



HAL
open science

Impact d'une exposition aux nanoparticules de carbone couplées au benzo(a)pyrène sur la réponse inflammatoire dans des modèles expérimentaux d'asthme

Julie Carrard

► To cite this version:

Julie Carrard. Impact d'une exposition aux nanoparticules de carbone couplées au benzo(a)pyrène sur la réponse inflammatoire dans des modèles expérimentaux d'asthme. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS004 . tel-03242714

HAL Id: tel-03242714

<https://theses.hal.science/tel-03242714>

Submitted on 31 May 2021

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 Lille - Ecole Doctorale Biologie Santé

THESE

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Discipline : IMMUNOLOGIE

**Impact d'une exposition aux nanoparticules de carbone
couplées au benzo(a)pyrène sur la réponse inflammatoire dans
des modèles expérimentaux d'asthme**

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2020 par

Julie CARRARD

Devant le jury composé de :

Professeure Cécile CHENIVESSE Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Hôpital Calmette, Lille	Présidente
Professeur Pascal CHANEZ Clinique des bronches, allergies et du sommeil, Hôpital Nord, Marseille	Rapporteur
Docteur Karine ANDREAU T3S, Université de Paris	Rapporteur
Professeur Didier CATALDO Service de Pneumologie-allergologie, CHU, Liège	Examineur
Docteur Jean-Marc LO GUIDICE IMPECS, Université de Lille	Examineur
Professeur Arnaud SCHERPEREEL Service Pneumologie et Oncologie Thoracique, Hôpital Calmette, Lille	Co-Directeur
Docteur Patricia de NADAI Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 13, Lille	Co-Directeur

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR9017, Institut Pasteur de
Lille, Université Lille Nord de France, Equipe 13 : "Immunité Pulmonaire"

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'étudier et d'évaluer ce travail de thèse :

Madame la Professeure Cécile CHENIVESSE, pour avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur le Professeur Pascal CHANEZ et Madame le Docteur Karine ANDREAU, pour avoir accepté la tâche prenante de rapporteur.

Monsieur le Professeur Didier CATALDO et Monsieur le Docteur Jean-Marc LO GUIDICE, pour avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de mon laboratoire pour leur soutien tout au long de mon parcours.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Anne Tsicopoulos pour sa bienveillance et son accueil au sein de son laboratoire mais également pour l'opportunité qu'elle m'a offerte d'assister à un congrès international.

Je remercie chaleureusement le Professeur Arnaud Scherpereel et le Docteur Patricia de Nadaï, mes directeurs de thèse, pour leur accompagnement et pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce projet. Patricia, je te remercie particulièrement pour l'autonomie que tu m'as laissée dans la gestion de mon projet et je te remercie également pour tes conseils, ta disponibilité et ta bienveillance depuis le début de ma licence.

Je remercie à nouveau la Professeure Cécile CHENIVESSE pour ses précieux conseils et le temps qu'elle m'a accordé pour la rédaction de ma publication.

Je tiens également à remercier le Docteur Catherine Duez pour sa bienveillance et ses conseils qui m'ont toujours été d'une grande aide. Que tu sois à Lille ou à Marseille, que ce soit scientifiquement ou humainement, tu as toujours été là pour me soutenir.

Au Docteur Muriel Pichavant pour sa gentillesse, ses conseils et le temps qu'elle a consacré à mon projet qui a pris un nouveau tournant grâce à son aide.

Au Docteur Hélène Bauderlique pour m'avoir apporté son expertise en cytométrie en flux mais également pour son aide lors de mes expériences aux FACS.

A Philippe Marquillies et Valérie Ledroit, merci pour votre soutien sans faille tout au long de ma thèse. Travailler à vos côtés aura été un vrai plaisir.

A tous les membres de l'équipe 13 « Immunité Pulmonaire » du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille : Nathalie, Corine, Nathanaële, Odile, Justine, Daniel, Joanne, Camille, Alexandre, Lucie, Philippe Lassalle et Saliha.

A Mélodie, pour toutes les aventures vécues ensembles durant ces années de thèse. Participer à ces congrès à tes côtés aura été un plaisir même si on a bien failli rater notre avion pour les Etats-Unis !

A Audrey et Quentin pour leur amitié, leur soutien et vos coups de main durant ces trois années.

Enfin je souhaite remercier tout particulièrement mes amis et ma famille pour leur soutien inébranlable ! Un grand merci à ma sœur, Amandine, pour toute la patience et le temps qu'elle m'a consacré tout au long de mes études, en particulier au cours de ces derniers mois pour la rédaction de cette thèse. J'aurais la satisfaction personnelle de lui avoir fait découvrir qu'et al. n'est pas un auteur particulièrement prolix dans le domaine de la science.

RESUME

L'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes. Elle se caractérise par le recrutement de cellules inflammatoires incluant les lymphocytes T helper (Th) CD4⁺ de type 2, producteurs d'interleukine (IL)-4, IL-5 et IL-13, ainsi que les éosinophiles, les mastocytes et les basophiles. La prévalence de l'asthme ne cesse d'augmenter ces dernières décennies et les modifications génétiques ne peuvent être les seules responsables. La pollution atmosphérique, et notamment particulaire, est suspectée de participer à cette tendance à la hausse. Les particules atmosphériques peuvent être classées selon leur diamètre aérodynamique, parmi lesquelles on retrouve les particules ultrafines (< à 100 nm). Ces dernières sont potentiellement plus nocives en raison de leur petite taille qui leur confère la capacité de se déposer profondément dans l'arbre bronchique. Elles sont également capables d'adsorber des molécules telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Or, certains de ces hydrocarbures, tels que le benzo(a)pyrène, sont connus pour être nocifs pour la santé et notamment pour l'appareil respiratoire. Nous nous sommes intéressés aux effets d'une exposition aux particules ultrafines liées au benzo(a)pyrène, sur la réponse inflammatoire dans deux modèles expérimentaux d'asthme induits par un allergène. Pour cela, nous avons utilisé un modèle simplifié de particules issues d'un processus industriel, que nous appellerons donc « nanoparticules ».

Dans notre premier modèle, une exposition chronique aux nanoparticules de carbone couplées ou non au benzo(a)pyrène, a été réalisée chez des souris C57Bl/6 sensibilisées par voie intranasale à l'allergène *Dermatophagoïdes pteronyssinus*. Les nanoparticules n'ont eu aucun effet sur le recrutement cellulaire dans le lavage broncho-alvéolaire induit par l'allergène. De manière surprenante, la co-administration des nanoparticules avec l'allergène a diminué l'hyperréactivité bronchique par rapport à l'allergène seul. A l'inverse, au niveau tissulaire, la co-exposition aux nanoparticules couplées au benzo(a)pyrène avec l'allergène induit une forte augmentation de l'expression des cytokines Th2 et du recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire par rapport aux souris sensibilisées. De plus, cette co-exposition modifie le type de cellules recrutées par rapport à l'allergène, avec une augmentation du nombre de neutrophiles, de cellules NKT-like, des cellules T CD8⁺, des monocytes/macrophages Ly6C⁺ et Ly6C⁻. Ces résultats n'ont pas été retrouvés lors d'une co-exposition de l'allergène avec les nanoparticules non couplées au benzo(a)pyrène.

Dans notre deuxième modèle, une exposition aux nanoparticules de carbone, couplées ou non au benzo(a)pyrène, a été réalisée chez des souris C57Bl/6 sensibilisées par voie intranasale avec une faible dose de l'allergène *Dermatophagoïdes farinae*. Les résultats préliminaires ont montré un effet adjuvant des nanoparticules avec l'allergène sur la production d'immunoglobulines E et sur l'infiltrat inflammatoire dans le lavage broncho-alvéolaire,

principalement composé d'éosinophiles. L'expression des cytokines Th2 est également augmentée par la co-administration de l'allergène avec les nanoparticules non couplées au benzo(a)pyrène, mais pas avec celles couplées. La co-exposition aux nanoparticules couplées au benzo(a)pyrène avec l'allergène induit néanmoins l'expression de l'IL-33, une alarmine produite par l'épithélium, également pro-Th2.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les nanoparticules ont un impact sur l'inflammation chez les souris sensibilisées à l'allergène dans nos deux modèles expérimentaux. Cependant, la dose, la quantité et la nature des allergènes ainsi que des nanoparticules inhalées semblent influencer la réponse induite *in vivo*.

Mots clés : Asthme, Pollution, Nanoparticules

SUMMARY

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. It is characterized by the recruitment of inflammatory cells including CD4⁺ type 2 helper T-lymphocytes (Th), interleukin (IL)-4, IL-5 and IL-13 producers, eosinophils as well as mast cells and basophils. The prevalence of asthma has continued to increase in recent decades and genetic changes cannot be solely responsible. Air pollution, especially particulate matter, is suspected to be part of this rising trend. Atmospheric particles can be classified according to their aerodynamic diameter, including ultrafine particles (< 100 nm). These particles are potentially more harmful because of their small size, which gives them the ability to settle deep in the bronchial tree. They are also able to adsorb molecules such as polycyclic aromatic hydrocarbons. However, some of these hydrocarbons, such as benzo(a)pyrene, are known to be harmful to health and in particular to the respiratory system. We investigated the effects of exposure to benzo(a)pyrene-bound ultrafine particles on the inflammatory response in two experimental models of allergen-induced asthma. For this, we used a simplified model of particles from an industrial process that we call « nanoparticles ».

In our first model, chronic exposure to carbon nanoparticles coupled or not to benzo(a)pyrene, was performed in C57Bl/6 mice sensitized intranasally to the allergen *Dermatophagoides pteronyssinus*. Nanoparticles had no effect on cell recruitment in allergen-induced bronchoalveolar lavage. Surprisingly, co-administration of nanoparticles with the allergen decreased bronchial hyperreactivity compared to allergen alone. In contrast, we observed an effect on lung tissue when co-exposed to benzo(a)pyrene-coupled nanoparticles and allergen. Indeed, this co-exposure induced a strong increase in Th2 cytokine expression and cell recruitment in lung tissue compared to sensitized mice. In addition, this co-exposure modified the type of cells recruited by the allergen, with an increase in the number of neutrophils, NKT-like cells, CD8⁺ T cells, Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes/macrophages. These results were not found in co-exposure to nanoparticles not coupled to benzo(a)pyrene.

In our second model, exposure to carbon nanoparticles, coupled or not with benzo(a)pyrene, was performed in C57Bl/6 mice sensitized intranasally with a low dose of the allergen *Dermatophagoides farinae*. Preliminary results showed an adjuvant effect of nanoparticles with the allergen on immunoglobulin E production but also on the inflammatory infiltrate in the broncho-alveolar lavage, mainly composed of eosinophils. The expression of Th2 cytokines is also increased by the administration of allergen with nanoparticles uncoupled to benzo(a)pyrene and not with benzo(a)pyrene-coupled particles. But, co-exposure of allergen with benzo(a)pyrene-coupled nanoparticles induces the expression of *IL-33*, an alarmin produced by the epithelium, which is also pro-Th2.

In conclusion, our results suggest that nanoparticles have an impact on inflammation in allergen-sensitized mice in our two experimental models. However, the dose, the amount of allergen and the nature of the inhaled nanoparticles appear to influence the induced response *in vivo*.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	13
INTRODUCTION	14
Chapitre 1 : L'asthme	15
I. Généralités.....	15
1. Définition.....	15
2. Phénotypes et endotypes.....	17
3. Données épidémiologiques.....	19
4. Facteurs impliqués dans le déclenchement de l'asthme	20
a. L'influence de la génétique.....	20
b. Facteurs environnementaux.....	21
II. La réaction inflammatoire allergique.....	22
1. La phase de sensibilisation	22
2. La phase effectrice	23
III. Les médiateurs cellulaires de l'asthme allergique	25
1. Les cellules épithéliales des voies respiratoires	25
2. Les cellules lymphoïdes innées	26
3. Les monocytes et macrophages	27
4. Les éosinophiles.....	31
5. Les neutrophiles	33
6. Les lymphocytes.....	34
a. Les lymphocytes T CD4 ⁺ (Th1, Th2, Th17).....	34
b. Les lymphocytes T CD8 ⁺ (Tc1, Tc2, Tc17).....	38
c. Les lymphocytes T γδ.....	42
d. Les lymphocytes B	42
e. Les cellules Natural killer-T	43

IV.	Apport des modèles animaux dans l'asthme allergique	44
Chapitre 2 :	La pollution atmosphérique et son effet sur la santé	47
I.	La Pollution particulaire	47
1.	Définition et caractérisation des particules atmosphériques	47
a.	Définition.....	47
b.	Classification.....	47
c.	Sources.....	48
d.	Réglementation.....	49
e.	Concentrations atmosphériques.....	49
2.	Les particules ultrafines.....	50
3.	Impact de la pollution particulaire sur la santé.....	54
a.	Données épidémiologiques	54
b.	Impact sur l'appareil respiratoire	56
i.	Description de l'appareil respiratoire	56
ii.	Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire.....	57
iii.	Influence de la pollution particulaire sur l'asthme.....	59
II.	Pollution aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	61
1.	Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	61
a.	Généralités	61
b.	Sources atmosphériques.....	62
c.	Concentrations atmosphériques.....	62
d.	Partition gaz/particules	63
e.	Métabolisme des HAPs	64
2.	Impact des HAPs sur la santé.....	66
a.	Données épidémiologiques	66
b.	Impact des HAPs sur l'asthme allergique.....	66
	CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	70
	RESULTATS	73
	DISCUSSION	97
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	110

BIBLIOGRAPHIE	113
ANNEXES	133

ABREVIATIONS

B(a)P	Benzo(a)pyrène
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CMH	Complexes majeurs d'histocompatibilité
CML	Cellules musculaires lisses
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
DC	Dendritic cell
DEP	Particules diesel
Der f	Dermatophagoïdes farinae
Der p	Dermatophagoïdes pteronyssinus
Gata3	GATA-binding protein 3
GINA	Global Initiative for Asthma
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HDM	House Dust Mite
HRB	Hyperréactivité bronchique
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC	Innate lymphoid cell
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharides
LTB4	Leucotriènes B4
MBP	Major basic protein
MPO	Myéloperoxidase
NKT	Natural Killer T
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NP	Nanoparticules
NP-B(a)P	Nanoparticules couplées au B(a)P
NP-Ø	Nanoparticules non couplées au N(a)P
OVA	Ovalbumine
PAF	Platelet-activating factor
PGD2	Prostaglandines D2
PM	Particulate Matter
PRR	Pattern recognition receptor
PUF	Particule ultrafine
ROR	Retinoic acid-related orphan receptor
TGF	Transforming growth factor

TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factors
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prise en charge de l'asthme selon le stade de la maladie.	16
Figure 2 : Les différents sous-types dans l'asthme.....	19
Figure 3 : Phase de sensibilisation à un allergène dans les voies respiratoires.	23
Figure 4 : Représentation schématique de la phase effectrice composée de la phase immédiate et retardée.	24
Figure 5 : Les compartiments monocytaires murins.	28
Figure 6 : Schéma de la repopulation des macrophages au niveau alvéolaire.....	30
Figure 7 : Signaux d'initiation de la réponse effectrice T CD4 ⁺	35
Figure 8 : Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs en lymphocytes T helper et leur rôle dans l'allergie.....	37
Figure 9 : Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes T CD8 ⁺ naïfs en lymphocytes Tc1, Tc2, Tc17 et T CD8 régulateurs.	38
Figure 10 : Les cellules CD8 ⁺ Tc2 dans l'asthme allergique.	41
Figure 11 : Comparaison entre les PM ₁₀ , les PM _{2,5} et les PM _{0,1}	51
Figure 12 : Schéma illustrant un exemple de la composition complexe des particules ultrafines (PUFs) d'échappement de véhicules.....	52
Figure 13 : Schéma anatomique de l'appareil respiratoire.	56
Figure 14 : Schéma des différents mécanismes de dépôts des particules dans les voies respiratoires.....	58
Figure 15 : Schéma des dépôts de particules par compartiment.	59
Figure 16 : Voie de signalisation génomique de l'Ahr.....	65
Figure 17 : Schéma du mécanisme potentiel de recrutement des monocytes par la voie IL-6. .	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs et fonctions des populations monocytaires humaines et murines.	27
Tableau 2 : Classification des cellules NKT et NKT-like.....	44
Tableau 3 : Les avantages et limites d'utilisation des modèles murins d'asthme par rapport à la pathologie humaine.....	45
Tableau 4: Comparaison des caractéristiques des nanoparticules manufacturées et des particules ultrafines.....	54

INTRODUCTION

Chapitre 1 : L'asthme

I. Généralités

1. Définition

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes qui se caractérise par des épisodes récurrents durant lesquels sont observées une gêne respiratoire (dyspnée), des sensations d'oppression thoracique, une toux et une respiration sifflante et par une hyperréactivité bronchique. Les symptômes ont pour particularité d'être variables dans le temps et en intensité. Le diagnostic d'asthme se fait sur l'association de manifestations cliniques typiques et d'une limitation des débits expiratoires variables dans le temps. Les explorations fonctionnelles respiratoires et les signes cliniques sont des éléments courant du diagnostic mais ne reflètent que partiellement la composante inflammatoire (1). La gravité et la fréquence des symptômes varient généralement en fonction de l'intensité de l'inflammation des voies aériennes et s'aggravent classiquement lors d'un effort physique ou pendant la nuit. De plus, ils sont souvent en lien avec des modifications de l'environnement (exposition à l'allergène par exemple). Ces symptômes sont souvent réversibles spontanément ou sous l'effet d'un traitement par β_2 -agonistes. L'évolution de l'asthme est caractérisée par la survenue d'exacerbations, le plus souvent déclenchées par des infections virales. Ces exacerbations peuvent engager le pronostic vital du patient et doivent être traitées par une corticothérapie orale.

