepteurs de surface

Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm et  $10^6$  cellules sont resuspendues dans 100  $\mu$ L de tampon FACS (2% SVF, PBS). Elles sont ensuite incubées pendant 5 min avec un anticorps purifié anti-CD16/CD32 de souris afin de bloquer la partie Fc de IgG à la surface des cellules. Elles sont alors marquées pendant 20 à 30 min, à 4°C et à l'abri de la lumière avec différents anticorps couplés à des fluorochromes (Tableau 3) avant d'être lavées avec du tampon FACS, centrifugées 5 min à 1500 rpm et resuspendues dans 100  $\mu$ L de tampon FACS. Dans certain cas, les cellules sont fixées avec un tampon de fixation « Cytofix » pendant 15 min à 4°C à l'abri de la lumière, lavées avec du tampon FACS, centrifugées 5 min à 1500 rpm et resuspendues dans 100  $\mu$ L de tampon FACS. Les cellules marquées sont alors passées dans un cytomètre de flux FACS Canto (BD Biosciences). Les données sont analysées grâce au logiciel « BD FACS Diva 7.0 » (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ).

|   | FITC   | PE   | PerCP-CY5.5 | PE-Cy7 | APC   | APC-Cy7   |
|---|--------|------|-------------|--------|-------|-----------|
| <b>Phénotypage des cellules dendritiques</b>                  | CD80   |      | CD11c       | CD86   | CMHII | Live/Dead |
| <b>Test de phagocytose</b>                                    | Billes |      | CD11c       |        |       | Live/Dead |
| <b>% de pureté des T CD4+</b>                                 |        |      |             | CD3    | CD4   | Live/Dead |
| <b>Lavage broncho-alvéolaire (Inflammation aiguë HDM)</b>     | CD3    | Gr-1 | CD11c       | CD19   | NK1.1 | Live/Dead |
| <b>Lavage broncho-alvéolaire (Inflammation chronique OVA)</b> | CD19   | Gr-1 | CD3         | NK1.1  | CD11c | Live/Dead |
| <b>Lavage broncho-alvéolaire (Transfert des T CD4+)</b>       |        | Gr-1 | CD11c       | CD3    | CD4   | Live/Dead |

**Tableau 3:** Anticorps utilisés pour les marquages extracellulaires en fonction de leur couplage aux fluorochromes.

CD80-FITC (BD Biosciences) ; CD3-FITC, CD3-PerCP-Cy5.5, CD11c-PerCPCy5.5, CD86-PE-Cy7 (BioLegend – San Diego, CA) ; CD19-FITC, CD4-APC (Immunotools - Friesoythe, Allemagne) ; Gr1-PE, CD3-PE-Cy7, CD19-PECy7, NK1.1-PE-Cy7, CD11c-APC, CMHII-APC (eBioscience) ; Live/Dead® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Invitrogen - Paisley, Royaume-Uni).

-----

La composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires est analysée en suivant la méthode décrite par van Rijt et al., ((van Rijt et al., 2004)). Les diverses sous populations de cellules sont sélectionnées en Side Scatter (SSC) / Forward Scatter (FSC), les doublets étant exclus en SSC-A/SSC-H. Seules les cellules vivantes (APC-Cy7 négatives) sont analysées. Parmi ces cellules, la fenêtre Gr-1 contre CD11c permet de distinguer différentes populations : les lymphocytes (Gr-1 négatifs – CD11c négatifs), les cellules dendritiques (Gr-1 négatifs - CD11c intermédiaires), les macrophages (Gr-1 négatifs - CD11c positifs), les éosinophiles (Gr-1 intermédiaires - CD11c négatifs) et les neutrophiles (Gr-1 positifs - CD11c négatifs). Parmi les lymphocytes, la fenêtre CD3 contre CD19 permet de différencier les lymphocytes T (CD3 positifs - CD19 négatifs) des lymphocytes B (CD3 négatifs - CD19 positifs). De plus, la fenêtre CD3 contre NK1.1 permet de distinguer les cellules « Natural Killer » (CD3 négatifs - NK1.1 positifs). Enfin, la fenêtre CD3 contre CD4 permet de distinguer les lymphocytes T CD4+ (CD3 positifs – CD4 positifs).

## B. Marquage intracellulaire du récepteur transmembranaire RET

Après le marquage extracellulaire des cellules par l'anticorps anti-CD19 et le « Live-Dead », les cellules sont lavées avec du tampon FACS et centrifugées 5 min à 1500 rpm à 4°C. Elles sont ensuite resuspendues dans 100 µL de tampon de fixation/perméabilisation « Cytotfix-Cytoperm » pendant 15 min à 4°C puis lavées avec le tampon de lavage « Perm/Wash ». Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm puis resuspendues dans 100 µL de Perm/Wash avant d'être marquées pendant 20 min à 4°C et à l'abri de la lumière avec l'anticorps « APC AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L) ». Les cellules sont alors lavées avec du Perm/Wash, centrifugées 5 min à 1500 rpm puis resuspendues dans 100 µL de Perm/Wash avant d'être marquées pendant 20 min, à 4°C et à l'abri de la lumière avec l'anticorps spécifique « Mouse Anti-Human Ret Monoclonal Antibody » ou son isotype contrôle. Les cellules sont lavées avec du Perm/Wash,

centrifugées 5 min à 1500 rpm à 4°C et resuspendues dans 100 µL de Perm/Wash. Les cellules sont ensuite incubées 20 min à 4°C et à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire « R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) ». Les cellules sont finalement lavées deux fois avec du Perm/Wash, centrifugées 5 min à 1500 rpm à 4°C et resuspendues dans 100 µL de tampon FACS avant d'être passées dans un cytomètre de flux FACS Canto. Les données sont analysées grâce au logiciel « FlowJo » (Tree Star inc, Ashland, OR).

L'analyse de l'expression de RET est réalisée sur les cellules de poumons de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA. Ces cellules sont sélectionnées en SSC/FSC et les doublets étant exclus en SSC-A/SSC-H. Parmi les cellules vivantes (APC-Cy7 négatives), les lymphocytes B (CD19 positifs) et les cellules marquées de façon aspécifique (APC positives) sont exclus.

### C. Dosage des cytokines par « Cytometric Bead Array » (CBA)

Les taux de cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , KC et TNF- $\alpha$  sont mesurées par des kits CBA selon les instructions du fabricant. Brièvement, les surnageants de culture sont incubés 1 h à l'abri de la lumière avec un mélange de billes couplées à un anticorps reconnaissant de façon spécifique les cytokines ciblées. Ils sont ensuite incubés 1 h avec le réactif de détection avant d'être lavées, centrifugées 10 min à 200 g et resuspendues dans la solution de lavage. En parallèle, une courbe standard est réalisée pour chaque cytokine en suivant la même procédure. Les échantillons sont alors passés au cytomètre de flux FACS Canto. Les données sont analysées grâce au logiciel « FCAP Array™ 3.0 » (Soft Flow Inc., Pecs, Hongrie).



## V. Histologie

### A. Histochimie

Les organes prélevés sont fixés dans une solution de PFA 4% pendant 24 h avant d'être lavés avec du PBS puis inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes de 6 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome (SLEE Medical) et sont ensuite déparaffinées puis réhydratées grâce à des bains successifs de xylène 100% (2 x 10 min), d'éthanol 100% (5 min), d'éthanol 95% (5 min), d'éthanol 70% (5 min) et d'éthanol 50% (5 min) selon un protocole standard.

#### 1. Marquage Hématoxyline-Eosine

Les coupes sur lames sont colorées avec de l'hématoxyline pendant 10 à 15 secondes, puis avec de l'éosine pendant 1 min puis déshydratées dans un bain d'éthanol 100% (3 min) suivi d'un bain de xylène 100% (5 min). Les coupes sont finalement montées avec lamelles à l'aide de liquide de montage « Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium » et observées au microscope Leica couplé à un appareil photo (DMI 6000B) afin de visualiser l'infiltration des cellules immunitaires au niveau des bronchioles.

#### 2. Marquage trichrome de Masson

Les coupes de poumons sont colorées grâce au kit « Trichrome stain Masson kit » selon les instructions du fabricant afin de visualiser le collagène autour des bronchioles. Brièvement, les coupes ont été déparaffinées puis réhydratées comme décrit précédemment puis rincées à l'eau. Elles sont ensuite colorées avec différents colorants : de l'hématoxyline pendant 5 min et une solution écarlate de Biebrich-fuschine pendant 5 min. Les coupes sont rincées à l'eau entre chaque coloration. Elles sont ensuite plongées dans un bain d'une solution 1 (1 volume d'acide phosphotungstique, 1 volume d'acide phosphomolibdique, 2 volumes d'H<sub>2</sub>O) pendant 5min, de Bleu d'Aniline pendant 5min, d'une solution 2 (1% acide acétique, H<sub>2</sub>O) et rincées à l'eau. Les coupes sont alors déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 95% (3 min), d'éthanol 100% (3 min) et de xylène 100% (3 min). Les coupes sont finalement montées avec lamelles à l'aide de liquide de montage et observées au microscope. L'analyse de l'épaisseur du collagène entourant les bronchioles a été mesurée



en soustrayant le diamètre des bronchioles du diamètre des bronchioles avec le dépôt de collagène.

## B. Immunofluorescence

L'extrémité de la trachée ainsi que la bifurcation des bronches sont fixées à l'aide de fines épingles à plat sur une plaque de cire puis immergées dans un tampon de fixation « Zamboni » (15% Acide picrique, 12.5% PFA, PB 0.1M qsp 1L) toute la nuit à 4°C. Les échantillons sont lavés 10 fois pendant 1 h dans du PBS avant d'être incubés 2 h dans une solution de perméabilisation (0.3% Triton X-100, PB 0,1 M) puis 2 h dans une solution de blocage (1% BSA, 4% Sérum de cheval, PB 0,1 M). Ils sont ensuite incubés toute la nuit avec l'anticorps primaire anti-PGP9.5 ou anti-CGRP dilué dans la solution de blocage et à l'abri de la lumière puis lavés 5 fois 30 min dans du PB 0,1M. Ils sont ensuite incubés toute la nuit avec l'anticorps secondaire correspondant couplé au Cy3 dilué dans la solution de blocage et lavés 5 fois 30 min dans du PB 0,1M. Les échantillons sont alors montés avec lamelle à l'aide de liquide de montage avant d'être observés au microscope confocal à fluorescence Zeiss LSM 710.

## VI. Biologie moléculaire

### A. Dosage de protéines

La concentration en protéines de chaque échantillon est déterminée par un « Bradford assay » par rapport à une courbe standard réalisée à partir de BSA. La densité optique (DO) à 595 nm est mesurée par un spectrophotomètre et permet de calculer la concentration en protéines des échantillons.

### B. Western Blot

Les échantillons de poumons sont lysés dans du tampon de lyse « RIPA » (0.05% SDS, Tris 50mM pH 7,5, Hépès 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, 1% NP-40, EDTA 1mM, Inhibiteurs de protéases 1X). Après séparation des protéines sur un gel d'acrylamide de 15% dans du tampon de migration (Tris 25mM pH8.3, Glycine 192mM, 0,1% SDS), le transfert des protéines est effectué dans un « Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell » (Bio-Rad) pendant 30 min à 14 V et 900 mA sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Cette membrane a été préalablement incubée 15 sec dans du méthanol, rincée 2 min dans de l'eau et équilibrée pendant 5 min dans du tampon de transfert (Tris 25mM pH8.3, Glycine 192mM, 0,1% SDS, 10% méthanol). La membrane est ensuite rincée dans du TBS-Tween 0,05% (TBS-T), incubée 2 h dans une solution de blocage (5% BSA, TBS-T) puis toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-ATF3 (Santa-Cruz) dilué à 1/100 dans la solution de blocage. La membrane est ensuite lavée 4 fois 10 min dans du TBS-T avant d'être incubée pendant 2 h avec l'anticorps secondaire, un anti-IgG couplé à l'HRP. La membrane est ensuite lavée 4 fois 10 min dans du TBS-T avant d'être révélée à l'aide du kit « West femto chemiluminescent kit ». Le signal est détecté et analysé grâce au système « ImageQuant LAS 4000 » (GE HealthCare - Brabant, Belgique). La membrane est alors lavée pendant 10 min dans du TBS-T puis 15 min dans le tampon « Restore™ Western Blot Stripping Buffer » puis à nouveau 10 min dans du TBS-T. La membrane est alors incubée pendant 1 h dans la solution de blocage puis 2 h avec l'anticorps primaire anti-actine dilué à 1/6000. La membrane est lavée 4 fois 10min dans du TBS-T avant d'être incubée 1 h avec l'anticorps secondaire, un anti-IgG de souris couplé à l'HRP. La membrane est ensuite lavée 4 fois 10 min dans du TBS-T avant d'être révélée et analysée comme précédemment. Les bandes correspondantes à la protéine ATF3 sont normalisées à celles de l'actine à l'aide du logiciel « ImageQuant ».

### C. Zymographie

Les échantillons de poumons sont lysés dans du tampon de lyse « RIPA » (0,05% SDS, Tris 50mM pH 7,5, Hépès 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, 1% NP-40, EDTA 1mM, inhibiteur de protéase 1X). Les échantillons sont chargés sur un gel de gélatine en présence de tampon de charge (Tris-HCl 0,25M pH 6.8, 0,1% (m/V) Bleu de bromophénol, 2% SDS, 4% sucrose). La migration des protéines est effectuée à 20 mA pendant 2 h dans du tampon de migration (Tris-HCl 25mM, Glycine 190mM, 0,1% SDS). Le gel est alors lavé 2 fois 30 min dans du tampon de lavage (2,5% Triton X-100, H<sub>2</sub>O) puis rincé dans de l'eau avant d'être incubé pendant 18h dans un tampon d'incubation (Tris-HCl 50mM pH 8, CaCl<sub>2</sub> 5mM, 0.02% NaN<sub>3</sub>). Le gel est ensuite coloré avec la solution « GelCode Blue Stain Reagent » pendant 30 min puis décoloré 2 fois 30 min dans une solution de décoloration (30% méthanol, 10% acide acétique, 60% H<sub>2</sub>O). L'activité de la MMP9 est analysée par densitométrie à l'aide du logiciel « ImageQuant ».

### D. ELISA

#### 1. Immunoglobulines

Les taux d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques de l'OVA ou de l'HDM sont quantifiés par ELISA dans le sérum des souris issues des différents protocoles d'inflammation. Des plaques 96 puits sont adsorbées toute la nuit à 4°C avec 15 µg/mL d'HDM, 200 µg/mL d'OVA, ou avec un anticorps anti-IgE purifié dilués dans du PBS, sont lavées 4 fois avec du TBS-T avant d'être incubées avec une solution de blocage (3% BSA, TBS-T) pendant 2 h à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du TBS-T avant d'être incubées avec les différents échantillons ou un standard pour les IgE pendant 2 h à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du TBS-T avant d'être incubées avec des anticorps anti-IgE, anti-IgG1 ou anti-IgG2a biotinylés dilués dans la solution de blocage pendant 1 h à température ambiante. Les plaques ont ensuite été lavées 4 fois avec du TBS-T avant d'être incubées avec une solution d'avidine-HRP diluée à 1/1000 dans la solution de blocage pendant 30 min à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées 8 fois avec du TBS-T avant d'être incubées avec du TMB. La réaction est stoppée par l'addition d'acide sulfurique et la DO est mesurée à 450nm par un lecteur de plaque « Versamax microplate reader » (Molecular devices). La concentration en IgE est déterminée par rapport au

standard IgE en ng/mL grâce au logiciel « VersaMax Pro 6.2.1 » et les taux d'IgG1 et IgG2a ont été exprimés en unités arbitraires.

## 2. TGF- $\beta$

Le taux de TGF- $\beta$  est mesuré dans les lavages broncho-alvéolaires des souris issues de protocole d'inflammation aiguë avec OVA grâce au kit « Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go! » selon les instructions du fabricant. En résumé, les puits sont incubés avec un standard et les échantillons dilués dans la solution « RD1-73 » pendant 2 h à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 4 fois avec la solution de lavage avant d'être incubés avec un anticorps anti-TGF- $\beta$ . Les puits sont à nouveau lavés 4 fois avec la solution de lavage avant d'être incubés avec une solution de révélation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'addition d'une solution « Stop ». La DO est mesurée à 450nm par un lecteur de plaque et les concentrations, exprimées en pg/mL, sont calculées par rapport au standard.

## 3. Substance P

Le taux de substance P est mesuré dans les surnageant de culture des cellules de ganglions de la racine dorsale grâce au « Substance P Parameter Assay Kit » selon les instructions du fabricant. En résumé, le standard et les échantillons dilués dans la solution « RD5-45 » sont incubés dans des puits pré-adsorbés en présence d'une solution d'anticorps primaire et d'une solution de conjugué de substance P pendant 3 h à température ambiante sous agitation horizontale. Les puits sont lavés 4 fois avec une solution de lavage avant d'être incubés avec une solution de révélation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'addition d'une solution « Stop ». La DO à 450 nm est alors mesurée et les concentrations, exprimées pg/mL, sont calculées par rapport au standard.

## E. Extraction de l'ARN, reverse-transcription et PCR quantitative

L'ARN total est extrait des différents types cellulaire grâce au kit « RNeasy minikit » et des échantillons de poumons grâce au kit « RNeasy Lipid tissue » selon les recommandations du

fabricant. L'ARN est ensuite dosé au « Nanodrop 1000 » (Thermofischer) et sa qualité est contrôlée grâce au système « Agilent 2100 Bioanalyzer » (Agilent technologies - Diegem, Belgique). Seuls les échantillons dont la qualité (RNA integrity number – RIN) est supérieure à 7 (sur une échelle de 0 à 10) sont utilisés dans la suite des expériences. Un microgramme d'ARN est alors rétrotranscrit en ADNc en utilisant la « Prime Script Reverse Transcriptase » en présence de dNTP 10µM, d'oligo dT, de tampon de réaction 5X et d'H<sub>2</sub>O qsp 20µL.

La réaction de PCR quantitative est réalisée de la façon suivante : 10 µL de « Fast Sybr® Green Mastermix 2X », 10 à 50 ng d'ADNc, 2 µM de chaque amorce et d'H<sub>2</sub>O qsp 20 µL. Les amorces utilisées pour ces expériences sont décrites dans le Tableau 4. La réaction d'amplification est effectuée selon les paramètres suivants : 20 s à 95°C puis 40 cycles d'1 s à 95°C et 20 s à 58°C ou 59°C selon la température d'hybridation des amorces utilisées. Les qPCR sont réalisées sur le « ViiA™ 7 Real-Time PCR System » (Life technologies) et analysées en triplicats grâce au logiciel « ViiA™ 7 » (Life technologies) selon la méthode de quantification relative.

-----

|              | Amorce sens                       | Amorce anti sens                     |
|--------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>GAPDH</b> | 5'-GTG GAG TCT ACT GGT GTC TTC-3' | 5'-AGT TGT CAT ATT TCT CGT GGT TC-3' |
| <b>GFRa2</b> | 5'-AGG ACA AAG AGA AGC CCA AT-3'  | 5'-GAC ATG CCT GGT AGT TGT CC-3'     |
| <b>RET</b>   | 5'- GGT CAA CAA CAA CTC CGT TC-3' | 5'-GAC ACG TTG AAA TGG GAG GAC-3'    |
| <b>ATF3</b>  | 5'-AGA GTG CCT GCA GAA AGA GTC-3' | 5'-GAG GTT CCT CTC GTC TTC-3'        |

**Tableau 4** : Amorces utilisées dans la réaction de PCR quantitative.  
 Les amorces ont été conçues grâce à la base de données PubMed NIH.Gov

-----

## VII. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en valeurs numériques moyennes avec les déviations standards à partir d'expériences indépendantes et sont analysées grâce au logiciel « Graph Pad Prism 5.0 ». Le test statistique de comparaison multiple Newman-Keuls (analyse des variances ou ANOVA) ainsi que des tests t de Student sont utilisés pour déterminer la signification statistique des données. Toute différence avec une valeur p inférieure à 0,05 est considérée comme significative.



# Résultats

---





## I. Implication de la NTN dans l'inflammation neurogène au niveau des voies respiratoires

Lors de l'inflammation des voies respiratoires, suite à l'exposition à un allergène, des neuropeptides sont libérés au niveau des terminaisons nerveuses des fibres nociceptives innervant la trachée ou les poumons. Ces neuropeptides sont impliqués dans la modulation de l'inflammation ou inflammation neurogène. Le récepteur GFR $\alpha$ 2 étant présent sur ces terminaisons nerveuses (Heuckeroth et al., 1999), l'hypothèse que la NTN pourrait être responsable du développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires peut être posée. Pour tester l'implication de la NTN, les expériences suivantes ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du docteur Christina Nassenstein de l'Institut d'Anatomie et de Biologie Cellulaire de l'Université de Justus Liebig à Giessen en Allemagne.

### A. Densité d'innervation de la trachée chez les souris NTN<sup>-/-</sup>

La densité d'innervation de la fin de la trachée et de la bifurcation des bronches a été comparée entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec OVA. Les tissus ont été marqués avec un anticorps dirigé contre les fibres nerveuses totales, l'anti-PGP9.5 (Figure 16A), et un anticorps spécifique des fibres C composant les neurones sensitifs, l'anti-CGRP (Figure 16B).

-----

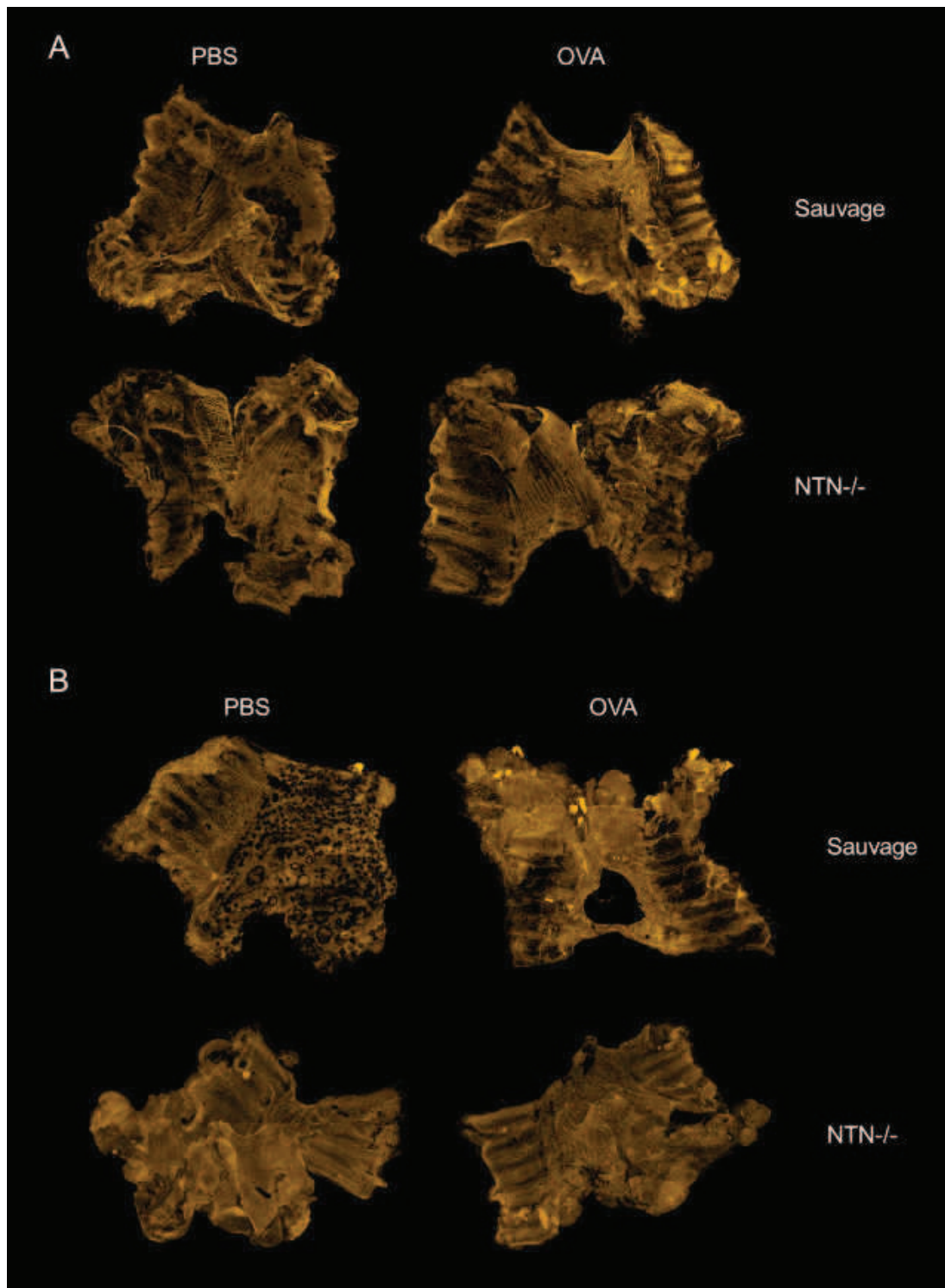


Figure 16 : Densité d'innervation de la trachée chez les souris sauvages et *NTN<sup>-/-</sup>*.

Marquage fluorescent des fibres nerveuses totales avec l'anti-PGP9.5 (A) et des fibres C avec l'anti-CGRP (B) lors d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA.

---

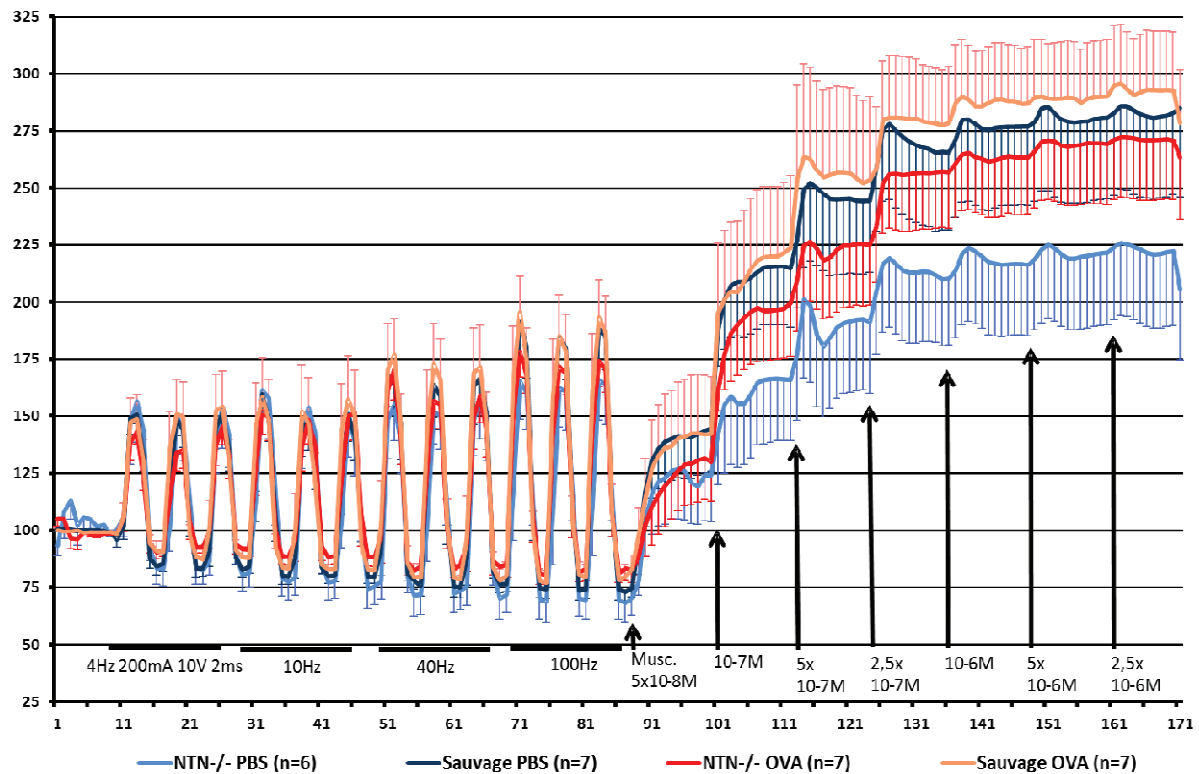
L'observation au microscope confocal à fluorescence des coupes montre que les souris PBS sauvages et PBS NTN<sup>-/-</sup> ont une densité d'innervation équivalente (Figure 16A), ainsi l'absence de NTN durant le développement des souris n'entraîne apparemment pas de modifications majeures de l'innervation au niveau de la trachée. La sensibilisation des souris avec de l'OVA n'affecte pas plus la densité d'innervation de la trachée des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>.

De même, lorsque l'on compare la densité des fibres C au niveau de la trachée (Figure 16B), aucune différence n'est observée entre les souris PBS sauvages et PBS NTN<sup>-/-</sup> ce qui montre que l'absence de NTN chez les souris n'influence pas la densité d'innervation de la trachée par les fibres nerveuses sensibles CGRP positives. Enfin, en accord avec les résultats de Veres et al. ((Veres et al., 2007)), la stimulation des souris avec de l'OVA n'induit aucune différence de la densité d'innervation par les fibres nerveuses sensibles CGRP positives.

#### B. Capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant la trachée chez les souris NTN<sup>-/-</sup>

La capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant les fibres musculaires lisses composant la trachée a été comparée entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA (Figure 17).

-----



**Figure 17** : Capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant la trachée chez les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>.

La force de contraction isométrique a été étudiée par des stimulations électriques (de 4 Hz à 100 Hz) et l'excitabilité des fibres nerveuses de la trachée par stimulation avec différentes doses de muscarine ( $5 \cdot 10^{-8}$  M à  $2,5 \cdot 10^{-7}$  M) en fonction du temps.

Les trachées montées en parallèle dans le système de bain d'organes ont d'abord été exposées à des stimulations électriques de fréquence croissantes (de 4 Hz à 100 Hz). La contraction isométrique des fibres musculaires lisses ainsi provoquée est équivalente chez les souris PBS sauvages et PBS NTN<sup>-/-</sup>. La stimulation des souris avec de l'OVA n'induit pas plus de différence de contraction des fibres musculaires lisses de la trachée entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Ces résultats montrent que l'absence de NTN chez les souris n'induit pas de différence au niveau de la capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant les fibres musculaires lisses de la trachée.

Les trachées ont ensuite été exposées à des doses croissantes de muscarine, un agoniste des récepteurs muscariniques du système nerveux parasympathique. Les observations montrent que la réactivité des fibres nerveuses innervant les fibres musculaires lisses de la trachée est équivalente entre les souris PBS sauvages et PBS NTN<sup>-/-</sup>, indiquant que l'absence de NTN

chez les souris ne modifie pas cette réactivité. La stimulation des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> avec de l'OVA n'entraîne pas plus de modifications de cette réactivité.

Tous ces résultats indiquent que l'hyperréactivité des souris NTN<sup>-/-</sup>, suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA, ne dépend pas de la capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant les fibres musculaires lisses de la trachée.

### C. Niveau d'activation des cellules des ganglions de la racine dorsale chez les souris NTN<sup>-/-</sup>

Les cellules des ganglions de la racine dorsale ont été isolées à partir de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ayant subi un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA. Après leur mise en culture, ces cellules ont été stimulées par différentes doses de capsaïcine (10nM, 100nM et 1µM), un agoniste du TRPV1, ou par de la cinnamaldéhyde (3nM, 30nM et 300nM), un agoniste du TRPA1. La sécrétion de substance P a alors été mesurée par ELISA dans le surnageant de ces cultures. Le taux de substance P sécrété étant inférieur à la limite de détection du kit ELISA (39 ng/mL), le niveau d'activation des cellules des ganglions de la racine dorsale des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> n'a pas pu être évalué (données non montrées). Ces résultats indiquent que la forte réponse inflammatoire que développe les souris NTN<sup>-/-</sup>, suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec OVA, ne dépend pas d'une différence d'innervation de la trachée ou de la libération de neuropeptides connus pour influencer la réponse inflammatoire.



## II. Rôle des cellules dendritiques et lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> lors d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA

Il a été montré au laboratoire que les souris NTN<sup>-/-</sup> ayant subi un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA développaient une forte réponse inflammatoire en comparaison avec les souris sauvages. Les souris NTN<sup>-/-</sup> présentaient, entre autres, une augmentation de la sécrétion de cytokines de type Th2 dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les surnageants des cellules des ganglions médiastinaux restimulées *in vitro* avec de l'OVA (Michel et al., 2011).

### A. Niveau de la réponse de type Th2 par les splénocytes totaux chez les souris NTN<sup>-/-</sup>

Afin de déterminer par quels mécanismes les souris NTN<sup>-/-</sup> développent une forte réponse Th2, l'étude s'est poursuivie par l'observation du niveau de sécrétion des cytokines Th2 par les cellules de la rate. Suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA, les rates de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont été prélevées et les splénocytes totaux ont été mis en culture et restimulés *in vitro*, en présence d'IL-2, avec de l'OVA. La quantité de cytokines de type Th1 et Th2 sécrétées dans les surnageants de culture a été mesurée par CBA (Figure 18).

-----



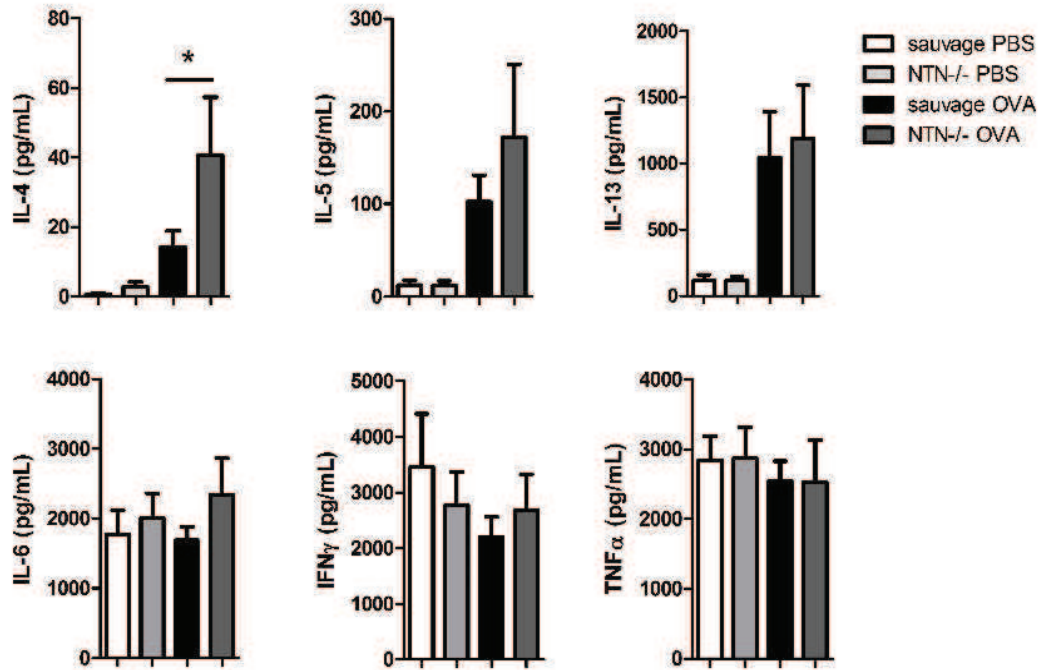


Figure 18 : Sécrétion de cytokines Th1 et Th2 par les splénocytes totaux.

Les taux d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13, d'IL-6, d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  ont été mesurés par CBA dans les surnageants de culture des splénocytes totaux issus de souris sauvages ou NTN<sup>-/-</sup> stimulées par PBS ou OVA après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec OVA. Les splénocytes totaux ont été restimulés *in vitro* en présence d'IL-2 +/- OVA.

-----

Les résultats montrent que les splénocytes totaux des souris OVA sauvages sécrètent davantage d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 que ne le font les souris PBS sauvages. Des résultats identiques sont obtenus quand on compare les sécrétions de cytokines de souris PBS *versus* des souris OVA NTN<sup>-/-</sup>. Cependant, la mesure de la sécrétion de cytokines de type Th1 comme l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , par les splénocytes totaux, ne révèle aucune différence entre les souris PBS sauvages et PBS NTN<sup>-/-</sup> comme après une inflammation induite avec OVA. Lorsque l'on compare les souris OVA sauvages et OVA NTN<sup>-/-</sup> entre elles, les résultats montrent que les splénocytes totaux issus des souris NTN<sup>-/-</sup> sécrètent de façon significative un taux plus élevé d'IL-4 et la même tendance est observée pour l'IL-5 et l'IL-13. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T induisant la voie Th2 chez les souris NTN<sup>-/-</sup> ont une plus grande capacité à sécréter des cytokines de type Th2.

## B. Différences phénotypiques entre les cellules dendritiques sauvages et NTN<sup>-/-</sup>

Dans le but d'étudier l'influence des cellules dendritiques dans le phénomène d'hyperréactivité chez les souris NTN<sup>-/-</sup>, le niveau d'expression des marqueurs d'activation MHCII, CD80 et CD86 a été analysé par cytométrie en flux à la surface des cellules dendritiques issues de la rate ou dérivées de la moelle osseuse (Figure 19 et 20). Les analyses ont été réalisées parmi les cellules CD11c positives (CD11c +). Les cellules dendritiques, issues de la rate et exprimant le CMHII et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, sont présentes en plus grand nombre chez les souris NTN<sup>-/-</sup> que parmi les cellules dendritiques des souris sauvages (Figure 19A). Le même résultat est observé après activation avec des LPS ou de l'OVA (Figures 19B, 19C). Par contre, le niveau d'expression (MFI) des molécules CMHII, CD80 et CD86 ne varie pas entre les cellules dendritiques sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent que les cellules dendritiques issues de la rate des souris NTN<sup>-/-</sup>, plus nombreuses à exprimer le CMHII, et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, pourraient avoir une plus grande capacité d'activation.