L'asthme nécessite une prise en charge afin de contrôler les symptômes, de limiter les risques d'exacerbations futures et d'éviter un potentiel trouble ventilatoire obstructif persistant. Ainsi, 5 paliers ont été décrits par la "Global Initiative for Asthma" (GINA) en fonction de la charge thérapeutique nécessaire pour contrôler l'asthme. Les traitements se basent sur la prise de corticoïdes inhalés. De plus, des β_2 -agonistes de longue durée d'action et/ou des antagonistes de récepteurs aux leucotriènes peuvent être ajoutés. Si ces traitements sont insuffisamment efficaces pour contrôler les symptômes et diminuer la fréquence des exacerbations, alors les doses de corticoïdes inhalés pourront être augmentées progressivement. Des thérapeutiques additionnelles telles que des anticorps monoclonaux dirigés contre les IgE, le récepteur de l'interleukine (IL)-4, ou l'IL-5/IL-5R peuvent également être administrées dans les formes les plus sévères d'asthme de phénotype T2 correspondant au stade 5 (**Figure 1**). Les traitements sont ajustés au cours du temps en fonction du contrôle des symptômes, du nombre et de la sévérité des exacerbations. Ainsi, ils peuvent être augmentés lorsque les symptômes deviennent non contrôlés, ou au contraire dans le cas inverse (GINA report 2020).

Adults & adolescents 12+ years

Personalized asthma management:
Assess, Adjust, Review response

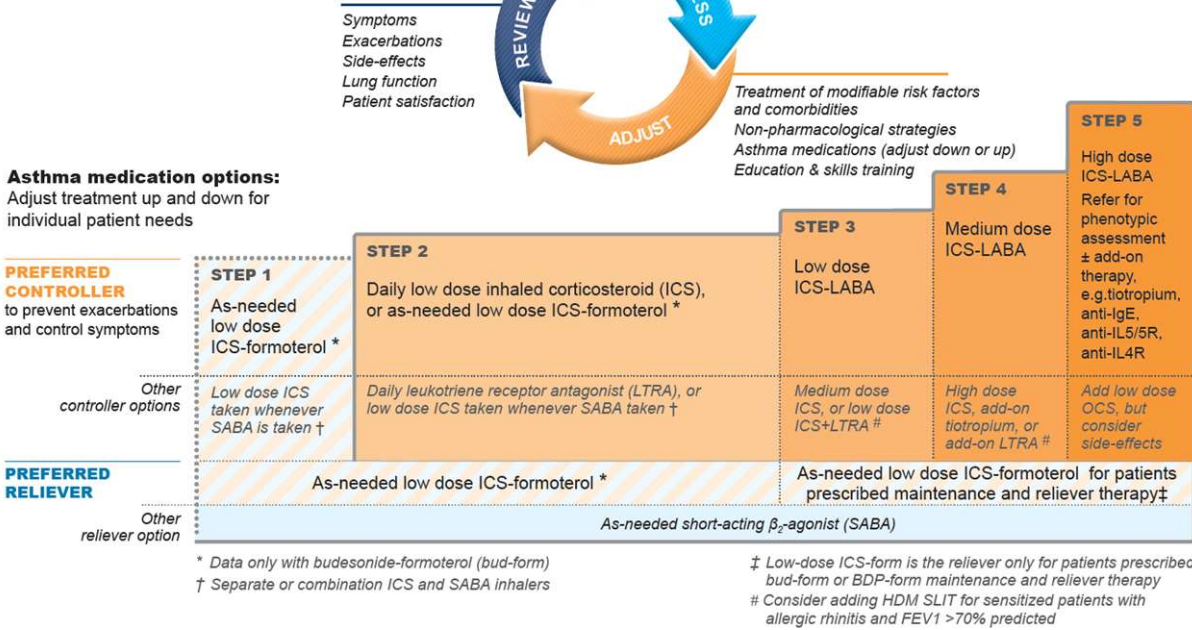


Figure 1 : **Prise en charge de l'asthme selon le stade de la maladie.** Issu de Global Initiative for Asthma report 2020. Cinq stades ont été définis selon la charge thérapeutique nécessaire au contrôle des symptômes. ICS : corticoïdes inhalés, SABA : β-2agoniste à courte durée d'action, LABA : β-2agoniste à longue durée d'action, LTRA : antagonistes des récepteurs aux leucotriènes, OCS : corticoïdes oraux.

Le traitement par corticoïdes inhalés est généralement efficace, cependant, une proportion de patients asthmatiques répond mal à ces molécules. L'asthme est dit corticorésistant, lorsque l'inflammation des voies aériennes n'est pas ou peu diminuée par les corticoïdes. La résistance aux corticoïdes reposerait sur l'absence de modification du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) lors d'une cure aux corticoïdes oraux. Ainsi, les patients présentant une amélioration du VEMS inférieur à 15% par rapport à la valeur de base seraient considérés comme résistants aux corticoïdes tandis qu'une augmentation supérieure ou égale à 30% par rapport à la valeur de départ montrerait une sensibilité aux corticoïdes. Cependant, la définition de la résistance aux corticoïdes n'est actuellement pas consensuelle. Elle a été proposée pour les études scientifiques. La corticorésistance apparaît généralement à l'intérieur de cohortes de patients porteurs d'un asthme sévère (2). Il s'agit d'un asthme contrôlé en réponse aux traitements de stade 4 et 5 ou qui demeure incontrôlé malgré la charge thérapeutique.

2. Phénotypes et endotypes

L'asthme est une maladie hétérogène en termes de sévérité, d'histoire naturelle mais également en ce qui concerne la réponse aux traitements. Les premières descriptions de l'asthme ont classé cette pathologie en deux grands phénotypes : l'asthme non allergique et l'asthme allergique. Les phénotypes sont définis comme des caractéristiques observables chez un individu et résultent de la combinaison des influences héréditaires et environnementales (3). Plusieurs données sont recueillies afin de déterminer le phénotype : l'histoire de la maladie ainsi que celle du patient, les conséquences cliniques (la fréquence des exacerbations et leur sévérité), les co-morbidités ainsi que les facteurs liés aux patients comme la morphologie et les réponses aux thérapeutiques (4). Les personnes atteintes d'asthme allergique développent en général cette pathologie tôt dans leur vie. D'autres maladies allergiques telles que la rhinite allergique ou la dermatite atopique/eczéma peuvent être identifiées. En revanche, les personnes atteintes d'asthme non allergique développent généralement cette pathologie plus tardivement dans leur vie et elle n'est pas associée à une sensibilisation allergénique (3). D'autres phénotypes d'asthme ont été définis grâce à l'utilisation d'une approche basée sur des variables cliniques, ce qui a permis de classer les patients dans de grandes catégories en fonction de la gravité de la maladie, des facteurs déclenchant, de l'âge où la maladie se déclare, du type d'inflammation, des exacerbations mais aussi de l'obstruction des voies aériennes. Dans cette approche, les phénotypes majeurs observés sont : l'asthme allergique (apparaît dans l'enfance et est associé à d'autres symptômes allergiques comme l'eczéma ou la rhinite allergique), l'asthme hyper-éosinophilique non allergique (apparaît plus tardivement et est associé à une polypose nasale), l'asthme exacerbé par l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS), l'asthme avec trouble ventilatoire obstructif persistant et l'asthme associé à l'obésité (5). Néanmoins, une limite majeure de cette approche est la superposition de certains groupes. De récentes approches ont permis d'atténuer ces biais cliniques afin d'obtenir des résultats plus pertinents. Les analyses de cluster ont appliqués des algorithmes qui intègrent de multiples interactions dans de grandes cohortes afin de décrire et prédire les phénotypes cliniques de l'asthme ainsi que les mécanismes moléculaires (6). Parmi les différents groupes travaillant sur ces clusters, figurent le SARP (Severe Asthma Research Program) (7) qui distingue cinq phénotypes cliniques d'asthme à l'aide d'une analyse par groupe hiérarchiques non supervisée, ainsi que les études U-BIOPRED (Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome) (8) et ADEPT (Airways Disease Endotyping for Personalized Therapeutics) (9). L'étude ADEPT permet d'identifier quatre phénotypes avec des profils cliniques et des biomarqueurs distincts. Le phénotype 1 est peu symptomatique avec une bonne fonction pulmonaire et une faible inflammation à éosinophiles tandis que le phénotype 2 est caractérisé par une obstruction réversible, un contrôle modéré de l'asthme et une inflammation prédominante à éosinophiles. Le phénotype 3 est quant à lui caractérisé par une obstruction fixe prédominante, une faible inflammation à éosinophiles mais avec une prédominance de neutrophiles. Le phénotype 4 présente un phénotype sévère non

contrôlé avec une importante obstruction bronchique réversible, et un profil inflammatoire granulocytaire mixte. Ces phénotypes ont été retrouvés dans la cohorte d'asthme U-BIOPRED (8).

L'hétérogénéité de l'asthme se reflète également par des mécanismes multiples au niveau cellulaire et moléculaire qualifiés d'endotypes. L'endotype a pour objectif d'identifier des biomarqueurs qui permettent de comprendre les mécanismes physiopathologiques et ainsi d'adapter le traitement. Dans l'asthme, deux endotypes majeurs ont été décrits : l'endotype T2-high et l'endotype non T2 (ou T2-low). L'endotype T2-high comprend notamment l'asthme allergique, l'asthme exacerbé par l'aspirine et l'asthme non allergique hyper-éosinophilique (**Figure 2**). Le terme T2 désigne les cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et les cellules productrices de ces cytokines, notamment les cellules Th2, les ILC2, les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles, les macrophages et les cellules NKT (10,11). Les cytokines sont impliquées dans le recrutement des éosinophiles et le switch isotypique vers la production d'IgE, deux caractéristiques de l'allergie. Le nombre d'éosinophiles dans les expectorations et le sang est souvent mesuré chez les patients asthmatiques (12,13) et parfois extrapolé pour refléter un asthme T2-high. D'autres marqueurs de l'endotype T2 comme la périostine au niveau du compartiment sanguin et l'oxyde nitrique dans l'air expiré sont également augmentés (6). Actuellement, plusieurs biothérapies ciblées sont proposées aux patients présentant un endotype T2-high. En effet, l'omalizumab, un anticorps monoclonal spécifique des IgE, peut être proposé aux patients asthmatiques allergiques sévères. Deux anticorps monoclonaux ciblant la cytokine IL-5 ou son récepteur (le mepolizumab et le benralizumab) sont quant à eux administrés aux patients asthmatiques hyper-éosinophiliques (14). Enfin, le dupilumab, un anticorps monoclonal ciblant l'IL-4R (anti-IL4/IL-13), peut être administré aux patients présentant un endotype T2 en général.

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'endotype non T2 (également appelé T2-low) sont actuellement peu compris et décrits. Cet endotype est généralement caractérisé par une inflammation à neutrophile (>40-60%) ou paucigranulocytaire (les taux d'éosinophiles et de neutrophiles sont normaux) dans les expectorations de patients asthmatiques. Une absence de réponse face à la thérapie aux corticostéroïdes est généralement constatée. Par conséquent, les patients présentant un endotype T2-low souffrent d'un asthme plus sévère. L'endotype T2-low se distingue également par la présence de lymphocytes Th1 et/ou Th17. Il inclut l'asthme associé à l'obésité et au tabagisme, l'asthme paucigranulocytaire et l'asthme tardif (**Figure 2**). Il existe peu de biomarqueurs spécifiques de l'endotype T2-low, d'où la nécessité d'approfondir les connaissances afin de mieux identifier ces patients et d'adapter leur traitement (6).

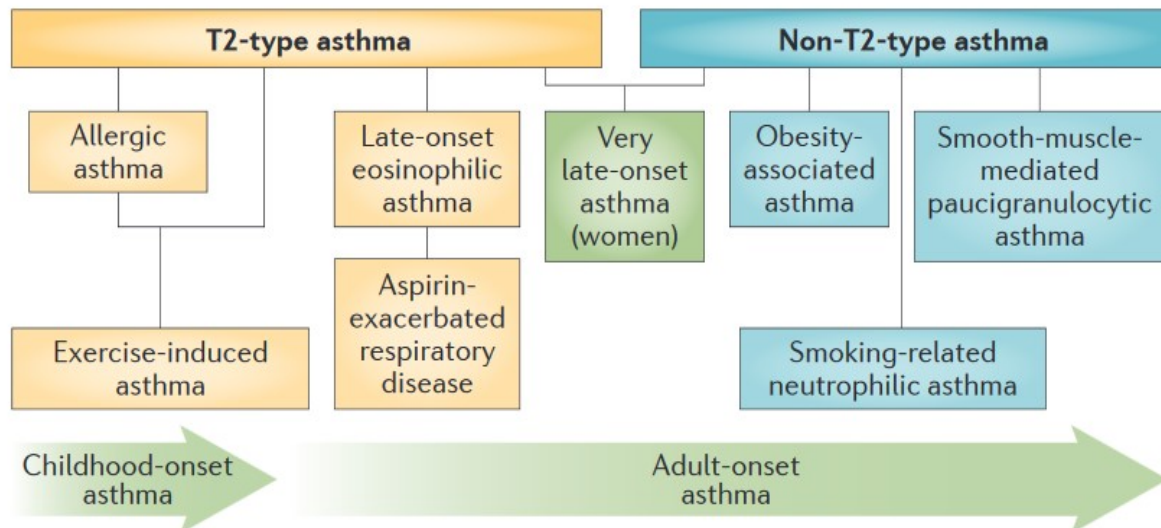


Figure 2 : **Les différents sous-types dans l'asthme.** Tiré de Holgate *et al*, 2015. L'endotype T2 high comprend l'asthme allergique, l'asthme exacerbé par l'aspirine et l'asthme non allergique hyper-éosinophilique. L'endotype non T2 (ou T2-low) inclue l'asthme associé à l'obésité et au tabagisme et l'asthme paucigranulocytaire.

3. Données épidémiologiques

L'asthme est un problème de santé publique dans de nombreux pays quel que soit leur niveau de développement. Les personnes de tous âges peuvent déclencher cette maladie chronique. La prévalence de l'asthme en France et dans le monde n'a pas cessé d'augmenter ces dernières décennies. L'étude Global Burden of Disease publiée en 2016, a estimé le nombre de personnes asthmatiques à 339 millions à travers le monde. Cela représente une augmentation de la prévalence de 3,6% depuis 2006. En France, la prévalence de l'asthme a été estimée entre 6 et 7% chez l'adulte et à 9% chez l'enfant (15).

L'asthme constitue un coût économique important pour la société qui peut se diviser en coûts directs et indirects. Les coûts directs sont attribuables aux hospitalisations, visites chez le médecin, frais de laboratoires et médicamenteux. Les coûts indirects correspondent aux pertes financières non médicales dues à une diminution de la productivité au travail, à l'absentéisme scolaire et professionnel ainsi qu'aux décès. En Europe, les patients asthmatiques représentent 0,6% du nombre des hospitalisations, mais les taux varient d'un pays à l'autre. Une importante variation est également observée pour les taux d'admission entre les enfants et les adultes, en effet, les hospitalisations pour cause d'asthme concernent plus souvent les enfants. En France, environ 62 000 séjours hospitaliers étaient imputables à l'asthme au cours de l'année 2015, dont plus des deux tiers concernaient des enfants âgés de moins de 15 ans (Santé publique France).

4. Facteurs impliqués dans le déclenchement de l'asthme

Le développement de l'asthme résulte de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. La multitude des facteurs et leur association possible pourraient être à l'origine des différents phénotypes. Nous allons décrire dans cette partie certains facteurs liés à la génétique et à l'environnement.

a. L'influence de la génétique

Le caractère héréditaire de l'asthme est un facteur bien connu. Le risque de souffrir de cette maladie augmente considérablement lorsque les patients ont des membres de leur famille avec de l'asthme (16). Les facteurs génétiques ont un effet important sur la susceptibilité, la sévérité ainsi que sur la réponse au traitement de l'asthme. L'analyse du génome humain a permis d'identifier et de décrire une multitude de gènes de susceptibilité à l'asthme. Ces gènes ont été identifiés par différentes techniques telles que les études de liaison ou clonage positionnel, approche du gène candidat ou encore par des études d'association pangénomique (Genome-Wide Association Studies, GWAS). Les gènes de susceptibilité ont été répertoriés en 4 groupes. Le premier groupe comprend les gènes associés à l'immunité innée et l'immuno-régulation. Il comprend les gènes codant pour les PRR (Pattern recognition receptors) tels que les toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, TLR6, TLR10, Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD) 1 et NOD2, les cytokines immuno-régulatrices (IL-10, TGF- β 1), le facteur de transcription Signal transducer and activator of transcription (STAT)3, les molécules impliquées dans la présentation antigénique et le récepteur de la prostaglandine E₂. Le deuxième groupe comprend les gènes impliqués dans la différenciation et les fonctions effectrices des cellules Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13. Le troisième groupe correspond à l'immunité épithéliale et mucoale. Il inclut les gènes de chimiokines (CCL5, CCL11, CCL24 et CCL26), de peptides antimicrobiens et de molécules impliquées dans l'intégrité de la barrière épithéliales. Le dernier groupe se compose de gènes associés à la fonction pulmonaire et au remodelage bronchique tels que le TNF- α ou le TGF- β 1 (17).

Les données épigénétiques concernant l'asthme et les maladies allergiques se sont multipliées ces dernières années. L'engagement vers un phénotype allergique est étroitement régulé par la méthylation de l'ADN et les modifications des histones au niveau de la région de contrôle du locus Th2. L'acquisition et le maintien de l'identité des cellules Th2 impliquent des modifications épigénétiques au niveau du locus de ce gène. L'expression du facteur de transcription Gata3 (GATA Binding Protein 3), indispensable à la différenciation des lymphocytes Th2, implique également des modifications épigénétiques (18). Lorsque le contrôle épigénétique est perturbé, soit expérimentalement soit par des expositions environnementales, l'équilibre Th1/Th2 pourrait

être affecté. L'étude des processus épigénétiques apportent de nouvelles connaissances sur la manière dont les facteurs environnementaux et génétiques interagissent (19).

b. Facteurs environnementaux

L'augmentation rapide de la prévalence de l'asthme ne peut s'expliquer par les seules modifications génétiques. La tendance mondiale à l'augmentation de l'urbanisation et la croissance rapide des populations contribuent à des changements dans le mode de vie (alimentation, temps passé à l'intérieur, activité physique) et une modification de l'exposition environnementale (pollution, allergènes, tabagisme, moisissures, infections) (20–22). Un grand nombre de ses changements sont associés à des facteurs de risques dans le développement et l'exacerbation de l'asthme et des maladies allergiques.

Les facteurs environnementaux impliqués dans l'asthme incluent les allergènes qui sont susceptibles de déclencher des réponses immunitaires. Les allergènes les plus fréquents sont les acariens, les spores de champignon, le pollen ainsi que les antigènes d'animaux (23,24). Une exposition importante à des moisissures ou à l'humidité pendant l'enfance a été associée à un risque plus élevé de développer de l'asthme (25,26). Les infections subies durant l'enfance et une exposition à certains antigènes microbiens semblent présenter une forte corrélation négative avec les allergies. Ainsi, l'hypothèse de l'hygiène basée sur l'équilibre Th1/Th2 a été proposée pour expliquer l'augmentation de la prévalence de l'asthme. Selon cette théorie, une diminution de l'exposition bactérienne et virale au cours des premières années de l'enfant favorise le développement de l'asthme et des maladies allergiques (27). L'utilisation accrue des antibiotiques, l'amélioration de l'hygiène et l'urbanisation ont probablement réduit l'exposition des enfants à des infections et des agents microbiens auparavant courants. Une expression déséquilibrée prolongée et précoce du phénotype allergique Th2 peut persister chez les personnes n'ayant pas développé de réponse Th1 contre les infections au début de leur vie (19). Actuellement, le mode de vie occidental se caractérise par un manque d'activité physique, une augmentation du temps passé à l'intérieur ainsi qu'une alimentation pauvre en fibres et riche en graisses saturées. Ces modifications influencent fortement la composition et la diversité du microbiome intestinal et de la peau. Ainsi, une alternative à la théorie de l'hygiène a été proposée : l'hypothèse des « vieux amis » ou « l'hypothèse de la biodiversité ». Cette dernière affirme que l'augmentation des allergies observée est due à la perte des relations symbiotiques avec les parasites et les bactéries qui étaient autrefois bénéfiques à notre évolution. Les modifications du microbiome intestinal, de la peau et du nez sont associées aux allergies alimentaires, à l'eczéma et à l'asthme (28).

Par ailleurs, les infections aiguës des voies respiratoires en début de vie sont fortement associées à la respiration sifflante chez les nourrissons ainsi qu'à l'apparition et à l'exacerbation

de l'asthme chez les enfants. Il n'a pas encore été déterminé si ces infections sont à l'origine de la pathogénèse de l'asthme ou si elles permettent de démasquer l'asthme (29,30). D'autres facteurs liés à l'individu ou à son mode de vie ont également été associés au développement de l'asthme. En effet, le stress (31), l'obésité (32), le changement des habitudes alimentaires (33) et les facteurs endocriniens (34) seraient considérés comme des facteurs de risque dans le développement de l'asthme. Le comportement maternel a une incidence sur l'évolution de l'enfant. Par exemple, le tabagisme de la mère durant la grossesse constitue un risque avéré de développer de l'asthme pour l'enfant (35). De même, une exposition au tabagisme passif pendant l'enfance prédisposera également au développement de cette maladie (36). Enfin, la pollution atmosphérique liée au trafic incluant le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, des particules et des hydrocarbures aromatiques polycycliques pourraient également déclencher et/ou aggraver l'asthme (37).

II. La réaction inflammatoire allergique

Pour ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'asthme allergique, que nous détaillerons dans la suite de ce chapitre. La physiopathologie de l'allergie peut se diviser en plusieurs phases successives. La première, est la **phase de sensibilisation** au cours de laquelle l'allergène entre en contact avec les cellules épithéliales au niveau des voies respiratoires pour l'asthme. C'est au cours de cette phase asymptomatique que la mémoire immunitaire s'instaure avec la production d'immunoglobulines de type E (IgE). Lors d'une seconde exposition à l'allergène, la libération de médiateurs inflammatoires provoque une inflammation au niveau tissulaire. Une exposition répétée à l'allergène conduira à une inflammation chronique des voies aériennes responsable à long terme d'un remodelage bronchique.

1. La phase de sensibilisation

L'épithélium et la muqueuse pulmonaire sont associés à une population de cellules immunes spécialisées dans la présentation de l'antigène appelées cellules dendritiques (DCs). Celles-ci expriment les récepteurs du système immunitaire inné et ont un rôle de capture des antigènes. Elles clivent ces antigènes en peptides afin de les présenter aux cellules T via les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (38).

L'allergène est pris en charge par ces DCs au niveau des voies respiratoires. Certains allergènes possédant une activité protéasique, peuvent accéder aux cellules dendritiques situées sous la muqueuse. En effet, l'allergène va cliver les jonctions serrées entre les cellules épithéliales ce qui induit alors une brèche dans l'épithélium. Les DCs activées migrent vers les ganglions lymphatiques drainant le poumon afin de présenter l'antigène aux récepteurs de surface des

cellules T naïves grâce au CMH I et II. En présence d'IL-4, les cellules T CD4⁺ naïves acquièrent les caractéristiques des cellules T auxiliaires ou helper de type 2 (Th2) en produisant de l'IL-4 ainsi que de l'IL-13. Ces cellules Th2 interagissent avec les cellules B, qui présentent l'allergène via leur BCR (B cell receptor), permettant ainsi la production des IgE spécifiques de l'allergène. Ces dernières diffusent localement et entrent dans les vaisseaux lymphatiques puis dans la circulation sanguine afin d'être distribuées en systémique. Les IgE spécifiques se lient aux récepteurs de forte affinité (FcεRI) à la surface des cellules. Cette phase de sensibilisation est asymptomatique mais le système immunitaire est prêt à répondre rapidement lors d'une réexposition à l'allergène (39). **(Figure 3)**

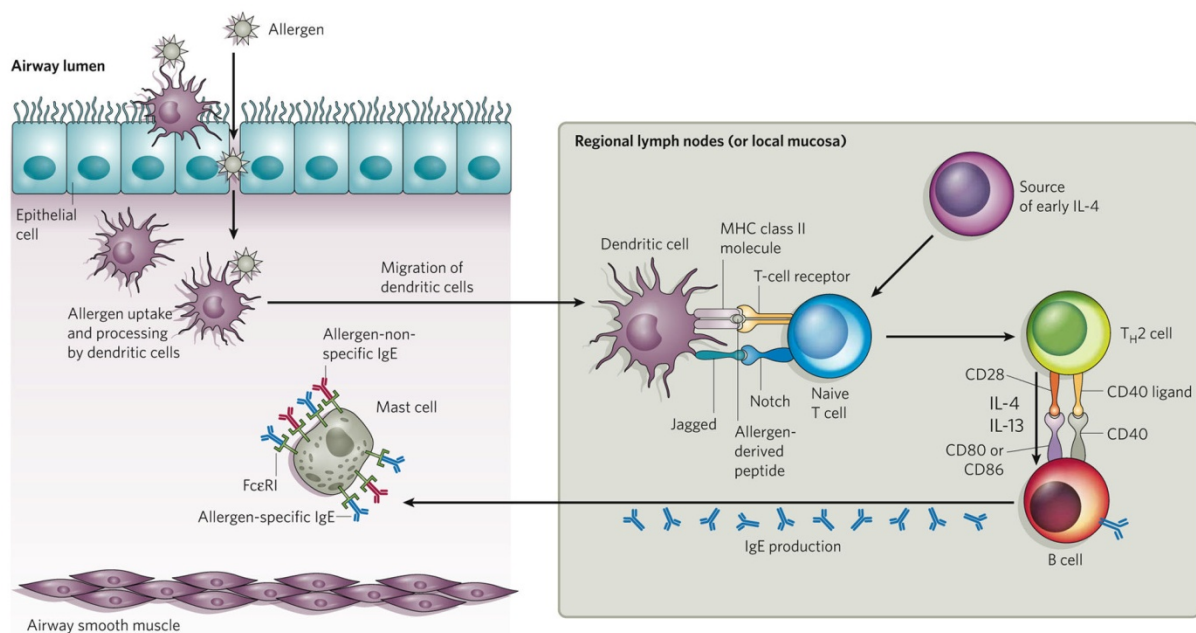


Figure 3 : **Phase de sensibilisation à un allergène dans les voies respiratoires.** Tiré de Galli et al, 2008. Les cellules dendritiques de la sous-muqueuse sont activées par l'allergène et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène via le CMH II aux lymphocytes T naïfs. En présence d'IL-4, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th2 producteurs d'IL-4 et d'IL-13. La production de ces dernières avec la liaison des molécules de co-stimulation (CD40/CD40L, CD80/CD28 ou CD86 /CD28) avec les lymphocytes B conduit à la production des IgE. Ces derniers se fixent à leurs récepteurs situés sur les mastocytes.

2. La phase effectrice

La phase effectrice comprend les réactions immédiate et retardée. La réaction immédiate se produit dans les minutes qui suivent la réexposition à l'allergène et reflète principalement la sécrétion de médiateurs par les mastocytes au niveau du site d'entrée. Cette phase se caractérise par des signes cliniques dépendants du tissu cible (irritation tissulaire, sécrétion de mucus, formation d'œdème, broncho-constriction) (39). Chez un individu sensibilisé, l'allergène est reconnu par les IgE spécifiques, lié aux récepteurs FcεRI, à la surface des mastocytes et des basophiles. Le complexe allergène/IgE conduit à l'agrégation des récepteurs FcεRI qui activent

les mastocytes et les basophiles. Cela entraîne la libération de médiateurs inflammatoires préformés contenus dans les granules cytoplasmiques. Ces granules comprennent des molécules telles que l'histamine, les tryptases ou encore l'héparine. Des médiateurs lipidiques comme les leucotriènes B4 (LTB4) et prostaglandines D2 (PGD2) ainsi que de nombreuses cytokines et chimiokines peuvent également être produites à la suite de l'activation des mastocytes. Ces médiateurs entraînent une bronchoconstriction, une vasodilatation ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la production de mucus par les cellules caliciformes (40).

Les mastocytes contribuent également à la transition vers la phase retardée en initiant le recrutement des cellules inflammatoires par la sécrétion des différents médiateurs. La phase tardive apparaît généralement 2 à 6 heures après l'inhalation de l'allergène avec un pic plus élevé après 6 heures (39). Elle se caractérise par un infiltrat au niveau du tissu, constitué d'une accumulation d'éosinophiles, de basophiles, de monocytes et de lymphocytes T (41). A leur tour, ces cellules sécrètent des substances pro-inflammatoires impliquées dans la destruction de l'épithélium et l'inflammation de la sous-muqueuse (**Figure 4**).

Lorsque l'exposition à l'allergène est continue ou répétée, l'inflammation persiste et de nombreuses cellules immunitaires peuvent être retrouvées dans les tissus. Cette inflammation persistante aboutit à long terme à la modification structurale des voies aériennes. Ce phénomène est nommé remodelage bronchique. Celui-ci se caractérise par une augmentation des cellules caliciformes, la desquamation de l'épithélium, un épaississement des parois bronchiques et une hyperplasie des cellules musculaires lisses (39).

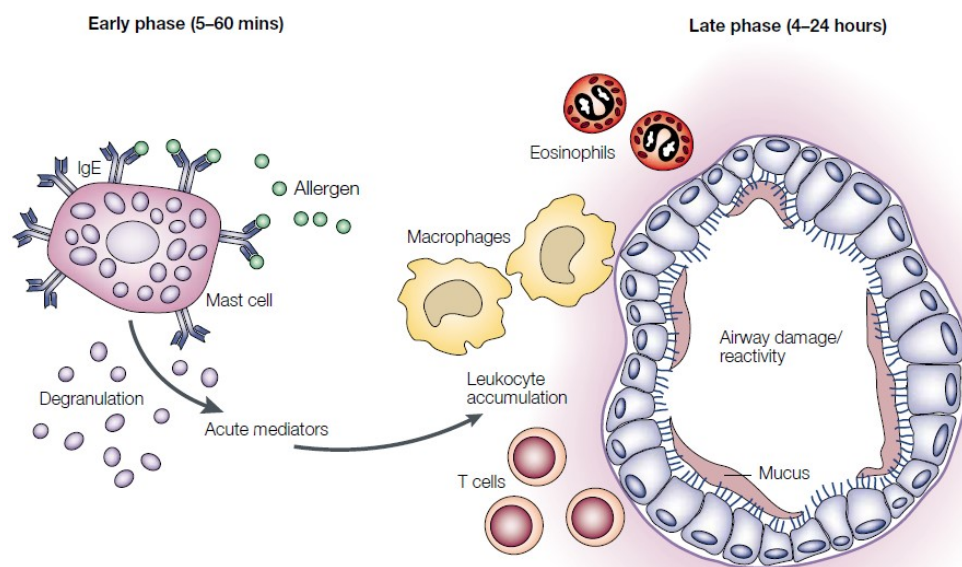


Figure 4 : **Représentation schématique de la phase effectrice composée de la phase immédiate et retardée.** Tiré de Lukacs, 2001. La phase effectrice peut se diviser en deux réactions distinctes. La réaction immédiate, également appelée phase précoce, se produit dans les minutes qui suivent l'exposition à

l'allergène. Les mastocytes dégranulent et néo-synthétisent des médiateurs inflammatoires qui entraînent des modifications des voies aériennes. Ces médiateurs, libérés durant la phase précoce, induisent la phase retardée en provoquant une accumulation de cellules inflammatoires dont les éosinophiles, les monocytes et les lymphocytes T. L'accumulation des cellules s'associe également à des dommages et à un dysfonctionnement des voies aériennes.

III. Les médiateurs cellulaires de l'asthme allergique

Une réponse immunitaire efficace nécessite deux types de mécanismes de défense : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée permet de défendre l'organisme de façon immédiate contre des agents infectieux. Elle est constituée de plusieurs types cellulaires comme les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles. A l'inverse, l'immunité adaptative confère une protection plus tardive mais durable dans le temps et nécessite la participation des lymphocytes.

1. Les cellules épithéliales des voies respiratoires

Le poumon est en permanence exposé aux composés extérieurs, ceux-ci contiennent de nombreux agents physiques, chimiques et biologiques potentiellement nocifs. L'épithélium bronchique constitue la première ligne de défense en formant une barrière physique et en jouant un rôle important dans l'immunité innée. Cet épithélium est composé de plusieurs types de cellules épithéliales, notamment des cellules épithéliales ciliées et des cellules caliciformes productrices de mucus. Les cellules épithéliales sont reconnues pour participer au développement des réponses allergiques et notamment dans le cas de l'asthme par leur production de cytokines et de chimiokines.

Dans les conditions physiologiques, les cellules épithéliales forment une barrière qui régule de manière stricte le passage des substances et possède une forte capacité à se réparer en cas de lésions. Au contraire, dans l'asthme, l'épithélium bronchique est plus fragile et la fonction de barrière est altérée. Divers facteurs environnementaux, tels que l'allergène d'acarien *Der p1*, la fumée de cigarette ou encore certains virus, affectent cette barrière en rompant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, ce qui augmente alors la perméabilité épithéliale. Cela facilite le passage de l'allergène dans la sous muqueuse des voies aériennes et son contact avec les cellules immunitaires des muqueuses (42).

Les cellules épithéliales expriment différents récepteurs dont des récepteurs aux cytokines ainsi que des PRRs, capables de reconnaître différents pathogènes (43). L'activation de ces derniers induit la production de cytokines ce qui mène au recrutement de cellules inflammatoires. De surcroît, la stimulation des cellules épithéliales par l'allergène ou encore par des agents

microbiens entraîne la sécrétion de cytokines comme la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), l'IL-33 et l'IL-25 également appelées alarmines. Celles-ci orientent les DCs vers une réponse Th2 et favorisent ainsi le développement de la réponse allergique (44).

2. Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont caractérisées par leur capacité à sécréter les mêmes cytokines que les T auxiliaires. Ces cellules ont une morphologie de type lymphoïde et n'expriment pas les marqueurs de lignées cellulaires spécifiques. Elles expriment la chaîne γ_c , commune à différents récepteurs de cytokines impliqués dans la prolifération lymphocytaire tels que le récepteur de l'IL-7 (CD127) et le récepteur de cellules souches ckit (CD117) (45). De par leur sécrétion de cytokines et leur expression spécifique de facteur de transcription, elles ont été classées en trois groupes. Les ILC de type 1 (ILC1), nommées ainsi par analogie aux cellules Th1, regroupent les cellules Natural Killer (NK) et les ILC1 productrices d'IFN- γ . Elles expriment le facteur de transcription T-bet. Les ILC2 ont la capacité de sécréter les cytokines de type 2 comme l'IL-5, l'IL-9, l'IL-13 et potentiellement l'IL-4. Ce groupe exprime les facteurs de transcription ROR α et Gata3. Les ILC3 comprennent les sous populations ILC3 NCR $^-$ capables de sécréter l'IL-17 et l'IL-22 et les ILC3 NCR $^+$ qui sécrètent uniquement l'IL-22. Les ILC3 expriment le facteur de transcription ROR γ_t et AhR.

Les ILC2 jouent un rôle important dans l'inflammation allergique des voies respiratoires en agissant comme des acteurs précoces dans les modèles expérimentaux d'asthme. Lors d'une provocation allergénique, l'épithélium pulmonaire répond en produisant des alarmines, telles que l'IL-33, l'IL-25 et le TSLP. Ces dernières induisent la production de cytokines par les ILC2. Les cytokines de type 2 produites par les ILC2 agissent à leur tour sur l'épithélium mais recrutent également des granulocytes et déclenchent la réponse immunitaire adaptative. De plus, les ILC2 favorisent la polarisation des cellules Th2 via la migration des cellules dendritiques dépendantes de l'IL-13 vers le ganglion lymphatique. Les souris déficientes en ILC2 ne développent pas de réponses Th2 efficaces et ont une inflammation de type 2 réduite dans les poumons. Les cellules Th2, via la sécrétion d'IL-2, peuvent également favoriser le développement des ILC2. Il existe donc une action réciproque entre les cellules ILC2 et les cellules Th2 dans les réactions allergiques, révélant le rôle essentiel des ILC2 dans l'inflammation allergique pulmonaire. Des données récentes ont également montré une implication des cellules ILC2 dans la phase de résolution de l'inflammation par la production d'amphiréguline qui maintient l'intégrité de la barrière épithéliale (46).

3. Les monocytes et macrophages

Dans ce travail de thèse, les monocytes et macrophages ont particulièrement suscité notre intérêt. Les macrophages sont des cellules immunitaires innées décrites pour la première fois au XIX siècle par Elie Metchnikoff, ce qui lui a valu l'obtention du prix Nobel de médecine en 1908. Les macrophages comme les monocytes font partie du système phagocytaire mononucléé qui est associé à l'élimination et à la phagocytose des cellules mortes et des microorganismes. Les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes sanguins qui ont quitté la circulation pour entrer dans les tissus. Il existe deux sous-types majeurs de monocytes : les classiques et les non classiques qui se distinguent chez l'homme par l'expression différentielle de cluster de différenciation (CD). Ainsi, les monocytes $CD14^{+}CD16^{low}$, également appelés monocytes classiques, expriment fortement le récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) nécessaire à leur recrutement et plus faiblement CX_3CR1 (C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1) impliqué dans leur survie. A l'inverse, les monocytes non classiques $CD14^{low}CD16^{+}$ expriment faiblement le récepteur CCR2 et fortement CX_3CR1 (**Tableau 1**). Chez la souris, les monocytes classiques sont caractérisés par la combinaison des marqueurs $Ly6C^{Hi}CX_3CR1^{int}CCR2^{+}$ à leur surface tandis que les non classiques sont définis par $Ly6C^{Low}CX_3CR1^{Hi}CCR2^{Low}$ (47).

Species	Subsets	Surface markers	% in MNC	Chemokine receptors	Functions
Human	Classical	$CD14^{++}CD16^{-}$	80-95	$CCR2^{high}CX_3CR1^{low}$	Phagocytosis
	Intermediate	$CD14^{++}CD16^{+}$	2-11	$CCR2^{mid}CX_3CR1^{high}CCR5^{+}$	Pro-inflammatory
	Non-classical	$CD14^{+}CD16^{++}$	2-8	$CCR2^{low}CX_3CR1^{high}$	Patrolling
Mouse	$Ly6C^{high}$ ($Ly6C^{+}$)	$CD11b^{+}CD115^{+}Ly6C^{high}$	40-45	$CCR2^{high}CX_3CR1^{low}$	Phagocytosis & Pro-inflammatory
	$Ly6C^{middle}$ ($Ly6C^{+}$)	$CD11b^{+}CD115^{+}Ly6C^{middle}$	5-32	$CCR2^{high}CX_3CR1^{low}$	Pro-inflammatory
	$Ly6C^{low}$ ($Ly6C^{-}$)	$CD11b^{+}CD115^{-}Ly6C^{low}$	26-50	$CCR2^{low}CX_3CR1^{high}$	Patrolling; tissue repair

Human MCs are divided into three subsets based on the cell surface expression of CD14 and CD16. $CD14^{++}CD16^{-}$ MCs, also called the classical MC, are the most prevalent MC subset in human blood and express high level of CCR2. The $CD14^{++}CD16^{+}$ MCs are intermediate MC which contribute significantly to atherosclerosis. The $CD14^{+}CD16^{++}$ MCs are referred to as non-classical monocytes which perform a *in vivo* patrolling function. Mouse MCs are divided into two subsets based on their cell surface expression of Ly6C. The $Ly6C^{high}$ and $Ly6C^{middle}$ subsets perform pro-inflammatory functions and express high level of CCR2, which is considered the counterpart of human classical MCs. The $Ly6C^{low}$ subsets express low level of CCR2, majorly patrol along the vascular endothelium and are involved in tissue repair, functionally similar to human non-classical MCs. CD, cluster of differentiation; CCR2, chemokine (C-C motif) receptor 2; CX_3CR1 , CX3C chemokine receptor 1; $Ly6C$, lymphocyte antigen 6 complex.

Tableau 1 : **Marqueurs et fonctions des populations monocytaires humaines et murines.** Tiré de Yang *et al*, 2014.

Les monocytes non classiques, $Ly6C^{-}$ pour la souris ou leur homologue humain $CD14^{low}CD16^{+}$ peuvent se différencier à partir des monocytes $Ly6C^{+}$ de manière dépendante du facteur de transcription nuclear receptor subfamily 4 group member 1 ($Nr4a1$) (48). Ces monocytes semblent agir principalement au sein du compartiment vasculaire. En effet, ils « patrouillent » dans les vaisseaux sanguins en roulant sur l'endothélium grâce à l'intégrine Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Les monocytes non classiques jouent un rôle clé dans l'élimination des cellules endothéliales endommagées, maintenant ainsi l'intégrité du système vasculaire en conditions physiologique et inflammatoire. Ces monocytes possèdent une capacité très limitée pour migrer hors du système vasculaire (49). Néanmoins, une étude réalisée chez la souris a

récemment montré la capacité des monocytes non classiques $Ly6C^-$ à recruter des neutrophiles dans le système vasculaire via TLR7. Les neutrophiles induisent alors une nécrose des cellules endothéliales. L'activation de TLR7 entraîne la rétention intravasculaire de ces monocytes $Ly6C^-$ et l'élimination des débris cellulaires par ces monocytes retenus (50).

Les monocytes classiques, $Ly6C^+$ chez la souris ou $CD14^+CD16^{low}$ pour l'homme, sont souvent référencés comme « monocytes inflammatoires ». Ils sont capables de migrer de la circulation sanguine vers les tissus afin de « patrouiller » l'environnement tissulaire (48). De plus, ces monocytes $Ly6C^+$ peuvent être retrouvés en petite quantité dans presque tous les tissus du corps où ils constituent une fraction mineure mais significative du pool de macrophages résidents dans les tissus. En condition inflammatoire, les monocytes classiques sanguins sont rapidement recrutés vers le tissu via l'expression du récepteur CCR2. Ces derniers traversent l'endothélium pour entrer dans le tissu grâce à l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les monocytes se différencient alors en macrophages et en cellules dendritiques (47) (**Figure 5**). Toutefois, des études plus récentes ont établi que les cellules dendritiques classiques et une grande partie des macrophages tissulaires proviennent et sont maintenus indépendamment de l'apport des monocytes (51,52).

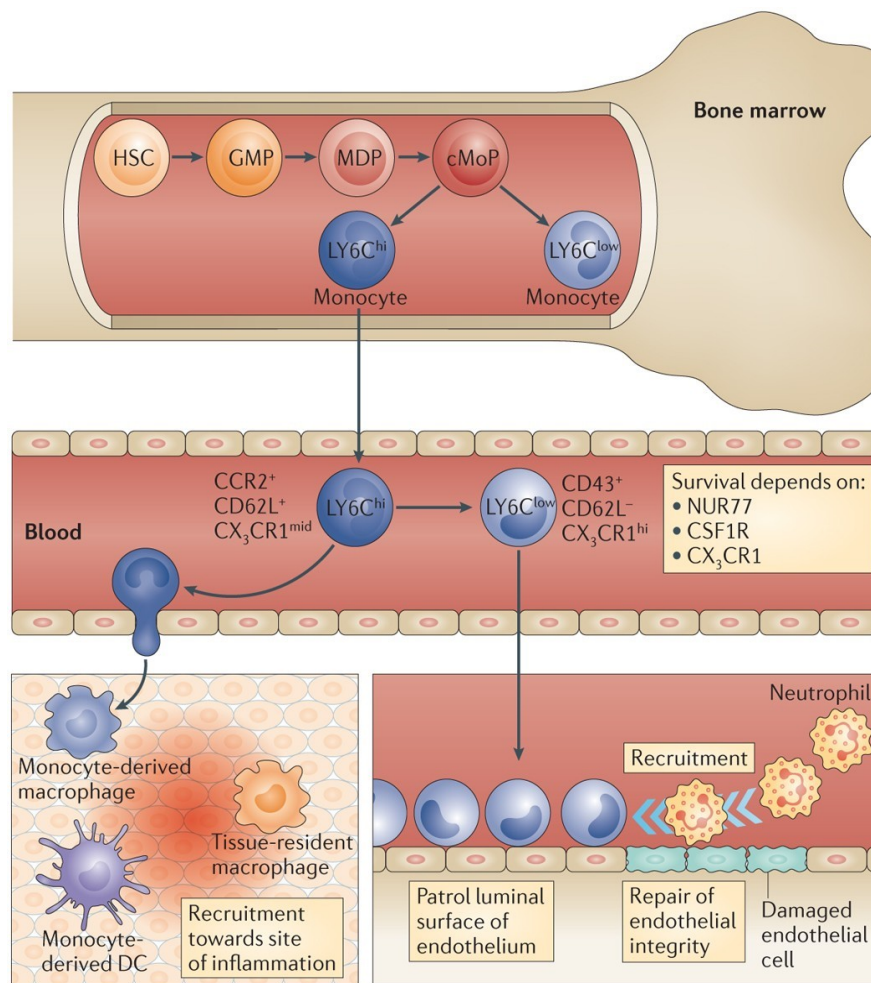


Figure 5 : Les compartiments monocytaires murins. Tiré de Ginhoux et Jung, 2014. Les monocytes

sont générés en continu dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSCs). En condition physiologique, les monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low} circulent au niveau des vaisseaux sanguins mais sont fonctionnellement distincts. Les monocytes Ly6C^{low} surveillent la surface endothéliale et coordonne sa réparation en recrutement de neutrophiles si nécessaire. Les monocytes Ly6C^{high} sont recrutés sur les sites inflammatoires où ils peuvent donner naissance à des cellules dendritiques ainsi qu'à des macrophages. CCR2, CC-chemokine receptor 2; CSF1R, colony-stimulating factor 1 receptor; CX₃CR1, CX3C-chemokine receptor 1; GMP, granulocyte–macrophage progenitor.

Les macrophages participent aux défenses immunitaires innées par la reconnaissance de nombreux pathogènes (virus, bactéries, parasites, champignons). En effet, ils expriment à leur surface les PRRs qui reconnaissent des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) et des DAMPs (damage-associated molecular patterns). Les PAMPs sont des motifs moléculaires très conservés exprimés par les pathogènes tandis que les DAMPs sont libérés par les cellules endommagées ou mortes lors d'un stress cellulaire (53). L'activation des macrophages mène à la phagocytose et à la sécrétion de médiateurs inflammatoires (facteurs de croissances, cytokines et chimiokines). Les macrophages sont également impliqués dans l'activation de l'immunité adaptative par leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes, via les molécules de CMH I et II. Ces macrophages ont de nombreuses fonctions. Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie et l'intégrité des tissus par l'élimination des débris internes, la réparation tissulaire, le remodelage tissulaire ainsi que la résolution de l'inflammation. L'environnement tissulaire influence la différenciation des macrophages qui acquièrent une spécificité fonctionnelle différente selon le tissu où ils résident. Ainsi, les macrophages sont divisés en sous-populations basées sur leur localisation anatomique et leur phénotype fonctionnel (54).

Les macrophages pulmonaires incluent une population hétérogène de phagocytes mononucléés qui sont classés en deux catégories principales : les macrophages alvéolaires et les macrophages interstitiels. Les macrophages alvéolaires résident à la surface des cellules épithéliales bronchiques, et contrairement aux autres macrophages résidents, ils sont en contact direct avec l'environnement (allergènes, bactéries commensales, particules) (55). Les monocytes dérivés de l'embryon semblent coloniser le poumon peu après la naissance et se différencier en macrophages alvéolaires. Ils vivent et se renouvellent indépendamment de l'apport de monocytes sanguins. Toutefois, si les macrophages alvéolaires sont endommagés ou épuisés, les monocytes recrutés de la circulation sanguine deviennent une nouvelle source de macrophages alvéolaires et contribuent au repeuplement de la niche des macrophages alvéolaires (56). Les macrophages alvéolaires sont des cellules effectrices de l'immunité qui peuvent prendre une fonction pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Dans l'asthme allergique, à la suite de l'exposition à un allergène, les monocytes sont rapidement recrutés et cette augmentation favorise une réponse inflammatoire aiguë. Au contraire, la prolifération des macrophages alvéolaires résidents supprime l'inflammation allergique (**Figure 6**). Il a été suggéré que les macrophages alvéolaires issus des monocytes combattent les signaux de danger induits par les

allergènes en favorisant une réponse inflammatoire, tandis que l'expansion des macrophages résidents restaure l'homéostasie (56).

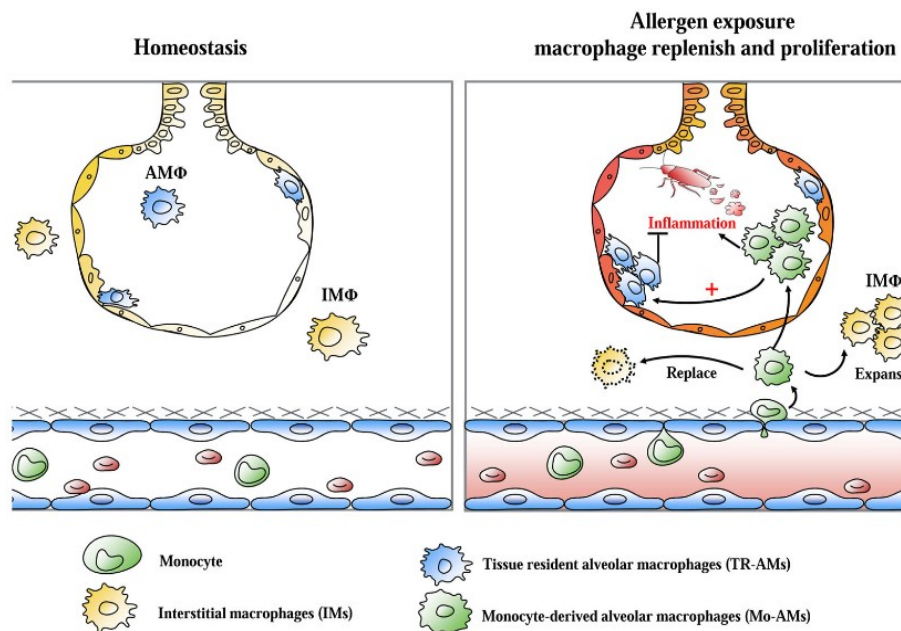


Figure 6 : **Schéma de la repopulation des macrophages au niveau alvéolaire.** Tiré de Saradna *et al*, 2018. A l'homéostasie, la majorité des macrophages alvéolaires résidents sont issus de progéniteurs embryonnaires, avec une faible contribution des macrophages dérivés de monocytes sanguins. Cependant, après une exposition aux allergènes, les médiateurs inflammatoires produits par les cellules épithéliales endommagées ou les cellules immunitaires innées résidentes activées provoquent un afflux de monocytes sanguins. Ces monocytes se différencient et se développent ensuite dans les voies aériennes afin de repeupler la niche des macrophages alvéolaires. Les macrophages alvéolaires résidents dans les tissus (TR-AMs) suppriment l'inflammation tandis que les macrophages alvéolaires dérivés de monocytes (Mo-AMs) favorisent l'inflammation.