-----

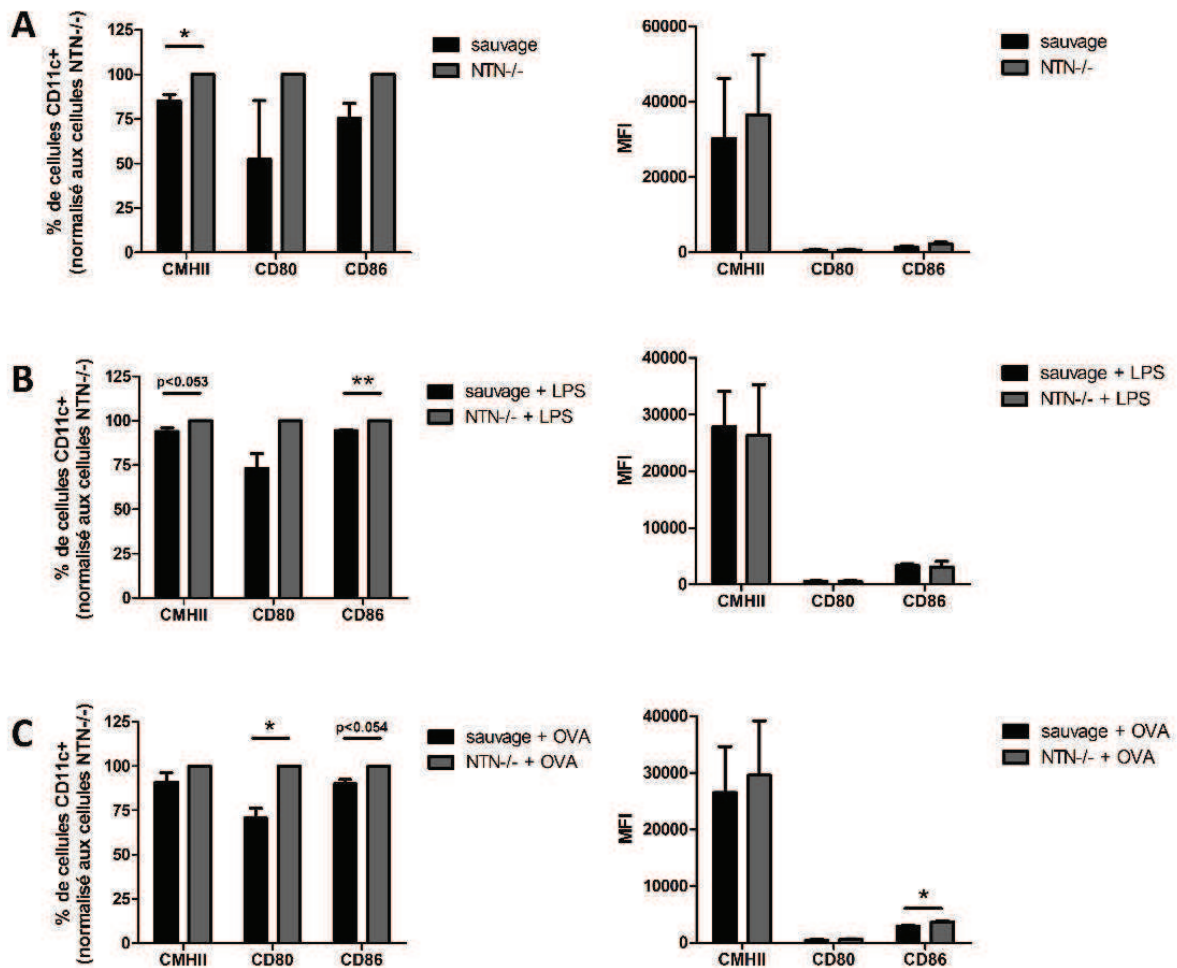


Figure 19 : Phénotype des cellules dendritiques issues de la rate.

Le pourcentage et le niveau d'expression du CMHII et des molécules de co-stimulation, CD80 et CD86, ont été évalués parmi les cellules CD11c<sup>+</sup> issues de culture de cellules dendritiques issues de la rate (A), activées ou non par de l'OVA (B) ou des LPS (C).

Dans le cas des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, le nombre de cellules exprimant les molécules CMHII, CD80 et CD86 ne varie pas entre les souris NTN<sup>-/-</sup> et les sauvages (Figure 20A). Cette donnée ne varie pas si ces cellules sont activées par des LPS ou de l'OVA (Figures 20B, 20C). Ces résultats suggèrent que les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont, contrairement aux cellules dendritiques issues de la rate, un même niveau de maturité.

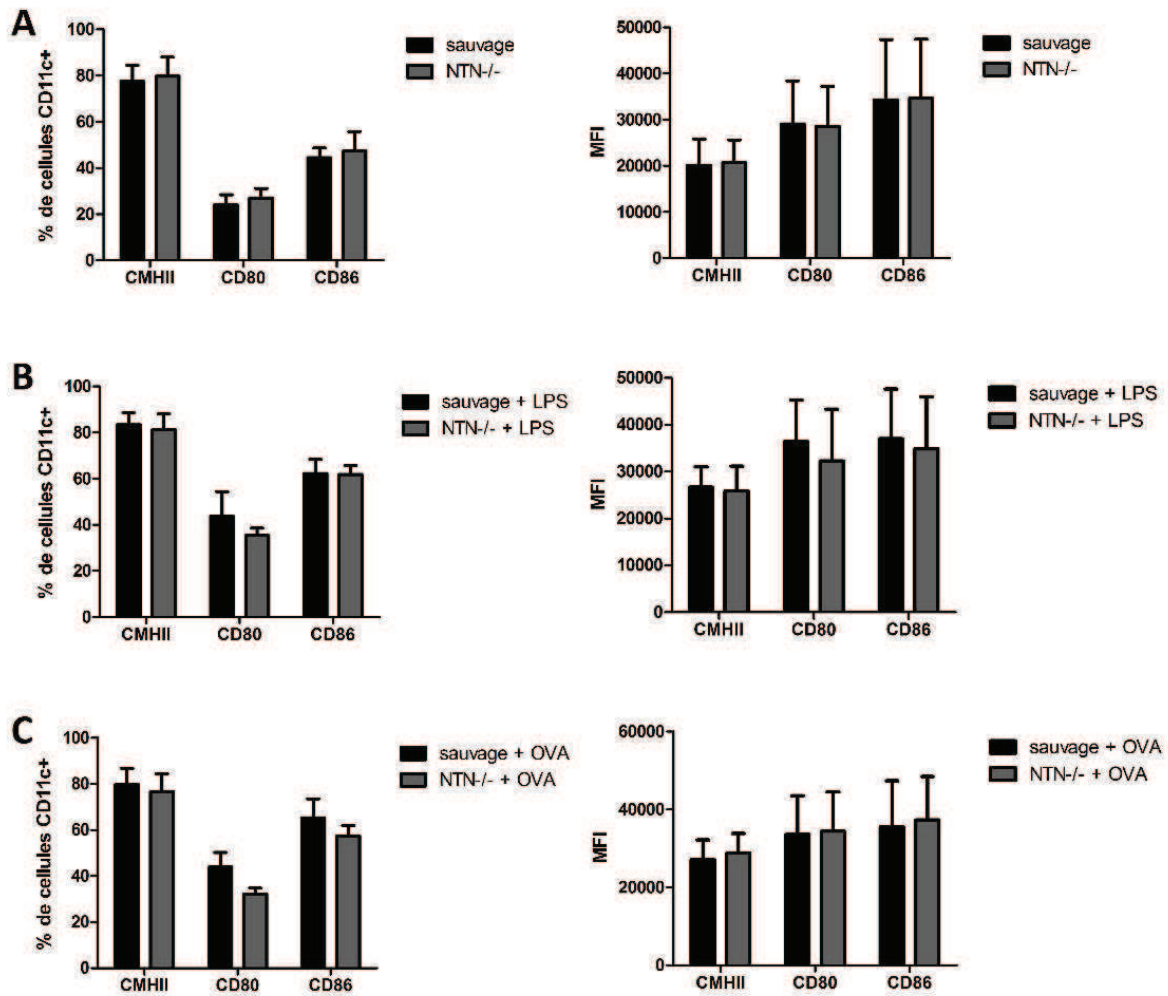


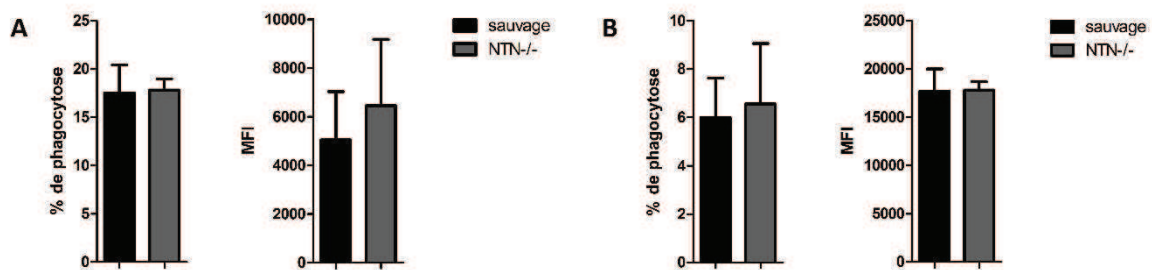
Figure 20 : Phénotype des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse.

Le pourcentage et le niveau d'expression du CMHII et des molécules de co-stimulation, CD80 et CD86, ont été évalués parmi les cellules CD11c<sup>+</sup> issues de culture de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (A), activées ou non par de l'OVA (B) ou des LPS (C).

### C. Différence fonctionnelle des cellules dendritiques sauvages et NTN<sup>-/-</sup>

La capacité fonctionnelle des cellules dendritiques de la rate ou dérivées de la moelle osseuse a été testée en observant leur niveau de phagocytose de billes de collagène fluorescentes. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux et les analyses ont été réalisées parmi les cellules CD11c<sup>+</sup> (Figure 21). Comme le montre la Figure 21A, un même pourcentage de cellules dendritiques sauvages et NTN<sup>-/-</sup> issues de la rate, s'avère capable de phagocyter les billes de collagène fluorescentes. De plus, la capacité de phagocytose par

cellule (MFI) s'avère, elle aussi, identique entre les cellules dendritiques sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Ces résultats montrent que ce n'est apparemment pas la capacité de phagocytose des cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> qui est impliquée dans le phénomène d'hyperréactivité que l'on retrouve chez les souris NTN<sup>-/-</sup>. Il en va de même pour ce qui concerne la phagocytose par les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (Figure 21B). Ces résultats montrent que les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, issues de souris sauvages ou NTN<sup>-/-</sup>, ont une même capacité de phagocytose.



**Figure 21** : Test de phagocytose des cellules dendritiques issues de la rate ou dérivées de la moelle osseuse.

Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (A) ou issues de la rate (B) ont été incubées pendant 1h en présence de billes fluorescentes. La capacité de phagocytose a été analysée parmi les cellules CD11c<sup>+</sup>.

#### D. Influence des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sur la voie Th2 chez les souris NTN<sup>-/-</sup>

Afin d'observer l'influence potentielle des cellules dendritiques ou des lymphocytes T sur la forte activation de la voie Th2 chez les souris NTN<sup>-/-</sup>, des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, pré-stimulées avec de l'OVA, ont été mises en présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA. La production de cytokines de type Th2 a alors été mesurée par CBA (Figures 22 et 23).

## 1. Influence des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate issue d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec l'OVA

Comme le montre la Figure 22A, les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> cultivés en présence de cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> sont responsables d'une plus forte production d'IL-5 et d'IL-13 que ne le réalisent les lymphocytes T CD4+ sauvages cultivés en présence de cellules dendritiques sauvages (Figure 22A). Afin de déterminer si cette plus forte production de cytokines de type Th2 par les souris NTN<sup>-/-</sup> est induite par les cellules dendritiques, des lymphocytes T CD4+ sauvages ont été cultivés en présence de cellules dendritiques sauvages ou NTN<sup>-/-</sup>. Ces expériences montrent que les lymphocytes T CD4+ sauvages ont une plus forte capacité à sécréter de l'IL-5 et de l'IL-13 en présence des cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> (Figure 22B). Ces résultats suggèrent que les cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> ont une plus forte capacité à activer des lymphocytes T CD4+ sauvages, quand on compare ces résultats à ceux obtenus en présence de cellules dendritiques sauvages.

Par ailleurs, afin de déterminer si cette plus forte production de cytokines de type Th2 par les souris NTN<sup>-/-</sup> était induite par les lymphocytes T CD4+, des lymphocytes T CD4+ sauvages ou NTN<sup>-/-</sup> ont été cultivés en présence de cellules dendritiques sauvages.

Les résultats montrent que les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> sont responsables d'une plus forte production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 en comparaison avec la capacité de sécrétion des lymphocytes T CD4+ sauvages incubés en présence des mêmes cellules dendritiques sauvages (Figure 22C). Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> purifiés à partir de la rate ont une plus grande capacité à produire des cytokines de type Th2 que ne l'ont les lymphocytes T CD4+ sauvages.

-----

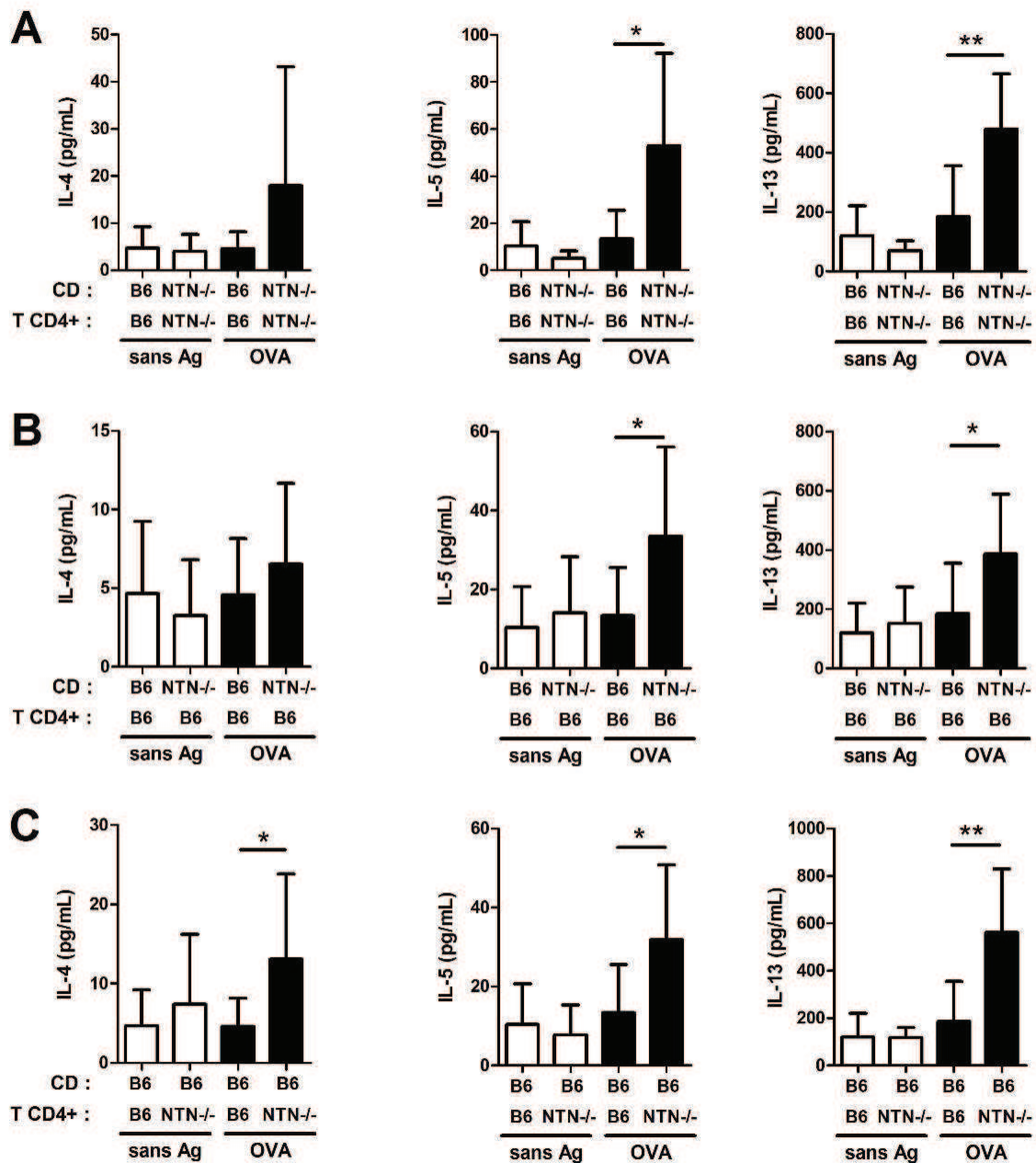


Figure 22 : Influence sur la voie Th2 des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate.

Des lymphocytes T CD4+ ont été purifiés à partir de la rate de souris sauvages (B6) ou NTN<sup>-/-</sup> OVA suite à un protocole d'inflammation aiguë avec de l'OVA et cultivés avec des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (CD) activées par de l'OVA. Les lymphocytes T CD4+ ont également été cultivés avec des cellules dendritiques non activées (sans Ag) servant de contrôle négatif. Les cytokines de type Th2 ont été mesurées dans les surnageants de ces cultures par CBA.

## 2. Influence des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir des ganglions médiastinaux issus d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec l'OVA

Des expériences identiques à celles reportées au paragraphe précédent ont été réalisées. Des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux de souris OVA ont été cultivés en présence de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse pré-stimulées avec de l'OVA (Figure 23).

Les résultats montrent que les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> cultivés en présence de cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> sont responsables d'une plus forte production d'IL-5 et d'IL-13 en comparaison avec les résultats obtenus en cultivant des lymphocytes T CD4+ sauvages en présence de cellules dendritiques sauvages (Figure 23A).

Afin de tester l'influence des cellules dendritiques, des lymphocytes T CD4+ sauvages ont été cultivés en présence de cellules dendritiques sauvages ou NTN<sup>-/-</sup>. Ces expériences montrent que les lymphocytes T CD4+ sauvages produisent plus d'IL-4 et d'IL-13 en présence de cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> qu'elles ne le font en présence de cellules dendritiques sauvages (Figure 23B). Ainsi, il apparaît que les cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> ont une plus forte capacité à activer des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux que ne l'ont les cellules dendritiques sauvages. Afin de tester l'influence des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes T CD4+ sauvages ou NTN<sup>-/-</sup> ont été cultivés en présence de cellules dendritiques sauvages. Les résultats montrent que les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> ont une légère tendance à produire plus d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 comparativement aux lymphocytes T CD4+ sauvages (Figure 23C). Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux ont aussi une plus grande capacité à produire des cytokines de type Th2 que ne l'ont les lymphocytes CD4+ sauvages.

Ainsi, ces résultats démontrent que les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse et les lymphocytes T CD4+ issus de la rate et des ganglions médiastinaux participent au mécanisme d'hyperréactivité que l'on retrouve chez les souris NTN<sup>-/-</sup> suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA.



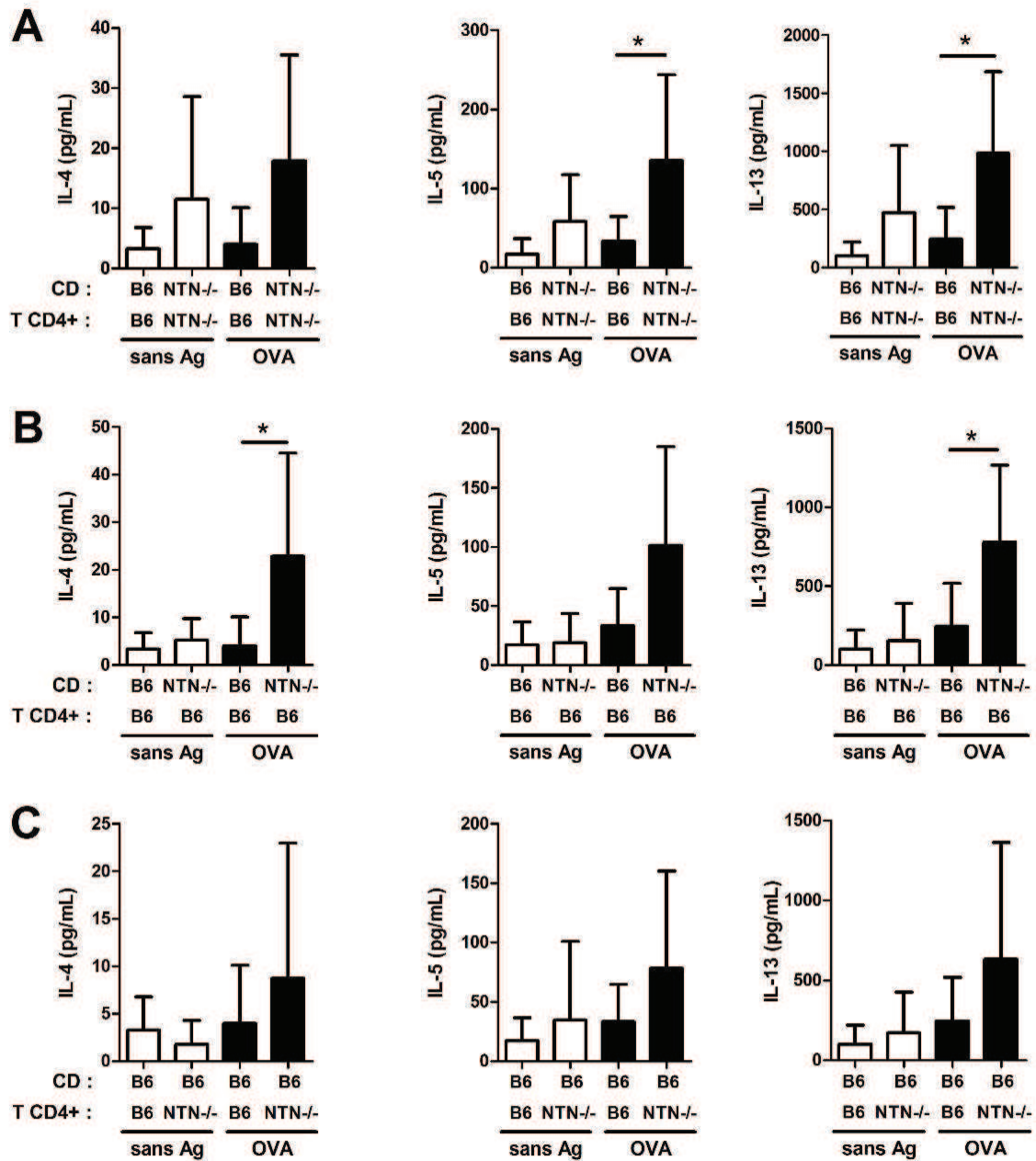


Figure 23 : Influence sur la voie Th2 des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux.

Des lymphocytes T CD4+ ont été purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux de souris sauvages (B6) ou NTN<sup>-/-</sup> OVA suite à un protocole d'inflammation aiguë avec de l'OVA. Ils ont été cultivés avec des cellules dendritiques (CD), sauvages ou NTN<sup>-/-</sup>, dérivées de la moelle osseuse et activées par de l'OVA. Les lymphocytes T CD4+ ont également été cultivés avec des cellules dendritiques non activées (sans Ag) servant de contrôle négatif. Les cytokines de types Th2 ont été mesurées dans les surnageants de ces cultures par CBA.

### E. Rôle des lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> après transfert dans les souris immuno-déficientes Rag<sup>-/-</sup>

Des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> OVA et PBS ont été injectés dans des souris receveuses immuno-déficientes Rag<sup>-/-</sup>. Ces souris ont ensuite été stimulées par des instillations nasales d'OVA, afin d'étudier l'influence des lymphocytes T transférés sur l'hyperréactivité des voies respiratoires (Figure 24).

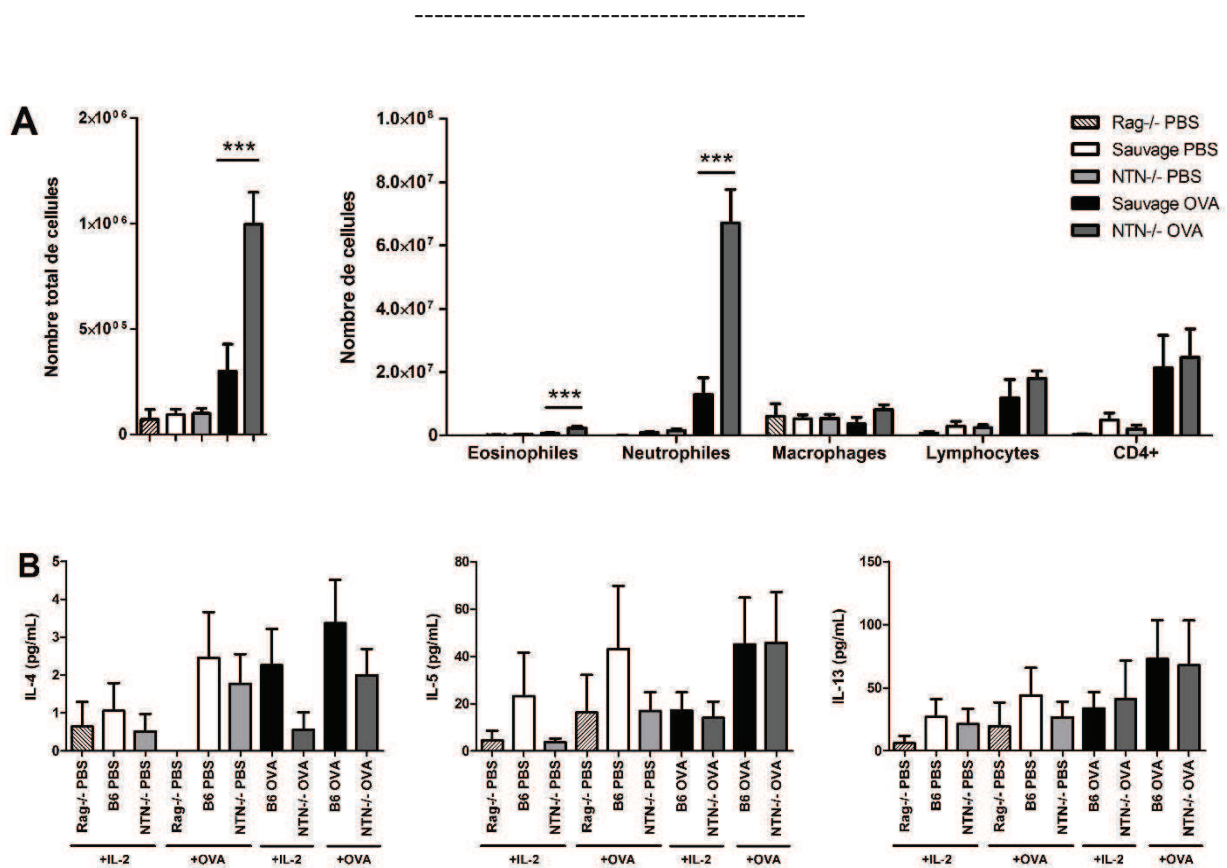


Figure 24 : Influence des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> et transférés dans les souris immuno-déficientes Rag<sup>-/-</sup>.

Le nombre de cellules et la composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires ont été analysés chez les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4+ sauvages (B6) ou NTN<sup>-/-</sup> issus de souris OVA ou PBS (A). La production de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) a été analysée dans les surnageants de culture des splénocytes totaux issus de ces mêmes souris (B).

Un comptage du nombre de cellules infiltrées dans les lavages broncho-alvéolaires de ces souris a été effectué (Figure 24A). Les résultats montrent une augmentation du nombre de cellules totales chez les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris OVA sauvages en comparaison avec les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris PBS sauvages. Des résultats identiques sont observés chez les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris OVA NTN<sup>-/-</sup> comparativement à des souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris PBS NTN<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent que les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issues de souris OVA sauvages ou NTN<sup>-/-</sup> développent bien une inflammation au niveau des voies respiratoires. Lorsque l'on compare les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA sauvages à celles ayant reçu des cellules provenant de souris OVA NTN<sup>-/-</sup>, les résultats montrent que le transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA NTN<sup>-/-</sup> entraîne une plus forte infiltration de cellules au niveau des voies respiratoires chez les souris Rag<sup>-/-</sup>.

La composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires a été analysée par cytométrie en flux sur les seules cellules vivantes APC-Cy7 négatives. L'analyse des lavages broncho-alvéolaires des souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris sauvages OVA révèle une forte augmentation du nombre de neutrophiles et de lymphocytes, en comparaison avec les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris PBS sauvages (Figure 19B). Une forte augmentation du nombre d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes est également observée chez les souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA NTN<sup>-/-</sup> comparées aux souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris PBS NTN<sup>-/-</sup>. La comparaison des souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA sauvages et de souris OVA NTN<sup>-/-</sup> montre une forte augmentation du nombre d'éosinophiles et de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires des souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris NTN<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus des souris NTN<sup>-/-</sup> ont une plus grande capacité à recruter des éosinophiles et des neutrophiles lors de l'inflammation des voies respiratoires générées par de l'OVA.

En parallèle, la production de cytokines de type Th2 a été mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires chez ces souris. Cependant, les résultats étant très faibles (inférieurs à

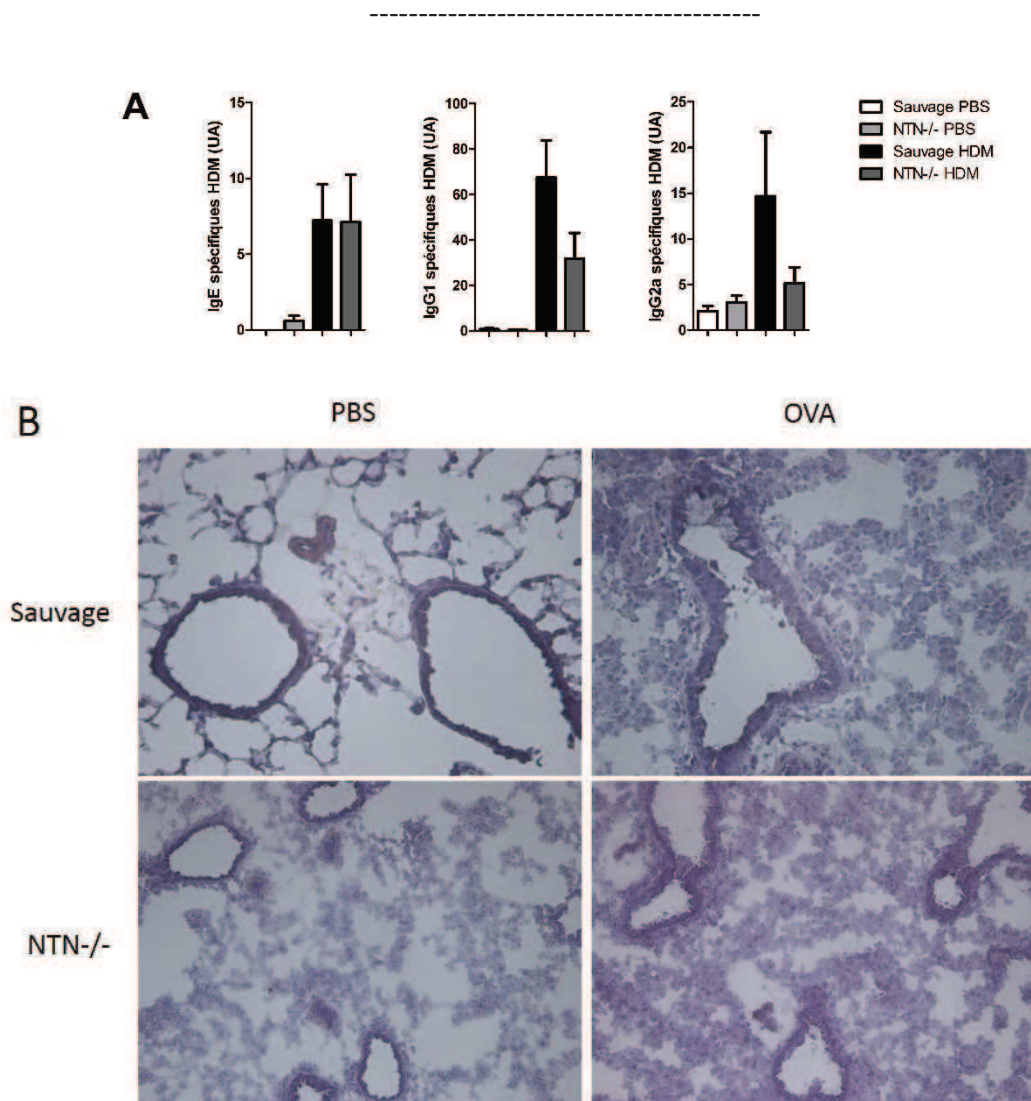
2 pg/mL), ils n'ont pas pu être interprétés. Une augmentation de la production de cytokines de type Th2 n'a ainsi pas pu être associée à l'augmentation du nombre total de cellules dans les lavages broncho-alvéolaires de ces souris.

La production de cytokines de type Th2 a également été mesurée dans les surnageants de culture de cellules de la rate restimulées *in vitro*, en présence d'IL-2 et d'OVA (Figure 24B). Aucune différence n'est observée dans la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 dans les cultures de cellules de la rate issues de souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA sauvages comparativement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris PBS sauvages. Des résultats identiques sont observés dans les cultures des cellules de la rate issues de souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA NTN<sup>-/-</sup> en comparaison avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris PBS NTN<sup>-/-</sup>. La comparaison de la production de cytokines de type Th2 par les cellules de la rate des souris Rag<sup>-/-</sup> ayant reçu des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris OVA sauvages et de souris OVA NTN<sup>-/-</sup> ne montre pas plus de différence dans la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris NTN<sup>-/-</sup> OVA ne sont pas capables d'induire une plus forte sécrétion de cytokines de type Th2 chez les souris Rag<sup>-/-</sup> receveuses.



## II. Implication de la NTN lors d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM

Dans le but de confirmer dans un modèle d'asthme impliquant un autre allergène les résultats obtenus lors des protocoles d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec OVA, des expériences ont été menées en utilisant un allergène plus proche du modèle d'asthme humain, l'HDM. Ainsi, les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont été sensibilisées et stimulées avec de l'HDM afin de tester les différents paramètres de l'inflammation (Figure 25).



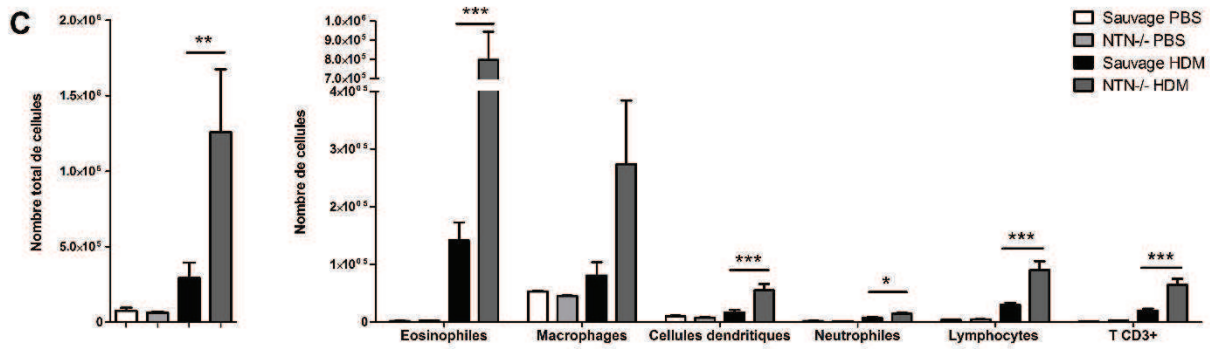


Figure 25 : Implication de la NTN suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM (1)

Les taux d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques de l'HDM ont été mesurés dans le sérum des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (A). L'infiltration des cellules a été observé sur des coupes de poumons de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> marquées à l'hématoxyline-éosine (B). Le nombre de cellules et la composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires a été analysée chez les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (C). UA : Unités arbitraires

Suite au protocole d'inflammation avec de l'HDM, les taux d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques de l'HDM ont été quantifiés dans le sérum des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Les souris HDM sauvages produisent des IgE, des IgG1 et des IgG2a spécifiques de l'HDM, mis en évidence par la quasi absence de production de ces Ig par les souris PBS sauvages (Figure 25A) en réaction à l'inflammation. Des résultats identiques sont observés chez les souris HDM NTN<sup>-/-</sup> en comparaison avec les souris PBS NTN<sup>-/-</sup>. De plus, l'observation des coupes histologiques de poumons colorées à l'hématoxyline-éosine révèle une forte infiltration cellulaire au niveau des bronchioles chez les souris HDM sauvages et NTN<sup>-/-</sup> absente chez les souris PBS (Figure 25B). La comparaison des niveaux d'IgE, IgG1 et IgG2a ainsi que le degré d'infiltration par des cellules péri-bronchiolaire ne diffèrent pas de manière significative entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> HDM.

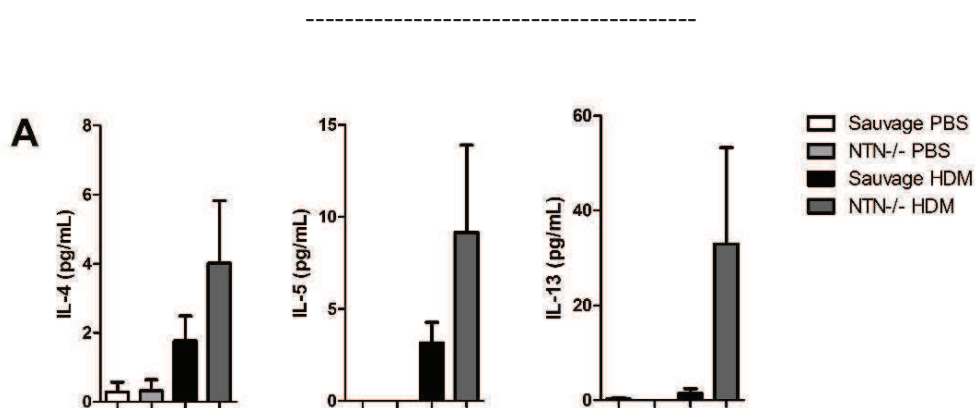
Afin de confirmer la présence d'un infiltrat immunitaire dans les poumons, un comptage des cellules dans les lavages broncho-alvéolaires (Figure 25C) a été effectué. Les résultats montrent une augmentation du nombre total de cellules chez les souris HDM sauvages comparativement aux souris PBS sauvages. Les souris HDM NTN<sup>-/-</sup> montrent également une forte augmentation du nombre total de cellules comparées aux souris PBS NTN<sup>-/-</sup>, indiquant

que les souris ont réagi au protocole d'inflammation avec de l'HDM. Enfin, une augmentation significative du nombre total de cellules retrouvées dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> est observée en comparaison avec les souris sauvages.

La composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires a été analysée par cytométrie en flux (Figure 25C). L'analyse des lavages broncho-alvéolaires des souris sauvages HDM révèle une forte augmentation du nombre d'éosinophiles, de macrophages, de cellules dendritiques et de lymphocytes en comparaison avec les souris sauvages PBS.

Des résultats identiques sont observés chez les souris NTN<sup>-/-</sup> HDM comparées aux souris NTN<sup>-/-</sup> PBS. La comparaison des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> HDM a montré une forte augmentation du nombre d'éosinophiles, de macrophages, de cellules dendritiques et de lymphocytes dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> indiquant que les souris NTN<sup>-/-</sup> sont plus réactives que les sauvages, lors de l'inflammation des voies respiratoires avec de l'HDM.

La mesure du taux de cytokines présentes dans les lavages broncho-alvéolaires montre que l'augmentation du nombre total de cellules est aussi associée à une plus forte sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 chez les souris sauvages HDM comparativement aux souris PBS (Figure 26A). Un même profil est observé pour l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> HDM en comparaison avec les souris PBS. Ainsi, la comparaison des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> HDM indique une tendance à l'augmentation de la production de cytokines de type Th2 dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup>.