Comme les cellules de l'immunité adaptative, les macrophages ont la capacité de se polariser. Il s'agit d'un processus par lequel le macrophage exprime différents phénotypes fonctionnels en réponse à des signaux du microenvironnement notamment par le biais des cytokines. Plusieurs classes de macrophages ont été décrites chez l'homme et la souris en se basant sur l'expression des marqueurs de surface, la production spécifique de médiateurs et leur activité biologique (57). Il existe deux grandes sous-populations de macrophages : les macrophages inflammatoires (ou M1) ou les macrophages anti-inflammatoires (ou M2).

Les macrophages M1 sont généralement induits par les cytokines de type Th1 telles que l'IFN- γ et le TNF- α ou par la reconnaissance des molécules bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS). Ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23) et des chimiokines qui jouent un rôle prédominant dans l'élimination des pathogènes intracellulaires ainsi que dans le recrutement et l'activation des cellules B et T (57).

Les macrophages polarisés M2 peuvent se diviser en trois sous-populations (M2a, M2b et M2c) en fonction des stimuli qui induisent leur différenciation (58). En effet, les macrophages M2a peuvent être induits par l'IL-4 et l'IL-13, les cellules M2b par des complexes immuns, des agonistes des TLRs ou l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) et les macrophages M2c par l'IL-10 et le TGF- β . Les macrophages M2 ont une grande capacité de phagocytose, éliminent les débris et possèdent des propriétés pro-angiogéniques et pro-fibrotiques. De surcroît, ils favorisent la réparation tissulaire et la cicatrisation (57).

Les macrophages sont des cellules essentielles dans l'asthme allergique. En effet, ils participent activement au développement de la réponse inflammatoire. Les macrophages pulmonaires des patients asthmatiques se retrouvent dans un microenvironnement contenant les cytokines de type 2, notamment l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-33, ce qui oriente leur différenciation vers le phénotype M2 (59,60). Ces macrophages produisent à leur tour une variété de cytokines et de chimiokines qui participent au recrutement de cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme (61). Girodet *et al.* ont montré une augmentation des macrophages M2 dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients asthmatiques comparé aux sujets sains (62). Bien qu'il existe une dominance de la réponse Th2, des études ont montré une implication des macrophages M1 dans l'asthme allergique. La cortico-résistance observée chez certains patients asthmatiques sévères était corrélée à une polarisation M1 des macrophages dans les LBA. Ce phénomène peut être lié à la présence de LPS retrouvé dans les voies aériennes de ces patients. La raison de la présence de LPS dans les voies respiratoires est actuellement inconnue. La colonisation bactérienne au niveau des voies aériennes et une exposition environnementale sont potentiellement responsables de sa présence (63). Similairement, les concentrations de LPS, d'IFN- γ et de TNF- α ont été trouvées augmentées dans les expectorations de patients asthmatiques (64–66). Néanmoins, la polarisation des macrophages M1/M2 reste très simplifiée. Il s'agit d'une construction réalisée *in vitro* pour mieux comprendre la biologie des macrophages *in vivo*. Il existe des limites à ces observations liées notamment à la mise en culture des macrophages qui pourrait altérer le phénotype *in vitro*. Leurs caractéristiques sont liées à l'environnement tissulaire ou encore l'existence de stades intermédiaires de macrophages qui ferait un lien entre les extrêmes M1/M2.

4. Les éosinophiles

Les éosinophiles sont des contributeurs majeurs de la réponse inflammatoire allergique. Leur nombre est augmenté dans le sang périphérique ainsi que dans les expectorations des patients asthmatiques (67). Les précurseurs des éosinophiles sont directement recrutés à partir de la moelle osseuse. Il s'agit de cellules souches progénitrices CD34⁺ exprimant le récepteur à l'IL-5. De nombreuses cytokines, telles que l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF (Granulocyte-macrophage

colony-stimulating factor), prennent part à leur développement. Cependant, l'IL-5 constitue une cytokine indispensable à la différenciation, l'activation et la survie des éosinophiles dans les tissus (68). La libération de facteurs, incluant des leucotriènes, des prostaglandines notamment PGD₂, des cytokines et chimiokines, entraîne le recrutement des éosinophiles (67). Ces derniers migrent alors jusqu'au poumon grâce à des chimiokines comme l'éotaxine-1 (ou CCL11). La migration entre l'endothélium et le tissu nécessite l'expression à la membrane de molécules d'adhérence notamment des intégrines. Les éosinophiles expriment la VLA4 (very late antigen 4), qui va venir se lier à une autre intégrine exprimée par les cellules endothéliales, la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule). La liaison entre les deux intégrines participe à la migration des éosinophiles de l'endothélium vers le tissu (69). De plus, les cytokines IL-4 et IL-13 produites par les cellules Th2 et les ILC2 participent indirectement à la migration des éosinophiles car elles favorisent l'augmentation des molécules d'adhérence du système vasculaire nécessaire à la transmigration (70).

Une fois présents dans le tissu pulmonaire, les éosinophiles libèrent le contenu de leurs granules et exercent une action toxique sur les tissus environnants. Parmi les différentes substances libérées figurent diverses protéines cationiques (EPO (eosinophil peroxidase), MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein), EDN (eosinophil-derived neurotoxin)), des facteurs de croissance et des médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, prostaglandines). Les éosinophiles sont également la source de cytokines pro-inflammatoires et régulatrices (IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , TGF- β) et de chimiokines (CCL11, CCL5) qui participent au recrutement d'autres cellules inflammatoires (71). De surcroît, les éosinophiles peuvent moduler la réponse immune en interagissant avec d'autres cellules. Ainsi, une étude a démontré la capacité des éosinophiles, exprimant les molécules de CMH II, à interagir avec les lymphocytes T, de présenter un antigène et d'induire leur prolifération (72). La protéine EDN, quant-à-elle, module les DCs en activant la voie de signalisation TLR2, ce qui a pour effet d'amplifier la réponse Th2 (73). Les effets de ces médiateurs confèrent ainsi, aux éosinophiles, des fonctions cytotoxiques, pro-inflammatoires et immuno-modulatrices.

L'inflammation persistante causée par les éosinophiles mène à des dommages au niveau des voies aériennes et la protéine MBP des éosinophiles y contribue. En effet, les cellules musculaires lisses (CML) des voies aériennes se contractent à la suite de l'activation du récepteur muscarinique M3 par l'acétylcholine. En revanche, le récepteur muscarinique M2 limite le relargage de l'acétylcholine et agit donc comme un mécanisme régulateur. Or, la protéine MBP agit comme un antagoniste allostérique du récepteur muscarinique M2 exprimé par les CML. Ainsi, l'inhibition de ce récepteur mène à la contraction de cellules musculaires lisses (74). La libération des leucotriènes par les éosinophiles active les mastocytes ainsi que les basophiles qui sécrètent alors des prostaglandines, de l'histamine, et des leucotriènes (69). L'activation du récepteur M3 ainsi que les médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles participent à la bronchoconstriction observée dans l'asthme. Les éosinophiles semblent contribuer au

remodelage bronchique par la libération de protéines cationiques et de cytokines impliquées dans ce remodelage comme le TGF- β . De plus, ils contribuent de façon indirecte en libérant des médiateurs qui activent les cellules épithéliales et les mastocytes, qui à leur tour libèrent des protéines impliquées dans le remodelage bronchique (75,76).

5. Les neutrophiles

Le rôle des neutrophiles dans l'asthme allergique n'est pas encore entièrement élucidé. Cependant, ils semblent être impliqués dans la réponse allergique et plus spécifiquement dans les formes sévères de l'asthme. En effet, le nombre de neutrophiles est augmenté dans les expectorations des patients asthmatiques sévères (77,78). Sous l'action de chimiokines telle que IL-8/CXCL8 chez l'homme, les neutrophiles migrent jusqu'aux voies respiratoires. Or, il a été démontré une augmentation des niveaux de IL-8/CXCL8 dans les expectorations lors d'exacerbations aiguës de l'asthme allergique (79) et après une provocation allergénique (80). Une corrélation significative a été retrouvée entre le nombre de neutrophiles dans les expectorations et les taux d'IL-8/CXCL8 (80). Une fois infiltrés dans le tissu pulmonaire, les neutrophiles peuvent libérer un grand nombre de cytokines (IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TGF- β), des dérivés oxygénés et des médiateurs inflammatoires (LTB₄, platelet-activating factor (PAF)) qui participent à la réponse allergique (81). De plus, les neutrophiles de patients asthmatiques allergiques produisent de l'oncostatine M, une cytokine appartenant à la famille de l'IL-6, qui joue un rôle important dans le dysfonctionnement de la barrière muqueuse (82). En effet, les cellules épithéliales pulmonaires cultivées *ex-vivo* en présence de doses physiologiques d'oncostatine M, montrent une diminution de la résistance et une augmentation de la perméabilité épithéliale ainsi qu'une perte de la structure des jonctions serrées (81). Ceci suggère que l'oncostatine M pourrait favoriser l'entrée des allergènes dans le tissu. Cependant, la contribution de l'oncostatine M dans l'asthme allergique n'est pas encore bien comprise. L'activation des neutrophiles mène également à la formation de pièges extracellulaires, appelés NETs (neutrophil extracellular trap). Ce sont des structures principalement composées de chromatine mitochondriale et/ou nucléaire des neutrophiles associées à des protéines telles que la NE (neutrophil elastase), la MPO (myéloperoxidase) et la cathepsine G. Ces NETs peuvent être libérés dans l'espace extracellulaire en réponse à de nombreux stimuli. Une étude récente, a montré que les NETs étaient essentiels dans la médiation de l'exacerbation de l'asthme allergique provoquée par une infection à rhinovirus chez l'homme et dans un modèle murin d'asthme aux acariens. En effet, les NETs sont massivement formés dans le poumon de souris asthmatiques allergiques infectées par un rhinovirus et l'inhibition ou la dégradation de NETs protège les souris de la réponse inflammatoire de type 2 (83). Les neutrophiles sont également la source de médiateurs clés du remodelage bronchique. Ils produisent la métalloprotéase MMP-9 (matrix metalloproteases-9), la NE et la MPO. Une augmentation des protéines MMP-9 (84) et

NE (85) a été décrite dans les expectorations de patients asthmatiques et est corrélée avec le pourcentage de neutrophiles. De plus, *in vitro*, les neutrophiles issus de patients asthmatiques allergiques, stimulés avec l'allergène, libèrent la MMP-9 (86). Durant la phase de provocation allergénique dans un modèle à l'ovalbumine, l'inhibition de la NE est associée à une diminution du nombre de cellules caliciformes, du recrutement des éosinophiles, de l'hyperréactivité bronchique ainsi que de la réponse immune Th2 (87). Tandis que des souris exposées de manière chronique à la NE développent une inflammation pulmonaire et une métaplasie des cellules productrices de mucus (88). L'ensemble de ces données suggère que les neutrophiles participent à l'aggravation de l'asthme allergique.

Par ailleurs, l'asthme sévère est par définition peu réceptif aux corticoïdes. De multiples mécanismes peuvent être à l'origine de cette absence de réponse aux corticothérapies, cependant, il a été montré que les corticoïdes favorisent l'apoptose des éosinophiles mais inhibent celle des neutrophiles (89). Une augmentation du nombre de neutrophiles a été détectée dans les expectorations, le sang périphérique et le LBA de patients asthmatiques sévères ou cortico-résistants (90). Ainsi, la modification d'un profil inflammatoire à éosinophiles vers un profil à neutrophiles peut expliquer une partie des résistances aux corticoïdes dans l'asthme allergique.

6. Les lymphocytes

Il existe deux populations de lymphocytes : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes T sont subdivisés en plusieurs sous-populations : les lymphocytes T helper ou auxiliaires CD4⁺ (Th1, Th2, Th17), les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (Tc1, T2, Tc17), les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules NKT (Natural Killer T). Certaines de ces populations lymphocytaires jouent un rôle important dans le développement de l'asthme allergique.

a. Les lymphocytes T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17)

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont capables de se différencier en de nombreux sous-types sous l'influence d'un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène et des cytokines sécrétées. Le processus de différenciation nécessite trois signaux. Le premier signal résulte de l'interaction entre le récepteur des cellules T (TCR) et le peptide antigénique présenté par le CMH de classe II présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le second signal est généré après l'interaction entre les corécepteurs CD28 à la surface des cellules T et une molécule de co-stimulation telle que le CD80 ou le CD86 à la surface des CPA. Le troisième signal résulte de la production de cytokines inflammatoires par les CPA ou d'autres cellules au niveau du site d'activation des lymphocytes. Ce sont ces cytokines qui dirigent la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en sous-types particuliers (91) (**Figure 7**). Dans l'allergie, les cellules

T naïves se différencient en lymphocytes Th2. Cependant, les sous-types Th1 et Th17 peuvent également être générés, aboutissant parfois à des formes plus sévères de la maladie (92).

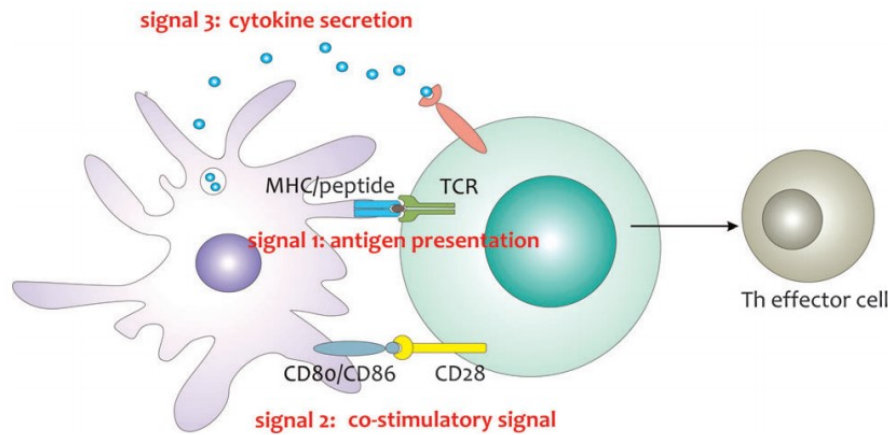


Figure 7 : **Signaux d'initiation de la réponse effectrice T CD4⁺**. Tiré de De Koher *et al*, 2011. Le déclenchement de la réponse effectrice des cellules T nécessite 3 signaux. 1) Stimulation du TCR par le complexe peptide/CMH. 2) Interaction entre les molécules de costimulation CD80/CD86 sur les CPA et CD28 sur les cellules T. 3) Sécrétion de cytokines inflammatoires.

En présence d'IL-12, les cellules T CD4⁺ naïves se différencient en **lymphocytes Th1**, producteurs d'IFN- γ sous la dépendance du facteur de transcription T-bet (**Figure 8**) (18). Les cellules Th1 sont principalement induites en réponse à une infection virale, bactérienne ou protozoaire. L'IFN- γ est impliqué dans la régulation des réponses immunes et inflammatoires. Cette cytokine peut agir sur les cellules présentatrices d'antigènes pour améliorer la réponse antivirale dans le but d'éliminer l'infection. Ainsi, l'IFN- γ est capable d'activer les macrophages afin d'éliminer des pathogènes intracellulaires. De même, l'IFN- γ améliore la présentation des antigènes en augmentant les molécules CMH I et II (93). Par ailleurs, les cellules Th1 via l'IFN- γ favorisent la production d'IgG par les cellules B, comme l'IgG2a chez la souris, impliquée dans l'opsonisation, la fixation du complément et la neutralisation des virus (94).

Les premières études ont montré que les cellules Th1 seules n'induisent aucune caractéristique de l'asthme. Ensuite, l'IFN- γ et le facteur de transcription t-bet ont été associés à la suppression de l'infiltration d'éosinophiles dans le poumon et de l'hyperréactivité bronchique (HRB). La suppression des cellules Th2 est probablement due au facteur de transcription t-bet qui est capable d'interagir directement avec Gata3, le facteur de transcription des cellules Th2. T-bet peut ainsi inhiber la différenciation des cellules en Th2 en se liant aux séquences d'ADN cibles de Gata3. Ces données suggèrent que les cellules Th1 joueraient un rôle dans le contrôle de l'inflammation dans l'asthme (18). Un taux élevé d'IFN- γ a été retrouvé durant l'exacerbation de l'asthme et un nombre important de cellules Th1 a été détecté dans les voies respiratoires des patients asthmatiques. Ceci suggère que les cellules Th1 participent à la pathogénèse de

l'asthme. De plus, plusieurs études ont montré que les cellules Th1 induisent une inflammation à neutrophiles dans les voies aériennes, ce qui est souvent associé à l'asthme sévère (95). Ces résultats suggèrent que l'impact de l'axe cellules Th1/IFN- γ sur la réponse inflammatoire Th2 est modulé par une balance entre des effets suppresseurs sur la différenciation des cellules Th2 et des effets favorisant le recrutement de cellules Th2 différenciées.

Les lymphocytes Th2 jouent un rôle central dans l'inflammation allergique. En présence d'IL-4, les cellules T naïves se différencient en lymphocytes Th2 qui sécrètent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 sous la dépendance du facteur de transcription Gata3 (**Figure 8**). En effet, l'IL-4 entraîne une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation du facteur de transcription Gata3 via STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6). Gata3 est indispensable à la différenciation des cellules Th2 et à la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. L'IL-4 et l'IL-13 jouent un rôle clé dans la commutation de classe des immunoglobulines produites par les cellules B vers la synthèse d'IgE alors que l'IL-5 favorise l'activation et la maturation des éosinophiles. L'IL-13 est également associée à l'hypersécrétion de mucus et à l'hyperréactivité bronchique (96). Par ailleurs, Saatian *et al.* ont montré que l'IL-4 et l'IL-13 perturbaient la barrière épithéliale des voies aériennes en augmentant sa perméabilité, ce qui pourrait contribuer à l'inflammation pulmonaire dans l'asthme allergique (97).