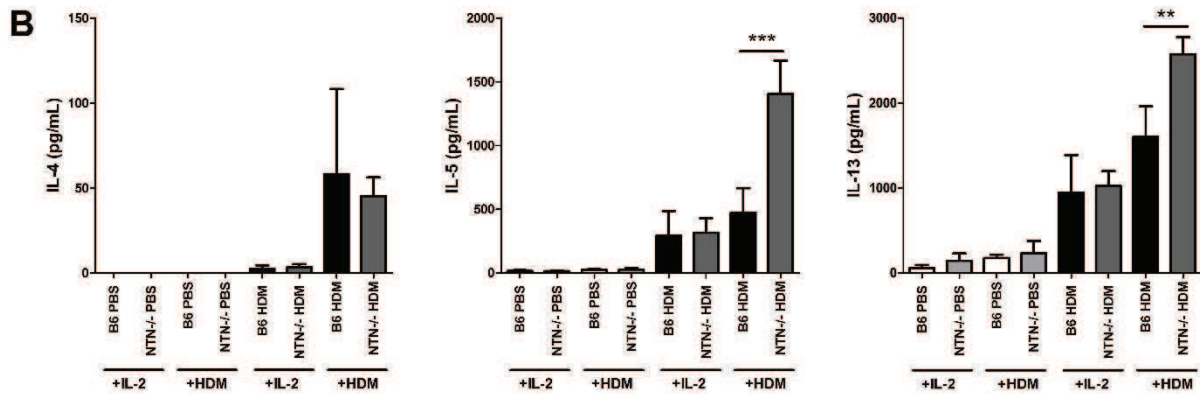


Figure 26 : Implication de la NTN suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'HDM (2).

Les taux de cytokines de type Th2 secrétées ont été analysés dans les lavages broncho-alvéolaires (A) ainsi que dans les surnageants de culture des cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux restimulées *in vitro* en présence d'IL-2 +/- HDM (B) chez les souris sauvages (B6) et NTN<sup>-/-</sup>.

La production de cytokines de type Th2 a aussi été mesurée dans les surnageants de culture des cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux restimulés *in vitro* en présence d'IL-2 et d'HDM (Figure 26B). Une augmentation de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 est observée dans les cultures des cellules de ganglions médiastinaux issus de souris HDM sauvages comparativement aux souris PBS. Des résultats identiques sont observés dans les cultures des cellules de ganglions médiastinaux issues de souris HDM NTN<sup>-/-</sup> en comparaison avec les souris PBS. La comparaison de la production de cytokines de type Th2 par les cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux des souris HDM sauvages et NTN<sup>-/-</sup> montre une forte augmentation de la production d'IL-5 et d'IL-13 par les cellules NTN<sup>-/-</sup> montrant bien que ces cellules ont une plus grande capacité à produire des cytokines de type Th2 en étant restimulées *in vitro*. Tous ces résultats montrent que les souris NTN<sup>-/-</sup> réagissent plus fortement lors de l'inflammation aiguë des voies respiratoires avec l'HDM comme allergène. L'absence de NTN conduit à une hyperréactivité des voies respiratoires associée à une forte infiltration cellulaire au niveau des bronchioles et à une augmentation de la sécrétion de cytokines de type Th2.

### III. Implication de la NTN lors d'un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA

Une augmentation significative de la sécrétion de TGF- $\beta$  a été observée dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> en comparaison aux souris sauvages, après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA (Figure 27). Le TGF- $\beta$  est reconnu comme étant une cytokine anti-inflammatoire et pro-fibrotique jouant un rôle dans le remodelage des tissus dans des pathologies d'inflammation chronique. Des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont alors été exposées de façon chronique à de l'OVA afin de recréer un modèle d'asthme allergique chronique et d'étudier l'influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation et du remodelage des tissus.

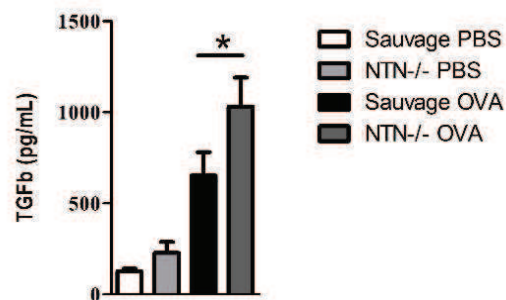


Figure 27 : Taux de TGF- $\beta$  dans les lavages broncho-alvéolaires des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA.

#### A. Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation

Suite au protocole d'inflammation chronique avec de l'OVA, les taux d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques de l'OVA ont été quantifiés dans le sérum des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Les souris OVA sauvages ont produit, en réaction à l'inflammation, des IgE, des IgG1 et des IgG2a spécifiques de l'OVA en comparaison aux souris PBS sauvages (Figure 28A). Des résultats identiques sont observés chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA comparées aux souris NTN<sup>-/-</sup> PBS. La comparaison entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> OVA a montré que les souris NTN<sup>-/-</sup> développent de façon significative plus d'IgE spécifiques de l'OVA alors qu'aucune différence

n'est observée en ce qui concerne les IgG1 et les IgG2a. L'observation des coupes histologiques de poumons colorées à l'hématoxyline-éosine révèle une forte infiltration cellulaire péri-bronchiolaire chez les souris OVA sauvages et NTN<sup>-/-</sup> par rapport aux souris PBS sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (Figure 28B). Ces résultats indiquent que l'exposition chronique des souris à l'OVA entraîne une forte infiltration cellulaire au niveau des poumons.

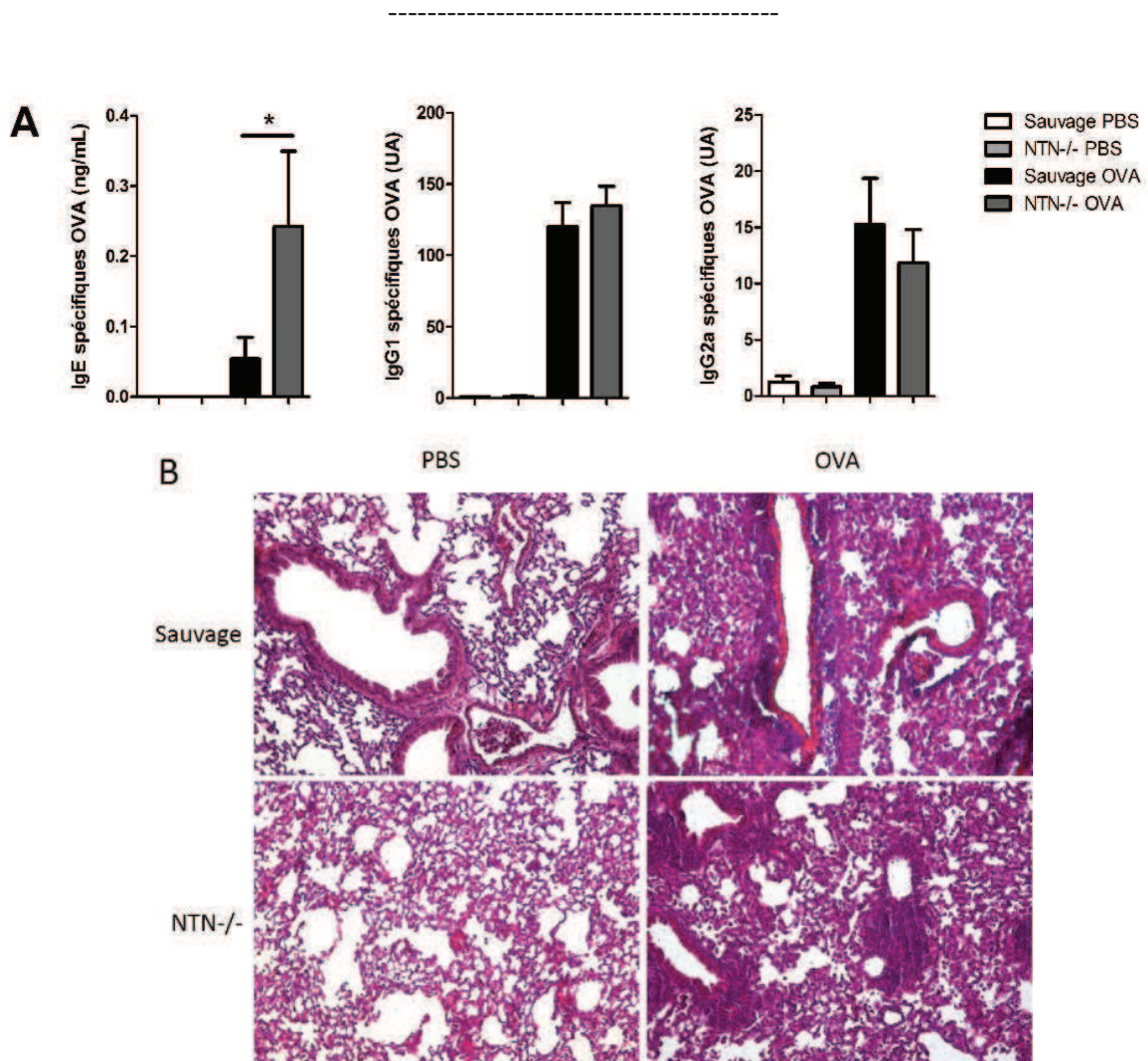


Figure 28 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (1).

Les taux d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques de l'OVA ont été mesurés dans le sérum des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (A). L'infiltration des cellules et la production de mucus ont été observées sur des coupes de poumons de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> marquées à l'hématoxyline-éosine (B). UA : Unités arbitraires

Afin de confirmer la présence d'un infiltrat immunitaire dans les poumons, un comptage des cellules dans les lavages broncho-alvéolaires (Figure 29A) a été effectué. Les résultats montrent une augmentation significative du nombre total de cellules chez les souris OVA sauvages comparativement aux souris PBS sauvages. Les souris OVA NTN<sup>-/-</sup> montrent également une augmentation significative du nombre total de cellules comparées aux souris PBS NTN<sup>-/-</sup>, indiquant que les souris réagissent bien au protocole d'inflammation chronique avec de l'OVA. Enfin, une augmentation significative du nombre total de cellules retrouvées dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> est observée en comparaison avec les souris sauvages.

La composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires a été analysée par cytométrie en flux (Figure 29A). L'analyse des lavages broncho-alvéolaires des souris sauvages OVA révèle une forte augmentation du nombre d'éosinophiles, de macrophages et de neutrophiles comparé aux souris sauvages PBS. Des résultats identiques sont observés chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA comparées aux souris NTN<sup>-/-</sup> PBS. L'exposition chronique à l'OVA entraîne une augmentation significative du nombre de neutrophiles chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA comparativement aux souris sauvages OVA. Ces résultats vont dans le sens de nos précédentes conclusions (paragraphes II et III) quant à l'hyperréactivité des souris NTN<sup>-/-</sup> comparées aux souris sauvages, lors d'inflammation des voies respiratoires.

Le recrutement des neutrophiles dans les poumons est contrôlé par divers médiateurs, notamment la chémokine KC ainsi que le TNF- $\alpha$ . Les taux de KC et de TNF- $\alpha$  ont été mesurés par CBA dans les lavages broncho-alvéolaires et ces quantifications montrent que les souris sauvages OVA et NTN<sup>-/-</sup> OVA sécrètent plus de KC et de TNF- $\alpha$  que ne le font les souris sauvages PBS et NTN<sup>-/-</sup> PBS (Figure 29B). De plus, en parallèle à l'augmentation du nombre de neutrophiles chez les souris NTN<sup>-/-</sup>, le niveau de sécrétion de KC et de TNF- $\alpha$  est également supérieur dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> OVA comparativement aux souris sauvages OVA. Des résultats identiques sont observés concernant la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Enfin, l'analyse des cytokines de type Th2 sécrétées dans les lavages broncho-alvéolaires montre une augmentation des concentrations d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 après inflammation aussi bien chez les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> mais sans différence significative.

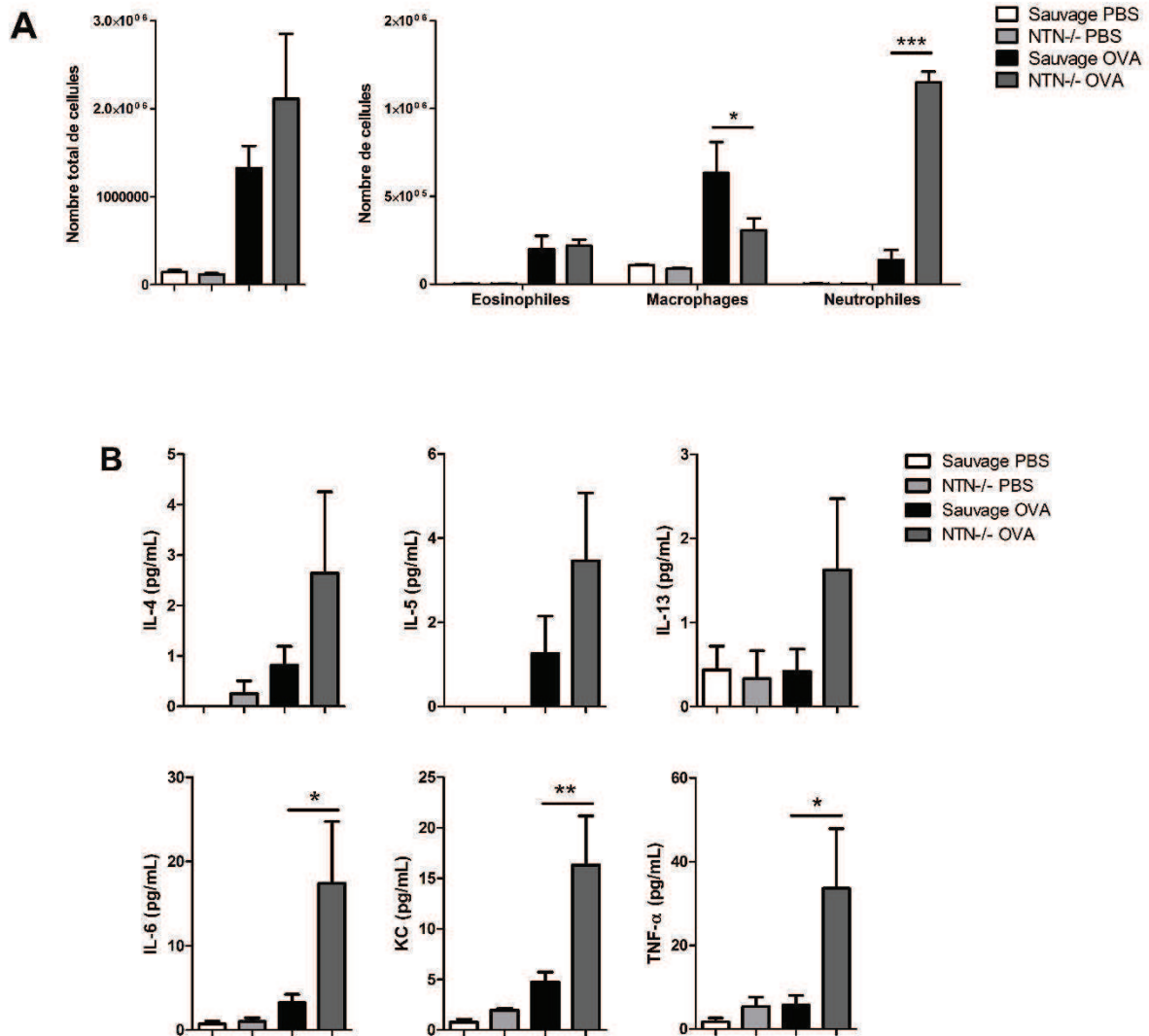


Figure 29 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (2).

Le nombre de cellules totales et la composition cellulaires des lavages broncho-alvéolaires ont été analysés chez les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (A). Les taux de cytokines sécrétées ont été mesurés dans les lavages broncho-alvéolaires de ces souris (B).

La production de cytokines de types Th1 et Th2 a alors été mesurée dans les surnageants de culture des cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux restimulées *in vitro* en présence d'IL-2 et d'OVA (Figure 30). L'analyse de la sécrétion des cytokines de type Th2 montre des résultats identiques à ceux obtenus lors de l'étude des lavages

broncho-alvéolaires. Ainsi les taux d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 sont sensiblement les mêmes entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> après inflammation. Par contre, les cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux issues des souris NTN<sup>-/-</sup> ont une plus grande capacité à produire de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , comparativement aux souris sauvages, confirmant les résultats obtenus lors de l'étude des cytokines présentes dans les lavages broncho-alvéolaires. Ces résultats montrent que l'exposition chronique des souris à l'OVA entraîne l'activation d'une voie de recrutement des neutrophiles par la sécrétion de KC et de TNF- $\alpha$  et que celle-ci est amplifiée dans les souris NTN<sup>-/-</sup>.

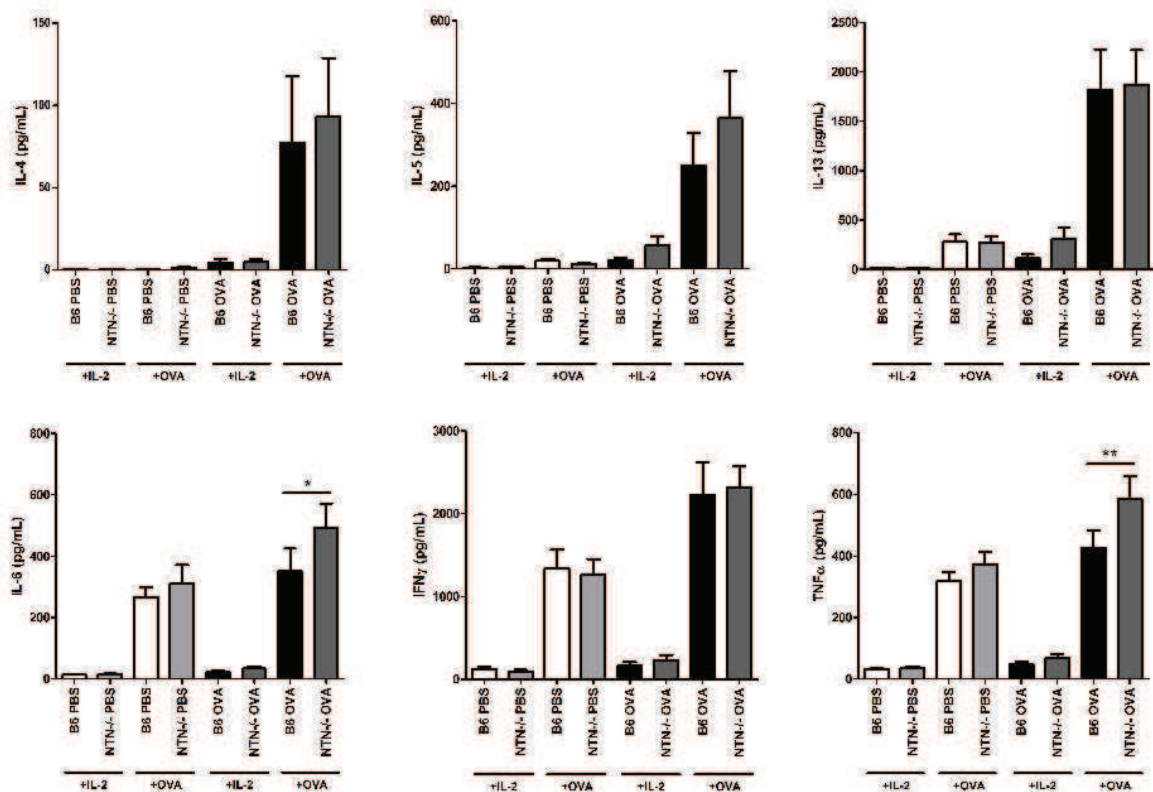


Figure 30 : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (3)

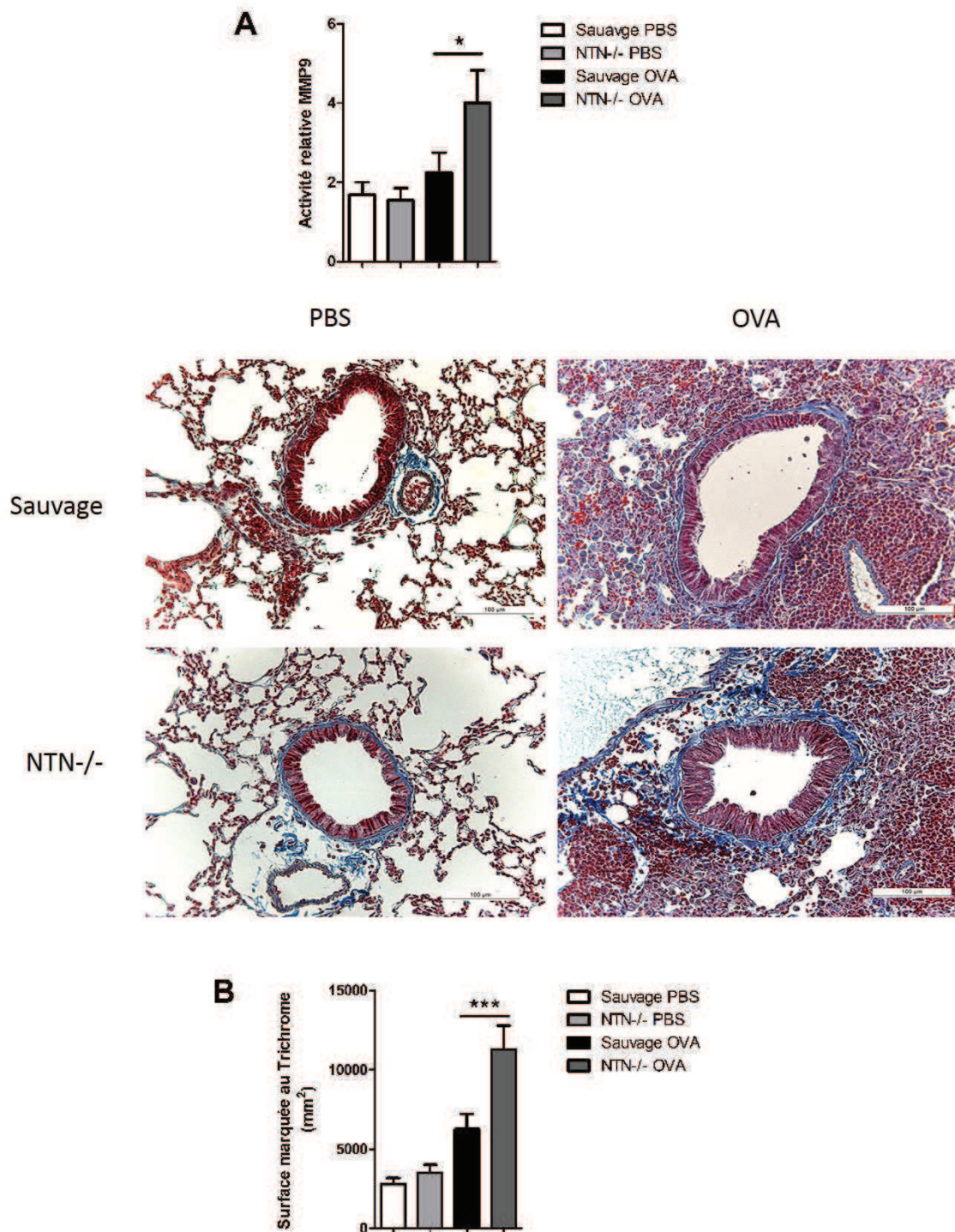
Les taux de cytokines ont été mesurés dans les surnageants de culture des cellules des ganglions lymphatiques médiastinaux restimulées *in vitro* en présence d'IL-2 +/- OVA chez les souris sauvages (B6) et NTN<sup>-/-</sup>.

## B. Influence de la NTN sur le remodelage des tissus

La présence de TNF- $\alpha$  et de KC dans l'environnement des neutrophiles va induire le relargage de granules contenant, entre autres, la MMP9. Le nombre de neutrophiles étant largement supérieur dans les lavages broncho-alvéolaires des souris OVA NTN<sup>-/-</sup> comparativement aux souris OVA sauvages, le niveau d'activité de cette protéase a été évalué par densitométrie après migration sur un gel de zymographie (Figure 31A). La quantification relative de l'activité de la MMP9 dans les lavages broncho-alvéolaires montre que cette activité est augmentée chez les souris sauvages OVA en comparaison avec les souris PBS sauvages, ainsi qu'entre les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA et les souris NTN<sup>-/-</sup> PBS. En comparant l'activité relative de la MMP9 entre les souris sauvages OVA et NTN<sup>-/-</sup> OVA, il apparaît que la MMP9 est 2 fois plus active dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> comparées aux souris sauvages, pouvant ainsi engendrer un remodelage des tissus plus important.

L'accumulation de fibres de collagène autour des bronchioles est un autre paramètre associé à l'activité de la MMP9 et lié à l'inflammation chronique au niveau des voies respiratoires. Afin de quantifier le niveau de dépôt du collagène dans notre étude, des coupes histologiques de poumons colorées au trichome de Masson ont alors été observées (Figure 31B). L'analyse morphométrique révèle un épaissement des fibres de collagène chez les souris sauvages OVA et NTN<sup>-/-</sup> OVA par rapport aux souris sauvages PBS et NTN<sup>-/-</sup> PBS. L'accumulation de ces fibres de collagène est de façon significative supérieure chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA comparées aux souris sauvages OVA. Ainsi, l'absence de NTN chez la souris entraîne un remodelage des tissus au niveau des poumons beaucoup plus important dans les souris NTN<sup>-/-</sup> que dans les souris sauvages.

-----



**Figure 31** : Influence de la NTN sur les paramètres de l'inflammation suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA (4)

L'activité relative de la MMP9 a été quantifiée dans les poumons des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (A). Marquage et quantification du collagène péri-bronchiolaire sur des coupes histologiques de poumons colorées au trichrome de Masson chez des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> (B).





#### IV. Effet anti-inflammatoire de la NTN *in vitro*

Afin de tester l'effet anti-inflammatoire de la NTN *in vitro*, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris sauvages ont été stimulées par de l'OVA, en présence de doses croissantes de NTN, puis mises en contact avec des lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate de souris sauvages OVA. Les taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  sécrétés ont été mesurés par CBA dans le surnageant de ces co-cultures (Figure 32A). Ces mesures montrent que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  par les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4+ est diminuée de façon significative en présence des différentes doses de NTN. Cependant, aucun effet-dose n'est observé sur la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  en fonction des concentrations de NTN testées.

En parallèle, l'effet anti-inflammatoire de la NTN a été étudié sur une lignée de cellules épithéliales de poumons, les cellules LA-4 (Figure 32B). Ces cellules ont été cultivées dans un système d'interface air-liquide afin de mimer l'épithélium respiratoire puis ces cellules ont été stimulées du côté apical avec de l'OVA en présence ou non de NTN. Le taux d'IL-6 sécrétée a été mesuré par CBA dans le surnageant de culture de ces cellules. Les résultats montrent qu'en présence de NTN, la sécrétion d'IL-6 est diminuée de façon significative par rapport à la condition avec OVA en absence de NTN. Ces expériences démontrent que la NTN a un effet anti-inflammatoire au niveau des cellules épithéliales, des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+, en limitant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ .

-----

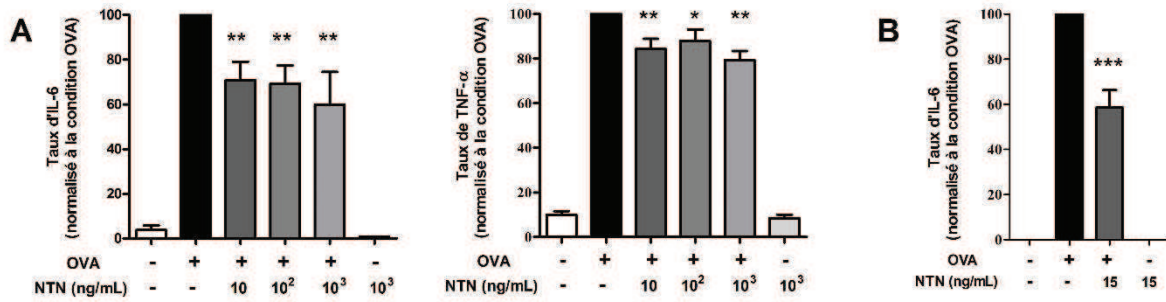


Figure 32 : Effet anti-inflammatoire de la NTN *in vitro*.

Les taux d'IL-6 et de TNF-α ont été mesurés dans les surnageants de co-culture de cellules dendritiques avec des lymphocytes T CD4+ issus de souris sauvages et activées avec de l'OVA en présence de doses croissantes de NTN (de 10 ng/mL à 1 µg/mL) (A). Le taux d'IL-6 a également été mesuré dans le surnageant de culture des cellules épithéliales LA-4 activées avec de l'OVA, en présence de 15 ng/mL de NTN (C). Les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle positif de l'expérience correspondant à la culture des cellules avec de l'OVA.

-----

## V. Voies de signalisation de la NTN

### A. Expression des récepteurs GFR $\alpha$ 2 et RET

Dans le but de déterminer par quelles voies de signalisation la NTN pourrait agir sur les cellules immunitaires et les cellules épithéliales, la présence des récepteurs de la NTN a été testée par PCR quantitative sur ces cellules (Figure 33A). Les résultats montrent que les ARNm de GFR $\alpha$ 2 et RET sont exprimés par les cellules épithéliales LA-4. Cette expression est retrouvée aussi au niveau des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ou issues de la rate de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Cependant, l'analyse quantitative ne révèle aucune différence dans le niveau d'expression de ces ARNm entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Les ARNm de GFR $\alpha$ 2 et RET sont également exprimés au niveau des poumons des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> sans différence significative d'expression.

L'expression de RET a aussi été analysée au niveau protéique par cytométrie de flux grâce à un marquage intracellulaire (Figure 33B). L'analyse des résultats révèle que les cellules de poumons des souris sauvages PBS et OVA expriment la protéine RET de façon équivalente. Les cellules de poumons des souris NTN<sup>-/-</sup> PBS et OVA expriment également RET au niveau protéique mais à un niveau supérieur au niveau d'expression dans les cellules des poumons des souris sauvages. Les récepteurs de la NTN étant présents au niveau des cellules épithéliales, des cellules dendritiques et au niveau des poumons, ces résultats suggèrent que la NTN est capable d'agir directement au niveau de ces cellules lors de l'inflammation des voies respiratoires.

-----

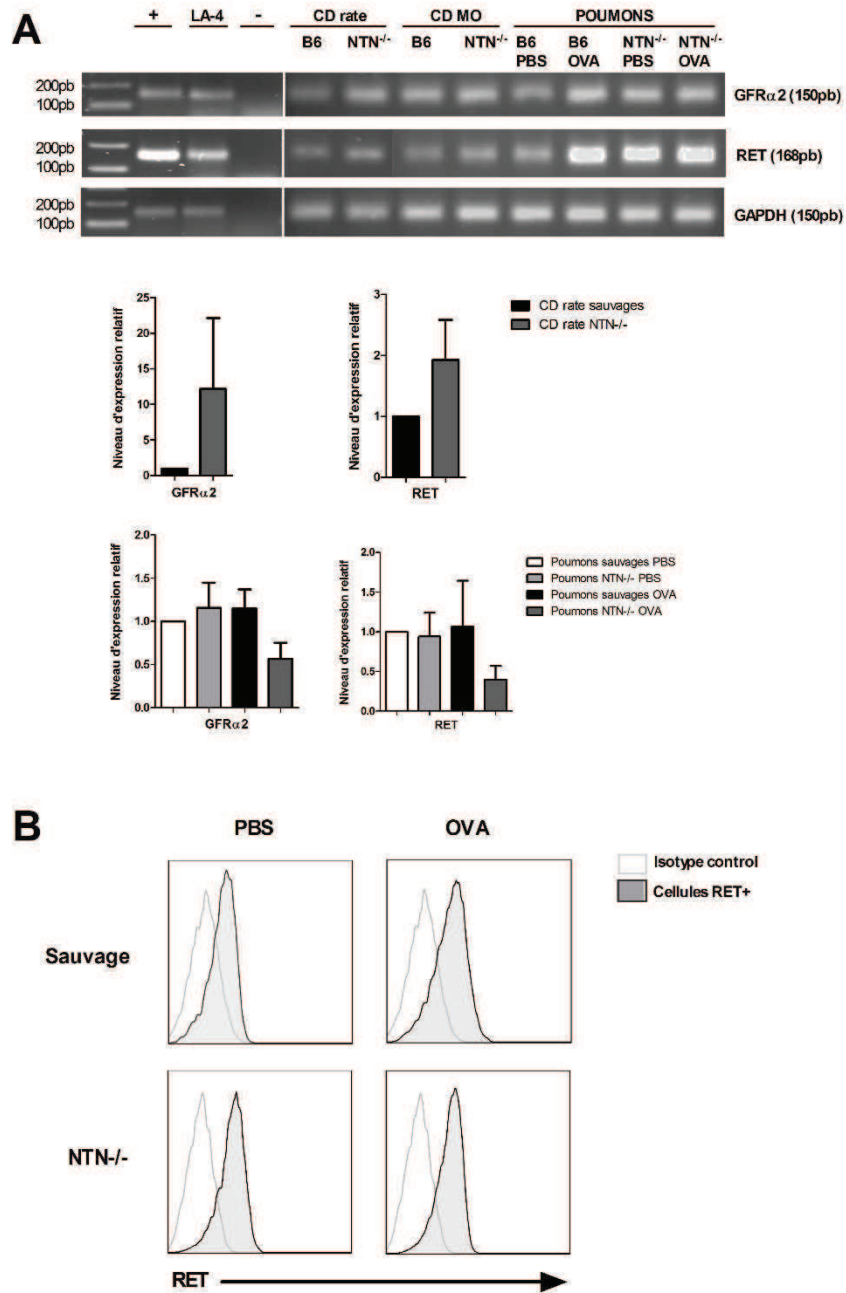


Figure 33 : Voies de signalisation de la NTN (1)

L'expression du récepteur GFR $\alpha$ 2 et du corécepteur RET de la NTN a été testée par PCR quantitative sur le cerveau (contrôle positif), les cellules épithéliales LA-4, les cellules dendritiques issues de la rate (CD rate) ou dérivées de la moelle osseuse (CD MO), ainsi que dans les poumons des souris sauvages (B6) et NTN<sup>-/-</sup> PBS et OVA après un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires (A). Le GAPDH a été utilisée comme gène de référence. L'expression de RET au niveau protéique a été analysée par cytométrie de flux (B). L'isotype contrôle est représenté par le trait gris clair et l'expression de RET par le trait noir. - : témoin négatif ; pb : paires de bases

## B. Niveau d'expression de l'ATF3 dans les poumons des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>

Afin de définir la voie de signalisation intracellulaire activée par la NTN, le niveau d'expression du facteur de transcription ATF-3, impliqué dans la régulation de l'expression des cytokines Th2, IL-6 et TNF- $\alpha$ , a été quantifié par Western blot dans les poumons des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ayant subi un protocole d'inflammation chronique avec de l'OVA (Figure 34).

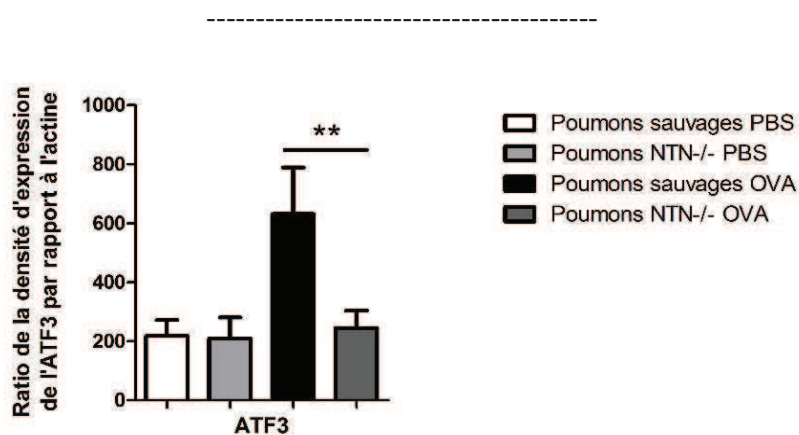


Figure 34 : Voies de signalisation de la NTN (2).

Le niveau d'expression de l'ATF-3 (rapporté à celui de l'actine) a été quantifié dans les poumons de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> PBS et OVA, après un protocole d'inflammation chronique avec de l'OVA.

En accordance avec Gilchrist et al. (Gilchrist et al., 2008), les résultats montrent une augmentation du niveau d'ATF3 chez les souris sauvages OVA comparées aux souris sauvages PBS. Cependant, cette augmentation n'est pas observée chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA comparativement aux souris NTN<sup>-/-</sup> PBS. Bien plus, le niveau d'expression de l'ATF3 est significativement inférieur chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA par rapport aux souris sauvages OVA. Cette observation suggère qu'il existe un défaut d'inhibition de la régulation de la réponse inflammatoire lié à la faible expression de l'ATF3 au niveau des cellules de poumons chez les souris NTN<sup>-/-</sup>.



# Discussion

---





Le rôle de la NTN dans la régulation de l'inflammation des voies respiratoires, d'un point de vue immunitaire ou neurologique, n'a pas encore été déterminé. Ainsi, dans le présent travail, nous avons étudié l'influence de la NTN dans l'inflammation neurogène au niveau des voies respiratoires et dans différents modèles d'asthme allergique induits chez la souris (Figure 30).

L'absence de NTN chez les souris NTN<sup>-/-</sup> n'entraîne aucune modification significative de la densité d'innervation de la trachée ou de la capacité d'excitabilité des fibres nerveuses innervant les muscles lisses de la trachée par rapport aux souris sauvages. De plus, aucune différence n'est observée au niveau de l'activation des cellules des ganglions de la racine dorsale entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>.

Par contre, les splénocytes totaux issus des souris NTN<sup>-/-</sup> ont une plus grande capacité à sécréter des cytokines de type Th2 comparativement aux souris sauvages. D'une part, les cellules dendritiques issues de la rate présentent un phénotype plus mature par rapport aux cellules sauvages. Cette caractéristique n'est pas partagée par les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse. D'autre part, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les cellules dendritiques provenant des souris NTN<sup>-/-</sup> participent à l'hyperréactivité retrouvée chez ces souris, suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires induit avec de l'OVA.

Il est à noter que les souris NTN<sup>-/-</sup> développent ce même phénotype, suite à l'inflammation des voies respiratoires induite par de l'HDM, allergène communément impliqué dans la pathologie de l'asthme chez l'homme.

Lors d'une exposition chronique à l'OVA, les souris NTN<sup>-/-</sup> présentent une plus forte inflammation des voies respiratoires comparativement aux souris sauvages, ainsi qu'un remodelage des tissus plus important.

Les effets anti-inflammatoires de la NTN ont été montrés in vitro en analysant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi que les cellules épithéliales. Ces différents types cellulaires s'avèrent être sensibles aux effets de la NTN, notamment via l'activation de la voie de signalisation induite par l'interaction entre la NTN et son récepteur GFR $\alpha$ 2 et son corécepteur RET. Ces faits suggèrent que la NTN exerce une action directe sur ces différents types de cellules.

Ces travaux ont donc apporté des précisions sur le rôle de la NTN au cours de l'inflammation des voies respiratoires. Dans les pages qui suivent, je me propose de discuter ces résultats point par point.

### 1. Implication de la NTN dans l'inflammation neurogène au niveau des voies respiratoires

L'absence de NTN lors du développement des voies respiratoires chez les souris NTN<sup>-/-</sup> n'induit aucune modification de l'innervation totale des muscles lisses de la trachée. En effet, le marquage immunofluorescent des fibres nerveuses totales, au niveau de l'extrémité de la trachée et de la bifurcation des bronches, n'a révélé aucune différence de densité d'innervation des muscles lisses entre les souris sauvages et les souris NTN<sup>-/-</sup> dans nos expériences. Il a pourtant été montré que la NTN est importante pour assurer le développement et le maintien des fibres nerveuses, notamment les fibres parasympathiques au niveau des glandes lacrymales (Heuckeroth et al., 1999). Il est à noter que ce rôle pourrait également être joué par le GDNF, un autre membre des GFLs, qui s'avère capable d'induire la croissance de fibres nerveuses dans un explant de poumon prélevé au stade embryonnaire (Tollet et al., 2002). Le marquage des fibres sensibles, fortement impliquées dans la régulation du tonus des muscles lisses des voies respiratoires, n'a pas plus révélé de différence de densité d'innervation entre les souris sauvages et les souris NTN<sup>-/-</sup>. Pourtant, la NTN intervient dans le développement des fibres nerveuses sensibles au peptide vasoactif intestinal ou à la substance P, en particulier au niveau du tractus digestif (Heuckeroth et al., 1999). Nos résultats suggèrent ainsi que l'absence de NTN n'influence pas le développement du système nerveux au niveau des voies respiratoires. Ces données restent inchangées, suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires induit avec de l'OVA. Ces dernières données sont en accord avec les résultats de Veres et al., qui montrent que la sensibilisation et la stimulation des souris avec de l'OVA n'entraîne pas de modification de la densité d'innervation par les fibres nerveuses sensibles (Veres et al., 2007).

Le système de bain d'organes permet d'étudier la réactivité des cellules musculaires lisses en réponse à différents stimuli. L'activation des fibres nerveuses parasympathiques par des stimulations électriques entraîne la libération d'acétylcholine, qui entraîne à son tour la

contraction des fibres musculaires lisses de la trachée. Une étude a montré que l'augmentation du NGF, membre de la famille des neurotrophines, au niveau des poumons, entraîne l'hyperréactivité des voies respiratoires en influençant l'excitabilité des fibres nerveuses innervant la trachée de souris sauvages. Ce phénomène se retrouve aussi dans des souris transgéniques surexprimant le NGF au niveau des cellules épithéliales pulmonaires (Braun et al., 2001). La capacité d'excitabilité des fibres nerveuses de la trachée de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> a également été testée grâce à cette technique. Cependant, nos résultats n'ont montré aucune différence d'excitabilité des fibres nerveuses entre des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. En parallèle, une étude a montré que l'augmentation du taux d'IgE spécifiques produites suite à la sensibilisation de souris BALB/c avec de l'OVA participe au développement de l'hyperréactivité neuronale des voies respiratoires (Hamelmann et al., 1999). Dans notre étude, ni les souris sauvages ni les souris NTN<sup>-/-</sup> sensibilisées et stimulées par de l'OVA n'ont montré une réduction de la capacité d'excitabilité des fibres innervant leur trachée. La présence d'adjuvant et le mode d'administration utilisé dans nos expériences entraîne pourtant la production d'IgE spécifiques (Michel et al., 2011). Cependant, les souris C57BL/6 que nous testons présentent certaines caractéristiques de l'asthme allergique induit par l'OVA, qui se révèlent moins marquées que chez les souris BALB/c, en particulier en ce qui concerne la production d'IgE spécifiques (Zhang et al., 1997). Ainsi, dans notre modèle animal, l'absence de NTN ne semble pas influencer l'hyperréactivité des voies respiratoires médiée par la contraction des muscles lisses de la trachée via la libération d'acétylcholine par les fibres nerveuses parasympathiques. Toutefois, la mesure de la réactivité des voies respiratoires est en partie liée à la masse de muscles lisses autour de la trachée (Florio et al., 1996). Sachant que l'augmentation de cette masse est une caractéristique de l'asthme chronique (Al-Muhsen et al., 2011), notre modèle d'inflammation *aiguë* des voies respiratoires ne permet peut-être pas de mettre en évidence une différence entre les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Le modèle d'inflammation *chronique* des voies respiratoires devrait alors être mieux adapté pour tester l'hypothèse que l'absence de NTN chez les souris entraînerait un défaut d'innervation des voies respiratoires.

Une étude a montré que les cellules nerveuses des ganglions de la racine dorsale innervant les poumons chez la souris expriment à la fois le TRPV1, la substance P et le TrkA, suggérant une implication de ces cellules dans la modulation de l'inflammation neurogène dans les

maladies touchant les voies respiratoires (Dinh et al., 2004). Dans notre modèle d'inflammation aiguë des voies respiratoires, le niveau d'activation des cellules des ganglions de la racine dorsale des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> a été testé en mesurant la production de substance P par ELISA. Les résultats, étant inférieurs à la limite de détection du test utilisé, laissent supposer que la libération de substance P par les cellules des ganglions de la racine dorsale n'influencerait pas le niveau de la réaction allergique induite chez les souris NTN<sup>-/-</sup> dans nos expériences. Cependant, il a été montré que des éosinophiles activés issus de patients allergiques et/ou asthmatiques, entraînent *in vitro* une augmentation de la sécrétion de substance P par les cellules des ganglions de la racine dorsale issues de rats (Garland et al., 1997). Les souris utilisées dans notre modèle d'inflammation aiguë des voies respiratoires induit avec de l'OVA présentant une forte infiltration d'éosinophiles au niveau des poumons (Michel et al., 2011), on ne peut exclure le fait que la non détection de substance P pourrait signifier, plus « simplement », que la mise en œuvre de cette expérience ou le choix du kit utilisé ne seraient pas adaptés à notre protocole.

## 2. Implication de la NTN dans l'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA

Le recrutement des lymphocytes T au niveau des poumons, en particulier des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, survient suite à la sensibilisation et à la stimulation des souris par un allergène. Ces cellules expriment des molécules de surface caractéristiques de lymphocytes T activés et de lymphocytes T mémoires (Kennedy et al., 1995). Dans un contexte d'asthme allergique, ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vont principalement sécréter des cytokines de type Th2 suite à leur interaction avec les cellules dendritiques au niveau des voies respiratoires. Cependant, il a été montré que les organes lymphoïdes secondaires, notamment les ganglions lymphatiques médiastinaux et la rate, jouent un rôle important dans le développement de la réponse Th2 suite à l'exposition à un allergène respiratoire (Gajewska et al., 2001) (Cheng et al., 2003). Les résultats précédemment obtenus au laboratoire sont en accord avec ces données. En effet, suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires induit avec de l'OVA, les cellules des ganglions médiastinaux issues de souris OVA, restimulées *in vitro* avec de l'OVA en présence d'IL-2, ont la capacité de produire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. De plus,

il a été observé que les cellules issues des souris NTN<sup>-/-</sup> produisent plus de cytokines de type Th2 que ne le font les cellules issues de souris sauvages (Michel et al., 2011). Cette production de cytokines de type Th2 a également été comparée dans la rate. A cette fin, les splénocytes totaux ont été restimulés *in vitro* avec de l'OVA en présence d'IL-2. Dans ces conditions, il s'avère que les cellules, issues de souris OVA NTN<sup>-/-</sup>, ont une plus grande capacité à sécréter de l'IL-4 en comparaison avec les splénocytes des souris OVA sauvages. La même tendance a été observée pour l'IL-5 et l'IL-13. Ces résultats indiquent que les cellules immunitaires présentes dans la rate contribuent à la forte réponse de type Th2 retrouvée chez les souris NTN<sup>-/-</sup> lors de l'inflammation aiguë des voies respiratoires.

Une étude a également montré l'implication des cellules dendritiques dans la réponse de type Th2 au niveau de la rate (Hammad et al., 2000). A cette fin, des PBMCs de patients allergiques ont été réinjectées chez des souris SCID (« Severe Combined ImmunoDeficiency »). Suite à l'exposition de ces souris à un allergène respiratoire, les cellules dendritiques humaines ont démontré leur capacité à migrer jusqu'à la rate où elles vont induire la sécrétion de cytokines de type Th2 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces résultats nous ont amenés à tester la capacité des cellules dendritiques et des lymphocytes T, issus de la rate, à influencer la forte réponse inflammatoire retrouvée chez les souris NTN<sup>-/-</sup>. Pour ce faire, les cellules dendritiques issues de la rate ont été cultivées *in vitro* en présence de GM-CSF, entraînant leur maturation caractérisée par l'expression des molécules CMHII, et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, toutes nécessaires à leur interaction avec les lymphocytes T (Lu et al., 1995). Le phénotype des cellules dendritiques de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> a donc été comparé pour apprécier le niveau d'expression de ces molécules de co-stimulation, ainsi que leur capacité de phagocytose. Nos résultats montrent que, dans ces conditions de cultures, les cellules dendritiques issues des souris NTN<sup>-/-</sup> sont plus nombreuses à exprimer ces molécules de co-stimulation, qu'elles soient activées ou non avec des LPS ou de l'OVA. En particulier, en présence d'OVA, les cellules dendritiques issues des souris NTN<sup>-/-</sup> expriment davantage le CD86. Une étude a montré que dans un modèle d'asthme allergique utilisant des souris BALB/c, les cellules dendritiques expriment davantage le CD80 mais pas plus le CD86, lorsqu'elles sont issues de la rate de souris OVA, et comparées à des souris PBS (Cheng et al., 2003). Cependant, l'expression de ces deux

molécules de co-stimulation est régulée dans les heures qui suivent la rencontre avec l'allergène inhalé (Mathur et al., 1999). Nos résultats permettent alors d'émettre l'hypothèse que dans un environnement polarisé de type Th2, les cellules dendritiques des poumons migrant dans la rate seraient responsables de la sur-activation des lymphocytes T chez les souris NTN<sup>-/-</sup>.

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle différence de fonctionnalité, la capacité de phagocytose des cellules dendritiques issues de la rate de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> a été testée en présence de billes de collagène. Nos résultats n'ont pas montré d'augmentation de la capacité des cellules dendritiques de souris NTN<sup>-/-</sup> à phagocyter ces billes. Toutefois, l'internalisation des antigènes par les cellules dendritiques se fait par différents mécanismes qui varient avec la nature de l'antigène (Liu and Roche, 2015). Aussi, l'utilisation d'OVA couplée à un fluorochrome pourrait être une alternative à l'utilisation de billes de collagène pour tester notre hypothèse.

En parallèle, le phénotype et la capacité de phagocytose des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont également été comparés. Ces cellules ont été cultivées en présence de GM-CSF et d'IL-4, cette association de cytokines leur permettant d'atteindre un niveau de maturité optimal pour la présentation d'antigène, caractérisé par une forte expression des molécules CMHII, CD80 et CD86 (Labeur et al., 1999). Nos résultats ont montré que les cellules dendritiques NTN<sup>-/-</sup> présentent le même phénotype de maturation que les cellules dendritiques sauvages ainsi que la même capacité de phagocytose des billes. Ces résultats suggèrent que l'absence de NTN n'aurait pas d'influence sur les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse par comparaison avec les cellules dendritiques issues de la rate.

Dans le but de préciser le rôle des cellules dendritiques et/ou des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la forte réponse de type Th2 observée chez les souris NTN<sup>-/-</sup>, des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>, mises en présence de l'allergène OVA, ont été cultivées avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> purifiés à partir de la rate des souris OVA sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. Nos résultats ont montré que *in vitro*, les cellules dendritiques de souris NTN<sup>-/-</sup> ont une plus grande capacité à induire la sécrétion de cytokines de type Th2 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. De plus, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris NTN<sup>-/-</sup> ont également une

plus grande capacité à produire ces cytokines. La même tendance a été observée en présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> purifiés à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux. Dans ces expériences, des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ont été utilisées car la culture de ces cellules s'avère plus stable que celle des cellules dendritiques issues de la rate, notamment par rapport au nombre de cellules récoltées ou au pourcentage de cellules exprimant les molécules de co-stimulation impliquées dans l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette approche nous a permis d'obtenir des cultures « comparables » à partir de cellules issues de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>. De plus, une étude a montré que les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ont, *in vitro*, la même capacité de stimulation des lymphocytes T que des cellules dendritiques matures issues de la rate (Garrigan et al., 1996). Ces résultats, pris dans leur ensemble, laissent supposer que la NTN pourrait réguler négativement la réponse Th2 suite à l'inflammation aiguë des voies respiratoires. Ce contrôle pourrait provenir des cellules dendritiques par 3 signaux différents: (i) la présentation des peptides antigéniques via le complexe majeur d'histocompatibilité, (ii) l'activation de la prolifération des lymphocytes T via les molécules CD80 et CD86 et (iii) la polarisation des lymphocytes T via la sécrétion de cytokines spécifiques (Bakdash et al., 2013). Toutefois, ce contrôle pourrait passer par d'autres molécules qui sont également impliquées dans des voies de signalisation entraînant l'activation ou l'inhibition des lymphocytes T, notamment des molécules de la famille TIM ou de la superfamille du TNF. Par exemple, il a été montré que la molécule LIGHT, membre de la superfamille du TNF, intervient dans le contrôle du remodelage du tissu pulmonaire suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'HDM, en régulant la sécrétion de l'IL-13 et du TGF- $\beta$  (Doherty et al., 2011). Il serait intéressant de caractériser plus précisément le niveau d'expression de ces molécules de co-stimulation secondaires, présentes à la surface des cellules dendritiques issues de souris NTN<sup>-/-</sup>.

Afin de déterminer si les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris NTN<sup>-/-</sup> sont plus réactifs que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris sauvages, des expériences *in vivo* de transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans des souris immuno-déficientes Rag<sup>-/-</sup>, dépourvues de lymphocytes B et de lymphocytes T, ont été réalisées. En effet, une étude a montré que des lymphocytes Th2 spécifiques d'un antigène, issus d'un rat sensibilisé par cet allergène, sont capables



d'induire une inflammation allergique au niveau des poumons lorsqu'ils sont transférés chez un rat receveur naïf stimulé par ce même antigène (Li et al., 1998). Ce transfert de cellules entraîne alors une augmentation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5, une forte infiltration d'éosinophiles ainsi que l'hyperréactivité des voies respiratoires. Cependant, une étude a montré que l'inflammation des voies respiratoires après le transfert de lymphocytes T CD4+ dans des souris receveuses n'est possible qu'après la stimulation des souris avec l'allergène par voie aérienne (Hogan et al., 1998). Nos résultats ont montré que le transfert de lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate de souris NTN<sup>-/-</sup> entraîne une plus forte infiltration d'éosinophiles et de neutrophiles au niveau des voies respiratoires des souris receveuses, en comparaison avec des lymphocytes T CD4+ issus de souris sauvages. Ces résultats sont en accord avec d'autres études où il a été montré que les lymphocytes T CD4+, par leur capacité à sécréter de l'IL-5, jouent un rôle majeur dans le recrutement des éosinophiles au niveau des voies respiratoires dans un modèle d'asthme allergique chez la souris (Gavett et al., 1994; Nakajima et al., 1992). A l'inverse, une autre étude a montré que seuls des lymphocytes T CD4+, purifiés à partir de la rate de souris sensibilisées avec de l'OVA et réactivés *in vitro* avec de l'OVA pendant 3 jours, sont capables d'induire une inflammation allergique pulmonaire caractérisée par une infiltration d'éosinophiles suite à la stimulation des souris receveuses (Wise et al., 1999). Cependant, dans cette étude, les souris receveuses ont été stimulées 3 jours après le transfert des lymphocytes T CD4+ par une dose unique d'OVA sous forme d'aérosols. Dans nos expériences, les souris receveuses ont été stimulées par des instillations nasales d'OVA pendant 3 jours mais ces instillations n'ont été réalisées que 14 jours après le transfert des lymphocytes T CD4+. La mise au point de ces expériences nous a montré que ce délai de 14 jours après le transfert sont nécessaires pour que le nombre de lymphocytes T CD4+ retrouvés dans la rate et les poumons soit suffisant pour induire l'inflammation des voies respiratoires après la stimulation des souris avec de l'OVA. Pourtant, nos résultats nous ont également montré que le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles, au niveau des voies respiratoires, ne s'accompagne que d'une faible sécrétion (inférieure à 5 pg/mL) de cytokines de type Th2, notamment d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, dans les lavages broncho-alvéolaires des souris receveuses (données non présentées). Des études ont montré que le traitement des souris Rag<sup>-/-</sup>, avec de l'IL-25 ou de l'IL-33, deux cytokines pro-Th2, s'avère nécessaire pour induire la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13

dans les lavages broncho-alvéolaires de ces souris (Hurst et al., 2002) (Kondo et al., 2008). De plus, il a été montré que cette sécrétion de cytokines de type Th2 dépend d'autres types de cellules, présentes au niveau des poumons (Halim et al., 2012) ou de la rate (Fort et al., 2001), comme les cellules lymphoïdes innées, qui pourraient ainsi aider au développement des lymphocytes T CD4+ impliqués dans la réaction allergique. Ces observations laissent supposer que la faible production de cytokines de type Th2, dans les lavages broncho-alvéolaires de nos souris receveuses, pourrait être due à l'absence de sécrétion de cytokines pro-Th2 lors de la stimulation des souris avec de l'OVA. Les lymphocytes T CD4+ NTN<sup>-/-</sup> issus de la rate des souris receveuses, restimulés *in vitro* avec de l'OVA en présence d'IL-2, n'induisent pas de plus forte sécrétion de cytokines de type Th2 par rapport aux cellules sauvages. Ainsi, nos résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4+ purifiés à partir de la rate de souris NTN<sup>-/-</sup> ont une plus grande capacité à induire le recrutement d'éosinophiles et de neutrophiles, mais il semblerait que ce mécanisme soit indépendant de la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 ou d'IL-13.

### 3. Choix du modèle d'asthme chez la souris

Différents modèles d'asthme allergique chez la souris ont été utilisés dans notre étude. Le modèle utilisant l'allergène OVA en présence d'Al(OH)<sub>3</sub> pour sensibiliser les souris en I.P., suivie d'une exposition à l'OVA par des instillations nasales répétées, est un modèle largement utilisé pour mimer la pathologie de l'asthme humain chez la souris (Chapman et al., 2014). L'OVA est un antigène capable d'induire les principales caractéristiques d'une inflammation des voies respiratoires mais seulement si elle est administrée en présence d'Al(OH)<sub>3</sub> (Renz et al., 1992). Ainsi, la présence d'Al(OH)<sub>3</sub> comme adjuvant pendant la phase de sensibilisation permet de diriger la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2, s'accompagnant notamment de la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B, d'une prolifération de lymphocytes T CD4+ et de la production de cytokines de type Th2 (Brewer et al., 1999; Serre et al., 2008). De plus, l'OVA utilisée dans nos protocoles est contaminée par des LPS. Cette contamination peut participer à l'activation de la voie de signalisation du TLR4, au niveau des cellules épithéliales des voies respiratoires, entraînant alors la libération de médiateurs pro-inflammatoires induisant une réponse de type Th2 (McAlees et al., 2015).

Cependant, l'utilisation de l'OVA comme allergène peut aussi être contestée. En effet, la sensibilisation des souris est effectuée par voie I.P. alors que les humains peuvent être sensibilisés par voie respiratoire. De plus, l'OVA n'est pas très présente dans notre environnement, contrairement aux poussières d'acariens (HDM). Cet allergène est responsable d'allergies respiratoires chez la majorité des patients asthmatiques (Nelson et al., 1996). Il a été montré que l'HDM contient entre autres, les protéases Der p 1 et Der p 9 (Gregory and Lloyd, 2011), impliquées dans la dégradation des jonctions épithéliales permettant un passage plus aisé des allergènes vers les cellules dendritiques. D'autres composants de l'HDM, tel que les LPS, participent également à la réponse inflammatoire allergique en déclenchant la voie de signalisation du TLR4 au niveau des cellules épithéliales (Hammad et al., 2009). Ainsi, pour confirmer les résultats précédemment obtenus dans lesquels des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> développent les principales caractéristiques de l'asthme allergique suite à un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA, l'HDM a été utilisé comme allergène. Nos résultats ont montré que la sensibilisation et la stimulation des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> par des instillations nasales d'HDM entraînent le développement des caractéristiques de l'asthme allergique, telles que la production d'IgE spécifiques, l'infiltration d'éosinophiles ou encore la sécrétion de cytokines de type Th2. De plus, les souris NTN<sup>-/-</sup> développent une plus forte inflammation des voies respiratoires, comparativement aux souris sauvages, notamment pour ce qui concerne le nombre d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires. Ces résultats suggèrent que l'absence de NTN semble influencer la réponse de type Th2, dans nos deux modèles d'inflammation aiguë des voies respiratoires, induits avec de l'OVA ou de l'HDM. Toutefois, le taux d'IgE spécifiques de l'HDM est inférieur au taux d'IgE spécifiques de l'OVA observé chez les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>, cette différence pouvant provenir du mode d'administration de ces allergènes qui diffère dans nos deux types de protocoles.

#### 4. Implication de la NTN dans l'inflammation chronique des voies respiratoires

##### - Paramètres de l'inflammation

Le TGF- $\beta$  est une cytokine impliquée dans le remodelage des voies respiratoires dans l'asthme chronique (Doherty and Broide, 2007). Suite à un protocole d'inflammation aiguë

des voies respiratoires avec de l'OVA, le taux de cette cytokine est augmenté dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages. Cette observation nous a amené à étudier l'impact de l'absence de NTN dans un modèle d'asthme chronique. A cette fin, des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont été exposées de façon chronique à l'OVA. Comme précédemment montré, lors d'un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires (Michel et al., 2011), les souris NTN<sup>-/-</sup> produisent un plus grand nombre d'IgE spécifiques de l'OVA en comparaison avec les souris sauvages. Cette production d'IgE s'accompagne de la présence d'une forte infiltration cellulaire dans les lavages broncho-alvéolaires ainsi que la production de mucus dans les voies respiratoires de ces souris. De façon plus détaillée, l'analyse de la composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires a révélé une forte augmentation du nombre de neutrophiles chez les souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> OVA en comparaison avec les souris PBS. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études : (i) l'une, montrant l'importance des neutrophiles, dans l'apparition de la réponse asthmatique tardive chez des souris BALB/c sensibilisées et stimulées avec de l'OVA dans un modèle d'asthme chronique (Nabe et al., 2011) et, (ii) la seconde, montrant que l'activation de la voie de signalisation du TLR4, chez des souris sensibilisées et stimulées par de l'OVA en présence de LPS, entraîne une augmentation du nombre de neutrophiles au niveau des poumons ainsi que l'augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Duechs et al., 2011). De plus, l'apparition des neutrophiles, consécutive à l'infiltration des éosinophiles et des lymphocytes T CD4+, survient lorsque les souris sont stimulées à au moins 4 reprises (Nabe et al., 2005), ce qui est le cas dans notre protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA. Ces observations permettent d'expliquer l'augmentation du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires des souris utilisées dans nos expériences. De plus, l'infiltration des neutrophiles est bien plus importante chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA que chez les souris sauvages OVA. L'analyse de la sécrétion des cytokines dans les lavages broncho-alvéolaires a également montré une augmentation de la sécrétion de KC et de TNF- $\alpha$  chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA par rapport aux souris sauvages OVA. Ces cytokines sont impliquées dans l'hyperréactivité des voies respiratoires et le remodelage des poumons qui caractérisent la pathologie de l'asthme (Jeffery, 2004). Le recrutement des neutrophiles dans les poumons étant en partie médié par le KC et le TNF- $\alpha$ , les taux élevés de ces cytokines pourraient expliquer la plus forte infiltration de neutrophiles dans les lavages

broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup>. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'absence de NTN entraîne un dérèglement de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation chronique des voies respiratoires.

### - Remodelage des tissus

Les neutrophiles activés sont impliqués dans la sécrétion de la MMP9 retrouvée dans les lavages broncho-alvéolaires. Cette métalloprotéase matricielle participe au remodelage du tissu pulmonaire lors de l'inflammation chronique des voies respiratoires (Ventura et al., 2014). La quantification de l'activité relative de la MMP9 révèle que son activité est 2 fois plus importante dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NTN<sup>-/-</sup> OVA par comparaison avec les souris sauvages OVA. L'augmentation de son activité s'accompagne d'une augmentation de l'accumulation de fibres de collagène autour des bronchioles chez les souris NTN<sup>-/-</sup> OVA par rapport aux souris sauvages OVA. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'absence de NTN entraîne un remodelage des tissus plus importants. Une des hypothèses serait que la NTN agirait sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation chronique des voies respiratoires par l'intermédiaire des neutrophiles. Une autre hypothèse, au regard des résultats observés avec des membres de la famille des neurotrophines (Hahn et al., 2006), serait que la NTN, sécrétée par les cellules épithéliales en réponse à un allergène, ait un rôle direct et anti-inflammatoire sur les neutrophiles, modulant ainsi l'activité de la MMP9 et le dépôt de fibres de collagène dans notre modèle d'asthme chronique. En effet, le NGF et le BDNF qui sont principalement produits par les cellules épithéliales chez les souris ayant subi un protocole d'asthme chronique, entraînent la survie des éosinophiles lors de l'inflammation chronique des voies respiratoires.

## 5. Effet anti-inflammatoire de la NTN

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire ont montré que, dans un protocole d'inflammation aiguë des voies respiratoires avec de l'OVA, l'addition de NTN par des instillations nasales avant la stimulation des souris avec l'OVA, permet de limiter l'inflammation des voies respiratoires en réduisant le nombre d'éosinophiles et la sécrétion des cytokines de type Th2 dans les lavages broncho-alvéolaires (Michel et al., 2011).

Cependant, afin de déterminer de quelle façon la NTN agit sur les paramètres de l'inflammation, les effets anti-inflammatoires de la NTN ont été testés *in vitro*. Le niveau de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, IL-6 et TNF- $\alpha$ , par les cellules épithéliales et par des cellules dendritiques cultivées avec les lymphocytes T CD4+, a été analysé en présence ou en absence de NTN. Ces 2 cytokines pro-inflammatoires sont importantes pour le développement de la réponse Th2 et le remodelage des tissus. L'IL-6 participe à la différenciation des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes T de type Th2, en induisant la production endogène de l'IL-4 nécessaire à ce processus (Rincon et al., 1997). De plus, le TNF- $\alpha$  participe au remodelage des poumons lors de l'inflammation chronique des voies respiratoires (Jeffery, 2004). Nos expériences ont montré que l'addition de NTN dans les cultures de ces cellules stimulées en présence d'OVA entraîne, de façon significative, une diminution de la sécrétion de ces 2 cytokines. Ces résultats laissent supposer que la NTN est capable d'agir sur les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+ et les cellules épithéliales en inhibant la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , limitant ainsi le développement de la réponse Th2 et le remodelage des poumons. Dans ce sens, une étude a montré que l'ajout de NTN, sur des PBMCs activés, entraîne la diminution de la sécrétion de TNF- $\alpha$ , confortant notre hypothèse du rôle anti-inflammatoire de la NTN sur les cellules immunitaires (Vargas-Leal et al., 2005). Notre hypothèse est également confortée par les résultats précédemment évoqués qui ont montré qu'en l'absence de NTN, les taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  sont supérieurs dans les lavages broncho-alvéolaires des souris ayant subi un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA.

## 6. Expression des récepteurs et voies de signalisation de la NTN

Afin de déterminer par quelle voie de signalisation la NTN est capable d'agir, nous avons étudié par PCR quantitative, l'expression du récepteur GFR $\alpha$ 2, et son co-récepteur RET, au niveau des poumons, des cellules dendritiques et des cellules épithéliales LA-4. Plusieurs études ont montré l'expression de la NTN et de ses récepteurs au niveau des voies respiratoires chez la souris (Widenfalk et al., 1997) (Golden et al., 1999). Nos résultats ont montré que l'ARNm des récepteurs de la NTN est exprimé par les cellules épithéliales LA-4, les cellules dendritiques issues de la rate ou dérivées de la moelle osseuse ainsi qu'au niveau

des poumons chez les souris ayant subi un protocole d'inflammation des voies respiratoires avec de l'OVA. Ces résultats suggèrent ainsi une action directe de la NTN sur ces cellules. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus au laboratoire qui ont montré l'expression de GFR $\alpha$ 2 au niveau des poumons et des ganglions médiastinaux chez la souris (Michel et al., 2011). En parallèle, l'expression de GFR $\alpha$ 2 et RET a également été montrée chez l'homme et la souris, au niveau des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD4+ (Almeida et al., 2014; Vargas-Leal et al., 2005). Cette étude chez l'homme a également montré que les lymphocytes T CD4+ sont capables de sécréter des facteurs neurotrophiques telle que la NTN *in vitro* (Vargas-Leal et al., 2005). De plus, en présence de NTN ou de GDNF, l'activation de RET au niveau de lymphocytes T naifs cultivés en conditions Th2, régule la production d'IL-10 (Almeida et al., 2014). L'IL-10 étant une cytokine régulatrice capable d'inhiber la réponse Th2 induite dans un contexte allergique (Hawrylowicz and O'Garra, 2005), ces résultats suggèrent que la NTN, via l'activation de GFR $\alpha$ 2 et de RET, pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire de type Th2 impliquée dans la pathologie de l'asthme. Dans ce sens, une étude a montré l'implication de RET, co-récepteur de la NTN, dans la modulation des réponses immunitaires, notamment dans le processus d'inflammation (Rusmini et al., 2014). Ainsi, les auteurs ont montré une corrélation positive entre le niveau d'expression des transcrits de RET et de l'IL-8 (équivalent de la chémokine KC chez la souris) dans des PBMCs activées en présence de GDNF, un autre membre de la famille des GFLs.

En parallèle, une autre voie de signalisation indépendante de RET a été mise en évidence. En effet, il a été montré *in vitro* sur des cellules RET<sup>-/-</sup>, que le GDNF peut agir indépendamment de RET via son récepteur GFR $\alpha$ 1, couplé à une tyrosine kinase de la famille Src. Cette interaction entraîne la phosphorylation des isoformes ERK1/2 de la voie des MAPK ainsi que la phosphorylation de facteurs de transcription appartenant à la famille des CREB tel que l'ATF-1 (Poteryaev et al., 1999). Ces données laissent supposer que la NTN peut agir via son récepteur GFR $\alpha$ 2, et indépendamment de RET, afin de moduler la réponse Th2 dans l'asthme. L'ATF3 est un régulateur négatif de la réponse Th2 dans l'inflammation des voies respiratoires (Gilchrist et al., 2008). En effet, ce facteur de transcription est exprimé à un faible niveau dans les cellules immunitaires inactivées. Suite à l'activation des cellules immunitaires, l'ATF3, dont l'expression est augmentée, régule alors la production de

cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , par un mécanisme de rétrocontrôle négatif, afin de limiter la réponse inflammatoire (Thompson et al., 2009) (Gilchrist et al., 2008). Nos résultats ont montré que le niveau d'expression de l'ATF3 n'est pas augmenté chez les souris NTN<sup>-/-</sup> contrairement aux souris sauvages, suite à une inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA. Cette observation laisse supposer que la NTN agirait sur le niveau d'expression de ce facteur de transcription pour réguler la production des cytokines de type Th2 et des cytokines pro-inflammatoires lors de l'inflammation des voies respiratoires. Dans ce sens, une étude a montré que la NTN est capable d'inhiber l'expression de l'ATF3 *in vitro*, dans des cultures de neurones cardiaques, via l'activation de la voie de signalisation du complexe GFR $\alpha$ 2/RET (Young et al., 2008). Cependant, le mécanisme d'action de la NTN au niveau des cellules immunitaires ou des cellules épithéliales reste à être déterminé lors de l'inflammation des voies respiratoires.



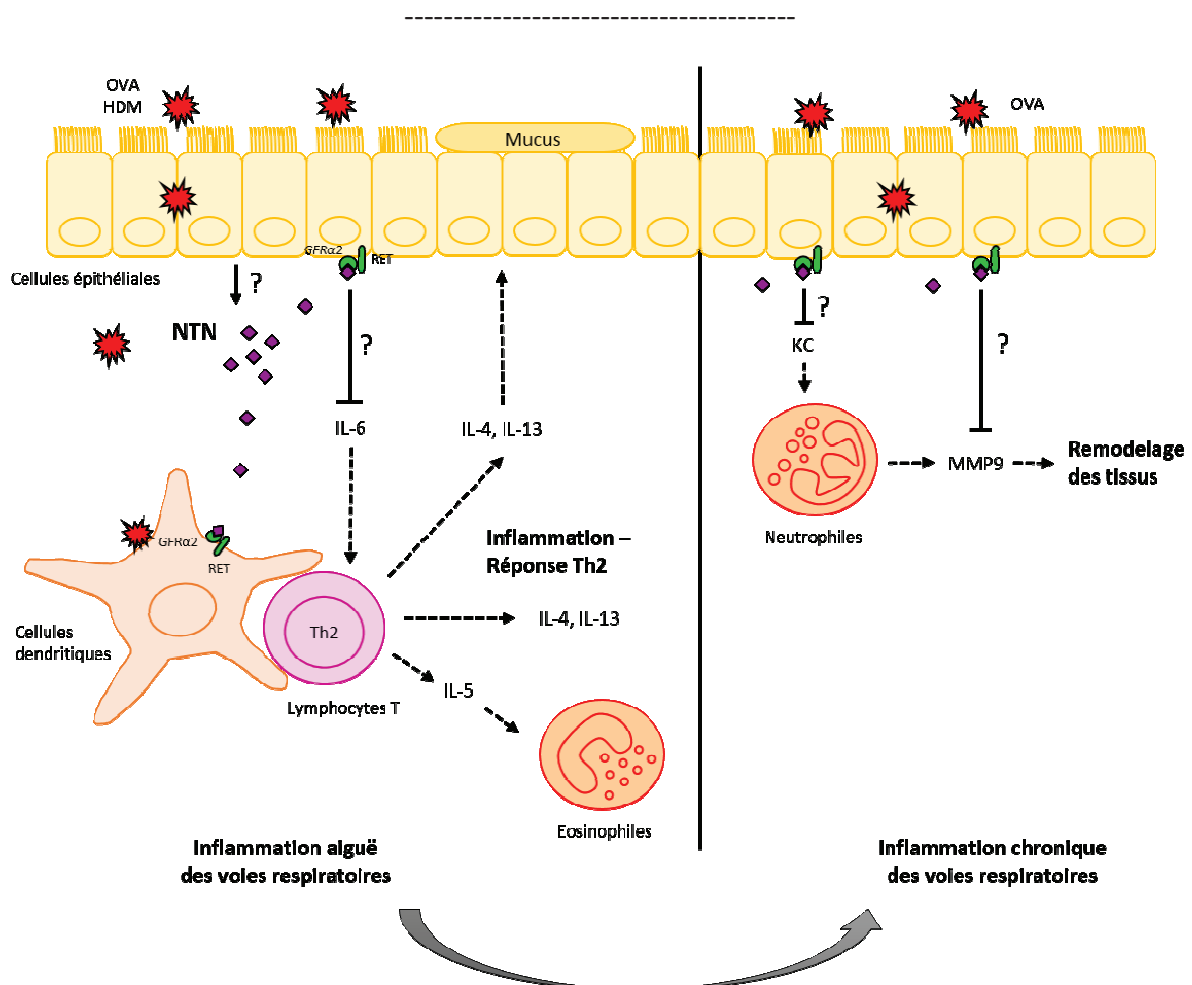


# Conclusion - Perspectives

---



D'après nos résultats, la NTN jouerait un rôle important dans la régulation de l'inflammation des voies respiratoires dans nos modèles d'asthme allergique chez la souris. Mon travail a permis de définir son action au niveau des cellules immunitaires impliquées dans la réaction inflammatoire chez les souris NTN<sup>-/-</sup>. Plus précisément, cette molécule interviendrait dans la modulation de la sécrétion de cytokines de types Th2 à l'origine des principaux symptômes de l'asthme, notamment lors de la réponse immunitaire immédiate. La NTN interviendrait également lors de la réponse immunitaire tardive, caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires et le remodelage des tissus, en régulant ces deux mécanismes (Figure 35). Cependant, les modes d'action *in vivo* de la NTN sont encore à définir afin de valider nos hypothèses.



**Figure 35 :** Hypothèse du mécanisme d'action de la NTN dans l'inflammation des voies respiratoires.

Suite à la rencontre avec un allergène, les cellules épithéliales pourraient produire la NTN qui agirait à la fois sur les cellules épithéliales et sur les cellules immunitaires. Elle pourrait

ainsi moduler la réponse inflammatoire, notamment par le contrôle de la sécrétion des cytokines impliquées dans l'inflammation des voies respiratoires dans nos différents modèles d'asthme. Ainsi, la NTN serait capable d'inhiber la production de cytokines de type Th2, lors de l'inflammation aiguë des voies respiratoires et la production des cytokines pro-inflammatoires menant au remodelage des tissus, lors de l'inflammation chronique des voies respiratoires.

-----

Il serait ainsi intéressant de déterminer les différents types cellulaires capables de produire la NTN en réponse à une stimulation par un allergène respiratoire. Une possibilité serait de doser le taux de NTN dans différents échantillons : (i) dans les lavages broncho-alvéolaires de souris sauvages, suite à un protocole d'inflammation des voies respiratoires et, (ii) dans les surnageants de culture de cellules dendritiques, de lymphocytes Th2 ou de cellules épithéliales, en présence ou en absence d'un allergène (OVA ou HDM). Les résultats de ces expériences permettrait de tester notre hypothèse, à savoir que les cellules épithéliales sont capables de produire de la NTN, comme d'autres facteurs neurotrophiques (Hahn et al., 2006) et ainsi, influencer la réponse inflammatoire. Il existe quelques kits commerciaux permettant de doser la NTN mais ils ne sont mentionnés dans aucune publication et l'utilisation de certains de ces kits nous a montré que leur spécificité restait à prouver. C'est pourquoi nous sommes actuellement en train de mettre au point un test ELISA, au sein du laboratoire, afin de doser la NTN dans nos échantillons issus des souris utilisées dans nos expériences. Par ailleurs, nous savons à présent que la plupart des cellules impliquées dans cette réponse inflammatoire - cellules épithéliales, cellules dendritiques et lymphocytes de type Th2 - expriment les récepteurs de la NTN. Ainsi, une action directe de la NTN sur ces cellules, au moyen de boucle autocrine ou d'une sécrétion paracrine, pourrait être envisagée pour valider l'hypothèse que la NTN est capable de limiter l'inflammation des voies respiratoires dans un modèle d'asthme allergique.

Il nous paraît également important de déterminer l'impact de la NTN sur les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation des voies respiratoires. L'ATF3, facteur de transcription qui régule négativement les réponses Th2 (Gilchrist et al., 2008), ou encore le NF- $\kappa$ B, facteur de transcription au cœur de la régulation des réponses immunitaires au

niveau des cellules épithéliales (Tully et al., 2013), nous paraissent être de bons candidats. Rappelons à ce propos que l'existence d'un lien entre l'absence de NTN et le niveau d'expression de l'ATF3 a été mise en évidence au niveau des poumons des souris, suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'influence de la NTN sur ces facteurs de transcription dans nos différents modèles d'asthme allergique, en particulier au niveau des différents types cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire, comme les cellules dendritiques, les lymphocytes de type Th2 ou les cellules épithéliales. Ces dernières jouant un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire, suite à l'exposition à un allergène, des expériences de PCR quantitatives sont d'ores et déjà en cours au laboratoire pour déterminer l'influence de la NTN sur le niveau d'expression de l'ATF3 dans les cellules épithéliales LA-4 activés par de l'OVA ou de l'HDM.