Le facteur de transcription Gata3 réprime également la différenciation des cellules Th1 en inhibant STAT4 qui est nécessaire à l'activation du facteur de transcription T-bet. À l'inverse, T-bet peut venir s'associer à Gata3 et inhiber la synthèse des cytokines de type Th2. Ainsi, les voies Th1 et Th2 sont antagonistes l'une vis-à-vis de l'autre (96).

Les lymphocytes Th17 constituent une population bien distincte des cellules classiques Th1 et Th2. Ils expriment les facteurs de transcriptions ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor γ t) et ROR α et produisent de l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (**Figure 8**). Chez la souris, l'IL-6 et le TGF β stimulent la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules Th17. Initialement, l'IL-23 a également été montrée comme étant nécessaire à la polarisation des cellules Th17. Cependant, des études suggèrent que l'IL-23 n'est pas indispensable pour cette polarisation mais semble essentielle pour la mise en place des cellules mémoires Th17. Chez l'homme, le développement des lymphocytes Th17 peut être induit par l'IL-1 β et l'IL-23 et est amélioré par la présence d'IL-6. Les cellules Th17 semblent jouer un rôle clé dans l'inflammation, l'auto-immunité et la défense contre les bactéries et champignons (95).

Des études ont détecté des taux élevés d'IL-17A dans les expectorations, les lavages bronchoalvéolaires et les biopsies bronchiques de patients asthmatiques (98,99). De nombreuses études suggèrent que la présence d'IL-17 dans les voies respiratoires des patients asthmatiques est associée à la sévérité de la maladie. En effet, des études ont montré une corrélation positive

entre la production d'IL-17 et la sévérité de l'asthme (99–101). De plus, Pène *et al.* ont montré que les biopsies bronchiques de patients asthmatiques contiennent un nombre important de cellules Th17 produisant de l'IL-17 (102). Les cellules Th17, par la sécrétion d'IL-17A, orchestrent le recrutement des neutrophiles soit directement via la production d'IL-8 soit indirectement en induisant la production d'IL-6, de CSFs (colony stimulatory factors) et de chimiokines comme CXCL1 et CXCL5 par les cellules épithéliales (103). L'interaction entre les fibroblastes bronchiques et les cellules T CD4⁺ obtenus de patients asthmatiques est capable de promouvoir spécifiquement le profil des cellules Th17 *in vitro* (104), démontrant ainsi que l'environnement local dans les voies respiratoires pourrait favoriser l'émergence de ces cellules chez les sujets asthmatiques. L'administration de corticoïdes, afin de réduire l'inflammation des voies respiratoires, constitue un traitement courant de l'asthme. Des études ont montré une inhibition de l'inflammation de type Th2 et de l'infiltration d'éosinophiles par l'administration de corticostéroïdes, néanmoins certains types cellulaires comme les Th17 semblent résister à ces traitements. McKinley *et al.* ont montré, dans un modèle murin, que l'inflammation neutrophilique pulmonaire induite par les cellules Th17 et l'hyperréactivité sont résistantes à la dexaméthasone (105). Ces résultats suggèrent que les cellules Th17 participent au développement de l'asthme allergique sévère.

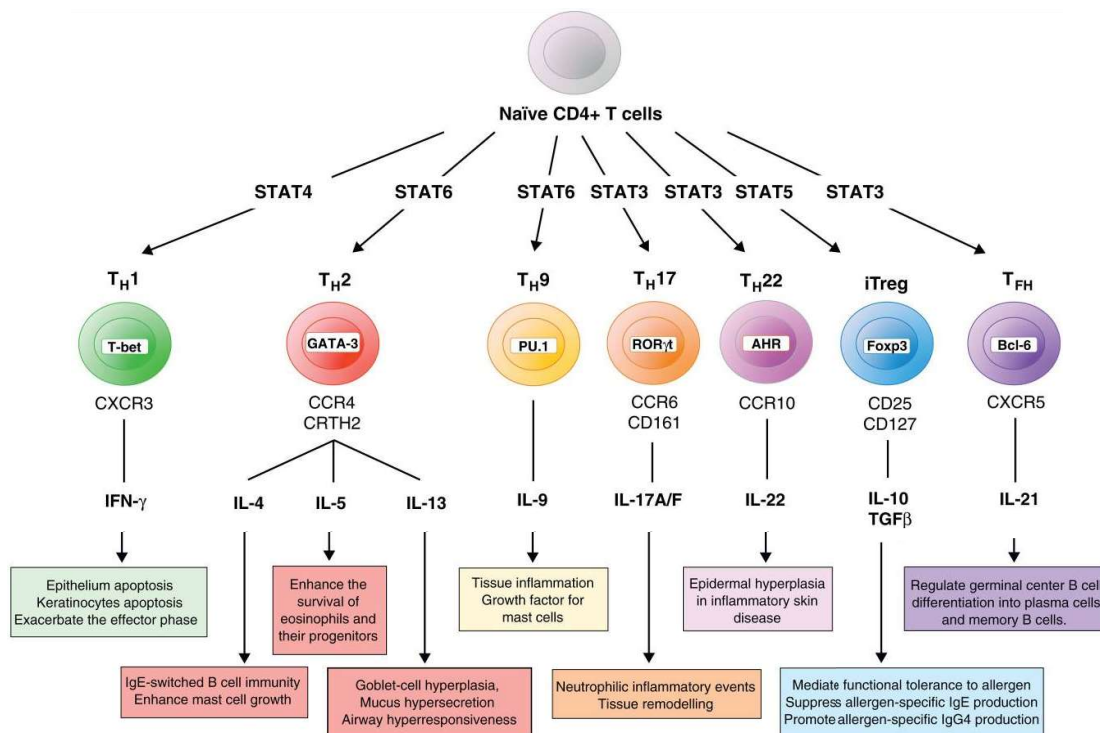


Figure 8 : Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T helper et leur rôle dans l'allergie. Tiré de Wambre *et al.*, 2012. Les différentes sous-populations lymphocytaires expriment des facteurs de transcriptions, des marqueurs de surface et produisent des cytokines spécifiques.

b. Les lymphocytes T CD8⁺ (Tc1, Tc2, Tc17)

Les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle important dans l'immunité adaptative en réponse aux pathogènes intracellulaires et aux tumeurs. Ils contribuent également à la régulation de processus pathologiques tels que l'allergie. Les cellules CD8⁺ naïves sont capables de se différencier en différents sous-types à la suite d'une interaction avec l'antigène et à l'environnement cytokinique. Comme pour les lymphocytes T CD4⁺, le processus de différenciation nécessite trois signaux : une interaction entre le TCR et le CMH porteur d'un peptide antigénique, des molécules de co-stimulation et des cytokines. Néanmoins, une différence notable existe entre les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. En effet, la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène se fait par le CMH de classe I pour les lymphocytes T CD8⁺. Les molécules de CMH I sont exprimées par la majorité des cellules nucléées ce qui donne l'opportunité aux cellules T CD8⁺ de reconnaître l'antigène présenté par presque toutes les cellules du corps. Ces lymphocytes se différencient alors en différents sous-types lymphocytaires, tels que Tc1, Tc2 et Tc17, possédant des caractéristiques et des fonctions qui leurs sont propres (**Figure 9**). Dans le contexte de l'asthme allergique, des études cliniques ont noté une corrélation positive entre le nombre de cellules CD8⁺ et la sévérité de la maladie. Van Rensen *et al.* ont identifié une corrélation entre le nombre de cellules T CD8⁺ présentes dans les biopsies bronchiques et le déclin pulmonaire chez les patients asthmatiques (106). De même, une augmentation des cellules T CD8⁺ dans le LBA a été associée à un asthme à éosinophile (107). Par ailleurs, les cellules T CD8⁺ humaines (108) et murines (109) sont plus résistantes aux corticostéroïdes que les cellules T CD4⁺. Ainsi, ces cellules pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie des maladies inflammatoires dont l'asthme allergique.

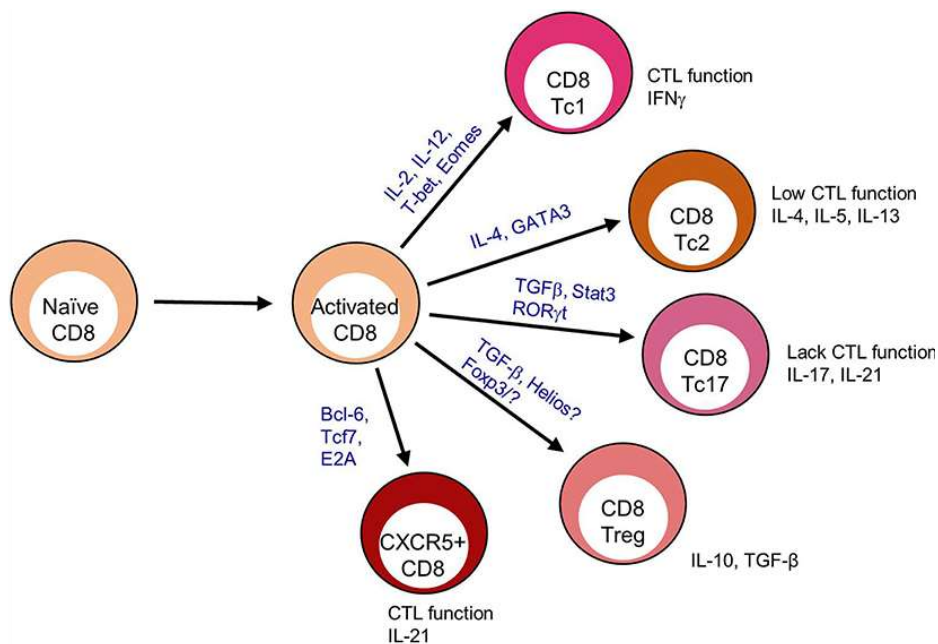


Figure 9 : Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en lymphocytes Tc1, Tc2, Tc17 et T CD8 régulateurs. Tiré de Valentine et Hoyer, 2019. Les différentes

populations lymphocytaires expriment des facteurs de transcriptions et produisent des cytokines spécifiques.

En présence d'IL-12 et d'IL-2, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs se différencient en **cellules effectrices Tc1**, également nommées lymphocytes T cytotoxiques, productrices d'IFN- γ . Les changements phénotypiques et fonctionnels durant le processus de différenciation sont induits par un réseau de facteur de transcription, incluant T-bet, Id2, Blimp-1 et interferon regulatory factor 4 (IRF4). Ces derniers favorisent le développement des cellules effectrices Tc1. Le facteur de transcription IRF4, est essentiel pour le maintien de la prolifération, la survie et la différenciation des cellules effectrices Tc1. Ces dernières jouent un rôle primordial dans l'élimination des pathogènes intracellulaires. En effet, les cellules Tc1 sont capables d'éliminer les cellules présentant l'antigène en libérant des molécules cytotoxiques comme les perforines et granzymes et en sécrétant de l'IFN- γ et du TNF- α . Ces cytokines permettent des réponses immunes innées et adaptatives plus efficaces et plus rapides contre les pathogènes intracellulaires (110).

Dans le contexte de l'allergie, l'implication des cellules Tc1 reste à explorer. Une étude a montré que les fréquences des cellules T CD8⁺ du sang périphérique produisant les cytokines de type 1 et 2 sont comparables aux fréquences des cellules T CD4⁺. La fréquence de l'IFN- γ produit par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ a été retrouvée plus élevée chez les sujets asthmatiques que chez les sujets sains (111). Similairement, Magnan *et al.* ont montré une augmentation des cellules CD8⁺ productrices d'IFN- γ chez les patients asthmatiques (112). Néanmoins, ces données sont controversées. Shirai *et al.* n'ont pas trouvé de modification concernant la production d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺ du sang périphérique entre les sujets asthmatiques et le groupe contrôle (113). Au contraire, Grob *et al.* ont noté une diminution de l'expression d'IFN- γ pour les cellules T CD8⁺ chez les patients asthmatiques (114). La divergence de ces résultats pourrait s'expliquer par les résultats de Cho *et al.* montrant que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺, issues du sang périphérique, ne reflètent pas nécessairement celles présentes dans le poumon. Une augmentation de la production d'IL-5 et d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺ a été constatée dans les expectorations de patients asthmatiques. Ces données n'étaient pas concordantes avec les échantillons sanguins qui ne montraient aucune différence entre les groupes (115). Malgré ces études qui suggèrent une variation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ producteurs d'IFN- γ dans l'asthme, aucune preuve mécanistique de leur rôle n'a encore été clairement démontrée.

En présence d'IL-4, les cellules T CD8⁺ se différencient en **cellules Tc2** et produisent de l'IL-5, de l'IL-13 et de l'IL-4 dans une moindre mesure. Le processus de différenciation nécessite le facteur de transcription Gata3 comme pour les cellules Th2. L'activation d'une enzyme stéroïdogène, la CYP11A1, est également essentielle pour le développement des cellules Tc2. Celles-ci possèdent différents récepteurs aux leucotriènes et prostaglandines incluant CRTH2 (prostaglandin D2 receptor 2), CysLT1 (Cysteinyl leukotriene receptor 1) et BLT-1 (leukotriene B4

receptor 1) reconnaissant leurs ligands PGD_2 , LTE_4 et LTB_4 respectivement. La fonction des cellules Tc2 diffère des cellules Tc1 par une activité cytotoxique plus faible. Elle peut également participer à l'aggravation de certaines maladies telles que l'arthrite rhumatoïde (110).

Les cellules Tc2 semblent jouer un rôle dans le développement de l'inflammation dans l'asthme allergique dans des modèles de rongeurs. Des souris naïves recevant des lymphocytes Tc2 par intraveineuse avant une provocation allergénique montrent une potentialisation de l'éosinophilie et de l'HRB (116,117). Chez l'homme, les cellules $CD8^+$ issues du sang de patients asthmatiques produisent plus d'IL-4 que celles de sujets contrôles (118). De plus, les cellules Tc2 $CD8^+$ IL-13⁺ du sang périphérique sont augmentées dans l'asthme et sont corrélées avec la sévérité de la maladie ainsi qu'avec le phénotype éosinophilique (107). Plusieurs études ont montré une augmentation des cellules Tc2 dans le sang périphérique dans l'asthme, bien que cette association soit plus forte avec les cellules Th2 (119). Le recrutement pulmonaire des cellules Tc2 semble être facilité par le récepteur BLT-1 exprimé à leur surface (120). L'ensemble de ces résultats montrent clairement que les cellules Tc2 contribuent à l'inflammation allergique, néanmoins, le mécanisme impliqué n'est pas clairement élucidé. C'est pourquoi Gelfand et Hinks ont émis l'hypothèse que l'apparition d'un asthme à éosinophilie se ferait à la suite d'une infection généralement virale des voies aériennes, entraînant un recrutement de cellules T $CD8^+$. Ceci favoriserait l'activation des cellules T $CD8^+$ qui subiraient une conversion en cellules Tc2 en présence d'IL-4. Ces cellules pourraient ensuite être activées soit de manière spécifique par des aéroallergènes ou des virus soit de manière indépendante de leur TCR via des médiateurs inflammatoires. Les cellules Tc2 expriment le CRTH2 et le CysLT1, récepteurs impliqués dans leur recrutement (121). Ainsi, Hinks *et al.* ont étudié les ligands PGD_2 et LTE_4 dans les voies respiratoires dans l'asthme. Ils ont montré une augmentation de PGD_2 dans les voies aériennes chez tous les sujets asthmatiques sévères, cependant, l'augmentation de LTE_4 était spécifique au phénotype à éosinophiles sévères. *In vitro*, PGD_2 et LTE_4 sont chimioattractants notamment pour les cellules Tc2. Par ailleurs, ces molécules agissent en synergie pour favoriser la production d'IL-5 et d'IL-13 par les cellules Tc2. Cet effet est plus important sur les cellules Tc2 que sur les Th2. Une des sources de ces médiateurs inflammatoires pourrait être les mastocytes puisque l'activation via les IgE de ces cellules entraîne la libération de ces médiateurs. Cela pourrait entraîner la migration des cellules Tc2 qui produisent alors l'IL-5 et l'IL-13 (122). De plus, la stimulation de cellules Tc2, *in vitro*, induit la production d'IL-5 et de GM-CSF, ce qui conduirait au recrutement et à la survie des éosinophiles (107) (**Figure 10**).