D'autres facteurs sont associés à la pathologie de l'asthme et peuvent être analysés au niveau des cellules épithéliales, en particulier, l'intégrité de la barrière physique que forment ces cellules. Ainsi, la mesure de la résistance transépithéliale ou du niveau d'expression des molécules impliquées dans les jonctions intercellulaires, suite à l'activation des cellules épithéliales avec un allergène et en présence de NTN, pourraient nous apporter des précisions sur le rôle tenu par la NTN dans l'intégrité de la barrière épithéliale. C'est ainsi que certaines de nos expériences ont déjà montré que : (i) il existe une diminution significative de l'expression de l'E-cadhérine dans les poumons des souris NTN<sup>-/-</sup>, en comparaison aux souris sauvages, suite à un protocole d'inflammation chronique des voies respiratoires avec de l'OVA et (ii) l'addition de NTN dans une culture air-liquide de cellules épithéliales LA-4 limite l'altération de l'intégrité de l'épithélium que forment ces cellules.

Il nous paraît également intéressant de caractériser les différents sous-types cellulaires qui participent à la réponse inflammatoire au niveau des poumons des souris NTN<sup>-/-</sup>, en particulier les sous-types de lymphocytes T tels que les lymphocytes T régulateurs ou les cellules lymphoïdes innées de type 2. En effet, ces dernières jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'asthme (Lund et al., 2013). Ainsi, elles pourraient contribuer au développement du phénotype observé chez les souris NTN<sup>-/-</sup>, suite à un protocole d'inflammation des voies respiratoires. Des expériences de marquage multi-couleurs sont actuellement en cours au laboratoire afin de déterminer le niveau d'activation de différents

sous-types de lymphocytes T issus de souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup>, afin de comparer l'expression de récepteurs de surface ou de facteurs de transcription au niveau des lymphocytes de type Th2 (TCR  $\alpha\beta$ , CD3, CD4, CCR4, IL-17RB, IL-33R/ST2, GATA-3 et STAT-6), des lymphocytes T régulateurs (CD3, CD4, CD25 et CD62L), des lymphocytes T mémoires (CCR7, CD62L, CD3 et IL-7R/CD127) ou des cellules lymphoïdes innées de type 2 (CD45, IL-7R/CD127, IL-17RB, IL-33R/ST2 et GATA-3).

Finalement, les résultats que nous avons obtenus chez la souris seront à transposer chez l'homme. La capacité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à produire de la NTN *in vitro* et l'expression des récepteurs de la NTN à la surface de ces cellules ont déjà été démontrés chez l'homme (Vargas-Leal et al., 2005). Ainsi, il serait intéressant d'utiliser des lignées cellulaires humaines, comme la lignée de cellules épithéliales A549, et des PBMCs de patients asthmatiques, activées *in vitro* en présence d'allergènes, pour étudier : (i) l'impact de la NTN sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) ou de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), (ii) l'influence de la NTN sur le niveau d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'inflammation et (iii) la sécrétion de NTN par ces cellules. Les résultats de ces expériences nous permettraient de valider nos hypothèses à propos des effets anti-inflammatoires de la NTN et de son rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire chez l'homme.

# Bibliographie

---





- Aibara, K., and N. Akaike.** 1991. Acetylcholine-activated ionic currents in isolated paratracheal ganglion cells of the rat. *Brain research* 558:20-26.
- Airaksinen, M.S., and M. Saarma.** 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature reviews. Neuroscience* 3:383-394.
- Al-Muhsen, S., J.R. Johnson, and Q. Hamid.** 2011. Remodeling in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128:451-462; quiz 463-454.
- Almeida, A.R., D. Fonseca-Pereira, S. Arroz-Madeira, H. Ribeiro, C. Labao-Almeida, and H. Veiga-Fernandes.** 2014. The neurotrophic factor receptor RET regulates IL-10 production by in vitro polarised T helper 2 cells. *European journal of immunology* 44:3605-3613.
- Alphonse, M.P., A.S. Saffar, L. Shan, K.T. HayGlass, F.E. Simons, and A.S. Gounni.** 2008. Regulation of the high affinity IgE receptor (Fc epsilonRI) in human neutrophils: role of seasonal allergen exposure and Th-2 cytokines. *PLoS one* 3:e1921.
- Atkinson, J.J., and R.M. Senior.** 2003. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28:12-24.
- Bakdash, G., S.P. Sittig, T. van Dijk, C.G. Figdor, and I.J. de Vries.** 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Frontiers in immunology* 4:53.
- Baloh, R.H., H. Enomoto, E.M. Johnson, Jr., and J. Milbrandt.** 2000. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Current opinion in neurobiology* 10:103-110.
- Barnes, P.J.** 1986. Neural control of human airways in health and disease. *The American review of respiratory disease* 134:1289-1314.
- Barnes, P.J.** 1987. Cholinergic control of airway smooth muscle. *The American review of respiratory disease* 136:S42-45.
- Barnes, P.J.** 2011. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews* 242:31-50.
- Barnes, P.J.** 2012. New drugs for asthma. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 33:685-694.
- Belvisi, M.G.** 2002. Overview of the innervation of the lung. *Current opinion in pharmacology* 2:211-215.
- Bessac, B.F., and S.E. Jordt.** 2010. Sensory detection and responses to toxic gases: mechanisms, health effects, and countermeasures. *Proceedings of the American Thoracic Society* 7:269-277.
- Blank, F., M. Wehrli, A. Lehmann, O. Baum, P. Gehr, C. von Garnier, and B.M. Rothen-Rutishauser.** 2011. Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology* 216:86-95.
- Bonini, S., A. Lambiase, S. Bonini, F. Angelucci, L. Magrini, L. Manni, and L. Aloe.** 1996. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:10955-10960.

- Botchkareva, N.V., V.A. Botchkarev, P. Welker, M. Airaksinen, W. Roth, P. Suvanto, S. Muller-Rover, I.M. Hadshiew, C. Peters, and R. Paus.** 2000. New roles for glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin: involvement in hair cycle control. *The American journal of pathology* 156:1041-1053.
- Bouffi, C., M. Rochman, C.B. Zust, E.M. Stucke, A. Kartashov, P.C. Fulkerson, A. Barski, and M.E. Rothenberg.** 2013. IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF-kappaB-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *Journal of immunology* 191:4317-4325.
- Bousquet, J., P. Chanez, J.Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard, and et al.** 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *The New England journal of medicine* 323:1033-1039.
- Bousquet, J., T.J. Clark, S. Hurd, N. Khaltaev, C. Lenfant, P. O'Byrne, and A. Sheffer.** 2007. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy* 62:102-112.
- Braun, A., E. Appel, R. Baruch, U. Herz, V. Botchkarev, R. Paus, C. Brodie, and H. Renz.** 1998. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *European journal of immunology* 28:3240-3251.
- Braun, A., M. Lommatzsch, A. Mannsfeldt, U. Neuhaus-Steinmetz, A. Fischer, N. Schnoy, G.R. Lewin, and H. Renz.** 1999. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21:537-546.
- Braun, A., D. Quarcoo, O. Schulte-Herbruggen, M. Lommatzsch, G. Hoyle, and H. Renz.** 2001. Nerve growth factor induces airway hyperresponsiveness in mice. *International archives of allergy and immunology* 124:205-207.
- Brewer, J.M., M. Conacher, C.A. Hunter, M. Mohrs, F. Brombacher, and J. Alexander.** 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *Journal of immunology* 163:6448-6454.
- Carucci, J.A., R. Ignatius, Y. Wei, A.M. Cypess, D.A. Schaer, M. Pope, R.M. Steinman, and S. Mojsov.** 2000. Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *Journal of immunology* 164:3494-3499.
- Casale, T.B., J.J. Costa, and S.J. Galli.** 1996. TNF alpha is important in human lung allergic reactions. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 15:35-44.
- Cassatella, M.A.** 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology today* 16:21-26.
- Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, and D. Julius.** 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Chang, Y.J., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu.** 2013. The role of type 2 innate lymphoid cells in asthma. *Journal of leukocyte biology* 94:933-940.

- Chao, M.V.** 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience* 4:299-309.
- Chapman, D.G., J.E. Tully, J.D. Nolin, Y.M. Janssen-Heininger, and C.G. Irvin.** 2014. Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next? *Journal of cellular biochemistry* 115:2055-2064.
- Chapman, M.D., S. Wunschmann, and A. Pomes.** 2007. Proteases as Th2 adjuvants. *Current allergy and asthma reports* 7:363-367.
- Cheng, X., C. Wang, G. Qian, and B. Zhu.** 2003. CD80, but not CD86 were up-regulated on the spleen-derived dendritic cells from OVA-sensitized and challenged BALB/c mice. *Immunology letters* 89:31-38.
- Chetta, A., A. Zanini, A. Foresi, R. D'Ippolito, A. Tipa, A. Castagnaro, S. Baraldo, M. Neri, M. Saetta, and D. Olivieri.** 2005. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35:1437-1442.
- Christianson, C.A., N.P. Goplen, I. Zafar, C. Irvin, J.T. Good, Jr., D.R. Rollins, B. Gorentla, W. Liu, M.M. Gorska, H. Chu, R.J. Martin, and R. Alam.** 2015. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *The Journal of allergy and clinical immunology* 136:59-68 e14.
- Chu, H.W., J.L. Halliday, R.J. Martin, D.Y. Leung, S.J. Szeffler, and S.E. Wenzel.** 1998. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158:1936-1944.
- Coffman, R.L., B.W. Seymour, D.A. Leberman, D.D. Hiraki, J.A. Christiansen, B. Shrader, H.M. Cherwinski, H.F. Savelkoul, F.D. Finkelman, M.W. Bond, and et al.** 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunological reviews* 102:5-28.
- Cookson, W.** 2004. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nature reviews. Immunology* 4:978-988.
- Costello, R.W., B.H. Schofield, G.M. Kephart, G.J. Gleich, D.B. Jacoby, and A.D. Fryer.** 1997. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *The American journal of physiology* 273:L93-103.
- Cromwell, O., Q. Hamid, C.J. Corrigan, J. Barkans, Q. Meng, P.D. Collins, and A.B. Kay.** 1992. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 77:330-337.
- D'Andrea, A., X. Ma, M. Aste-Amezaga, C. Paganin, and G. Trinchieri.** 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *The Journal of experimental medicine* 181:537-546.
- D'Atri, F., and S. Citi.** 2002. Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review). *Molecular membrane biology* 19:103-112.

- Dagnell, C., C. Kemi, J. Klominek, P. Eriksson, C.M. Skold, A. Eklund, J. Grunewald, and C. Olgart Høglund.** 2007. Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 150:303-310.
- Davies, D.E.** 2014. Epithelial barrier function and immunity in asthma. *Annals of the American Thoracic Society* 11 Suppl 5:S244-251.
- De, S., E.T. Zelazny, J.F. Souhrada, and M. Souhrada.** 1995. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol (1985)* 78:1555-1563.
- Devalia, J.L., H. Bayram, C. Rusznak, M. Calderon, R.J. Sapsford, M.A. Abdelaziz, J. Wang, and R.J. Davies.** 1997. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy* 52:45-51; discussion 57-48.
- Dinh, Q.T., D.A. Groneberg, C. Peiser, E. Mingomataj, R.A. Joachim, C. Witt, P.C. Arck, B.F. Klapp, and A. Fischer.** 2004. Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung. *Respiratory physiology & neurobiology* 144:15-24.
- Doherty, T., and D. Broide.** 2007. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Current opinion in immunology* 19:676-680.
- Doherty, T.A.** 2015. At the bench: understanding group 2 innate lymphoid cells in disease. *Journal of leukocyte biology* 97:455-467.
- Doherty, T.A., P. Soroosh, N. Khorram, S. Fukuyama, P. Rosenthal, J.Y. Cho, P.S. Norris, H. Choi, S. Scheu, K. Pfeffer, B.L. Zuraw, C.F. Ware, D.H. Broide, and M. Croft.** 2011. The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling. *Nature medicine* 17:596-603.
- Dominguez-Ortega, J., E. Phillips-Angles, P. Barranco, and S. Quirce.** 2015. Cost-effectiveness of asthma therapy: a comprehensive review. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 1-9.
- Doray, B., R. Salomon, J. Amiel, A. Pelet, R. Touraine, M. Billaud, T. Attie, B. Bachy, A. Munnich, and S. Lyonnet.** 1998. Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Human molecular genetics* 7:1449-1452.
- Douwes, J., P. Gibson, J. Pekkanen, and N. Pearce.** 2002. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 57:643-648.
- Drost, E.M., and W. MacNee.** 2002. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *European journal of immunology* 32:393-403.
- Duechs, M.J., C. Hahn, E. Benediktus, M. Werner-Klein, A. Braun, H.G. Hoymann, F. Gantner, and K.J. Erb.** 2011. TLR agonist mediated suppression of allergic responses is associated with increased innate inflammation in the airways. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24:203-214.
- Fahy, J.V.** 2001. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 164:S46-51.

- Fahy, J.V., and B.F. Dickey.** 2010. Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine* 363:2233-2247.
- Fava, R.A., N.J. Olsen, A.E. Postlethwaite, K.N. Broadley, J.M. Davidson, L.B. Nanney, C. Lucas, and A.S. Townes.** 1991. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *The Journal of experimental medicine* 173:1121-1132.
- Felten, S.Y., and J. Olschowka.** 1987. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synapticlike contacts on lymphocytes in the splenic white pulp. *Journal of neuroscience research* 18:37-48.
- Finkelman, F.D., I.M. Katona, J.F. Urban, Jr., J. Holmes, J. Ohara, A.S. Tung, J.V. Sample, and W.E. Paul.** 1988. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *Journal of immunology* 141:2335-2341.
- Florio, C., A. Styhler, S. Heisler, and J.G. Martin.** 1996. Mechanical responses of tracheal tissue in vitro: dependence on the tissue preparation employed and relationship to smooth muscle content. *Pulmonary pharmacology* 9:157-166.
- Fort, M.M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S.M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S.D. Hurst, G. Zurawski, M.W. Leach, D.M. Gorman, and D.M. Rennick.** 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15:985-995.
- Freund-Michel, V., C. Bertrand, and N. Frossard.** 2006. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cellular signalling* 18:621-627.
- Gajewska, B.U., D. Alvarez, M. Vidric, S. Goncharova, M.R. Stampfli, A.J. Coyle, J.C. Gutierrez-Ramos, and M. Jordana.** 2001. Generation of experimental allergic airways inflammation in the absence of draining lymph nodes. *The Journal of clinical investigation* 108:577-583.
- Garland, A., J. Necheles, S.R. White, S.P. Neeley, A.R. Leff, S.S. Carson, L.E. Alger, K. McAllister, and J. Solway.** 1997. Activated eosinophils elicit substance P release from cultured dorsal root ganglion neurons. *The American journal of physiology* 273:L1096-1102.
- Garrigan, K., P. Moroni-Rawson, C. McMurray, I. Hermans, N. Abernethy, J. Watson, and F. Ronchese.** 1996. Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood* 88:3508-3512.
- Gavett, S.H., X. Chen, F. Finkelman, and M. Wills-Karp.** 1994. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10:587-593.
- Gerblich, A.A., H. Salik, and M.R. Schuyler.** 1991. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *The American review of respiratory disease* 143:533-537.
- Gilchrist, M., W.R. Henderson, Jr., A.E. Clark, R.M. Simmons, X. Ye, K.D. Smith, and A. Aderem.** 2008. Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation. *The Journal of experimental medicine* 205:2349-2357.

- Gilchrist, M., V. Thorsson, B. Li, A.G. Rust, M. Korb, J.C. Roach, K. Kennedy, T. Hai, H. Bolouri, and A. Aderem.** 2006. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 441:173-178.
- Girolomoni, G., and R.E. Tigelaar.** 1990. Capsaicin-sensitive primary sensory neurons are potent modulators of murine delayed-type hypersensitivity reactions. *Journal of immunology* 145:1105-1112.
- Golden, J.P., J.A. DeMaro, P.A. Osborne, J. Milbrandt, and E.M. Johnson, Jr.** 1999. Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Experimental neurology* 158:504-528.
- Goldie, R.G., J.W. Paterson, and K.M. Lulich.** 1990. Adrenoceptors in airway smooth muscle. *Pharmacology & therapeutics* 48:295-322.
- Gounni, A.S., B. Lamkhioued, L. Koussih, C. Ra, P.M. Renzi, and Q. Hamid.** 2001. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:940-949.
- Gregory, L.G., and C.M. Lloyd.** 2011. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends in immunology* 32:402-411.
- Hahn, C., A.P. Islamian, H. Renz, and W.A. Nockher.** 2006. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117:787-794.
- Hai, T., and M.G. Hartman.** 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273:1-11.
- Halim, T.Y., R.H. Krauss, A.C. Sun, and F. Takei.** 2012. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 36:451-463.
- Hamelmann, E., K. Tateda, A. Oshiba, and E.W. Gelfand.** 1999. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model. *Allergy* 54:297-305.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M.A. Willart, R.N. Germain, and B.N. Lambrecht.** 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nature medicine* 15:410-416.
- Hammad, H., C. Duez, O. Fahy, A. Tscopoulos, C. Andre, B. Wallaert, S. Lebecque, A.B. Tonnel, and J. Pestel.** 2000. Human dendritic cells in the severe combined immunodeficiency mouse model: their potentiating role in the allergic reaction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80:605-614.
- Hammad, H., and B.N. Lambrecht.** 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature reviews. Immunology* 8:193-204.
- Hammad, H., and B.N. Lambrecht.** 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43:29-40.

- Hauck, S.M., N. Kinkl, C.A. Deeg, M. Swiatek-de Lange, S. Schoffmann, and M. Ueffing.** 2006. GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Molecular and cellular biology* 26:2746-2757.
- Hawrylowicz, C.M., and A. O'Garra.** 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology* 5:271-283.
- Hegarty, S.V., G.W. O'Keeffe, and A.M. Sullivan.** 2014. Neurotrophic factors: from neurodevelopmental regulators to novel therapies for Parkinson's disease. *Neural regeneration research* 9:1708-1711.
- Helme, R.D., A. Eglezos, G.W. Dandie, P.V. Andrews, and R.L. Boyd.** 1987. The effect of substance P on the regional lymph node antibody response to antigenic stimulation in capsaicin-pretreated rats. *Journal of immunology* 139:3470-3473.
- Herzog, C.D., L. Brown, B.R. Kruegel, A. Wilson, M.G. Tansey, F.H. Gage, E.M. Johnson, Jr., and R.T. Bartus.** 2013. Enhanced neurotrophic distribution, cell signaling and neuroprotection following substantia nigral versus striatal delivery of AAV2-NRTN (CERE-120). *Neurobiology of disease* 58:38-48.
- Heuckeroth, R.O., H. Enomoto, J.R. Grider, J.P. Golden, J.A. Hanke, A. Jackman, D.C. Molliver, M.E. Bardgett, W.D. Snider, E.M. Johnson, Jr., and J. Milbrandt.** 1999. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22:253-263.
- Hikawa, S., H. Kobayashi, N. Hikawa, T. Kusakabe, H. Hiruma, T. Takenaka, T. Tomita, and T. Kawakami.** 2002. Expression of neurotrophins and their receptors in peripheral lung cells of mice. *Histochemistry and cell biology* 118:51-58.
- Hogan, S.P., A. Koskinen, K.I. Matthaei, I.G. Young, and P.S. Foster.** 1998. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157:210-218.
- Holgate, S.T.** 1999. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402:B2-4.
- Holgate, S.T.** 2000. Epithelial damage and response. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 30 Suppl 1:37-41.
- Holgate, S.T.** 2007. Epithelium dysfunction in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120:1233-1244; quiz 1245-1236.
- Holgate, S.T., D.E. Davies, P.M. Lackie, S.J. Wilson, S.M. Puddicombe, and J.L. Lordan.** 2000. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 105:193-204.
- Holt, P.G., M.A. Schon-Hegrad, J. Oliver, B.J. Holt, and P.G. McMEnamin.** 1990. A contiguous network of dendritic antigen-presenting cells within the respiratory epithelium. *International archives of allergy and applied immunology* 91:155-159.



- Hoshino, M., Y. Nakamura, J. Sim, J. Shimojo, and S. Isogai.** 1998. Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 102:783-788.
- Huang, F.Y., C.C. Wang, S.L. Zhou, Y.H. Huang, H. Wang, F. Chen, Y.Y. Lin, G.H. Tan, and J.B. Liu.** 2009. Antisense interleukin-5 reduces eosinophil infiltration and hyperresponsiveness in an allergic asthma model. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 27:35-41.
- Hurst, S.D., T. Muchamuel, D.M. Gorman, J.M. Gilbert, T. Clifford, S. Kwan, S. Menon, B. Seymour, C. Jackson, T.T. Kung, J.K. Brieland, S.M. Zurawski, R.W. Chapman, G. Zurawski, and R.L. Coffman.** 2002. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *Journal of immunology* 169:443-453.
- Jacquet, A.** 2011. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 41:305-311.
- Janelins, B.M., A.R. Mathers, O.A. Tkacheva, G. Erdos, W.J. Shufesky, A.E. Morelli, and A.T. Larregina.** 2009. Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood* 113:3017-3026.
- Jeffery, P.K.** 2004. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1:176-183.
- Johnson, J.R., R.E. Wiley, R. Fattouh, F.K. Swirski, B.U. Gajewska, A.J. Coyle, J.C. Gutierrez-Ramos, R. Ellis, M.D. Inman, and M. Jordana.** 2004. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169:378-385.
- Joos, G.F.** 2001. The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma. *Current allergy and asthma reports* 1:134-143.
- Kabata, H., K. Moro, S. Koyasu, and K. Asano.** 2015. Group 2 innate lymphoid cells and asthma. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 64:227-234.
- Kapsenberg, M.L.** 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology* 3:984-993.
- Karta, M.R., D.H. Broide, T.A. Doherty.** 2016. Insights into group 2 innate lymphoid cells in human airway disease. *Current Allergy and Asthma Reports* 16:8.
- Kay, A.B.** 2005. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends in molecular medicine* 11:148-152.
- Kearley, J., K.F. Buckland, S.A. Mathie, and C.M. Lloyd.** 2009. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:772-781.
- Kennedy, J.D., C.A. Hatfield, S.F. Fidler, G.E. Winterrowd, J.V. Haas, J.E. Chin, and I.M. Richards.** 1995. Phenotypic characterization of T lymphocytes emigrating into lung tissue and the airway

- lumen after antigen inhalation in sensitized mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 12:613-623.
- Kilbinger, H., R. Schneider, H. Siefken, D. Wolf, and G. D'Agostino.** 1991. Characterization of prejunctional muscarinic autoreceptors in the guinea-pig trachea. *British journal of pharmacology* 103:1757-1763.
- Kim, Y.M., Y.S. Kim, S.G. Jeon, and Y.K. Kim.** 2013. Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the th2 hypothesis. *Allergy, asthma & immunology research* 5:189-196.
- King, C., S. Brennan, P.J. Thompson, and G.A. Stewart.** 1998. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *Journal of immunology* 161:3645-3651.
- Kohyama, T., X. Liu, F.Q. Wen, T. Kobayashi, S. Abe, R. Ertl, and S.I. Rennard.** 2002. Nerve growth factor stimulates fibronectin-induced fibroblast migration. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 140:329-335.
- Kondo, Y., T. Yoshimoto, K. Yasuda, S. Futatsugi-Yumikura, M. Morimoto, N. Hayashi, T. Hoshino, J. Fujimoto, and K. Nakanishi.** 2008. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *International immunology* 20:791-800.
- Kotzbauer, P.T., P.A. Lampe, R.O. Heuckeroth, J.P. Golden, D.J. Creedon, E.M. Johnson, Jr., and J. Milbrandt.** 1996. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384:467-470.
- Kradin, R., J. MacLean, S. Duckett, E.E. Schneeberger, C. Waeber, and C. Pinto.** 1997. Pulmonary response to inhaled antigen: neuroimmune interactions promote the recruitment of dendritic cells to the lung and the cellular immune response to inhaled antigen. *The American journal of pathology* 150:1735-1743.
- Kudo, M., Y. Ishigatsubo, and I. Aoki.** 2013. Pathology of asthma. *Frontiers in microbiology* 4:263.
- Kumar, R.K., C. Herbert, and P.S. Foster.** 2008. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current drug targets* 9:485-494.
- Labeur, M.S., B. Roters, B. Pers, A. Mehling, T.A. Luger, T. Schwarz, and S. Grabbe.** 1999. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *Journal of immunology* 162:168-175.
- Lambrecht, B.N., and H. Hammad.** 2009. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31:412-424.
- Lambrecht, B.N., B. Salomon, D. Klatzmann, and R.A. Pauwels.** 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *Journal of immunology* 160:4090-4097.
- Lammers, J.W., P. Minette, M.T. McCusker, K.F. Chung, and P.J. Barnes.** 1989. Capsaicin-induced bronchodilation in mild asthmatic subjects: possible role of nonadrenergic inhibitory system. *J Appl Physiol (1985)* 67:856-861.

- Lebman, D.A., and R.L. Coffman.** 1988. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *The Journal of experimental medicine* 168:853-862.
- Lee, C.G., H. Link, P. Baluk, R.J. Homer, S. Chapoval, V. Bhandari, M.J. Kang, L. Cohn, Y.K. Kim, D.M. McDonald, and J.A. Elias.** 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nature medicine* 10:1095-1103.
- Lewin, G.R., and Y.A. Barde.** 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience* 19:289-317.
- Li, X.M., R.K. Chopra, T.Y. Chou, B.H. Schofield, M. Wills-Karp, and S.K. Huang.** 1996. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *Journal of immunology* 157:3216-3219.
- Li, X.M., B.H. Schofield, Q.F. Wang, K.H. Kim, and S.K. Huang.** 1998. Induction of pulmonary allergic responses by antigen-specific Th2 cells. *Journal of immunology* 160:1378-1384.
- Lin, L.F., D.H. Doherty, J.D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins.** 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132.
- Lindsay, R.M., and A.J. Harmar.** 1989. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337:362-364.
- Liu, Z., and P.A. Roche.** 2015. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Frontiers in physiology* 6:1.
- Lommatzsch, M., K. Schloetcke, J. Klotz, K. Schuhbaeck, D. Zingler, C. Zingler, O. Schulte-Herbruggen, H. Gill, P. Schuff-Werner, and J.C. Virchow.** 2005. Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171:115-120.
- Lopez, A.F., C.J. Sanderson, J.R. Gamble, H.D. Campbell, I.G. Young, and M.A. Vadas.** 1988. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *The Journal of experimental medicine* 167:219-224.
- Lu, L., M. Hsieh, T.B. Oriss, P.A. Morel, T.E. Starzl, A.S. Rao, and A.W. Thomson.** 1995. Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses. *Immunology* 84:127-134.
- Lund, S., H.H. Walford, and T.A. Doherty.** 2013. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Disease. *Current immunology reviews* 9:214-221.
- Mak, J.C., and P.J. Barnes.** 1990. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *The American review of respiratory disease* 141:1559-1568.
- Marriott, I., and K.L. Bost.** 2001a. Expression of authentic substance P receptors in murine and human dendritic cells. *Journal of neuroimmunology* 114:131-141.
- Marriott, I., and K.L. Bost.** 2001b. Substance P receptor mediated macrophage responses. *Advances in experimental medicine and biology* 493:247-254.

- Marriott, I., M.J. Mason, A. Elhofy, and K.L. Bost.** 2000. Substance P activates NF-kappaB independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of neuroimmunology* 102:163-171.
- Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, R. Beasley, and P. Global Initiative for Asthma.** 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59:469-478.
- Mathur, M., K. Herrmann, Y. Qin, F. Gulmen, X. Li, R. Krimins, J. Weinstock, D. Elliott, J.A. Bluestone, and P. Padrid.** 1999. CD28 interactions with either CD80 or CD86 are sufficient to induce allergic airway inflammation in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21:498-509.
- Mattoli, S., V.L. Mattoso, M. Soloperto, L. Allegra, and A. Fasoli.** 1991. Cellular and biochemical characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in symptomatic nonallergic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 87:794-802.
- McAlees, J.W., G.S. Whitehead, I.T. Harley, M. Cappelletti, C.L. Rewerts, A.M. Holdcroft, S. Divanovic, M. Wills-Karp, F.D. Finkelman, C.L. Karp, and D.N. Cook.** 2015. Distinct Tlr4-expressing cell compartments control neutrophilic and eosinophilic airway inflammation. *Mucosal immunology* 8:863-873.
- Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 1:135-145.
- Micera, A., E. Vigneti, D. Pickholtz, R. Reich, O. Pappo, S. Bonini, F.X. Maquart, L. Aloe, and F. Levi-Schaffer.** 2001. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6162-6167.
- Michel, T., M. Theresine, A. Poli, O. Domingues, W. Ammerlaan, N.H. Brons, F. Hentges, and J. Zimmer.** 2011. Increased Th2 cytokine secretion, eosinophilic airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in neurturin-deficient mice. *Journal of immunology* 186:6497-6504.
- Minnicozzi, M., R.T. Sawyer, and M.J. Fenton.** 2011. Innate immunity in allergic disease. *Immunological reviews* 242:106-127.
- Minshall, E.M., D.Y. Leung, R.J. Martin, Y.L. Song, L. Cameron, P. Ernst, and Q. Hamid.** 1997. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17:326-333.
- Monteseirin, J.** 2009. Neutrophils and asthma. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 19:340-354.
- Myers, A.C., B.J. Udem, and D. Weinreich.** 1991. Influence of antigen on membrane properties of guinea pig bronchial ganglion neurons. *J Appl Physiol (1985)* 71:970-976.
- Nabe, T., F. Hosokawa, K. Matsuya, T. Morishita, A. Ikedo, M. Fujii, N. Mizutani, S. Yoshino, and D.D. Chaplin.** 2011. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. *Life sciences* 88:1127-1135.

- Nabe, T., C.L. Zindl, Y.W. Jung, R. Stephens, A. Sakamoto, S. Kohno, T.P. Atkinson, and D.D. Chaplin.** 2005. Induction of a late asthmatic response associated with airway inflammation in mice. *European journal of pharmacology* 521:144-155.
- Naka, T., N. Nishimoto, and T. Kishimoto.** 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis research* 4 Suppl 3:S233-242.
- Nakajima, H., I. Iwamoto, S. Tomoe, R. Matsumura, H. Tomioka, K. Takatsu, and S. Yoshida.** 1992. CD4+ T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *The American review of respiratory disease* 146:374-377.
- Nassenstein, C., J. Kutschker, D. Tumes, and A. Braun.** 2006. Neuro-immune interaction in allergic asthma: role of neurotrophins. *Biochemical Society transactions* 34:591-593.
- Nelson, R.P., Jr., R. DiNicolo, E. Fernandez-Caldas, M.J. Seleznick, R.F. Lockey, and R.A. Good.** 1996. Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in nonasthmatic control subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 98:258-263.
- Ng, W.H., G.Q. Wan, Z.N. Peng, and H.P. Too.** 2009. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) family of ligands confer chemoresistance in a ligand-specific fashion in malignant gliomas. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 16:427-436.
- Nials, A.T., and S. Uddin.** 2008. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & mechanisms* 1:213-220.
- Nithya, M., L. Suguna, and C. Rose.** 2003. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochimica et biophysica acta* 1620:25-31.
- Noga, O., M. Peiser, M. Altenahr, H. Knieling, R. Wanner, G. Hanf, R. Grosse, and N. Suttorp.** 2007. Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37:1701-1708.
- O'Byrne, P.M., G.M. Gauvreau, and L.J. Wood.** 1999. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29 Suppl 2:27-32.
- Panettieri, R.A., P.A. Yadavish, A.M. Kelly, N.A. Rubinstein, and M.I. Kotlikoff.** 1990. Histamine stimulates proliferation of airway smooth muscle and induces c-fos expression. *The American journal of physiology* 259:L365-371.
- Pare, P.D., T.R. Bai, and C.R. Roberts.** 1997. The structural and functional consequences of chronic allergic inflammation of the airways. *Ciba Foundation symposium* 206:71-86; discussion 86-79, 106-110.
- Pearce, N., N. Ait-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell, C. Robertson, and I.P.T.S. Group.** 2007. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62:758-766.

- Peden, D., and C.E. Reed.** 2010. Environmental and occupational allergies. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:S150-160.
- Piggott, D.A., S.C. Eisenbarth, L. Xu, S.L. Constant, J.W. Huleatt, C.A. Herrick, and K. Bottomly.** 2005. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *The Journal of clinical investigation* 115:459-467.
- Platts-Mills, T.A.** 2015. The allergy epidemics: 1870-2010. *The Journal of allergy and clinical immunology* 136:3-13.
- Poteryaev, D., A. Titievsky, Y.F. Sun, J. Thomas-Crusells, M. Lindahl, M. Billaud, U. Arumae, and M. Saarma.** 1999. GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS letters* 463:63-66.
- Renz, H., H.R. Smith, J.E. Henson, B.S. Ray, C.G. Irvin, and E.W. Gelfand.** 1992. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *The Journal of allergy and clinical immunology* 89:1127-1138.
- Ricci, A., L. Felici, S. Mariotta, F. Mannino, G. Schmid, C. Terzano, G. Cardillo, F. Amenta, and E. Bronzetti.** 2004. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30:12-19.
- Richardson, J., and J. Beland.** 1976. Nonadrenergic inhibitory nervous system in human airways. *Journal of applied physiology* 41:764-771.
- Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R.A. Flavell.** 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 185:461-469.
- Robinson, D.S., S. Ying, A.M. Bentley, Q. Meng, J. North, S.R. Durham, A.B. Kay, and Q. Hamid.** 1993. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 92:397-403.
- Roche, W.R., R. Beasley, J.H. Williams, and S.T. Holgate.** 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1:520-524.
- Rochlitzer, S., C. Nassenstein, and A. Braun.** 2006. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochemical Society transactions* 34:594-599.
- Rose, M.C., and J.A. Voynow.** 2006. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews* 86:245-278.
- Rusmini, M., P. Griseri, I. Matera, E. Pontarini, R. Ravazzolo, D. Mavilio, and I. Ceccherini.** 2014. Expression variability and function of the RET gene in adult peripheral blood mononuclear cells. *Journal of cellular physiology* 229:2027-2037.
- Saenz, S.A., B.C. Taylor, and D. Artis.** 2008. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological reviews* 226:172-190.

- Salmon, M., D.A. Walsh, H. Koto, P.J. Barnes, and K.F. Chung.** 1999. Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodelling. *The European respiratory journal* 14:633-641.
- Sapienza, S., T. Du, D.H. Eidelman, N.S. Wang, and J.G. Martin.** 1991. Structural changes in the airways of sensitized brown Norway rats after antigen challenge. *The American review of respiratory disease* 144:423-427.
- Schleimer, R.P., S.A. Sterbinsky, J. Kaiser, C.A. Bickel, D.A. Klunk, K. Tomioka, W. Newman, F.W. Luscinskas, M.A. Gimbrone, Jr., B.W. McIntyre, and et al. 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *Journal of immunology* 148:1086-1092.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch.** 1984. Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circulation research* 55:723-733.
- Schwartz, R.H.** 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71:1065-1068.
- Seder, R.A., W.E. Paul, M.M. Davis, and B. Fazekas de St Groth.** 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 176:1091-1098.
- Serre, K., E. Mohr, K.M. Toellner, A.F. Cunningham, S. Granjeaud, R. Bird, and I.C. MacLennan.** 2008. Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by Salmonella. *Molecular immunology* 45:3558-3566.
- Simcock, D.E., V. Kanabar, G.W. Clarke, B.J. O'Connor, T.H. Lee, and S.J. Hirst.** 2007. Proangiogenic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 176:146-153.
- Smith, S.G., R. Chen, M. Kjarsgaard, C. Huang, J.P. Oliveria, P.M. O'Byrne, G.M. Gauvreau, L.P. Boulet, C. Lemiere, J. Martin, P. Nair, and R. Sehmi.** 2016. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *The Journal of allergy and clinical immunology* 137:75-86 e78.
- Spina, D., and C.P. Page.** 2002. Pharmacology of airway irritability. *Current opinion in pharmacology* 2:264-272.
- Stumbles, P.A., J.A. Thomas, C.L. Pimm, P.T. Lee, T.J. Venaille, S. Proksch, and P.G. Holt.** 1998. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *The Journal of experimental medicine* 188:2019-2031.
- Takatsu, K., and H. Nakajima.** 2008. IL-5 and eosinophilia. *Current opinion in immunology* 20:288-294.
- Tang, M.L., J.W. Wilson, A.G. Stewart, and S.G. Royce.** 2006. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacology & therapeutics* 112:474-488.
- Teng, K.K., and B.L. Hempstead.** 2004. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:35-48.

- Thompson, M.R., D. Xu, and B.R. Williams.** 2009. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *Journal of molecular medicine* 87:1053-1060.
- Tollet, J., A.W. Everett, and M.P. Sparrow.** 2002. Development of neural tissue and airway smooth muscle in fetal mouse lung explants: a role for glial-derived neurotrophic factor in lung innervation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 26:420-429.
- Trinchieri, G.** 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008-4027.
- Tully, J.E., S.M. Hoffman, K.G. Lahue, J.D. Nolin, V. Anathy, L.K. Lundblad, N. Daphtary, M. Aliyeva, K.E. Black, A.E. Dixon, M.E. Poynter, C.G. Irvin, and Y.M. Janssen-Heininger.** 2013. Epithelial NF-kappaB orchestrates house dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, and fibrotic remodeling. *Journal of immunology* 191:5811-5821.
- Turner, J., and C.E. Jones.** 2009. Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochemical Society transactions* 37:877-881.
- Turner, M.O., P. Hussack, M.R. Sears, J. Dolovich, and F.E. Hargreave.** 1995. Exacerbations of asthma without sputum eosinophilia. *Thorax* 50:1057-1061.
- Ullah, M.A., J.A. Revez, Z. Loh, J. Simpson, V. Zhang, L. Bain, A. Varelias, S. Rose-John, A. Blumenthal, M.J. Smyth, G.R. Hill, M.B. Sukkar, M.A. Ferreira, and S. Phipps.** 2015. Allergen-induced IL-6 trans-signaling activates gammadelta T cells to promote type 2 and type 17 airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 136:1065-1073.
- Umetsu, D.T., J.J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, and R.H. DeKruyff.** 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature immunology* 3:715-720.
- van der Pouw Kraan, T.C., L.C. Boeijs, E.R. de Groot, S.O. Stapel, A. Snijders, M.L. Kapsenberg, J.S. van der Zee, and L.A. Aarden.** 1997. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *Journal of immunology* 158:5560-5565.
- van Rijt, L.S., H. Kuipers, N. Vos, D. Hijdra, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht.** 2004. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *Journal of immunological methods* 288:111-121.
- Vargas-Leal, V., R. Bruno, T. Derfuss, M. Krumbholz, R. Hohlfeld, and E. Meinl.** 2005. Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *Journal of immunology* 175:2301-2308.
- Venge, P.** 2010. The eosinophil and airway remodelling in asthma. *The clinical respiratory journal* 4 Suppl 1:15-19.
- Ventura, I., A. Vega, P. Chacon, C. Chamorro, R. Aroca, E. Gomez, V. Bellido, Y. Puente, M. Blanca, and J. Monteseirin.** 2014. Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy* 69:898-905.
- Veres, T.Z., S. Rochlitzer, and A. Braun.** 2009a. The role of neuro-immune cross-talk in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacology & therapeutics* 122:203-214.



- Veres, T.Z., S. Rochlitzer, M. Shevchenko, B. Fuchs, F. Prenzler, C. Nassenstein, A. Fischer, L. Welker, O. Holz, M. Muller, N. Krug, and A. Braun.** 2007. Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 37:553-561.
- Veres, T.Z., M. Shevchenko, G. Krasteva, E. Spies, F. Prenzler, S. Rochlitzer, T. Tschernig, N. Krug, W. Kummer, and A. Braun.** 2009b. Dendritic cell-nerve clusters are sites of T cell proliferation in allergic airway inflammation. *The American journal of pathology* 174:808-817.
- Veres, T.Z., S. Voedisch, E. Spies, T. Tschernig, and A. Braun.** 2011. Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *The American journal of pathology* 179:603-609.
- Vermaelen, K.Y., I. Carro-Muino, B.N. Lambrecht, and R.A. Pauwels.** 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 193:51-60.
- Virchow, J.C., P. Julius, M. Lommatzsch, W. Luttmann, H. Renz, and A. Braun.** 1998. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158:2002-2005.
- von Mutius, E.** 2000. The environmental predictors of allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 105:9-19.
- Walker, C., E. Bode, L. Boer, T.T. Hansel, K. Blaser, and J.C. Virchow, Jr.** 1992. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *The American review of respiratory disease* 146:109-115.
- Whittaker, L., N. Niu, U.A. Temann, A. Stoddard, R.A. Flavell, A. Ray, R.J. Homer, and L. Cohn.** 2002. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 27:593-602.
- Widenfalk, J., C. Nosrat, A. Tomac, H. Westphal, B. Hoffer, and L. Olson.** 1997. Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:8506-8519.
- Wills-Karp, M.** 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Current allergy and asthma reports* 4:123-131.
- Wise, J.T., T.J. Baginski, and J.L. Mobley.** 1999. An adoptive transfer model of allergic lung inflammation in mice is mediated by CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Journal of immunology* 162:5592-5600.
- Wong, C.K., S. Hu, P.F. Cheung, and C.W. Lam.** 2010. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 43:305-315.

- Woo, Y., D. Jeong, D.H. Chung, and H.Y. Kim.** 2014. The roles of innate lymphoid cells in the development of asthma. *Immune network* 14:171-181.
- Xiao, C., S.M. Puddicombe, S. Field, J. Haywood, V. Broughton-Head, I. Puxeddu, H.M. Haitchi, E. Vernon-Wilson, D. Sammut, N. Bedke, C. Cremin, J. Sones, R. Djukanovic, P.H. Howarth, J.E. Collins, S.T. Holgate, P. Monk, and D.E. Davies.** 2011. Defective epithelial barrier function in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128:549-556 e541-512.
- Yao, Q., M.A. Haxhiu, S.I. Zaidi, S. Liu, A. Jafri, and R.J. Martin.** 2005. Hyperoxia enhances brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor expression in peribronchial smooth muscle of neonatal rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289:L307-314.
- Ying, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, K. Mallett, D. Cousins, D. Robinson, G. Zhang, J. Zhao, T.H. Lee, and C. Corrigan.** 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *Journal of immunology* 174:8183-8190.
- Young, B.A., B.M. Girard, and R.L. Parsons.** 2008. Neurturin suppresses injury-induced neuronal activating transcription factor 3 expression in cultured guinea pig cardiac ganglia. *Journal of Comparative Neurology* 508:795-805.
- Zhang, Y., W.J. Lamm, R.K. Albert, E.Y. Chi, W.R. Henderson, Jr., and D.B. Lewis.** 1997. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155:661-669.
- Zosky, G.R., and P.D. Sly.** 2007. Animal models of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37:973-988.



# Annexes

---



Publication 1

« Neurturin influences inflammatory responses and airway remodeling in  
different mouse asthma models »

Marion Mauffray, Olivia Domingues, François Hentges, Jacques Zimmer,  
Daniel Hanau, Tatiana Michel

The Journal of Immunology, 2015 Feb 15;194(4):1423-33.  
Copyright 2015. The American Association of Immunologists, Inc.



## Neurturin Influences Inflammatory Responses and Airway Remodeling in Different Mouse Asthma Models

Marion Mauffray,\* Olivia Domingues,\* François Hentges,\* Jacques Zimmer,\* Daniel Hanau,<sup>‡</sup> and Tatiana Michel\*

Neurturin (NTN) was previously described for its neuronal activities, but recently, we have shown that this factor is also involved in asthma pathophysiology. However, the underlying mechanisms of NTN are unclear. The aim of this study was to investigate NTN involvement in acute bronchial Th2 responses, to analyze its interaction with airway structural cells, and to study its implication in remodeling during acute and chronic bronchial inflammation in C57BL/6 mice. We analyzed the features of allergic airway inflammation in wild-type and NTN<sup>-/-</sup> mice after sensitization with two different allergens, OVA and house dust mite. We showed that NTN<sup>-/-</sup> dendritic cells and T cells had a stronger tendency to activate the Th2 pathway in vitro than similar wild-type cells. Furthermore, NTN<sup>-/-</sup> mice had significantly increased markers of airway remodeling like collagen deposition. NTN<sup>-/-</sup> lung tissues showed higher levels of neutrophils, cytokine-induced neutrophil chemoattractant, matrix metalloproteinase 9, TNF- $\alpha$ , and IL-6. Finally, NTN had the capacity to decrease IL-6 and TNF- $\alpha$  production by immune and epithelial cells, showing a direct anti-inflammatory activity on these cells. Our findings support the hypothesis that NTN could modulate the allergic inflammation in different mouse asthma models. *The Journal of Immunology*, 2015, 194: 1423–1433.

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease characterized by a Th2-gauged immune response composed of the production of IgE, the secretion of Th2 cytokines and an accumulation of eosinophils in response to specific environmental allergen. The Th2-mediated inflammation in allergic airways proceeds from lung dendritic cells (DCs) through the capture and internalization of allergens leading to their migration into the draining lymph nodes (LN) where they can prime T cells and thereby generate a Th2 cytokine IL-4, IL-5, and IL-13 response (1, 2). This pathway is an optimal target for drug development by targeting Th2 inflammation and the development of the humoral response (3). In individuals with chronic asthma, there is in addition a structural remodeling of the airways, consisting of an increase in smooth muscle thickening, collagen deposition, accumulation of extracellular matrix components, and changes in the airway epithelium (4, 5). Important interactions take place between epithelial cells and DCs including the release of thymic

stromal lymphopoietin, which promotes a Th2 polarizing trend in DC precursors (6). The secretion of the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 will raise the production of chemokines like IL-8/cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) by the airway epithelial cells, which attract neutrophils (5). These cells will then release matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) involved in tissue remodeling (7). Many studies have explored therapeutic agents for asthma, nevertheless the variation in efficacy and possible side effects of these therapies determine a need for new treatments (8).

The neurotrophic factor neurturin (NTN) was originally identified for its role on the development and the maintenance of neuronal cells (9). In contrast to its neuronal activity, only a limited amount of information is available regarding its involvement in inflammatory or immune response. NTN belongs to the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands (GFLs), which are distant members of the TGF- $\beta$  superfamily. Anti-inflammatory activities and upregulation in serum of asthmatic patients were described in the case of TGF- $\beta$ 1 (10). Indeed, TGF- $\beta$ 1 produced by CD4<sup>+</sup> T cells inhibited the Th2-driven airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma (11). However, the effect of TGF- $\beta$ 1 in asthma diseases is diverse. Thus, this cytokine can have promoting effects, because when expressed by airway epithelial cells, it participates to the remodeling and fibrosis in asthmatic patients (12–14). On its side, the secreted NTN preferentially activates a pathway via a GPI-linked receptor termed GDNF family receptor  $\alpha$ -2 (GFR $\alpha$ -2) and the tyrosine kinase RET (15). In addition to this interaction, NTN might cross-talk weakly with the receptor GFR $\alpha$ -1 (16). Expression of NTN, RET, and GFR $\alpha$ -2 mRNAs was observed during the development of the respiratory system (17). In adult mice, NTN was detected at a moderate level in the lung alveoli and in the thymus (18). Jugular trachea and lung transient receptor potential vanilloid type 1-positive neurons expressed GFR $\alpha$ -2 and RET at the mRNA level in guinea pig (19). Moreover, tracheal sections have revealed a positive staining for other neurotrophic factors like GDNF in the OVA-induced asthma model (20). It was also shown that NTN and GDNF were important for the differentiation

\*Department of Infection and Immunity, Laboratory of Immunogenetics and Allergy, Public Research Center for Health, L-1526 Luxembourg, Luxembourg; and <sup>‡</sup>Mixed Research Unit S949; INSERM University of Strasbourg, Biology and Pharmacology of Haemostasis and Thrombosis, Blood Transfusion Center-Alsace, 67065 Strasbourg, France

Received for publication September 30, 2014. Accepted for publication December 13, 2014.

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg and by a grant from the Fonds National de la Recherche, Luxembourg (Grant ATR-2930129 to M.M.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Tatiana Michel, Department of Infection and Immunity, Laboratory of Immunogenetics and Allergy, Centre de Recherche Public Santé, 84 Val Fleuril, L-1526 Luxembourg, Luxembourg. E-mail address: tatiana.michel@crp-sante.lu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ATF3, activating transcription factor 3; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BMDC, bone marrow-derived DC; DC, dendritic cell; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GFR $\alpha$ 2, GDNF family receptor  $\alpha$  2; HDM, house dust mite; KC, cytokine-induced neutrophil chemoattractant; LN, lymph node; MHCII, MHC class II; MMP 9, matrix metalloproteinase 9; NTN, neurturin; WT, wild-type.

Copyright © 2015 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/15/\$25.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1402496



and survival of pulmonary neurons (21, 22). NTN<sup>-/-</sup> mice develop a dry-eye disease, characterized by a high level of MMP-9 and TNF- $\alpha$  mRNA expressed by the corneal epithelium (23). In a previous study, using a murine OVA-induced asthma model, we observed that the absence of NTN increased the peribronchial inflammatory cell infiltration. Thus, NTN<sup>-/-</sup> mice showed a stronger bronchial inflammation associated with higher amounts of Th2 cytokines and eosinophils as well as increased airway hyperresponsiveness. Furthermore, administration of NTN before challenge with OVA partially rescued the phenotype (24). How the anti-inflammatory effect of NTN could impact on immune and structural cells remains unclear.

In the current study, we investigated whether NTN was able to modulate the function of Th2 responses and examined the relationships between NTN and the structural airway remodeling by studying NTN<sup>-/-</sup> mice in models of acute and chronic allergic airway inflammation induced by the model allergen OVA and the natural allergen source house dust mite (HDM) extract. To further determine a direct anti-inflammatory activity of NTN on immune and epithelial cells, NTN was added with OVA to these cells in vitro and tested for its capacity to decrease proinflammatory cytokine production.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6 mice were obtained from Harlan (Horst, the Netherlands). NTN<sup>-/-</sup> mice on C57BL/6 background were provided by Prof. J. Millbrandt (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO). Mice were housed under a constant light/dark cycle and specific pathogen-free conditions. They were used at 6–8 wk of age. All procedures respected current European regulations and were approved by the National Animal Research Authority.

### Acute airway inflammation protocol

Mice were sensitized with OVA (20  $\mu$ g) emulsified in 2.25 mg aluminum hydroxide (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) in PBS (a total volume of 0.2 ml) as described previously (24). Briefly, mice were sensitized by i.p. injection on days 0, 14, and 21 and challenged intranasally on days 27, 28, and 29. Control mice were sensitized and challenged with PBS/alum and PBS. On day 30, mice were sacrificed, and samples were collected for further analysis. OVA (grade V; Sigma-Aldrich) contained endotoxin: 250 endotoxin units/mg protein OVA as measured by Pyrogen Plus Gel Clot LAL assays (Lonza, Belgium).

Mice were sensitized intranasally, according to the protocol described by Willart et al. (25), with 1  $\mu$ g HDM (*Dermatophagoides pteronyssinus*) in 50  $\mu$ l PBS on day 0 after a short anesthesia with isoflurane (CP-pharma, Burgdorf, Germany) and challenged 7 d later with 10  $\mu$ g HDM in 50  $\mu$ l PBS for 5 consecutive days. Control mice were sensitized and challenged with PBS. On day 14, mice were sacrificed, and samples were collected for further analysis. HDM (Greer, Lenoir, NC) contained endotoxin: 3.86 endotoxin units/mg protein.

### Chronic airway inflammation protocol

Mice were treated with OVA as described previously (24) with some modifications. Briefly mice were sensitized on days 0, 7, 14, and 21 and challenged intranasally on days 27, 29, 30, 34, 37, 41, 44, 48, 51, 55 and 57. Control mice were sensitized and challenged with PBS. On day 58, mice were sacrificed, and samples were collected for further analysis.

### Sample acquisition and preparation

Mice were anesthetized and sacrificed as described previously (24). Blood was collected by cardiac puncture for measurement of allergen-specific Ig. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed using PBS/5% BSA/mixture protease inhibitor (700  $\mu$ l) (Roche, Mannheim, Germany), followed by PBS (2  $\times$  500  $\mu$ l). Lungs were excised from mice and directly flash frozen for RNA extraction or fixed in 4% paraformaldehyde for histology analyses.

### Cell cultures

Cells from spleen and lung draining LNs of OVA-induced mice were isolated and adjusted to  $5 \times 10^6$  cells/ml and put in culture for 4 d in DMEM supplemented with IL-2 (1000 U/ml) and restimulated with OVA (200  $\mu$ g/ml).

LN cells from HDM-induced mice were adjusted to  $2 \times 10^6$  cells/ml with IL-2 and restimulated with HDM (15  $\mu$ g/ml), BAL fluid (BALF), spleen, and LN supernatants were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for later cytokine analysis.

Bone marrow from naive mice was flushed from tibiae and femurs and passed through a 40- $\mu$ m cell strainer. Bone marrow-derived DCs (BMDCs) were generated from culture of  $1 \times 10^7$  cells per 3 ml in 6-well plates for 6 d in medium supplemented with GM-CSF (20 ng/ml) and IL-4 (20 ng/ml), and half of the medium was replaced two times with fresh medium. At day 7, cells were replated with GM-CSF (20 ng/ml) for 24 h, then harvested and used for RNA extraction, DC-T cell coculture or stimulated for 2 d with LPS (100 ng/ml) or OVA (200  $\mu$ g/ml) and stained with specific Abs for FACS analysis.

Spleen DCs were generated from splenocyte cultures of  $1 \times 10^7$  cells per 3 ml for 14 d with GM-CSF (10 ng/ml). Half the medium was replaced three times per week with fresh medium. At day 14, cells were harvested for RNA extraction or stimulated for 2 d with LPS (100 ng/ml) or OVA (200  $\mu$ g/ml) and stained with specific Abs for FACS analysis.

LA-4 murine bronchial epithelial cells (European Collection of Cell Cultures, ECACC cell lines, reference number90040512) were cultured at  $2 \times 10^5$  cells in collagen-precoated Transwells in culture medium (DMEM 1:2, Ham's F12 1:2, 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 0.1% insulin). After 4 d, medium in the apical side was removed to set up air-liquid interface culture. Cells were cultured for 14 d in USG medium (DMEM 1:2, Ham's F12 1:2, 2% Ultrosor G, and 1% penicillin/streptomycin) and medium was changed 2 times per week. Cells were stimulated with NTN (1.5ng/ml) and/or OVA (200 $\mu$ g/ml) on the apical side for 3 d and supernatants were stored at  $-80^\circ\text{C}$  before cytokine analysis.

### DC and T cell coculture

BMDCs were harvested at day 8, cultured at  $3.10^5$  cells in medium (100  $\mu$ l) in 96 well plates and stimulated for 48 h with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) and OVA (200  $\mu$ g/ml) or medium alone as negative control in presence of different doses of NTN. In parallel, OVA-induced spleen and LN CD4<sup>+</sup> T cells were isolated by negative selection using the CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). The purity of CD4<sup>+</sup> T cells was  $\geq 90\%$ . Then,  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T cells were added to the culture of BMDCs. Supernatants were collected after 4 d and stored at  $-80^\circ\text{C}$  before cytokine analysis.

### Lung histology and morphometric analysis

After BAL, lungs were collected, fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Lung tissue sections (6  $\mu$ m) were stained to visualize collagen with a Trichrome stain Masson Kit (H15-1KT; Sigma-Aldrich). Pictures were taken with a Leica microscope mounted with a camera (model DMI 6000B). Morphometric analysis was performed using a Leica application Suite version S3.8 software (model DMI 6000B; Leica microscope). The peribronchial collagen thickness was measured (in square micrometers) in five bronchioles per mouse. The mean depth of collagen was quantified by the measurement of the differences between the area of the bronchiole and the area of the bronchiole extended with collagen deposition. Results are expressed as mean of the collagen depth for each animal.

### Western blot

Protein homogenates of lung tissue samples were prepared in lysis buffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>). Proteins (50  $\mu$ g) were loaded on a 15% SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, and blocked in TBS/Tween 0.05%/BSA 3% before incubation overnight with anti-activating transcription factor 3 (ATF3) Ab (1/100; Santa Cruz SC188) or anti-actin Ab (1/6000; Millipore MAB1501). Secondary Abs were added for 2 h before revelation using West Femto chemiluminescent Substrate kit (Fisher Scientific PI: 34094). The resulting bands were analyzed using ImageQuant (GE Healthcare) and normalized to those of actin.

### Zymography

Protein homogenates were prepared from each lung tissue as described in Western blot. MMP-9 activity was obtained by analysis of the resulting bands on a gelatin gel zymogram (Bio-Rad, 10% Ready Gel Zymogram: 161-1167) by densitometry using ImageQuant (GE Healthcare). The mean  $\pm$  SE density of MMP-9 activity was plotted in a graph and expressed as the relative ratio of the values in the control group, which were expressed as one.

### RNA extraction

Total RNA was extracted with RNeasy mini kit for cell lysates and RNeasy midi kit for lung samples (Qiagen, Venlo, the Netherlands). RNA quality assessment was tested using Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent). One microgram of RNA was used to synthesize cDNA using the PrimeScript Reverse Transcriptase kit (Takara).

**Real-time PCR**

Primers designed for real-time PCR assay were GFR $\alpha$ -2 (5'-AGGACA-AAGAGAAGCCCAAT-3', 3'-CCTGTGTGATGGTCCGTACAG-5'), RET1 (5'-GGTCAACAACAACCTCCGTTC-3', 3'-CAGGAGGTAAAGTTGCA-CAG-5'), and GAPDH (5'-GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC-3', 3'-CT-TGGTGTCTCTTTATACATGTTGA-5') as endogenous control. The reaction mix was as follows: 10  $\mu$ l Fast 97be green Master Mix (Life Technologies), 25–50 ng cDNA, 2  $\mu$ M primers in a final volume of 20  $\mu$ l. The amplification conditions were: 20s at 95°C (hold stage) and then 40 cycles of 1 s at 95°C and 20 s at 58°C. All samples were analyzed in triplicates using an Applied Biosystems ViiA 7 Real-Time PCR System.

**Measure of cytokines in culture supernatant**

Levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , and KC were measured by Cytometric Bead Array (CBA; BD Biosciences), according to the manufacturer's protocol.

**ELISA**

TGF $\beta$ -1 levels were measured by ELISA (eBioscience), according to the manufacturer's protocol. Specific IgE, IgG1 and IgG2a were measured in the serum as described previously (24).

**Flow cytometry**

Abs. used for flow cytometry were CD80-FITC (BD Biosciences), CD3-FITC, CD11c-PerCP-Cy5.5, CD86-PE-Cy7 (BioLegend), Gr1-PE, MHCII class II (MHCII)-allophycocyanin (eBioscience), CD4-allophycocyanin (Immunotools, Friesoythe, Germany), IgG-allophycocyanin, IgG-PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories), RET (R&D Systems, Abingdon, U.K.). Viable cells were identified with live/dead fixable near-IR dead cells stain (Life Technologies, Europe B.V.). Cells were acquired on a FACSCanto flow cytometer and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

**Statistical analysis**

Data were analyzed with Graph Pad Prism 5.0 software. One-way ANOVA-Newman-Keuls multiple comparison and *t* tests were used to determine the statistical significance of the results. The values were expressed as means  $\pm$  SEM from independent experiments. Any difference with a *p* value <0.05 was considered significant.

**Results*****NTN<sup>-/-</sup> splenocytes promote Th2 cytokine production***

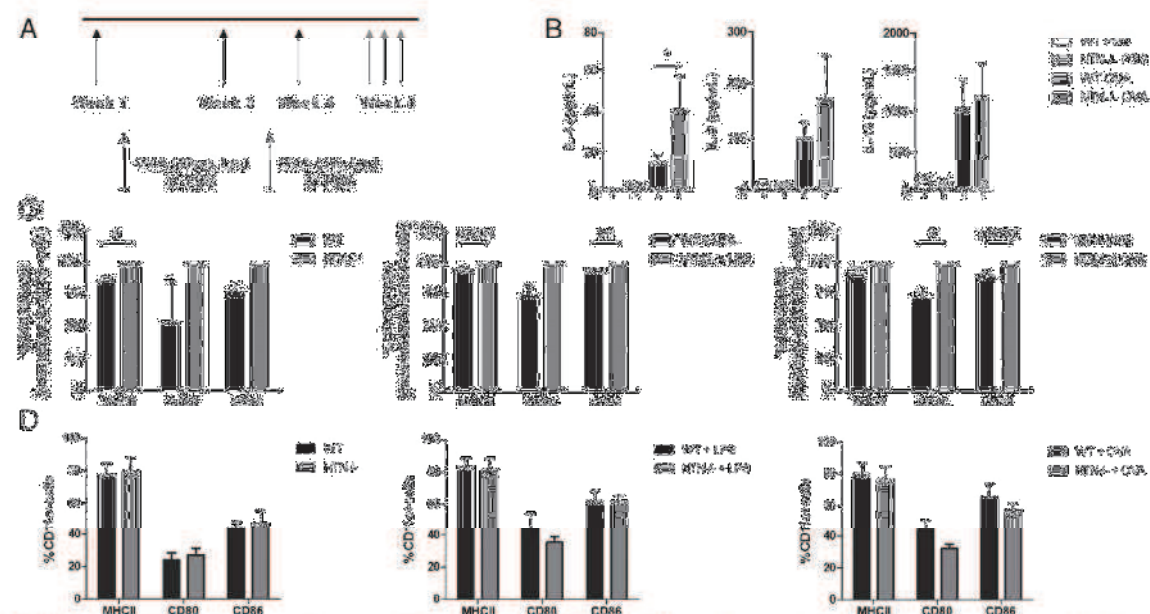
To investigate at which step the inflammation is overinduced in NTN<sup>-/-</sup> mice, we tested the presence of OVA-specific Th2 cells in lymphoid tissues. As we observed previously a higher Th2 response in NTN<sup>-/-</sup> lung draining LN cells (24), we performed *in vitro* experiments to analyze the capacity of NTN<sup>-/-</sup> spleen cells to induce the Th2 pathway. After sensitization and challenge with the allergen OVA (Fig. 1A), wild-type (WT) and NTN<sup>-/-</sup> spleen cells were put in culture and restimulated with OVA to activate the Th2 cytokine secretion. We found that spleen NTN<sup>-/-</sup> cells were able to produce more IL-4 compared with WT and that the same tendency was observed for the secretion of IL-5 and IL-13 (Fig. 1B).

***Spleen NTN<sup>-/-</sup> DCs have a distinct phenotype***

To characterize the nature of the cells at the origin of the NTN<sup>-/-</sup> phenotype, spleen DCs were put in culture and analyzed for their activation marker expression. NTN<sup>-/-</sup> DCs exhibited a more mature cell surface phenotype than WT cells, characterized by higher expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 and the MHCII molecules (Fig. 1C). The same differences were observed upon stimulation with LPS or OVA (Fig. 1C). Unlike spleen DCs, the NTN<sup>-/-</sup> BMDCs showed no phenotypic differences with WT (Fig. 1D). To determine the NTN<sup>-/-</sup> DC capacity to uptake allergen, FITC-dextran beads were added *in vitro* in the presence of spleen DCs or BMDCs. NTN<sup>-/-</sup> spleen and BMDCs showed the same phagocytosis capacities than WT DCs (data not shown).

***NTN<sup>-/-</sup> DCs elicit stronger Th2 cell responses***

To further investigate the ability of DCs to modulate the immune response of NTN<sup>-/-</sup> mice, purified spleen OVA-specific CD4+T cells were restimulated *in vitro* with OVA-pulsed BMDCs, which resulted in production of Th2 cytokines (Fig. 2). NTN<sup>-/-</sup>



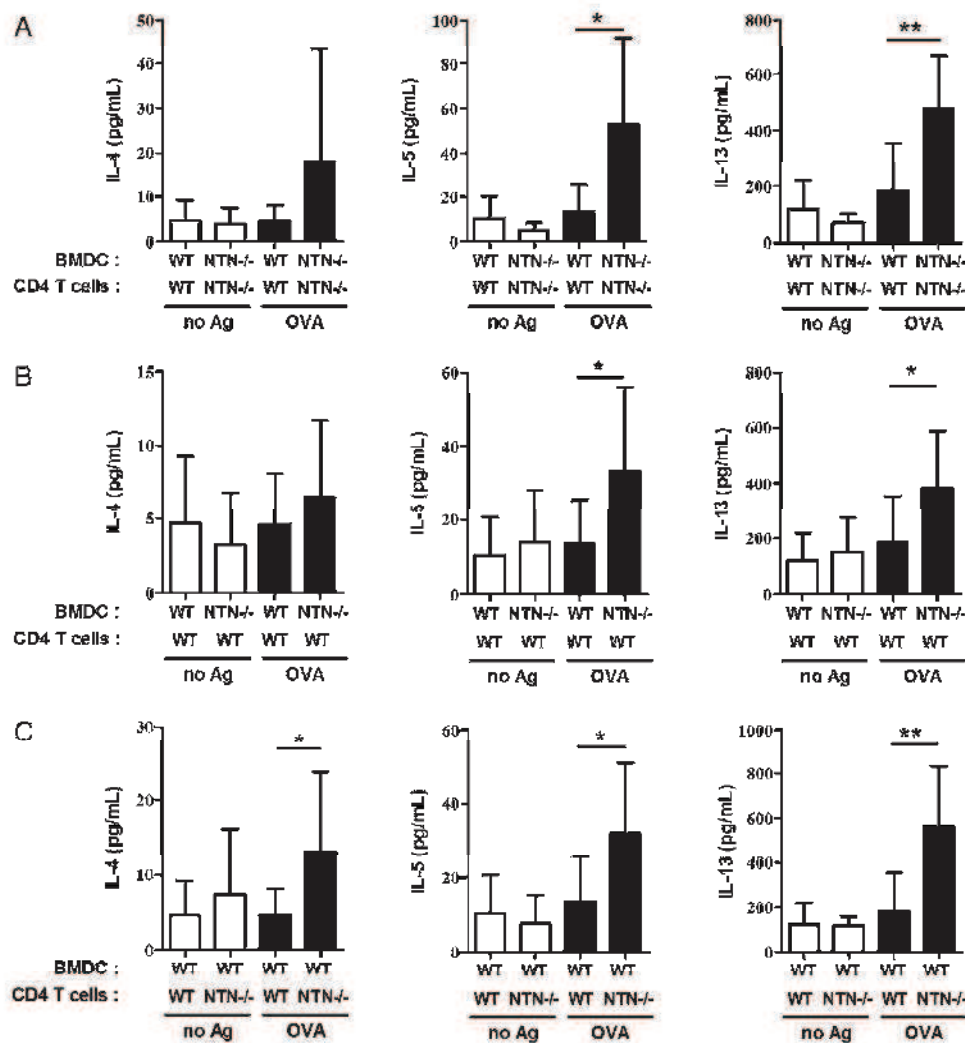
**FIGURE 1.** NTN<sup>-/-</sup> splenocytes produce more Th2 cytokines and DCs show different phenotypes. **(A)** Schematic of sensitization and challenge protocol. **(B)** Cytokine levels from spleens of sensitized and challenged mice. Levels of IL-4, IL-5, and IL-13 were measured in supernatants of splenocytes restimulated *in vitro* with OVA for 4 d. Data are derived from three mice per group of four independent experiments (*n* = 12). **(C)** Expression level of MHCII, CD80, and CD86 among CD11c<sup>+</sup> spleen DCs stimulated with LPS or OVA from naive mice (normalized to NTN<sup>-/-</sup> DC condition). **(D)** Expression level of MHCII, CD80, and CD86 among CD11c<sup>+</sup> BMDCs stimulated with LPS or OVA. Results are derived from three independent experiments. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01). i.n., intranasal.

T cells in contact with NTN<sup>-/-</sup> BMDCs produced more IL-5 and IL-13 compared with WT T cells (Fig. 2A). To determine whether DCs or T cells were responsible for this phenotype, we next assessed whether differences in Ag-induced Th2 cytokine production were attributable to the ability of NTN<sup>-/-</sup> DCs to present Ag. WT CD4<sup>+</sup> T cells had more capacity to secrete IL-5 and IL-13 in coculture with NTN<sup>-/-</sup> BMDCs in comparison with WT BMDCs (Fig. 2B). Thus, stimulation of T cells by NTN<sup>-/-</sup> BMDCs led to a more robust proinflammatory response. We next compared the ability of NTN<sup>-/-</sup> and WT CD4<sup>+</sup> T cells to secrete the Th2 cytokines. So, WT or NTN<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were put in contact with WT BMDCs. Results showed that Th2 responses were better activated by NTN<sup>-/-</sup> T cells (Fig. 2C). Furthermore, NTN<sup>-/-</sup> OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells purified from lung draining LN restimulated *in vitro* with OVA-pulsed DCs showed the same profile than NTN<sup>-/-</sup> spleen CD4<sup>+</sup> T cells (Supplemental Fig. 1A–

C). Thus, in NTN<sup>-/-</sup> mice, both BMDCs and CD4<sup>+</sup> T cells played a role in the stronger activation of the Th2 responses.

#### Higher Th2 secretion level in HDM-inflamed NTN<sup>-/-</sup> mice

To obtain a better relevance for human disease, the acute airway inflammation experiments were reproduced with HDM as a natural allergen source for sensitization and airway challenge (Fig. 3A). After the induction of acute airway inflammation with the allergen, HDM-specific IgG1, IgG2a, and IgE were increased in WT and NTN<sup>-/-</sup> sera and lung tissues showed immune cell infiltration around bronchi (Fig. 3B). At this stage, no significant differences were found between NTN<sup>-/-</sup> and WT HDM-specific IgG1, IgG2a, and IgE levels. A strong elevation of total cell numbers, in particular the eosinophils, DCs, and lymphocytes, was observed in the BALF of NTN<sup>-/-</sup> mice compared with WT (Fig. 3C). The analysis of Th2 cytokine levels in the BALF showed a tendency to



**FIGURE 2.** NTN<sup>-/-</sup> BMDCs and T cells induce higher Th2 cytokine secretion. Purified OVA-induced spleen CD4<sup>+</sup> T cells were cocultured with BMDCs in the presence of OVA (■) or no Ag (□). (A) Levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in culture supernatants of WT and NTN<sup>-/-</sup> BMDCs and T cells. (B) Levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in culture supernatants of WT or NTN<sup>-/-</sup> BMDCs in the presence of WT T cells. (C) Levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in culture supernatants of WT BMDCs in the presence of WT or NTN<sup>-/-</sup> T cells. Data are derived from three mice per group of three independent experiments (*n* = 8/9). Results of each group are expressed as means ± SEM (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

higher IL-4, IL-5, and IL-13 release in NTN<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3D). The Th2 cytokine production was also analyzed after expansion of the lung draining LN cells in the presence of HDM for 4 d. As previously shown with the allergen OVA (24), the level of IL-4, IL-5, and IL-13 was strongly increased in NTN<sup>-/-</sup> LN in the presence of HDM (Fig. 3E). These results confirmed in another model of inflammation that NTN<sup>-/-</sup> mice have higher capacities to secrete Th2 cytokines.

#### Stronger effects of chronic allergic airway inflammation and remodeling in NTN<sup>-/-</sup> mice

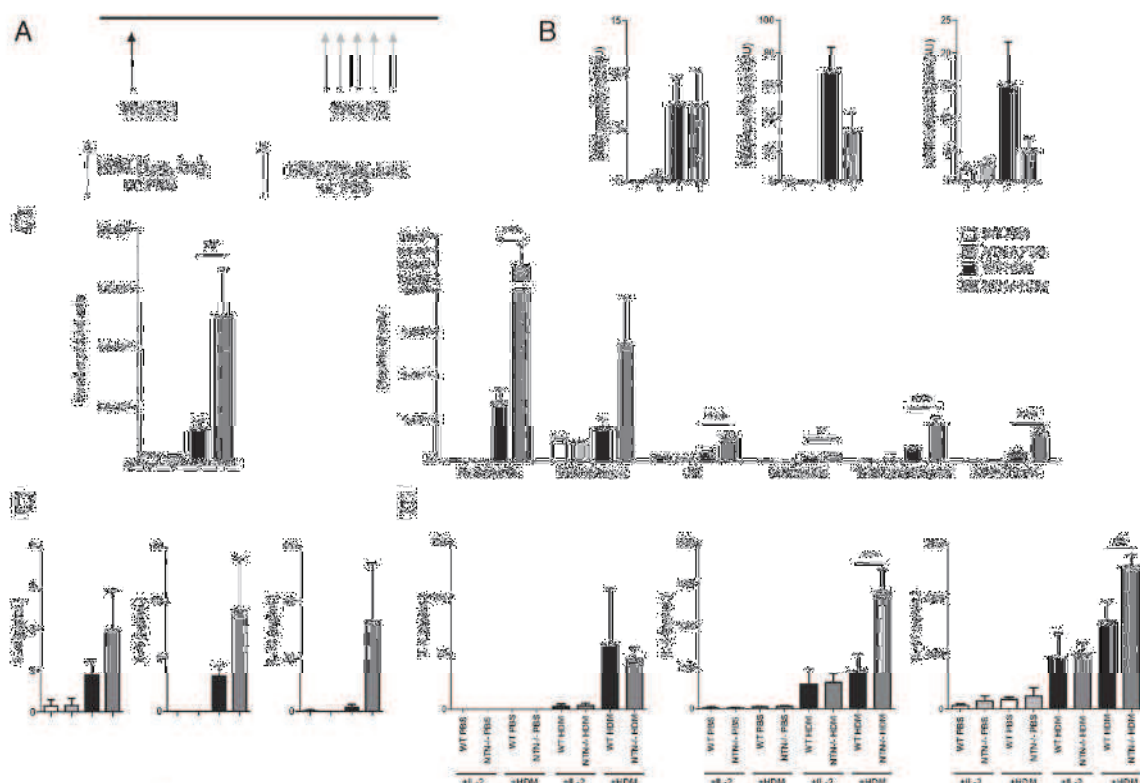
The amount of TGFβ-1 was significantly increased after acute airway inflammation in WT and NTN<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, TGFβ-1 expression was raised to higher levels in NTN<sup>-/-</sup> BALF compared with WT (Supplemental Fig. 2). Because this molecule has been identified as an anti-inflammatory and profibrotic cytokine playing a role in tissue remodeling (11, 26), we used a murine model of chronic allergic airway inflammation to assess the involvement of NTN in OVA-induced airway remodeling and chronic inflammation (Fig. 4A). IgE, IgG1, and IgG2a were upregulated in WT and NTN<sup>-/-</sup> sera after inflammation; in particular the IgE level was higher in the NTN<sup>-/-</sup> strain (Fig. 4B). BALF cell counts were increased in OVA-challenged mice. Thus, the level of eosinophils and the Th2 responses were elevated after inflammation. However, no difference was found between NTN<sup>-/-</sup> and WT mice (Fig. 4C, 4D). The same results were observed after analysis of the Th2 cytokine production of the lung

draining LN cells put in culture with OVA for 4 d (data not shown). In contrast, BALF composition showed an increase of neutrophils in NTN<sup>-/-</sup> and WT mice after a chronic airway inflammation, and the number was significantly higher in NTN<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice (Fig. 4C). Because NTN<sup>-/-</sup> mice showed a higher level of neutrophils, we examined whether the lack of NTN affected the level of the proinflammatory markers IL-6, KC, and TNF-α, in BALF and the activity of the metalloproteinase MMP-9 in lung tissues (Fig. 4D, 4E). NTN<sup>-/-</sup> mice sensitized and challenged with OVA had a higher level of KC (Fig. 4D). TNF-α found in the BALF was also higher in NTN<sup>-/-</sup> compared with WT mice and MMP-9 activity followed the same way after inflammation in the lung (Fig. 4D, 4E). In addition, the proinflammatory cytokine IL-6 was significantly more secreted in NTN<sup>-/-</sup> BALF compared with WT (Fig. 4D).

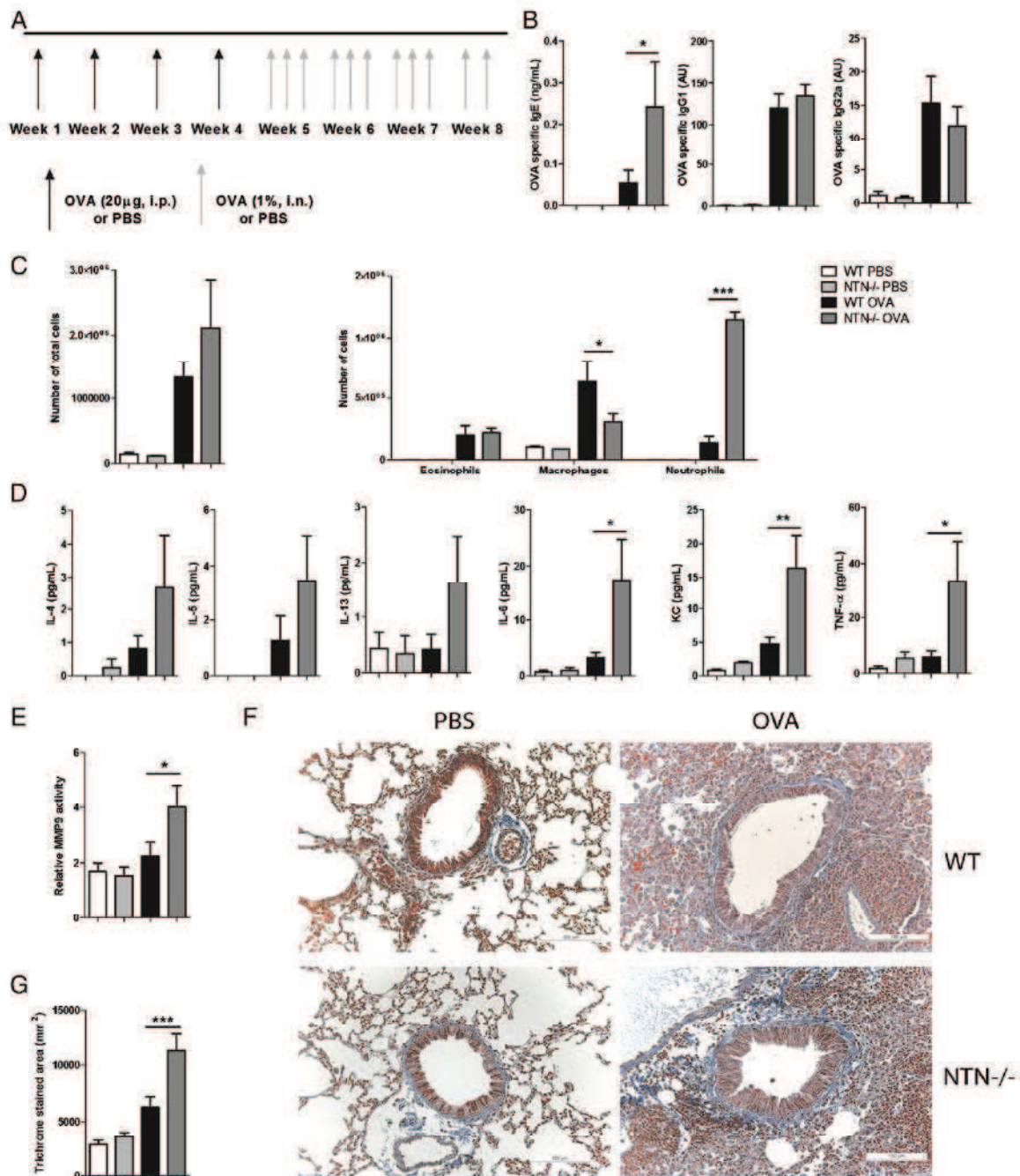
Chronic allergen exposure is associated with peribronchial collagen deposition (27). We assessed the thickness of airway walls with Masson's trichrome stain. After repeated exposure to OVA, WT and NTN<sup>-/-</sup> lung sections showed an increase of peribronchial collagen deposition (Fig. 4F). In the airways of OVA-sensitized and -challenged NTN<sup>-/-</sup> mice, the area of subepithelial collagen staining appeared more intense and the quantitative image analysis showed significant differences compared with WT (Fig. 4G).