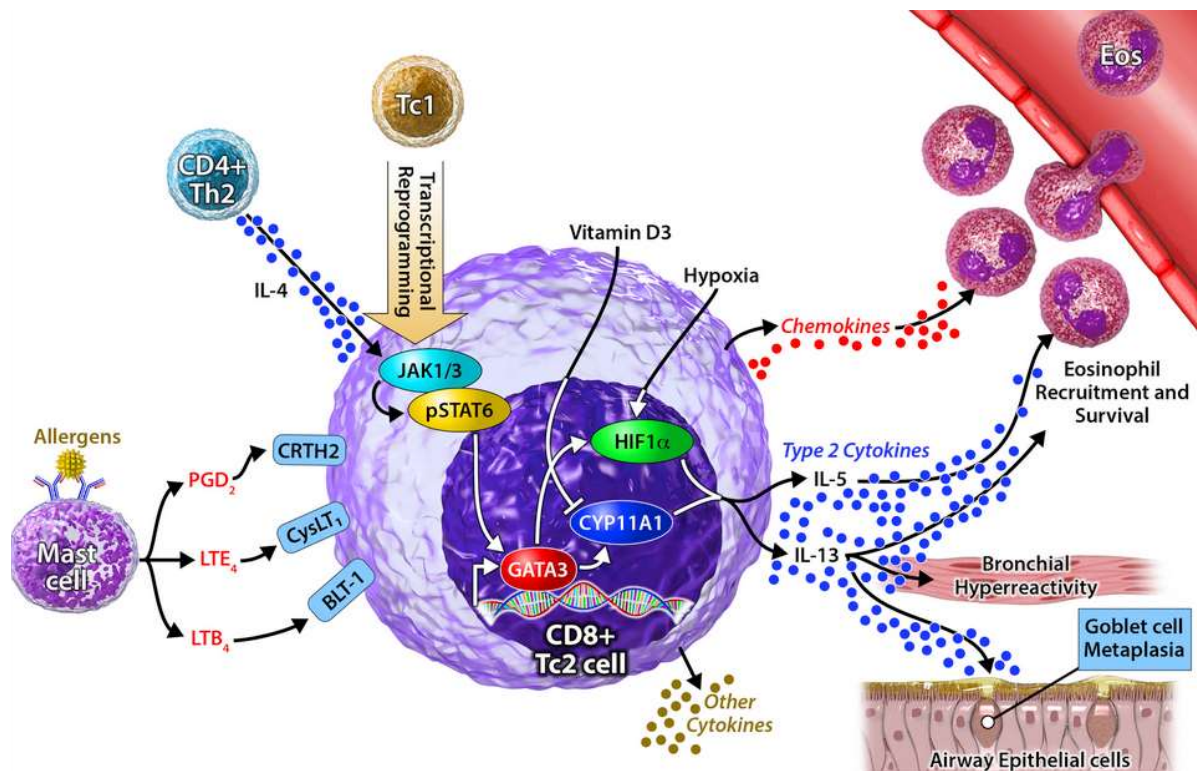


Figure 10 : **Les cellules CD8⁺ Tc2 dans l'asthme allergique.** Tiré de Gelfand et Hinks, 2019. L'IL-4 produite par les cellules, incluant les lymphocytes Th2, mène à la différenciation des cellules Tc2 par la reprogrammation transcriptionnelle des cellules Tc1. L'IL-4 active le facteur de transcription GATA3 qui à son tour augmente l'expression de HIF-1 α , CYP11A1 et les cytokines de type 2 (IL-5 et IL-13). Ces cytokines clés dans l'asthme conduisent au recrutement et à la survie des éosinophiles, une hyperréactivité bronchique, une métaplasie des cellules caliciformes. Les cellules Tc2 expriment les récepteurs CRTH₂, CysLT₁, BLT-1 qui répondent aux eicosanoïdes produits par les mastocytes activés via la liaison de l'allergène sur les IgE.

Les cytokines favorisant la différenciation des cellules T CD8⁺ naïves en **cellules Tc17** *in vitro* ne sont pas encore clairement identifiées. Néanmoins, les cytokines IL-6, IL-21, IL-23 et TGF β semblent participer à leur différenciation chez l'homme et la souris. Les cellules Tc17 produisent de l'IL-17A et de l'IL-21. Chez l'homme, le facteur de transcription spécifique de cette lignée est ROR γ t, alors que chez la souris, ce sont ROR γ t, ROR α , et IRF4 qui participent au processus de différenciation des cellules Tc17 (123). Ces cellules jouent un rôle dans l'élimination des virus et des bactéries dans l'immunité anti-tumorale et dans la promotion de l'inflammation (110). En ce qui concerne l'implication des cellules Tc17 dans l'asthme allergique, peu de données sont actuellement disponibles. Li *et al.* ont montré une augmentation du pourcentage de cellules Tc17 dans le sang périphérique de patients asthmatiques comparé aux sujets sains, ainsi que dans les poumons de souris asthmatiques (124). Une autre étude a montré une augmentation du pourcentage des cellules Tc17 et Tc2 et une diminution des cellules Treg CD4⁺ dans un modèle murin d'asthme allergique. Ils ont également montré une corrélation négative entre les Treg CD4⁺ et les cellules Tc2 et Tc17 (125). L'ensemble de ces résultats suggère un potentiel rôle des cellules Tc17 dans l'asthme.

c. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ appartiennent à la population des lymphocytes non conventionnels. A la différence des lymphocytes $\alpha\beta$, ils expriment un TCR $\gamma\delta$. La diversité du TCR $\gamma\delta$ est moins importante que celle du TCR $\alpha\beta$. Les cellules T $\gamma\delta$ constituent un petit sous-ensemble de cellules qui se localisent principalement dans les tissus muqueux tels que le poumon, la peau, l'utérus et l'intestin chez la souris (126). Les études menées sur le rôle des cellules T $\gamma\delta$ dans l'inflammation allergique, incluant l'asthme, sont limitées. Une étude a démontré que les cellules T $\gamma\delta$ étaient nécessaires à l'inflammation Th2 dans un modèle murin d'asthme allergique (127). En revanche, une autre étude a montré qu'une déplétion des cellules T $\gamma\delta$, chez des souris transgéniques exprimant le TNF, entraînait une augmentation de l'HRB dans un modèle murin d'asthme allergique. Dans cette étude, les auteurs ont également montré que l'activation de ces cellules T $\gamma\delta$ était dépendante du TNF- α (128). Chez l'homme, le rôle des cellules T $\gamma\delta$ n'est pas clairement établi. Néanmoins, Glanville *et al.* ont montré une augmentation du nombre de cellules T $\gamma\delta$ dans les voies aériennes au cours d'une exacerbation de l'asthme induit par un rhinovirus chez les patients asthmatiques par rapport aux sujets sains. Le nombre de cellules T $\gamma\delta$ des voies aériennes et du sang a été associé à une obstruction accrue des voies aériennes et à l'hyperréactivité bronchique (129).

d. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B participent à la réaction allergique dans l'asthme par la synthèse des IgE spécifiques aux allergènes sous l'influence des cellules Th2. La commutation de classe ou switch isotypique est initiée grâce à la phagocytose de l'allergène par le lymphocyte B via son récepteur membranaire (BCR). Les lymphocytes B sont des cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, ils présentent l'allergène aux lymphocytes Th2 via le CMH II, ce qui entraîne l'activation du TCR et l'expression du CD40L. L'engagement des molécules de costimulation CD40, CD80/86 sur les cellules B et CD40L et CD28 sur les lymphocytes Th2 entraîne l'expression des cytokines IL-4 et IL-13 par les cellules Th2. Ces cytokines, via leurs récepteurs sur les lymphocytes B, activent l'expression d'un transcrit « stérile » (ϵ -germline transcription) qui induit une recombinaison de l'ADN par l'AID (activation-induced cytidine deaminase). Cette recombinaison aboutit à l'excision de tous les gènes des immunoglobulines sauf celui de l'IgE. Le lymphocyte B est alors uniquement capable de produire l'immunoglobuline de type E spécifique de l'allergène (130).

Les lymphocytes B sont généralement reconnus pour leur potentiel de médiation de l'immunité humorale. En effet, ils produisent différents isotypes d'anticorps et sont impliqués dans l'opsonisation et la fixation du complément. Néanmoins, ces cellules B ont un potentiel immunitaire indépendant des anticorps. En effet, elles libèrent une large variété de cytokines (telles que IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , TGF- β), et peuvent être classés en

sous-populations distinctes productrices de cytokines (131). Ainsi, les cellules B productrices d'IL-4 seraient impliquées dans l'activation des lymphocytes Th2. Par ailleurs, elles seraient également impliquées dans une boucle d'auto-activation puisque l'absence du récepteur à l'IL-4, sur les cellules B, empêcherait la production de cette cytokine par ces mêmes cellules (132). Dans un modèle d'asthme induit par l'allergène de blatte, Lindell *et al.* ont montré que les lymphocytes B contribueraient potentiellement à la chronicité de la réponse allergique en favorisant les réponses Th2, par la présentation d'antigènes (133).

e. Les cellules Natural killer-T

Les cellules Natural Killer T (NKT) et NKT-like constituent une population mineure des lymphocytes qui expriment les marqueurs des cellules T comme le TCR et ceux des cellules NK. Les cellules NKT peuvent être divisées en 3 sous-types en fonction de leur TCR (**Tableau 2**). Les cellules NKT de type I, également appelées NKT invariante (iNKT), expriment un TCR invariant ($V\alpha 14-J\alpha 18$ chez la souris et $V\alpha 24-J\alpha 18$ chez l'homme). Les cellules iNKT reconnaissent les antigènes glycolipidiques présentés par le CD1d grâce à leur TCR. Le CD1d est exprimé par de nombreuses cellules incluant les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules B. Le ligand le plus connu est un glycolipide α -galactosylceramide (α -GalCer) présenté par le CD1d. Les cellules iNKT activées produisent de grande quantité de cytokines spécifiques des réponses Th1/Th2 et/ou Th17 qui activent les DCs, les macrophages et les cellules T et B conduisant au développement de l'immunité adaptative. Étant donné que ces cytokines exercent différentes fonctions immunomodulatrices, les cellules iNKT pourraient participer à la réaction allergique en l'inhibant ou en l'exacerbant (134). Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer leur rôle dans l'asthme. Akbari *et al.* ont évalué l'hyperactivité bronchique et l'inflammation allergique pulmonaire induite par l'ovalbumine chez des souris déficientes pour les iNKT. Ils ont montré un défaut dans le développement de l'hyperréactivité et de l'inflammation chez ces souris, suggérant ainsi que les iNKT contribuent au développement de l'asthme allergique (135). De plus, Woo *et al.* suggèrent que les cellules iNKT sont nécessaires pour la génération des cellules Th2 en recrutant des DCs CD103⁺ dans le poumon via l'axe XCL1-XCR1 (136). Les cellules iNKT sont augmentées dans le lavage bronchoalvéolaire et les expectorations de patients asthmatiques sévères (137,138). D'autres études ont montré, au contraire, que le nombre de cellules iNKT était faible chez les sujets asthmatiques (139). De même, des études expérimentales chez la souris ont montré que les cellules iNKT n'étaient pas nécessaires pour le développement de l'asthme allergique (140,141). Par conséquent, l'implication des cellules iNKT dans l'asthme allergique reste controversée.

Les cellules NKT de type II, également dépendantes du CD1d pour la présentation antigénique, expriment un TCR non invariant. Elles reconnaissent des antigènes hydrophobes et des molécules aromatiques. Les cellules NKT de type II sont nettement moins étudiées,

principalement parce qu'elles ne peuvent pas reconnaître le tétramère CD1d chargé avec l' α -GalCer.

Le troisième groupe de cellules NKT correspond aux cellules NKT-like également appelées cellules T CD1d indépendantes. Ces cellules ressemblent aux cellules NKT mais elles ne sont pas dépendantes du CD1d pour la présentation antigénique. En effet, elles ont besoin des molécules du CMH de classe I ou II pour reconnaître un antigène peptidique. Ces cellules expriment également les récepteurs T α/β ainsi que les marqueurs des cellules NK tels que le CD161 et/ou le CD56. Les cellules NKT-like constituent un groupe de cellules très hétérogène pouvant exprimer les marqueurs CD4⁺, CD8⁺ ou être double négative CD4⁻ CD8⁻. En ce qui concerne les NKT-like, aucune donnée n'est disponible concernant leur rôle dans l'asthme allergique (134).

	Invariant NKT cells Type I NKT cells Classical NKT cells	Type II NKT cells Non-classical NKT cells	NKT-like cells
Antigen presentation	CD1d	CD1d	MHC
Antigen	Glycolipid	Hydrophobic & aromatic molecules	Peptide
TCR repertoire	V α 24-J α 18 V β 11	Diverse	Diverse
NK cell markers	CD161 ^{+/-} CD56 ^{+/-}	CD161 ^{+/-} CD56 ^{+/-}	CD161 and/or CD56

Tableau 2 : **Classification des cellules NKT et NKT-like.** Tiré de Rijavec *et al*, 2011. Les différentes cellules NKT sont présentées en fonction de l'expression de molécules de surface. MHC : Major Histocompatibility Complex.

IV. Apport des modèles animaux dans l'asthme allergique

La compréhension de l'asthme allergique s'est développée grâce à la mise en place de différents modèles d'étude *in vivo*. Nous nous concentrerons sur les modèles murins qui ont permis de grandes avancées, notamment grâce au développement des animaux génétiquement modifiés. Un modèle d'asthme allergique murin présente une inflammation au niveau des voies aériennes, une hyperréactivité bronchique persistante et une obstruction pulmonaire réversible, pour pouvoir mimer la pathologie humaine. Une modification structurelle des voies aériennes doit également être observée, notamment une hyperplasie/métaplasie des cellules caliciformes, un épaississement des muscles lisses et une vascularisation accrue. L'asthme étant une maladie multifactorielle complexe, il n'est donc pas évident d'obtenir un modèle d'asthme murin unique représentant toutes les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles retrouvées chez l'homme. Par ailleurs, il est important de souligner que les modèles murins comportent des avantages concernant l'étude de la compréhension de l'asthme mais possèdent également des limites (**Tableau 3**) (142,143). Les modèles murins présentent plusieurs avantages en termes de disponibilité, leur système immunitaire bien caractérisé et leur génome est entièrement

séquencé. Ces modèles offrent de nouvelles possibilités pour étudier la physiopathologie de la maladie ainsi que le développement de nouvelles thérapeutiques. Cependant, les différences vis-à-vis de l'homme limitent la compréhension du développement et de l'évolution de l'asthme. Une approche multiple, impliquant des études *in vitro* à partir de prélèvements humains par exemple, est alors nécessaire afin d'obtenir une meilleure caractérisation de la complexité de l'asthme.

	Avantages	Limites
Raisons scientifiques	<ul style="list-style-type: none"> - Période de gestion courte - Manipulation facile - Génération d'animaux transgéniques - Différentes souches disponibles - Grande variété de réactifs disponibles - Durée de vie - Economique 	
Anatomie et physiologie du poumon	<ul style="list-style-type: none"> - Subdivisé en lobe - Contient un arbre bronchique ramifié 	<ul style="list-style-type: none"> - Différence concernant la fréquence respiratoire - Circulation pulmonaire non étendue peut entraîner des différences dans l'adhésion et la migration des leucocytes
Immunologie	<ul style="list-style-type: none"> - Structure générale du système immunitaire similaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Différences concernant la régulation de l'immunité innée et adaptative
Asthme	<ul style="list-style-type: none"> - Pertinent pour le type d'asthme allergique - Réaction médiée par les IgE 	<ul style="list-style-type: none"> - Peu relevant pour les autres types d'asthme - Ne développe pas d'asthme spontanément - Développement d'une tolérance possible en réponse à l'antigène - Répartition de l'inflammation pulmonaire différente - Différence concernant certaines populations cellulaires (ex : Mastocyte)

Tableau 3 : **Les avantages et limites d'utilisation des modèles murins d'asthme par rapport à la pathologie humaine.** D'après Marqués-García et Marcos-Vadillo, 2016 et Rydell-Törmänen et Johnson, 2018. Plusieurs critères d'évaluation permettent d'évaluer la pertinence de l'utilisation des modèles murins d'asthme.

Les souris ne développent pas spontanément une inflammation allergique des voies aériennes. Ainsi, pour étudier les différents mécanismes de cette maladie, il est nécessaire d'induire une réaction artificielle mimant l'asthme. Les modèles actuels sont pour la grande majorité basés sur l'administration d'antigènes tel que l'ovalbumine (OVA) qui est présente dans le blanc d'œuf et l'allergène d'acarien (144). Le modèle d'asthme allergique le plus classique est obtenu grâce à une sensibilisation intrapéritonéale à l'ovalbumine en présence ou non d'alun suivie de provocations allergéniques par des instillations intra-nasales ou des aérosols. L'alun est un adjuvant qui permet d'intensifier la réponse immunitaire vers un profil Th2 en présence de l'allergène (145). Cependant, l'OVA est rarement impliquée dans l'asthme chez l'humain.

L'utilisation d'allergènes plus physiologiques tels que les acariens de poussière de maison, ou « House Dust Mite » (HDM) en anglais, semble plus pertinent d'un point de vue clinique. L'HDM est un des aéroallergènes les plus répandus. Entre 50 à 85% des patients asthmatiques sont allergiques à l'HDM. Les deux espèces d'acariens les plus connues sont *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae*. Les allergènes associés à ces espèces sont nommés Der p et Der f suivit d'un numéro et partagent des homologies de séquences. L'HDM est aussi responsable de rhinites, de rhinoconjonctivites et de dermatites atopiques (146). Le modèle classique d'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien est obtenu par des instillations intranasales d'HDM suivies de provocations allergéniques également administrées par voie intranasale (144). Ces deux modèles ont l'avantage d'être de courte durée avec une fonction respiratoire et des caractéristiques inflammatoires proches de celles observées chez les patients asthmatiques allergiques. Cependant, un certain nombre de paramètres observés chez l'homme sont plus difficiles à analyser dans ces modèles car l'asthme est une pathologie chronique et évolutive. Ainsi, des modèles avec une exposition plus longue ou avec des molécules adjuvantes ont été développés afin d'évaluer notamment le remodelage des voies aériennes observés dans les formes sévères de la maladie (147).