#### NTN treatment downregulates IL-6 secretion by immune and lung epithelial cells

The presence of OVA in the coculture of WT BMDCs and CD4<sup>+</sup> T cells triggered the release of IL-6 (Fig. 5A). The simultaneous



**FIGURE 3.** NTN<sup>-/-</sup> mice develop a strong airway inflammation after exposure to HDM. (A) Schematic of HDM disease protocol. (B) HDM-specific IgE, IgG1, and IgG2a levels in the serum ( $n = 12$ ). (C) Numbers of total cells and cellular composition in BALF ( $n = 9$ ). (D) Levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in BALF ( $n = 9$ ). (E) Levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in culture supernatant of LN restimulated in vitro with IL-2 + HDM for 4 d ( $n = 9$ ). Data are derived from three mice per group of three or four independent experiments. Results of each group are expressed as means  $\pm$  SEM ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). AU, arbitrary unit; i.n., intranasal.



**FIGURE 4.** NTN<sup>-/-</sup> mice develop stronger features of chronic airway inflammation and remodeling. **(A)** Schematic of chronic OVA disease protocol. **(B)** OVA-specific IgE, IgG1, and IgG2a levels in serum (AU, arbitrary unit) ( $n = 9$ ). **(C)** Total cell numbers and eosinophils, macrophages and neutrophils in BALF ( $n = 6$ ). **(D)** Levels of IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, KC, and TNF- $\alpha$  in BALF ( $n = 6/9$ ). **(E)** MMP-9 activity quantified in lung tissues from gelatin-zymogram ( $n = 9$ ). **(F)** Lung histology. Representative sections of bronchi of WT or NTN<sup>-/-</sup> mice. Sections were stained with Trichrome. Scale bars, 100  $\mu$ m. **(G)** Peribronchial collagen thickness was measured as described in *Materials and Methods* ( $n = 15$ ). Data are derived from three mice per group of two or three independent experiments. Results of each group are expressed as means  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). i.n., intranasal.

addition of NTN and OVA to WT BMDCs significantly decreased the IL-6 production. The NTN treatment generated also a reduction of the TNF- $\alpha$  level (Fig. 5B). Nevertheless, the secretion of the Th2 cytokines was not influenced as the level of IL-4, IL-5,

and IL-13 was comparable in the presence or absence of NTN (data not shown).

IL-6 is secreted by lung epithelial cells in asthmatic patients, and may promote Th2 differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells (28). To test the

capacity of NTN to influence the secretion of IL-6 by mouse lung epithelial cells, the LA-4 cell line was put in air-liquid interface culture. Then, OVA or OVA and NTN were added on the apical side, and the levels of the IL-6 production were quantified. The consequence of adding NTN was a significant reduction of the IL-6 production (Fig. 5C).

#### *NTN receptors are expressed in lung tissues, DCs, and lung epithelial cells*

To determine whether the effects of NTN on immune and lung epithelial cells could be the result of a binding to the NTN receptor complex, we investigated the expression of RET and GFR $\alpha$ -2 in lung tissues, DCs, and the LA-4 cell line by quantitative RT-PCR analysis. Previous reports have shown the expression of NTN, RET, and GFR $\alpha$ -2 in the airways (17, 18, 29). Our results demonstrated the mRNA expression of GFR $\alpha$ -2 and RET in the LA-4 cell line, WT BMDCs, and spleen DCs. Furthermore, the absence of NTN had no influence on the basal expression of these receptors (Fig. 6A). WT and NTN<sup>-/-</sup> lung tissues also expressed GFR $\alpha$ -2 and RET, and the transcript levels measured in control mice and after inflammation were similar (Fig. 6A). RET expression at protein level was also detected in lung tissues of WT and NTN<sup>-/-</sup> mice by flow cytometry (Fig. 6B). Thus, we confirmed that the molecules required for active NTN signaling are expressed in lung tissues, DCs, and lung epithelial cells, suggesting a role for this neurotrophic factor in airway lung inflammation.

#### *Lower expression of ATF3 in NTN<sup>-/-</sup> lung tissue*

Activating transcription factor 3 (ATF3) is activated in response to asthmatic inflammation in the lung and negatively regulates the gene expression of many cytokines like IL-4, IL-5, IL-13, and the proinflammatory IL-6 (30, 31). Thereby, in the absence of ATF3, the Th2 cytokine production is enhanced (32). We tested the hypothesis that NTN modulates the immune response by inducing expression of ATF3. Therefore, the ATF3 protein expression level was quantified in WT and NTN<sup>-/-</sup> lung tissues after a chronic airway inflammation protocol. The data showed that ATF3 expression was significantly increased in the lungs of WT mice after OVA sensitization (Fig. 6C), confirming results from Gilchrist et al. (32). On the contrary, NTN<sup>-/-</sup> mice didn't show any rise of the ATF3 protein in their lung tissues following the overinflammatory phenotype observed in these mice (Fig. 6C).

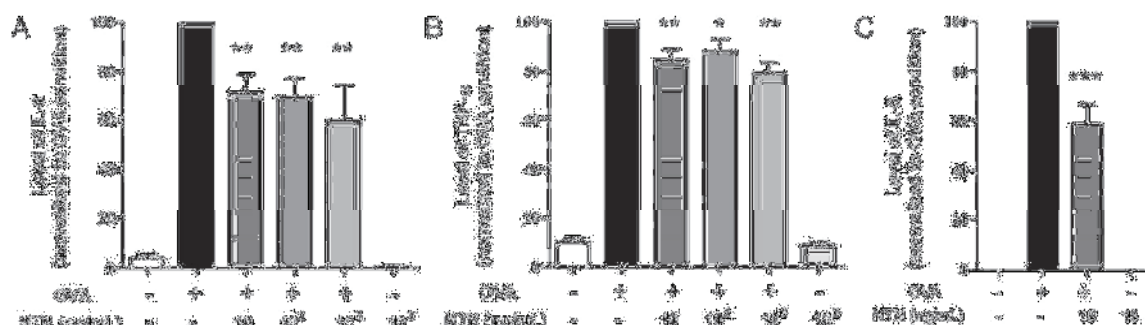
## Discussion

The implication of NTN in the regulation of asthmatic airway inflammation had not yet been further worked out. Our study of

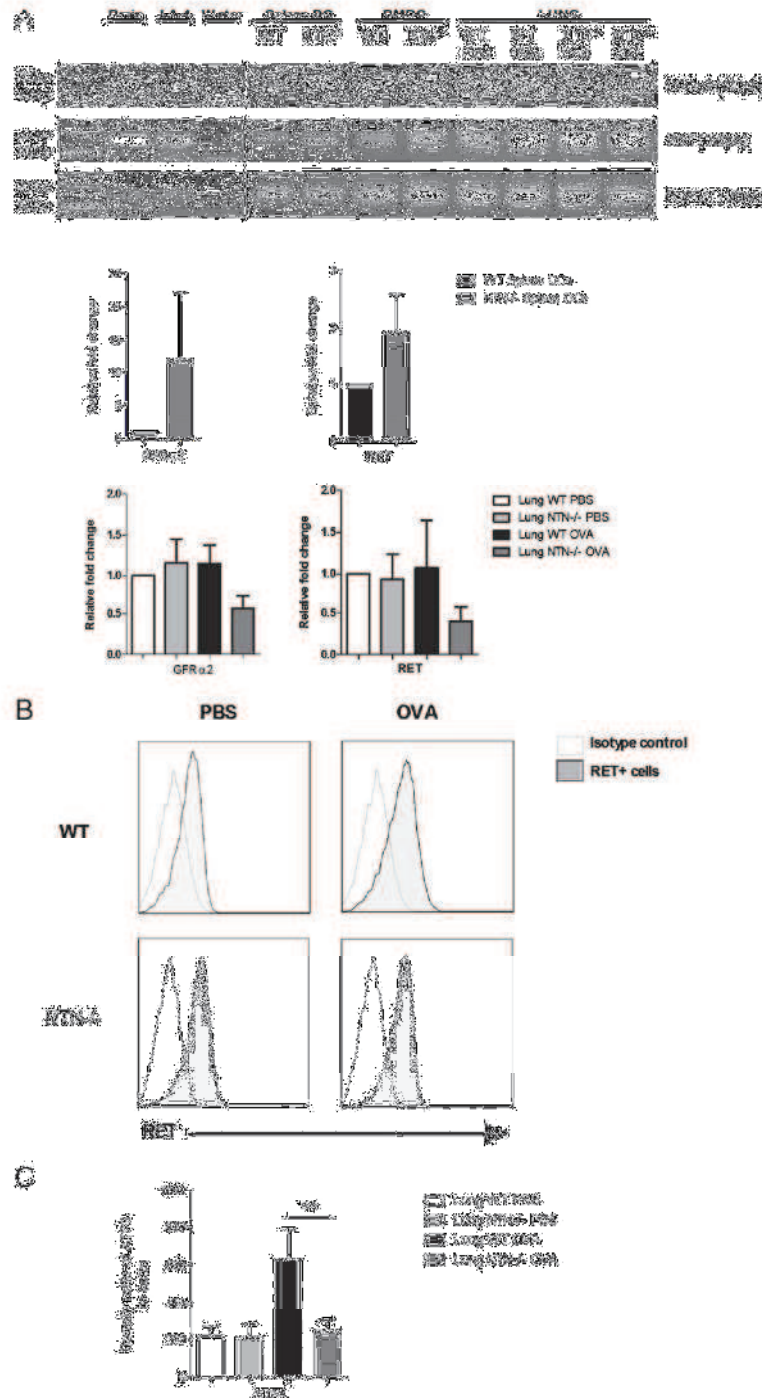
NTN<sup>-/-</sup> mice in airway inflammation demonstrates an essential role of NTN in the control of epithelial and immune cells like DC and CD4<sup>+</sup> T cells through the downregulation of the Th2 response. Thus, we tested the Ag-specific Th2 cell responses in lymphoid tissue and locally in the respiratory tract. As previously shown for NTN<sup>-/-</sup> lung draining LN cells (24), NTN<sup>-/-</sup> spleen cells better induce Th2 responses. Analyses of NTN<sup>-/-</sup> BMDCs and NTN<sup>-/-</sup> lymphoid CD4<sup>+</sup> T cells, demonstrated a higher capacity of these cells to activate the secretion of the Th2 cytokines compared with WT cells. Furthermore, the allergic airway inflammation in a HDM instead of OVA asthma model showed similar results by exhibiting more immune cells in the BALF of NTN<sup>-/-</sup> mice, in particular eosinophils, DCs, T cells, and neutrophils, and in addition, Th2 responses were increased. The same phenomenon was observed when NTN<sup>-/-</sup> mice had undergone chronic inflammation challenge using OVA. In this situation, NTN<sup>-/-</sup> lung tissues also exhibited increased markers of airway remodeling as shown by collagen deposition, neutrophils, KC, MMP-9, and the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6. In addition, we were able to demonstrate that NTN, added to OVA on DCs or LA-4 cell line, has the capacity to decrease in vitro the level of IL-6 and TNF- $\alpha$  and thus plays a direct role as an anti-inflammatory molecule. Finally, we showed the presence of the receptors GFR $\alpha$ -2 and RET on DCs and epithelial cells and a possible influence of NTN on the transcription factor ATF3 expression, because its level is lower in NTN<sup>-/-</sup> mice after OVA sensitization and challenge compared with WT mice.

To confirm our previous studies using OVA in acute airway asthma model inflammation (24), we tested another allergen model that is considered more relevant for human asthma (33). HDM extract contains many allergenic components to which 50–85% of asthmatics are allergic (34). In our model, HDM exposure induces a strong increase of airway inflammation markers in NTN<sup>-/-</sup> mice. Thus, NTN seems to play a role in the control of this pathology in both HDM- and OVA-induced acute asthma models. Nevertheless, the global Th2 response in the HDM model of airway inflammation is weaker than in the OVA model as reflected by a lower level of serum HDM-specific Ig.

DCs, as professional APCs, have an important function in the airways to initiate and modulate immune responses by influencing differentiation of T cells. It was shown that DCs use different signals to activate the T cell responses; one is delivered by MHCII molecules to the TCR and another one from costimulatory molecules such as CD80 and CD86 (35). Despite similar MHCII, CD80, and CD86 expression levels as in WT,



**FIGURE 5.** NTN has a potential anti-inflammatory role on immune and epithelial cells. Levels of IL-6 (A) and TNF- $\alpha$  in supernatants (B) of purified OVA-induced WT spleen CD4<sup>+</sup> T cells cocultured with WT BMDCs in the presence of OVA and/or 10 ng/ml NTN, 10<sup>2</sup> ng/ml, and 10<sup>3</sup> ng/ml. Data are derived from three mice per group of two or three independent experiments ( $n = 9$ ). (C) Levels of IL-6 in supernatants of LA-4 cells stimulated with OVA (200  $\mu$ g/ml) and/or NTN (15 ng/ml). Data are derived from seven independent experiments. Results of each group are expressed as means  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**FIGURE 6.** WT and NTN<sup>-/-</sup> mice express GFRα-2 and RET in lung tissues, DCs, and in LA-4 cell line. **(A)** GFRα-2 and RET mRNA expressions in LA-4 cell line ( $n = 3$ ), in BMDCs and in spleen DCs from naive mice ( $n = 3$ ), in lung tissues from OVA-induced mice ( $n = 5$ ) and in brain tissue as positive control. For each sample, GAPDH was used as endogenous control. **(B)** RET expression was examined by flow cytometry in OVA-induced WT and NTN<sup>-/-</sup> lung cells (RET<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> IgG<sup>-</sup>) compared with isotype control ( $n = 3$ ). Data are derived from three independent experiments. **(C)** ATF3 protein expression in OVA-induced WT and NTN<sup>-/-</sup> lung tissues were examined by Western blot. Data are derived from three mice per group of three independent experiments ( $n = 7/9$ ). Results of each group are expressed as means  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0.01$ ).

NTN<sup>-/-</sup> BMDCs have higher T cell stimulatory capacities in vitro. Moreover, stimulated NTN<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells induce a more robust activation compared with WT. These findings suggest that Th2 cell responses might at least in part be negatively regulated by NTN but that control might be dependent on several other cosignaling pathways, through adhesion or costimulatory molecules like TIM family or members of the TNF superfamily:

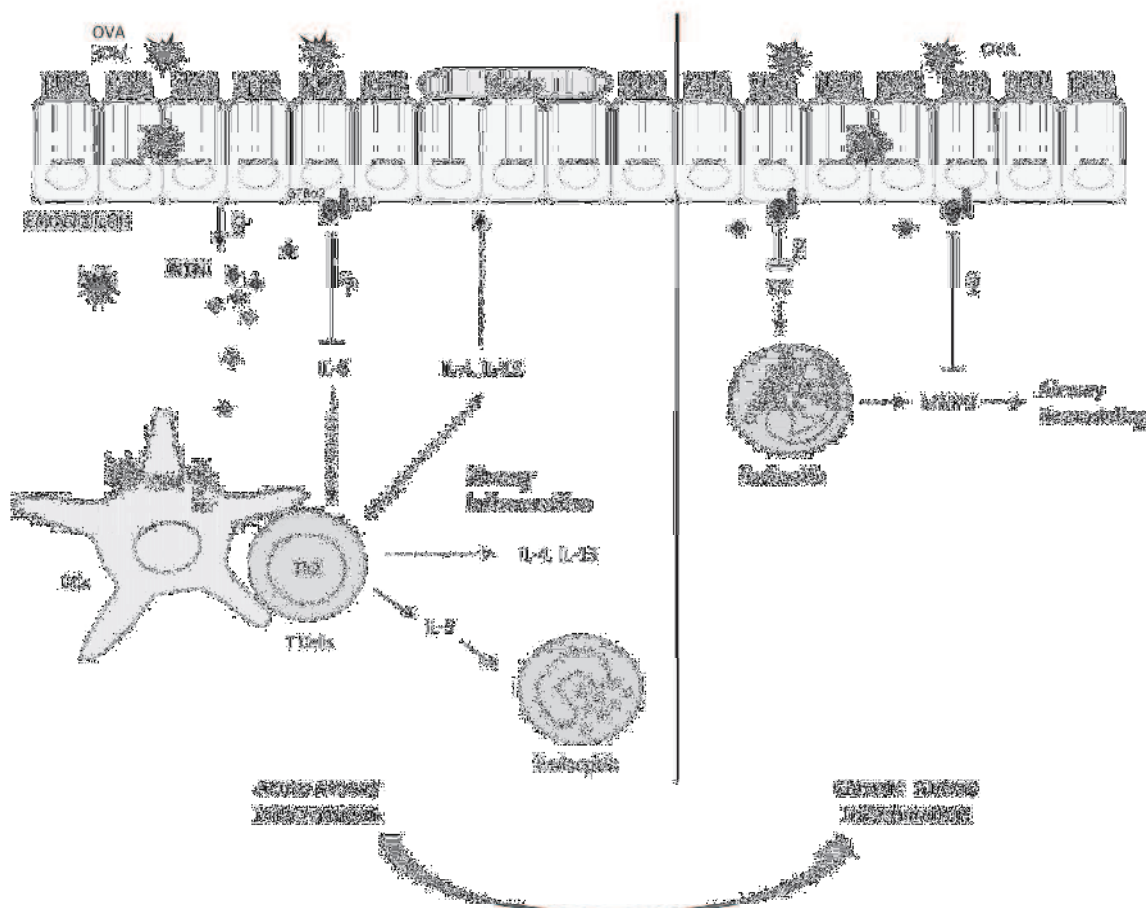
CD70, OX40 ligand and LIGHT (36). LIGHT could be an interesting candidate as it was described to be involved in T cell activation and in the promotion of MMP-9 and IL-13 expression in airway remodeling in OVA-induced animal models of chronic asthma (4, 37). This hypothesis needs to be tested to detail the potential anti-inflammatory effect of NTN demonstrated previously (24).

Because we observed the expression of GFR $\alpha$ -2 and RET mRNA in lung tissues, in immune and epithelial cells, this suggests a direct action of NTN on DCs and T cells. Our results are in accordance with previous reports, which described that mice and human lung, LN, and immune cell subsets like CD4<sup>+</sup> T cells and monocytes are able to produce NTN and express its receptors GFR $\alpha$ -2 and RET (29, 38–41). Furthermore, after a stimulation with OVA and NTN in a culture of DCs or the 1.A-4 cell line, the IL-6 levels were lower in comparison with the condition with OVA alone. IL-6 was shown to be produced by macrophages or DCs, by epithelial, endothelial, and some tumor cells. A potential role of IL-6R in controlling Th2 function was suggested (42). Thus, IL-6 might be released by DCs and then influence T cells by promoting a Th2 response in the airways. We can make the hypothesis that NTN, through the binding of its receptors GFR $\alpha$ -2 and RET on immune cells, may inhibit the secretion of IL-6, leading to a decrease of the inflammation as illustrated in Fig. 7. Accordingly, in absence of NTN, IL-6 is overexpressed resulting in an increase of the inflammation observed in NTN<sup>-/-</sup> mice.

Airway epithelial cells play an important role in asthma pathophysiology via the interaction with immune cells like DCs and the secretion of proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8/KC.

These cytokines have been associated not only with inflammation but also with airway remodeling and hyperresponsiveness (43). Direct interactions have been shown between the RET pathway and immune response as the RET mRNA level is correlated with the transcript of IL-8 in monocytes and macrophages (40). This could be a link to our results showing a strong increase of IL-8/KC secretion in lung in the absence of NTN. Furthermore, the secretion of TNF- $\alpha$  and KC inducing a recruitment of neutrophils, is associated with airway remodeling of chronic bronchial inflammation (44). In our experiments, TNF- $\alpha$  levels were higher in NTN<sup>-/-</sup> mice, as were the levels of neutrophils, which also differed between NTN<sup>-/-</sup> and WT mice. This could correlate with findings reported previously by Vargas-Leal et al. (39) who showed that addition of NTN to immune cells reduced the amount of TNF in the supernatants of PBMC. Taken together with our results, this study suggests that NTN might regulate the expression of TNF- $\alpha$  during chronic asthma.

Following stimulation by TNF- $\alpha$  and IL-8/KC, neutrophils will release granules whose major component is MMP-9 (45). MMP-9 is found in the BALF of asthmatic patients, and the increase of MMP-9 activity in the lung tissues is related to the increase of collagen deposition in the airway walls (46). We have shown that



**FIGURE 7.** Model of mechanism of action of NTN during airway inflammatory responses. As a response to stimulation from the allergen, NTN might be produced by airway epithelial cells. This molecule could be able to modulate epithelial and immune cells like DCs through the regulation of the acute airway inflammation. During chronic airway inflammation, this effect would lead to a partial control of the airway remodeling via various cytokines like, KC, MMP-9, TNF- $\alpha$ , and collagen deposition.



NTN<sup>-/-</sup> mice presented a higher MMP-9 activity than WT mice resulting in a higher level of peribronchial collagen deposition. As previously shown for the influence of the neurotrophin BDNF on eosinophils (47), one hypothesis could be that NTN produced by airway epithelial cells could be able to modulate immune cells like DCs, T cells, or neutrophils by the way of various cytokines like IL-6, KC, MMP-9, and TNF- $\alpha$  and collagen deposition (Fig. 7).

ATF3 regulates proinflammatory cytokine production like IL-4, IL-5, IL-6, and IL-13 in immune cells through a negative feedback mechanism to prevent acute inflammatory syndromes (48, 49). In response to LPS, ATF3 is also able to downregulate TNF- $\alpha$  (30). The fact that ATF3 is expressed at a lower level in NTN<sup>-/-</sup> mice after OVA sensitization and challenge compared with WT mice could be linked with the cytokine level observed in these mice. By which mechanism NTN is able to influence the ATF3 level expression remains to be determined. However, through the activation of GFR $\alpha$ -2 and RET pathway, it has been shown that NTN could modulate the ATF3 expression in neurons (50).

In conclusion, treatment with NTN can reduce the secretion of IL-6 by immune cells. The absence of this neurotrophic factor increases cellular infiltration by eosinophils and neutrophils in the airways, activates the synthesis and secretion of cytokines, and increases the IgE synthesis by B cells, related to acute and chronic airway inflammation and remodeling. Further studies should be performed using NTN in vitro with different partners like airway epithelial cells, DCs and T cells or neutrophils to define exactly the anti-inflammatory potential role of NTN. It now remains to be established whether and how this pathway is also operative in humans, as it was recently shown that RET is likewise present in human peripheral T cells (39, 40). In addition, NTN was identified in the transcriptome of the normal nonsmoker healthy human small airway epithelium (51) and was able to reduce TNF expression in human PBMC (39).

### Acknowledgments

We thank Caroline Davril for technical assistance, Nicolas H.C. Brous for flow cytometry analysis, and Stephanie Sallai and Chantal Courtois for taking care of the animals.

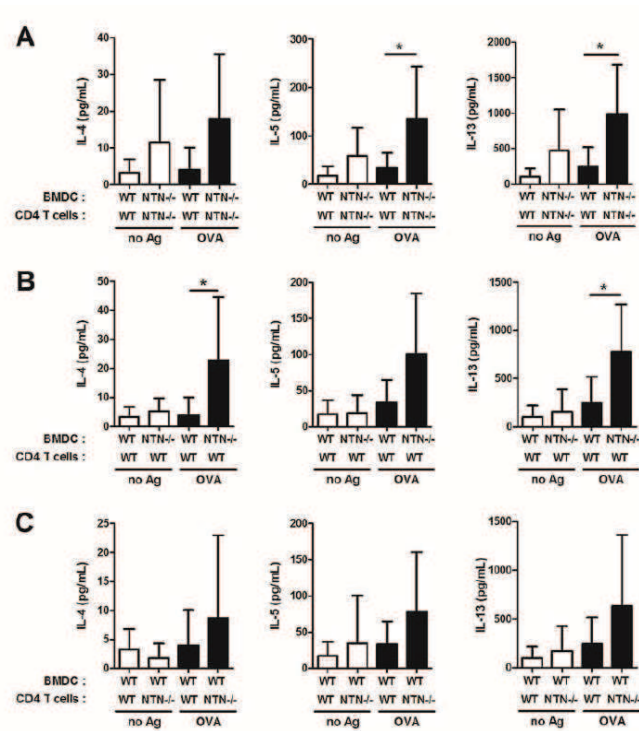
### Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

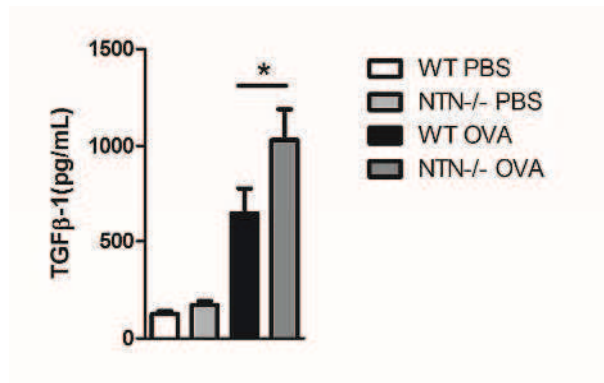
### References

- Plantinga, M., H. Hamada, and B. N. Lambrecht. 2010. Origin and functional specializations of DC subsets in the lung. *Eur J Immunol* 40: 2112–2118.
- Liu, Y. J. 2006. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 203: 269–273.
- Kaur, D., and C. Brightling. 2012. OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma. *Chest* 141: 494–499.
- Doherty, T. A., P. Sorosh, N. Khorram, S. Fukuyama, P. Rosenthal, J. Y. Cho, P. S. Norris, H. Choi, S. Scheu, K. Pfeffer, et al. 2011. The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for obstructive airway remodeling. *Nat Med* 17: 596–603.
- Lambrecht, B. N., and H. Hamada. 2012. The airway epithelium in asthma. *Nat. Med.* 18: 684–692.
- Barnes, P. J. 2011. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol. Rev.* 242: 31–50.
- Page, K., J. R. Ledford, P. Zhou, and M. Wills-Karp. 2009. A TLR2 agonist in German cockroach frass activates MMP-9 release and is protective against allergic inflammation in mice. *J. Immunol.* 183: 3400–3408.
- Kim, M. S., K. A. Cho, Y. J. Cho, and S. Y. Woo. 2013. Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models. *Allergy Asthma Immunol Res* 5: 197–206.
- Heuckeroth, R. O., H. Enomoto, J. R. Grider, J. P. Golden, J. A. Hanke, A. Jaekman, D. C. Molliver, M. E. Bardgett, W. D. Snider, E. M. Johnson, Jr., and J. Milbrandt. 1999. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22: 253–263.
- Pulley, L. J., R. Newton, I. M. Adcock, and P. J. Barnes. 2001. TGF $\beta$ 1 allele association with asthma severity. *Hum. Genet.* 109: 623–627.
- Hansen, G., J. J. McIntire, V. P. Yeung, G. Berry, G. J. Thorbecke, L. Chen, R. H. DeKroeger, and D. T. Umetsu. 2000. CD14<sup>+</sup> T helper cells engineered to produce latent TGF  $\beta$ 1 reverse allergen induced airway hyperactivity and inflammation. *J. Clin. Invest.* 105: 61–70.
- Joseph, J., S. Benedict, P. Badrinath, S. Wassef, M. Joseph, S. Abdulkhalik, and M. G. Nicholls. 2003. Elevation of plasma transforming growth factor  $\beta$ 1 levels in stable nonatopic asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 91: 472–476.
- Redington, A. E., J. Madden, A. J. Frew, R. Djukanovic, W. R. Roche, S. T. Holgate, and P. H. Howarth. 1997. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 642–647.
- Palomares, O., M. Martín-Fontecha, R. Lauener, C. Traidl-Hoffmann, O. Cavkaytar, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2014. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF  $\beta$ . *Genes Immun.* 15: 511–520.
- Buj-Bello, A., J. Adu, L. G. Piñón, A. Horton, J. Thompson, A. Rosenthal, M. Chinchetru, V. L. Buchman, and A. M. Davies. 1997. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 387: 721–724.
- Airaksinen, M. S., and M. Saarma. 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 383–394.
- Widenfalk, J., C. Nosrat, A. Tomac, H. Westphal, B. Hoffer, and L. Olson. 1997. Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor- $\beta$  (GFR $\beta$ ), novel proteins related to GDNF and GDNFR- $\alpha$  with specific cellular partners of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J. Neurosci.* 17: 8506–8519.
- Golden, J. P., J. A. DeMarco, P. A. Osborne, J. Milbrandt, and E. M. Johnson, Jr. 1999. Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp. Neurol.* 158: 504–528.
- Licu, T., M. Kollarik, A. C. Myers, and B. J. Underem. 2011. Neurturin and GDNF family ligand receptor expression in vagal sensory nerve subtypes innervating the adult guinea pig respiratory tract. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 300: L790–L798.
- Lieu, T. M., A. C. Myers, S. Meeker, and B. J. Underem. 2012. TRPV1 induction in airway vagal low-threshold mechanosensory neurons by allergen challenge and neurotrophic factors. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302: L941–L948.
- Liangsdorf, A., K. Radzikinas, A. Kroten, S. Jain, and X. Ai. 2011. Neural crest cell origin and signals for intrinsic neurogenesis in the mammalian respiratory tract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44: 293–301.
- Tollet, J., A. W. Everett, and M. P. Sparrow. 2002. Development of neural tissue and airway smooth muscle in fetal mouse lung explants: a role for glial-derived neurotrophic factor in lung innervation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36: 420–429.
- Song, X. J., D. Q. Li, W. Farley, L. H. Luo, R. O. Heuckeroth, J. Milbrandt, and S. C. Pflugfelder. 2003. Neurturin-deficient mice develop dry eye and keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4223–4229.
- Michel, T., M. Thérèse, A. Poli, O. Domingues, W. Ammerlaan, N. H. Brons, F. Hentges, and J. Zimmer. 2011. Increased Th2 cytokine secretion, eosinophilic airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in neurturin-deficient mice. *J. Immunol.* 186: 6497–6504.
- Willart, M. A., K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyacit, B. N. Lambrecht, and H. Hamada. 2012. Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J. Exp. Med.* 209: 1505–1517.
- Border, W. A., and N. A. Noble. 1994. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331: 1286–1292.
- Kudo, M., Y. Ishigatsubo, and I. Aoki. 2013. Pathology of asthma. *Frontiers Microbiol.* 4: 263.
- Neveu, W. A., J. L. Allard, D. M. Raymond, L. M. Bourassa, S. M. Burns, J. Y. Bunn, C. G. Irvin, D. A. Kaminsky, and M. Rincon. 2010. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respir. Res.* 11: 28.
- Almeida, A. R., S. Arroz-Madeira, D. Fonseca-Pereira, H. Ribeiro, R. Lasrado, V. Pachais, and H. Veiga-Fernandes. 2012. RET/GFR $\alpha$  signals are dispensable for thymic T cell development in vivo. *PLoS One* 7: e52949.
- Gilchrist, M., V. Thorsson, B. Li, A. G. Rust, M. Korb, J. C. Roach, K. Kennedy, T. Hai, H. Bolouri, and A. Adereem. 2006. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 441: 173–178.
- Caltori, C. M., L. B. Wender, and M. So. 2013. Upregulation of ATF3 inhibits expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 during *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Cell. Microbiol.* 15: 1837–1850.
- Gilchrist, M., W. R. Henderson, Jr., A. E. Clark, R. M. Simmons, X. Ye, K. D. Smith, and A. Adereem. 2008. Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med.* 205: 2349–2357.
- Chapman, D. G., J. E. Tully, J. D. Nolin, Y. M. Janssen-Heinger, and C. G. Irvin. 2014. Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next? *J. Cell. Biochem.* 115: 2055–2064.
- Nelson, R. P., Jr., R. DiNicolo, E. Fernandez-Caldas, M. J. Selenick, R. F. Lockey, and R. A. Good. 1996. Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in nonasthmatic control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 258–263.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 233–258.
- Bakdash, G., S. P. Sittig, T. van Dijk, C. G. Figdor, and T. J. de Vries. 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* 4: 53.

37. Tamada, K., K. Shimozaki, A. I. Chapoval, Y. Zhu, J. Su, S. F. Chen, S. L. Hsieh, S. Nagata, J. Ni, and L. Chen. 2000. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol.* 164: 4105–4110.
38. Yang, C., D. Hutto, and D. W. Sah. 2006. Distribution of GDNF family receptor  $\alpha 3$  and RET in rat and human non-neural tissues. *J. Mol. Histol.* 37: 69–77.
39. Vargas-Leal, V., R. Bruno, T. Derfuss, M. Krumbholz, R. Hohlfeld, and E. Meind. 2005. Expression and function of glial cell line derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *J. Immunol.* 175: 2301–2308.
40. Rusmini, M., P. Griseri, I. Matera, E. Pontarini, R. Ravazzolo, D. Mavilio, and I. Coccherini. 2014. Expression variability and function of the RET gene in adult peripheral blood mononuclear cells. *J. Cell. Physiol.* 229: 2027–2037.
41. Almeida, A. R., D. Fonseca-Pereira, S. Arroiz-Madeira, H. Ribeiro, C. Labão-Almeida, and H. Veiça-Fernandes. 2014. The neurotrophic factor receptor RET regulates IL-10 production by in vitro polarised T helper 2 cells. *Eur. J. Immunol.* 44: 3605–3613.
42. Doganci, A., K. Sauer, R. Kurwot, and S. Finotto. 2005. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 28: 257–270.
43. Vieira, R. P., T. Müller, M. Grimm, V. von Gerner, B. Verner, T. Dürk, S. Cicko, C. K. Ayata, S. Sonntcher, B. Kobayashi, et al. 2011. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184: 215–223.
44. Thomas, P. S., D. H. Yates, and P. J. Barnes. 1995. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 76–80.
45. Khokha, R., A. Murthy, and A. Weiss. 2013. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 649–665.
46. Atkinson, J. J., and R. M. Senior. 2003. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28: 12–24.
47. Hahn, C., A. P. Islamian, H. Renz, and W. A. Noecker. 2006. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 787–794.
48. Thompson, M. R., D. Xu, and B. R. Williams. 2009. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J. Mol. Med.* 87: 1053–1060.
49. Roussel, L., S. Robins, A. Schachter, J. Bérubé, Q. Hamid, and S. Roussseau. 2011. Steroids and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity suppress activating transcription factor 3 expression in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 1632–1634.
50. Young, B. A., B. M. Girard, and R. L. Parsons. 2008. Neurturin suppresses injury-induced neuronal activating transcription factor 3 expression in cultured guinea pig cardiac ganglia. *J. Comp. Neurol.* 508: 795–805.
51. Hackett, N. R., M. W. Butler, R. Shaykhiyev, J. Salit, L. Omberg, J. L. Rodriguez-Flores, J. G. Mezey, Y. Strulovici-Barel, G. Wang, L. Didon, and R. G. Crystal. 2012. RNA-Seq quantification of the human small airway epithelium transcriptome. *BMC Genomics* 13: 82.



**Figure S1: NTN<sup>-/-</sup> lung draining LN T cells and DCs induce higher Th2 cytokine secretion.** Purified OVA-induced LN CD4<sup>+</sup> T cells were co-cultured with BMDCs in the presence of OVA (black bars) or no Ag (white bars). (A) Levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in culture supernatants of WT and NTN<sup>-/-</sup> BMDCs and T cells. (B) Levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in culture supernatants of WT or NTN<sup>-/-</sup> BMDCs in the presence of WT T cells. (C) Levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in culture supernatants of WT BMDCs in the presence of WT or NTN<sup>-/-</sup> T cells. Data are derived from two or three mice per group of three independent experiments (n=7/8). Results of each group are expressed as means  $\pm$  SEM (\* p < 0.05).



**Figure S2: NTN<sup>-/-</sup> mice produce higher levels of TGFβ-1 after an acute airway inflammation.** Mice were treated with OVA or PBS. Levels of TGFβ-1 in BALF are shown. Data are derived from three mice per group of three independent experiments (n=9). Results of each group are expressed as means  $\pm$  SEM (\* p < 0.05).

Publication 2

« Mouse Lung and Spleen Natural Killer Cells Have Phenotypic and Functional Differences, in Part Influenced by Macrophages »

Tatiana Michel, Aurélie Poli, Olivia Domingues, Marion Mauffray, Maud Thérésine,  
Nicolaas H. C. Brons, François Hentges, Jacques Zimmer

PLoS One, 2012;7(12) : e51230.

Résumé :

Les cellules “Natural Killer” (NK) sont des cellules du système immunitaire inné. Elles constituent une première ligne de défense contre les infections virales et les cellules tumorales au niveau de la moelle osseuse et des organes périphériques comme les poumons et la rate. Les poumons, en contact avec de nombreux agents pathogènes respiratoires, sont le siège de maladies inflammatoires. La rate, en tant qu’organe lymphoïde secondaire connecté à la circulation sanguine, est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire systémique.

En utilisant des souris C57BL/6, nous avons étudié les différences phénotypiques et fonctionnelles qui pouvaient exister entre les cellules NK présentes au niveau de la rate ou des poumons. Le niveau de maturation de ces cellules, le niveau d’expression de leurs récepteurs, leur capacité de prolifération, leur activité cytotoxique et leur sécrétion de cytokines ont été analysés. Afin de déterminer si l’environnement des cellules NK pouvait expliquer les différences trouvées, l’influence des macrophages, issues des poumons et de la rate, sur les cellules NK a été étudiée *in vitro*.

Les résultats ont montré que les cellules NK issues des poumons ont des caractéristiques de cellules plus matures en comparaison avec les cellules NK issues de la rate. Cependant, le niveau d’expression des récepteurs, la capacité de prolifération, l’activité cytotoxique et la sécrétion de cytokine sont supérieures chez les cellules NK issues de la rate comparées aux cellules NK issues des poumons. De plus, suite à un contact direct des macrophages issus de la rate ou des poumons, l’activité cytotoxique de ces deux sous-types de cellules NK est augmentée.

Ces résultats suggèrent qu’il existe des différences phénotypiques et fonctionnelles entre les différents sous-types de NK selon leur localisation dans les différents organes. Ces différences peuvent être en partie dues à leur environnement cellulaire.

# Mouse Lung and Spleen Natural Killer Cells Have Phenotypic and Functional Differences, in Part Influenced by Macrophages

Tatiana Michel<sup>1\*</sup>, Aurélie Poli<sup>1</sup>, Olivia Domingues<sup>1</sup>, Marion Mauffray<sup>1</sup>, Maud Thérésine<sup>1</sup>, Nicolaas H. C. Brons<sup>2</sup>, François Hentges<sup>1</sup>, Jacques Zimmer<sup>1</sup>

**1** Laboratory of Immunogenetics and Allergology, Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé), Luxembourg, Luxembourg, **2** Core Facility Flow Cytometry, Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé), Luxembourg, Luxembourg

## Abstract

NK cells are lymphocytes of the innate immune system which are a first line of defense against infections and tumor cells, in bone marrow and peripheral organs like lung and spleen. The lung is an organ in contact with respiratory pathogens and the site of inflammatory disorders triggered by the respiratory environment. In contrast, spleen is a lymphatic organ connected to the blood system which regulates the systemic immune response. Here we compare NK cell maturation and expansion as well as expression of NK cell receptors in spleen and lung compartments. We show that spleen and lung NK cells differ in phenotypic and functional characteristics due to a difference of maturity and cellular microenvironment. Indeed we observe that spleen and lung macrophages have the capacity to influence the cytotoxicity of NK cells by cell-to-cell contact. This suggests that the differences of NK cell subsets are in part due to a modulation by the organ environment.

**Citation:** Michel T, Poli A, Domingues O, Mauffray M, Thérésine M, et al. (2012) Mouse Lung and Spleen Natural Killer Cells Have Phenotypic and Functional Differences, in Part Influenced by Macrophages. PLoS ONE 7(12): e51230. doi:10.1371/journal.pone.0051230

**Editor:** Vassiliki A. Boussiotis, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, United States of America

**Received:** August 24, 2012; **Accepted:** October 31, 2012; **Published:** December 5, 2012

**Copyright:** © 2012 Michel et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg and by a grant from the FNR (Fond National de la Recherche), Luxembourg. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: tatiana.michel@crp-sante.lu

## Introduction

NK cells are lymphocytes present all around the body, which contribute to trigger antiviral and anti-tumor defense. They participate in the resistance against infectious agents and influence the acquired immune response by cytotoxic activity and the secretion of cytokines, particularly IFN- $\gamma$  but also Th2-associated cytokines such as IL-5 and IL-13 and the immunoregulatory cytokine IL-10 [1,2]. NK cells are found in most organs, including bone marrow, spleen, lymph nodes, liver, lung and uterus [3,4]. The tissue distribution of NK cells *in vivo* may impact their local role in immune responses. It has been described in the mouse, that NK cells, in various lymphoid or non lymphoid organs, are quite different [5–8]. In bone marrow, NK cell subsets are considered precursors of a mature NK cell population, which is CD11b<sup>low</sup> and predominantly found in peripheral organs such as the spleen, blood, liver and lung [9]. The lung is an important site of exposure to antigens and pathogens via its airways and its vascular system [10]. A viral infection will enhance NK cell activity in the lung or spleen, depending on whether the virus is given intranasally or intravenously. It was described that NK cells from spleen and lung have quite the same surface characteristics [11,12], but their maturation is different, in fact there are more CD27<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> NK cells in the lung compared to the spleen [6,12].

There is a considerable crosstalk between NK cells, dendritic cells (DCs) or macrophages. Several studies have shown that TLR-stimulated DCs or macrophages contribute to NK cell activation [13–20]. Macrophages are present in the environment of NK cells

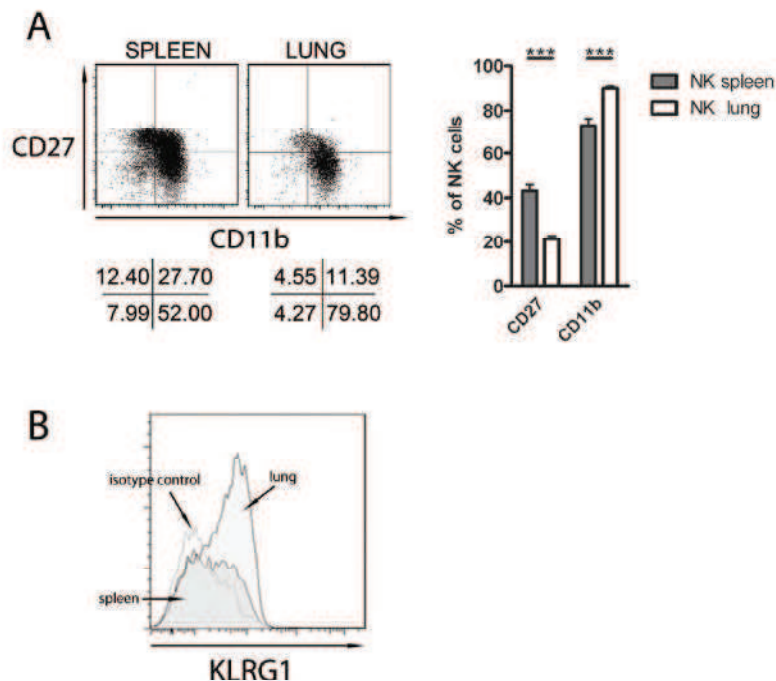
in the lung and in the spleen. It was shown that macrophages can influence NK cell activity. The crosstalk between human macrophages and NK cells activates the proliferation and the cytokine secretion of the latter, and primes NK cell cytotoxicity against potential target cells [16]. Furthermore, human alveolar macrophages are able to inhibit NK cell activity *in vitro* [17,18]. In a rat model, it has been shown that NK cell activities are not inhibited by spleen macrophages [19]. Nevertheless, some major differences among species (rat, mouse and human) were found *in vivo* in the regulation of NK activity by macrophages [20].

In this study, we show in a mouse model that NK cells from the lung have other phenotypic and functional characteristics than NK cells from the spleen. Furthermore, we investigated the potentially different role of lung and spleen macrophages in the regulation of NK cell activity, by comparing *in vitro* the NK cell cytotoxicity in the presence of these two subsets of macrophages. Results indicated that macrophages increased NK cell-mediated cytotoxicity against tumor cells. Interestingly, spleen macrophages have a tendency to prime further NK cells cytotoxicity than lung macrophages.

## Materials and Methods

### Mice

Female C57BL/6 mice were obtained from Harlan (The Netherlands). Mice were kept under specific pathogen-free conditions and were used at 6–10 weeks of age. All procedures



**Figure 1. Differences of the mature phenotype between spleen and lung NK cells.** NK cells (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) from lung and spleen were analyzed by flow cytometry. (A) NK cells were analyzed for CD27 and CD11b expression. The data shown represent one out of seven experiments. Results for each group (n = 7) are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0.001 (Student's unpaired t-test). (B) NK cells were gated for KLRG1 expression. The data shown represents one out of three experiments. doi:10.1371/journal.pone.0051230.g001

respected current European regulations and were approved by the National Animal Research Authority.

#### Cell Isolation and Culture

The mice were killed by cervical dislocation and spleen and lung were removed. Then cells were isolated using a digestion solution: collagenase II (1 ng/ml) (Invitrogen, Belgium), benzonase (50 U/ml) (Merck, Germany), MgCl<sub>2</sub> (0.06  $\mu$ M), 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and treatment with red blood cell lysis buffer. Total spleen and lung cells were stained for FACS analysis, CFSE assay or incubated over-night with LPS (1  $\mu$ g/ml), IL-12 (5 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml), or PMA (50 ng/ml)/ionomycin (1  $\mu$ g/ml) and IL-4 (50 ng/ml) in complete medium: DMEM with 10% FCS, penicillin/streptomycin, 1 mM HEPES buffer and 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol supplemented with recombinant human IL-2 (1000 U/ml) (R&D Systems, UK). Macrophages were purified with the F4/80 biotin Ab and magnetic beads (anti-microbead Biotin isolation kit, Miltenyi Biotec, Belgium). NK cell purification was performed after a Nylon wool column (G.KISKER, Germany) as a negative selection, using magnetic beads and the F4/80 biotin Ab added in a cocktail of biotin-conjugated antibodies. (NK cell isolation kit II, Miltenyi Biotec).

Freshly isolated macrophages were incubated in 96 well plates or in transwells in 24 well plates. After 1 h, NK cells were incubated alone, in direct contact or in transwells with macrophages for 24 h at the ratio of 5:1 in complete medium supplemented with IL-2.

#### CFSE Assays

Spleen and lung cells were labeled with 10  $\mu$ M of CFSE (Sigma-Aldrich, Belgium) for 15 min at 37°C in PBS with 0.2% BSA. After two washes, cells were resuspended in complete medium supplemented with IL-2 and put in culture for 4 days in 48 well plates. 7-AAD<sup>-</sup> cells were gated for analysis.

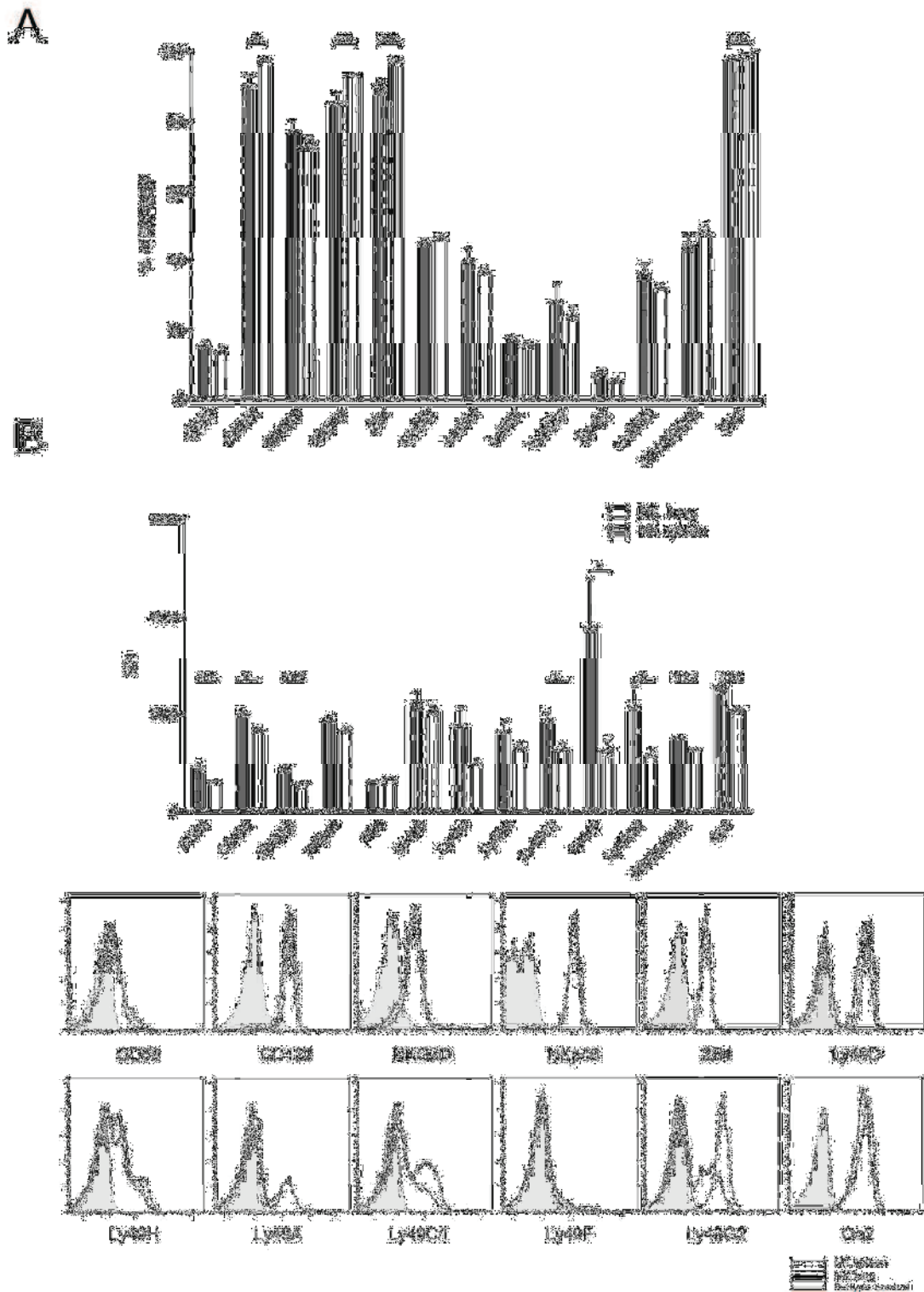
#### Degranulation and Cytokine Assays

Lysosomal granule exocytosis was determined by CD107a expression. After an over-night activation of spleen and lung cells at 37°C with different types of stimulating molecules (see cell isolation and culture part), cells were incubated for 5 minutes with anti-CD16/CD32 Ab (1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells) followed by staining with anti-CD107a-FITC mouse-Ab or isotype control. After 1 h of incubation, Golgi stop (BD Biosciences, Belgium) was added for additional 4 h. Subsequently, intracellular staining for IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  were performed.

#### Cytotoxicity Assays

Cytotoxicity assays were performed as described previously [21]. Briefly NK cell cytotoxicity was determined after 24 h of incubation in 1000 U/ml of IL-2, or IL-2, IL-12 (5 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml), against the YAC-1 target cells that were labeled with 5  $\mu$ M of CFSE. Effector cells (E) were mixed with target cells (T) at E/T ratios ranging from 1/1 to 25/1. After 4 h of incubation at 37°C, cells were analyzed on a FACSCanto flow cytometer. To identify dead cells, 15  $\mu$ M of the dead cell marker

NK Cell Differences and Macrophage Influences





**Figure 2. The level of receptor expression differs between spleen and lung NK cells.** Spleen and lung cells were stained for NK cells (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) and analyzed for several markers and Ly49 receptors by flow cytometry. (A) % of NK cells expressing the receptors. (B) MFI values of NK cell receptors. Results for each group (n = 7) are expressed as means ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (Student's unpaired t-test). doi:10.1371/journal.pone.0051230.g002

TO-PRO-3 (Invitrogen, Belgium) was added. The percentage of dead cells during the test was normalized to the percentage of NK cells in lung and spleen suspensions. To assess NK cell cytotoxicity after coculture or transwell culture with macrophages, NK cells were removed by harvesting non-adherent cells and washing with medium. The purity of isolated NK cells was the same than the culture of NK cells alone (>90% NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells) as determined by flow cytometry.

### Flow Cytometry and Antibodies

Anti-mouse antibodies used for flow cytometry were as follows: CD107a-ITTC, Ly49G2-ITTC, 2B4-ITTC, Ly49D-ITTC, (BD Biosciences); Ly49H-ITTC, CD27-ITTC, Qa2-ITTC, NKG2A/C/E-ITTC (eBioscience, USA); Ly49A-PE, Ly49C/F-PE, Ly49F-PE, NKG2D-PE (BD Biosciences), CD69-PE (Biologend), IL-5-PE, IL-6-PE, IL-10-PE, IL-13-PE, TNF-α-PE, IFN-γ-PE, CD122-PE (eBioscience); NK1.1-PE-Cy7, CD11b-APC, NKp46-APC and CD3-APC-Alexa780, KLRG1-biotin (eBioscience) and F4/80-biotin (Biologend), Fluorescein (DTAF)-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch, UK). The viability was confirmed by staining the cells with live/dead fixable near-IR dead cells stain (Invitrogen). Cells were analyzed on a FACSCanto flow cytometer and the graphs were performed with Flow Jo software (Tree Star).

### Statistical Analysis

The statistical significance of differences was determined by an unpaired t test and Mann Whitney test using GraphPad software. The values were expressed as means ± SEM from independent experiments. Values of \*p<0.05 were considered significant.

## Results and Discussion

### NK Cell Maturation and Receptor Expression Change Depending on the Organ

The ratio of the NK cell subsets differ between various compartments of the body. The most immature subset is CD27<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup>, followed by CD27<sup>int</sup>CD11b<sup>int</sup> and CD27<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> subsets [9]. It has been described that the ratio of NK cell subsets varies between spleen and lung [6]. Here we confirm that the percentage of CD27<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> NK cells is higher in the lung than in the spleen (Fig. 1, A). Lung NK cells expressed more CD11b than spleen NK cells (90.07% ± 0.8 *versus* 73.24% ± 3.1) and less CD27 (21.17% ± 1.7 *versus* 43.20% ± 2.7) (n = 7) (Fig. 1, A).

KLRG1 is another marker of NK cell maturation, indeed it was shown that its expression at the NK cell surface characterizes the most mature NK cell subset [22,23]. So we analyzed the presence of this receptor at the surface of spleen and lung CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK cells. We found that lung NK cells expressed more KLRG1 than spleen NK cells (61.9% *versus* 36.5%) (Fig. 1, B), confirming that lung NK cells have a more mature phenotype.

CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK cells from spleen and lung were characterized for their receptor distribution. The frequency of NK cells which express CD122, NKp46, 2B4 and Qa2 is higher in lung NK cells compared to spleen NK cells. The CD27<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> subset of NK cells represents a terminally mature population with high expression of Ly49 receptors [6,23]. The percentage of NK cells expressing the Ly49 receptor repertoire doesn't change between these two organs (Fig. 2, A). These results are in accordance with

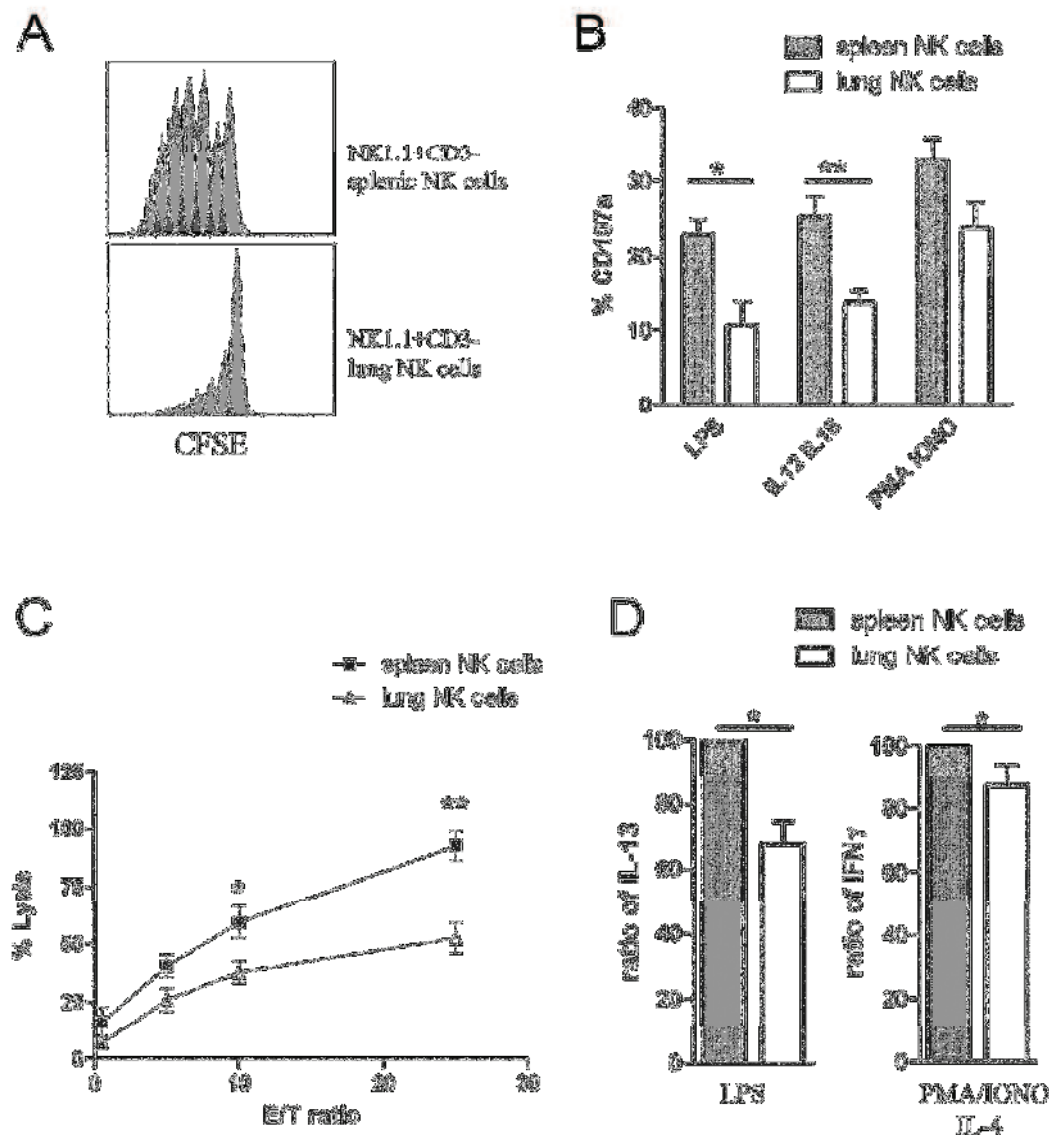
data reported by Guo and Topham [12]. Surprisingly the expression level at the cell surface, reflected by the mean fluorescence intensities (MFI) of the Ly49 inhibitory receptors (Ly49C/I, Ly49F and G2) is higher in NK cells from the spleen than from the lung (Fig. 2, B). The MFI of CD69, CD122, NKG2D, NKG2A/C/E and Qa2 is also significantly higher in spleen NK cells (Fig. 2, B). These data indicated that lung NK cells have a more mature phenotype and expressed less receptors at their surface. Hayakawa et al., have found that CD27<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup> NK cells displayed a skewed expression of inhibitory Ly19 receptors (C and I isoforms) [6]. Our results support the hypothesis that the more NK cells are CD27<sup>low</sup>CD11b<sup>high</sup>, the more this population is at the end stage of differentiation [9]. At this stage of maturation, lung NK cells may have a decrease of the capacity to present receptors at their surface [24]. Previous reports shown that CD3<sup>-</sup>NKp16<sup>+</sup> NK cells from the lung have more expression at their surface of Ly49D and Ly49C/I than those of the spleen [12,25]. This contradiction with our results could be due to the fact that the gender of mice is different, the conditions of gating (CD3<sup>-</sup>NKp16<sup>+</sup> population and not CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>), the methods (digestion step) and the group of cells analyzed (purified lymphocytes and not total cells) are not the same.

### NK Cell Proliferation Changes Depending on the Organ

In order to investigate if NK cells from the spleen and the lung have a different capacity to divide, we determined the proliferation rate of these two types of NK cells after CFSE staining. After 4 days in culture with IL-2, spleen NK cells displayed a stronger proliferative response than lung NK cells, as shown by the division profile in Fig. 3, A. We have found that lung NK cells express less CD122, the IL-2Rβ chain, at their surface. This may explain why these cells have a limited capacity to proliferate in comparison to spleen NK cells. This result is in accordance with previous data showing that the CD27<sup>low</sup> NK cell subset has less proliferative potential [6,9].

### NK Cell Degranulation and Cytotoxicity Change Depending on the Organ

We have compared the cytotoxic ability of lung NK cells and spleen NK cells. In three different conditions of activation (LPS, IL-12/IL-18 or PMA/ionomycin), spleen NK cells show a significantly stronger degranulation than lung NK cells (Fig. 3, B). This result correlates with the level of expression of the activating receptor CD69 found in lung and spleen NK cells, respectively. Furthermore the cytotoxic activity of spleen NK cells against YAC-1 target cells is two times higher than that of lung NK cells (92.8% ± 6.5 *versus* 52.65% ± 6.6) for the ratio 25/1 and the difference is also significant for the ratio 10/1 (Fig. 3, C). As described in a previous report, we found that the more the organ contains CD27<sup>low</sup> NK cells, the less there is cytotoxic activity [6]. Under steady-state conditions, lung is continuously exposed to antigen and pathogen compared to spleen. Thus lung develops specific strategy to prevent local inflammation. In regard of our functional assay, we suggest that lung NK cells have less capacity to react against microorganisms compared to spleen NK cells in absence of infection. The regulation of their activities could result from the cell environment. Therefore, the tissue distribution of NK cells seems to condition their role in immune response.

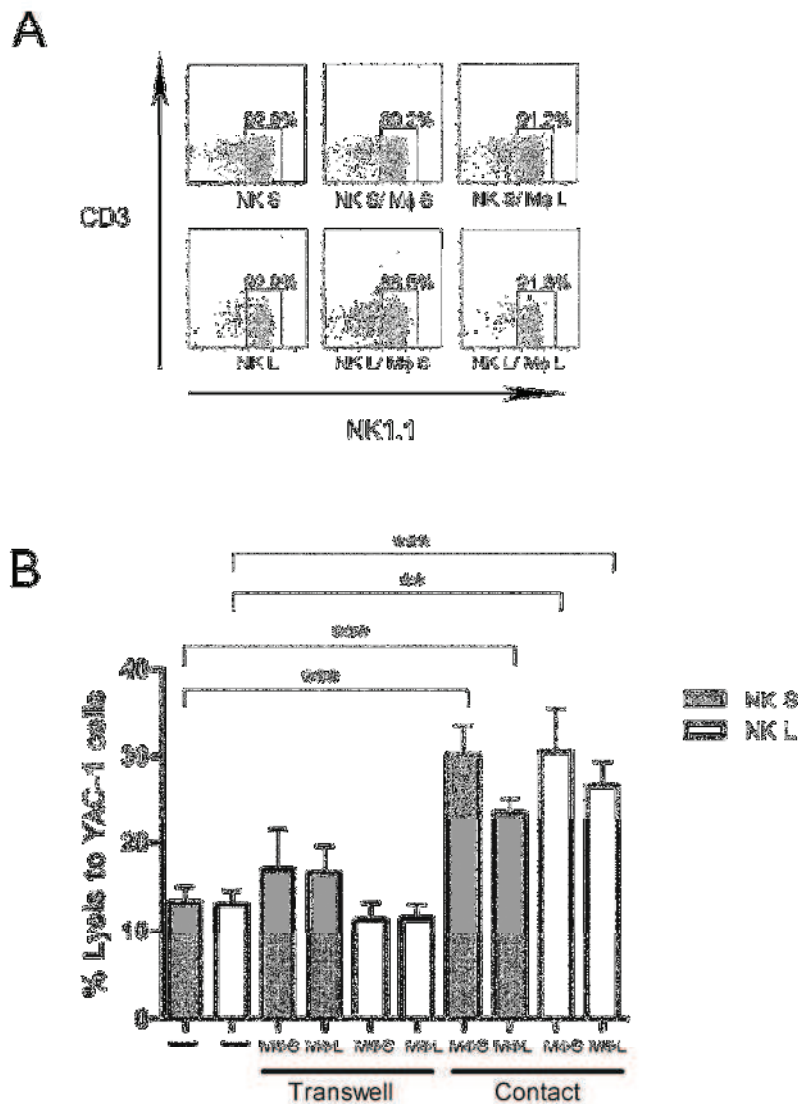


**Figure 3. Spleen and lung NK cells have different proliferative and cytotoxic capacity.** (A) Proliferation of 7AAD<sup>-</sup> NK cells. Splenocytes and lung cells were stained with CFSE and analyzed by flow cytometry after 4 days in culture. From high to low the peaks are showing an additional cell cycle, the highest arbitrary fluorescence unit peak could be cells which didn't cycle at all. Data are representative of three experiments. (B) Degranulation assay. Spleen and lung NK cells were stimulated with LPS, IL-12/IL-18 or PMA/ionomycin (PMA/IONO). CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK cells were analyzed for CD107a expression (n=4). (C) Cytotoxicity assay was performed against YAC-1 target cells (n=4). The results for each group are expressed as means ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01. (D) Cytokine levels. IL-13 and IFN-γ were produced by NK cells from the lung and the spleen after stimulation under different conditions: LPS or PMA/ionomycin/IL-4. Results are presented as a ratio of spleen NK cells (100%) to lung NK cells (n=4). The results for each group are expressed as means ± SEM. \*p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0051230.g003

#### Cytokine Secretion Levels from NK Cells Change Depending on the Organ

Cytokine production by spleen and lung NK cells was determined by intracellular staining. Upon stimulation with LPS, or PMA/ionomycin during 12 h, the expression levels of IL-13 and IFN-γ were higher in spleen NK cells in comparison to lung NK cells (Fig. 3, D). The levels of IL-5, IL-6, IL-10 and TNF-α

tended to be higher in spleen NK cells in comparison to lung NK cells but without reaching statistical significance (data not shown). It has been described that the CD27 receptor mediates IFN-γ production and that the CD27<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> NK cell subset shows the highest IFN-γ producing capacity [6,26]. As the spleen has a higher percentage of this NK cell subset when compared to the lung, rationally we found that spleen NK cells have a higher



**Figure 4. Influence of macrophages on NK cell cytotoxicity.** (A) Purity of NK cells used for the cytotoxicity test after contact with macrophages. The data shown represents one out of three experiments. (B) Cytotoxicity assays were determined against YAC-1 target cells at E:T ratio 1:2, after cell-to-cell contact or in transwells with macrophages or alone ( $n=3$ ). The results for each group are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . Mφ: macrophage, NK S: NK spleen, NK L: NK lung. doi:10.1371/journal.pone.0051230.g004

cytokine production capacity. Studies have shown after following the trafficking of CFSE labeled splenocytes in mouse, that spleen NK cells are not programmed to home to the spleen but could be found in all NK cell-containing organs [4,9,27]. This suggests that differences found between spleen and lung NK cells could be due to the different environment. As presented here, the organ microenvironment seems to have a significant role in influencing cytokine production by NK cells. Therefore we tried to define the environmental impact on spleen and lung NK cell function.

#### Influence of Macrophages on NK Cells

It has been shown that human macrophages have the capacity to increase the activity of NK cells [16]. To observe the influence of macrophages on NK cell function in the mouse, lung and spleen macrophages and NK cells were purified and put in direct contact or separately in transwells. Then the cytotoxic capacity of NK cells was tested. Lung and spleen NK cell purity was the same before and after contact with macrophages (Fig. 4A). After cell-to-cell contact with macrophages, spleen and lung NK cells significantly increased their capacity to kill YAC-1 tumor cells (Fig. 4B). Spleen and lung macrophages are able to prime the cytotoxicity of NK

cells, however they need to be in contact since the transwell conditions didn't show any differences with the NK cells alone. Furthermore, the activity of NK cells seems to be higher by the interaction with spleen macrophages compared to lung macrophages (Fig. 4B). This could explain previous results showing that spleen NK cells are more cytotoxic than lung NK cells when the test is performed with total cells. In addition, we have analyzed and compared the level of IL-12, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokine secretion in the supernatant of the different conditions of co-culture of macrophages and NK cells. Results have shown no differences in the presence or the absence of macrophages, which means that this interaction didn't activate or inhibit the secretion of IL-12, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (data not shown).

We have observed that lung NK cells have characteristics of more mature cells when compared with spleen NK cells. The level of the receptors present at the NK cell surface is lower in the lung and the functional capacities are also different between lung and spleen NK cells. Due to the NK cell subset distribution, we expected to have more activity in lung NK cells, yet we found less degranulation, cytotoxicity and cytokine production in this NK cell subset. The fact that the tissue-specific environment may influence the NK cell differentiation should be considered in view of our results showing the activating role of macrophages on NK cells function. Furthermore the cytokines IL-2, IL-12 and IL-15 influence the division and activation of NK cells. It was previously

shown that IL-2, IL-12 and IL-15 mRNA are constitutively more expressed in spleen than lung tissues [28,29]. Moreover IL-15 is predominantly expressed by adherent cells in spleen and lung, which contain a high proportion of macrophages/monocytes. In addition, IL-15 mRNA is also more expressed in spleen as compared to lung macrophages [29]. Finally, IL-15 was described to be secreted by alveolar macrophages in the mouse [30]. Other candidates like DC may regulate the NK cell function in spleen and lung, it was shown that local production of IL-15 by DC is required for the maintenance of the NK-cell compartment [31]. Further experiments with lung and spleen NK cells in presence of different cell partners need to be performed to better understand the differences found in NK cells from these two organs.

### Acknowledgments

We are grateful to Stephanie Sallat and Chantal Courtois for taking care of the animals.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TM PH JZ. Performed the experiments: TM AP OD MM MT. Analyzed the data: TM AP NHCB. Contributed reagents/materials/analysis tools: OD MM MT. Wrote the paper: TM.

### References

- Grant LR, Yao ZJ, Hedrich CM, Wang F, Moorby A, et al. (2008) Stat4-dependent, T-bet-independent regulation of IL-10 in NK cells. *Genes Immun* 9: 310–327.
- Lodola MB, Lanier LL (2006) Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 18: 391–398.
- Grundy MA, Semman CL (2006) Immunodeficient mice have elevated numbers of NK cells in non-lymphoid tissues. *Exp Cell Res* 312: 7920–7926.
- Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello F, Grissmann F, et al. (2007) The maturing of natural killer cells. *Immunol Rev* 220: 160–169.
- Kim S, Iizaka K, Kang HS, Dokan A, French AR, et al. (2002) In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 3: 524–528.
- Hayakawa Y, Smyth MJ (2005) CD27 dissects murine NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 176: 1517–1524.
- Hayakawa Y, Haining ND, Nath SL, Smyth MJ (2006) Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* 214: 47–55.
- Walzer T, Chiosso L, Chais J, Calver A, Carozzo C, et al. (2007) Natural killer cell maturing in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol* 8: 1337–1344.
- Chiosso L, Chais J, Fiseri N, Roth C, Vivier E, et al. (2008) Maturation of mouse NK cells is a large developmental program. *Blood* 111: 5458–5468.
- Gulley FJ (2009) Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* 128: 151–163.
- Sirin-Sokolov J, Bennett M, Mann D, Kumar V (1993) Natural killer cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection. *J Immunol* 151: 2699–2704.
- Gao H, Topham DJ (2010) Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection. *J Virol* 84: 7750–7759.
- Rauler D11 (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5: 986–1002.
- Lucas M, Schachtel W, Oberle K, Aichele P, Dieffenbach A (2007) Dendritic cells prime natural killer cells by non-presenting interleukin 15. *Immunity* 26: 503–517.
- Bazatin M, Roeynck S, Lepolard C, Falk C, Sawantog S, et al. (2005) Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent immune responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11717–11722.
- Nedvezki S, Sawinski S, Eagle RA, Harris J, Vels T, et al. (2007) Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 109: 3770–3782.
- Weisman DN, deShazo RD, Banks DE (1986) Modulation of natural killer cell function by human alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 78: 571–577.
- Doulligan G, Voth P, Vercellotti A, Ghavvazi K, Imtani M, et al. (1987) Natural cytotoxic activity in human lungs. *Clin Exp Immunol* 47: 437–444.
- Zeller M, Marzin S (1992) Rat macrophages inhibit natural killer (NK) cell activity against adherent growing target cells. *Immunobiology* 163: 497–510.
- Reynolds CW, Brunda MJ, Holden ITT, Herbman RB (1981) Role of macrophage in in vivo augmentation of rat, mouse, and human natural killer activities. *J Natl Cancer Inst* 66: 937–949.
- Poli A, Bruns NH, Ammerlaan W, Michel T, Henges F, et al. (2010) Novel method for isolating unmatched rat natural killer cells with higher purity compared with positive selection and fluorescence-activated cell sorting. *Immunology*.
- Robbins SH, Tessner MS, Mckayama T, Brossay L (2001) Expansion and contraction of the NK cell compartment in response to murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 173: 259–266.
- Haining ND, Tubarius H, Faidas K, Brady J, Hayakawa Y, et al. (2007) NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol* 178: 4764–4770.
- Hazekamp J, Hampton P, Lord JM (2012) Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging Cell*.
- Wang J, Li F, Zheng M, Sun K, Wei H, et al. (2012) Lung Natural Killer Cells in Mice: Phenotype and Response to Respiratory Infection. *Immunology*.
- Takeki K, Oshima H, Hayakawa Y, Akiba H, Asano M, et al. (2009) CD27-mediated activation of murine NK cells. *J Immunol* 183: 1741–1745.
- Pelle M, Gibbs J, Jameson SC (2005) Characteristics of NK cell migration early after *Yersinia* infection. *J Immunol* 175: 2152–2157.
- Abebe F, Masafa T, Nerlund AH, Bjune GA (2006) Cytokine profile during latent and slowly progressive primary tuberculosis: a possible role for interleukin-15 in mediating clinical disease. *Clin Exp Immunol* 143: 180–192.
- Doherty TM, Sedes RA, Sher A (1996) Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 156: 735–741.
- Hocke AC, Lampe MP, Witzemann M, Mollenkopf H, Zerrahn J, et al. (2007) Cell-specific interleukin-15 and interleukin-15 receptor subunit expression and regulation in pneumococcal pneumonia: comparison to chloroquine lung infection. *Cytokine* 38: 61–73.
- Hochweller K, Sriegler J, Hammerling GJ, Garbi N (2008) A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirements for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol* 38: 2776–2784.





# Influence du facteur neurotrophique Neurturine dans les cellules nerveuses et immunitaires lors de l'inflammation des voies respiratoires

## Résumé

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique induite par des allergènes ou des substances environnementales irritantes et caractérisée par une hyperréactivité des voies respiratoires. Il existe un lien entre l'inflammation neurogène et l'inflammation immunitaire au niveau des voies respiratoires. Des études suggèrent que des facteurs neurotrophiques participent à l'apparition des symptômes de l'asthme.

Chez la souris, la Neurturine (NTN) est un facteur neurotrophique qui serait capable de moduler les principaux symptômes liés à l'asthme via un récepteur spécifique, le GDNF Family Receptor  $\alpha$  2 (GFR $\alpha$ 2) et son co-récepteur, la tyrosine kinase RET. Afin de déterminer par quels mécanismes la NTN peut influencer le niveau d'inflammation de la voie Th2, des souris sauvages et NTN<sup>-/-</sup> ont été comparées dans différents modèles d'asthme aigu ou chronique induits avec les allergènes ovalbumine ou du « House Dust Mite ». L'implication de la NTN au niveau de l'inflammation neurogène, de la régulation des cellules immunitaires et dans le remodelage des tissus a été évaluée. Son rôle anti-inflammatoire a également été testé *in vitro*.

Les résultats obtenus suggèrent que la Neurturine est capable d'agir *in vivo* et *in vitro* comme médiateur anti-inflammatoire.

**Mots-clés :** Neurturine, asthme, inflammation neurogène, cytokines Th2, remodelage, anti-inflammatoire.

## Summary

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease in response to allergens and environmental irritants. The pathophysiology of asthma is defined by airway inflammation and airway hyperreactivity. Interestingly, it has been shown that there is a link between neurogenic and immune airway inflammation. Moreover studies suggest that neurotrophic factors participate in the pathogenesis of many features and symptoms of asthma.

Neurturin (NTN) is a neurotrophic factor which could be involved in the modulation of many symptoms of asthma through the GDNF family receptor  $\alpha$  2 (GFR $\alpha$ 2) and the proto-oncogene RET co-receptor. However, the underlying mechanisms remain unclear. By studying WT and NTN<sup>-/-</sup> mice after acute and chronic airway inflammation protocols induced by the allergens ovalbumin or house dust mite, we investigated how NTN is able to modulate the level of Th2 responses through neurogenic inflammation and immune cells' regulation. We analysed its relationship with structural airway remodelling and we also tested the potential anti-inflammatory role of NTN *in vitro*.

The achievements suggest that Neurturin acts *in vivo* and *in vitro* as an anti-inflammatory mediator.

**Keywords :** Neurturin, asthma, neurogenic inflammation, Th2 cytokines, remodelling, anti-inflammatory.