Les modèles murin d'asthme induit par HDM que nous avons utilisés dans nos études, développe une inflammation pulmonaire, une réponse humorale, une production de mucus et une hyperréactivité bronchique. Ces caractéristiques sont semblables à celles retrouvées chez les patients asthmatiques allergiques.

Chapitre 2 : La pollution atmosphérique et son effet sur la santé

La prévalence de l'asthme et des maladies allergiques dans le monde n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. On soupçonne les changements environnementaux d'être en grande partie responsables de cette tendance à la hausse. La pollution atmosphérique est considérée comme une source d'exposition majeure. Les véhicules à moteur produisent une variété de polluants atmosphériques comprenant entre autres : le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, les composés organiques volatils et semi-volatils (dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques), des particules de tailles variables ainsi que d'autres polluants. Certains hydrocarbures aromatiques polycycliques sont capables de se lier aux particules atmosphériques modifiant alors la composition de celles-ci et potentiellement leur activité. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques liés aux particules sur l'asthme allergique.

I. La Pollution particulaire

1. Définition et caractérisation des particules atmosphériques

a. Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la santé, les particules atmosphériques sont définies comme : "Les particules en suspension ou les matières particulaires sont un polluant atmosphérique consistant en un mélange complexe de substances organiques et minérales en suspension dans l'air, sous forme solide et/ou liquide". Ces particules sont de tailles, de compositions et d'origines diverses. Leurs propriétés se définissent en fonction de leur diamètre aérodynamique appelé taille particulaire. Le diamètre aérodynamique d'une particule correspond au diamètre d'une sphère de masse volumique égale à 1 g/cm^3 et dont la vitesse de chute dans l'air est égale à celle de la particule considérée. La taille de la particule est une caractéristique fondamentale qui détermine le comportement des particules dans l'atmosphère et dans l'appareil respiratoire (148).

b. Classification

La taille des particules atmosphériques peut varier de quelques nanomètres à quelques micromètres. Ce paramètre gouverne leurs propriétés de transport dans l'air ainsi que leur pénétration et dépôt dans les voies respiratoires. Ainsi, les particules ont été classées selon leur diamètre aérodynamique exprimé en micromètre (μm). La classification utilisée dans la littérature emploie l'abréviation PM pour Particulate Matter suivie d'un indice de taille :

- **Les PM₁₀** (de diamètre aérodynamique <10 µm), également appelées particules grossières. Ces dernières sont capables de pénétrer dans l'appareil respiratoire jusqu'aux voies aériennes supérieures (149).
- **Les PM_{2,5}** (de diamètre aérodynamique <2,5 µm) également nommées particules fines. Celles-ci se déposent sur l'ensemble des voies respiratoires, en particulier dans les petites voies aériennes jusqu'aux alvéoles pulmonaires (149).
- **Les PM_{0,1}** (de diamètre aérodynamique <0,1 µm) ou définies comme particules ultrafines (PUFs). Leur taille leur confère des propriétés de diffusion et de dépôt dans l'arbre bronchique nettement plus importantes. Les particules ultrafines peuvent passer dans la circulation sanguine et ainsi être transférées vers le foie, la rate, le cœur (150) ou encore le cerveau (151). Actuellement, les particules ultrafines sont classées en deux grandes catégories en fonction de leur source. Les PUFs désignent les particules générées accidentellement dans l'environnement tandis que les nanoparticules (NP) sont fabriquées par des procédés industriels bien contrôlés. Bien qu'il existe de nombreuses différences dans la composition chimique entre les PUFs et les NP, leur unique caractéristique commune est leur diamètre inférieur à 100 nm (152).

c. Sources

Les particules atmosphériques sont générées à partir de sources naturelles et anthropiques. Les sources naturelles comprennent par exemple les embruns marins, les éruptions volcaniques, les feux de forêts spontanées et l'érosion des sols (153). Quant aux sources anthropiques, elles sont principalement dues à la circulation routière (émissions de suies par les moteurs thermiques mais aussi abrasions des freins, des pneus et de la route), d'autres formes de transport et les sources industrielles comme la production d'électricité, l'exploitation minière, le soudage et la construction. La combustion (charbon, biomasse, gaz naturel, essence, diesel...) est une source majeure de particules atmosphériques (154). Dans les zones urbaines, les principales sources de particules atmosphériques sont le transport, le chauffage et le cas échéant l'industrie (155).

En fonction de leur mécanisme de formation, les particules sont de type primaire ou de type secondaire. Les particules primaires sont directement rejetées dans l'atmosphère à partir de la source comme les particules émises par les transports routiers, l'utilisation de combustibles domestiques et les activités industrielles. En ce qui concerne les particules secondaires, elles se forment dans l'atmosphère à la suite de réactions chimiques mettant en jeu des polluants gazeux (composés organiques volatils, dioxyde de soufre, les oxydes d'azote ou encore l'ammoniac) (156).

La composition chimique des particules atmosphériques est particulièrement complexe. Elle peut évoluer localement selon les sources et temporellement du fait de la chimie atmosphérique. Les principaux constituants sont des sulfates, des nitrates, des sels marins, des éléments terrigènes (Si, Fe...), ou encore des constituants carbonés (suies, composés organiques dont les composés hydrocarbures aromatiques). Les activités industrielles peuvent également être des sources de particules incluant des métaux (Fe, Mn, Zn...) (157). Enfin, les particules peuvent transporter des polluants aérobiologiques dont les allergènes de pollens ou encore des composés microbiens (156). La composition des particules atmosphériques est en lien direct avec les sources d'émissions et leur mécanisme de formation (155).

d. Réglementation

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publie régulièrement des recommandations à propos des seuils de concentration d'exposition aux polluants atmosphériques. Ces seuils sont annoncés suite aux études évaluant les effets de cette pollution sur la santé. Les valeurs données sont des seuils au-delà desquels la pollution atmosphérique est considérée comme nuisible. L'OMS recommande un niveau d'exposition annuel de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ concernant les PM_{10} et les $\text{PM}_{2,5}$ respectivement. En revanche, les directives Européennes sont différentes puisqu'elles placent les valeurs limites pour les PM_{10} à une moyenne annuelle de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et une moyenne journalière de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, qui ne doit pas dépasser plus de 35 jours dans l'année. Concernant les $\text{PM}_{2,5}$, les valeurs limites ont été placées à une moyenne annuelle de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (OMS, 2018).

En France, les valeurs limites sont basées sur les directives européennes, ainsi les mêmes valeurs limites ont été annoncées. Néanmoins, l'objectif à long terme de la France est d'atteindre une moyenne annuelle de $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} et $\text{PM}_{2,5}$ respectivement, afin d'assurer une protection pour la santé humaine et environnementale.

Actuellement, aucune valeur limite n'a encore été annoncé par l'OMS ou par les directives européennes concernant les $\text{PM}_{0,1}$. Ces dernières sont peu mesurées dans l'atmosphère et aucune concentration limites concernant un potentiel néfaste sur la santé humaine n'ont été indiquées (AIRPARIF).

e. Concentrations atmosphériques

La répartition des particules atmosphériques dans le monde est hétérogène. En effet, des variations spatiales sont observées, certains pays sont nettement plus impactés par une exposition particulière par rapport à d'autres.

Une étude a analysée l'exposition spatiale et temporelle des $PM_{2,5}$ et PM_{10} entre 2014 et 2017 dans 3 pays (158). Les auteurs ont observés une variation de la concentration de la pollution particulaire atmosphérique au cours du temps mais également entre les pays. En 2017, les concentrations quotidiennes moyennes ont variées entre 2,79 et 21,64 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ et entre 7,94 et 61,06 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} aux Etats-Unis. Les concentrations annuelles moyennes respectives étaient de 7,94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ et 19,03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} , soit en dessous des normes recommandées par l'OMS (10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivement). De plus, les auteurs ont observés une diminution constante des concentrations entre 2014 et 2017.

En revanche, les concentrations moyennes annuelles en Chine sont nettement plus importantes qu'aux Etats-Unis et dépassent les valeurs recommandées par l'OMS. En 2017, les concentrations quotidiennes moyennes ont variées entre 6,03 et 126,03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ et entre 15,07 et 211,62 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} . Les concentrations annuelles moyennes respectives étaient de 41,62 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ et 75,10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} . Une augmentation des concentrations de $PM_{2,5}$ et PM_{10} ont été constatées entre 2014 et 2015, reflétant des émissions importantes de particules atmosphériques. La mise en place d'un plan d'action pour la prévention de cette pollution a permis d'observer une diminution de la concentration de ces deux types particulaires les deux années suivantes, reflétant alors une amélioration de la qualité de l'air. Néanmoins, les concentrations moyennes annuelles de la pollution particulaire reste au-dessus des normes de l'OMS.

Comme la Chine, les concentrations moyennes annuelles en Inde sont nettement plus importantes qu'aux Etats-Unis et dépassent les concentrations recommandées par l'OMS. En effet, les concentrations moyennes annuelles en 2017 étaient de 72,13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ et de 136,31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} . En ce qui concerne les concentrations quotidiennes moyennes, elles ont variées de 25,50 à 137,86 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et de 46,82 à 250,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ et PM_{10} respectivement. Ces valeurs sont plus importantes en comparaison des Etats-Unis et de la Chine. Les auteurs ont également observés une diminution de la concentration des $PM_{2,5}$ entre 2014 et 2017 tandis qu'une augmentation des taux de PM_{10} a été constatée. Ainsi, cette étude montre bien l'existence de variations spatiales de la pollution particulaire dans le monde.

2. Les particules ultrafines

Les particules peuvent être décrites de plusieurs façons : en terme de surface par particule, en termes de nombre de particules ou de masse, ou en termes de concentration de l'une ou l'autre de ces mesures. Les mesures les plus couramment utilisées pour décrire les particules sont la concentration en nombre et la concentration en masse. Les PM_{10} et $PM_{2,5}$ sont généralement décrites en termes de distribution de masse. En revanche, les particules ultrafines (PUFs) possédant un diamètre aérodynamique inférieur à 0,1 μm ont une masse négligeable mais

contribuent au nombre total de particules dans l'atmosphère et sont ainsi généralement quantifiées par la concentration en nombre (**Figure 11**) (159). Elles sont générées accidentellement dans l'environnement, souvent en tant que sous-produits de la combustion de combustibles fossiles, de la condensation de substances semi-volatiles ou d'émissions industrielles.


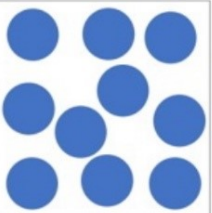
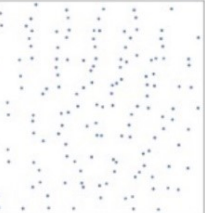
	10 µm (Coarse)	2.5 µm (Fine)	0.1 µm (Ultrafine)
			
Total mass	1	1	1
Particle number	1	64	1,000,000
Surface area per particle	1	0.0625	0.0001
Total surface area per mass	1	4	100
Organic carbon content	+	++	+++
Metal content	+++	++	+
National ambient air quality standard limit values	Annual mean : 40 µg/m³	Annual mean : 26µg/m³	No standard
	<ul style="list-style-type: none"> • Filtered in proximal airway • May irritate skin, mucosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Reaches peripheral airway • Cannot enter systemic circulation 	<ul style="list-style-type: none"> • Higher adsorbed toxic material on surface • May enter systemic circulation

Figure 11 : **Comparaison entre les PM₁₀, les PM_{2,5} et les PM_{0,1}.** Adapté de Kwon *et al*, 2020 et Li *et al*, 2016. Le diagramme suppose que toutes les particules de chaque catégorie soient des sphères parfaites, ont la même densité et sont présentes dans une quantité égale de masse. La masse, le nombre de particules et la surface des particules grossières sont arbitrairement désignés par 1. Les autres nombres sont relatifs à la particule grossière.

Les niveaux atmosphérique de PUFs en suspension dans l'air sont difficiles à mesurer à la fois géographiquement et chronologiquement puisque les concentrations diminuent fortement avec la distance des sources. De plus, leur taille et leur composition évoluent tout au long de leur vie dans l'atmosphère.

En 2008, l'Union Européenne a estimées l'émission totale des PUFs à 271 kilotonnes. Les sources d'émissions étaient : la production d'électricité (4 %), les processus industriels (5 %), les sources agricoles (8 %), la combustion industrielle (12 %), les secteurs résidentiel et commercial (15 %), le transport routier (34 %) et les autres transports et machines (22 %) (160). Les PUFs issues du milieu urbain, et notamment des gaz d'échappement des véhicules, ont généralement une composition complexe avec un cœur carboné sur lequel s'adsorbent des composés

chimiques comme des dérivés de métaux ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Figure 12).

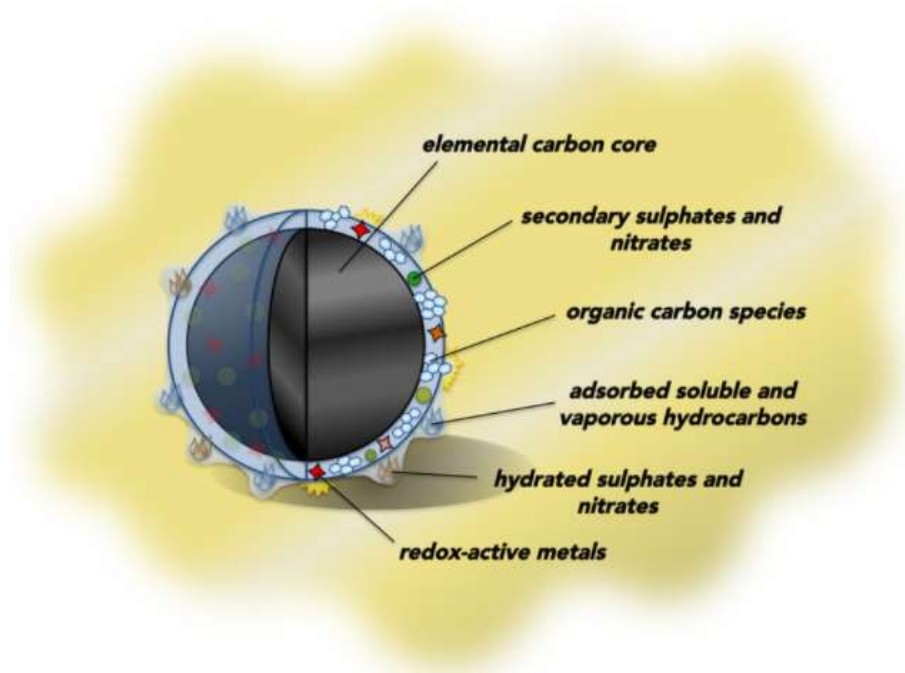


Figure 12: Schéma illustrant un exemple de la composition complexe des particules ultrafines (PUFs) d'échappement de véhicules. Tiré de Stone *et al*, 2017. Les PUFs issues de la pollution urbaine ont souvent un noyau de carbone recouvert d'une gamme diverse d'espèces chimiques, comprenant des métaux et des hydrocarbures organiques.

Les PUFs contribuent peu aux concentrations massiques des particules dans l'atmosphère, cependant, elles constituent la grande majorité du nombre de particules en suspension dans l'air (161). Les PUFs sont considérées comme plus menaçantes par rapport aux PM_{10} en raison de leur surface spécifique plus élevée (surface exposée par unité de masse). En effet, plus la taille de la particule sera petite et plus sa surface spécifique sera grande. Ainsi, une grande surface et une réactivité de surface élevée permet aux PUFs d'absorber, pour une masse donnée de particule, de plus grandes quantités de métaux nocifs et de composés organiques pouvant générer un stress oxydatif. Actuellement, aucune réglementation concernant des niveaux acceptables de PUFs dans l'atmosphère, ni aucun consensus sur une méthode normalisée permettant leur mesure n'ont été validés (159). Pourtant, des preuves de plus en plus nombreuses issues de la recherche sur la pollution atmosphérique suggèrent que ces particules ont des propriétés physicochimiques sensiblement différentes de celles des particules de plus grande taille et pourraient ainsi exercer des effets néfastes sur la santé.

L'utilisation de nanotechnologie a nécessité le développement de nanomatériaux tels que les nanoparticules manufacturées. Contrairement aux PUFs, ces particules sont intentionnellement générées à l'échelle nanométrique car elles présentent des propriétés qui offrent des avantages

technologiques. Par exemple, le carbone élémentaire (graphite) a des propriétés semi-conductrices à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules possèdent une structure tridimensionnelle et sont créées avec une taille, une forme et des caractéristiques spécifiques qui sont requises pour leur application. Il en existe diverses formes, par exemple : sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires.

Bien qu'il existe de nombreuses différences dans la composition physico-chimique des PUFs et des NP, une caractéristique commune est leur taille extrêmement petite qui leur permet d'induire de potentiels effets nocifs sur la santé (**Tableau 4**). Les nanotechnologies, en particulier la production commerciale et l'utilisation de nanomatériaux manufacturés, sont une industrie en plein essor. Elles affectent de plus en plus nos vies en raison d'une exposition potentielle due à la consommation de produits basés sur des nanotechnologies qui comprennent au moins un nanocomposant. Parmi les exemples courants de nanoparticules artificielles figurent le noir de carbone, le fullerène, l'argent, l'oxyde de zinc, l'oxyde de fer, les points quantiques, les nanotubes de carbone à paroi simple, les nanotubes de carbone à parois multiples (162). Le noir de carbone est constitué de matériel graphitique partiellement amorphe dont une fraction substantielle des particules élémentaires est de dimension nanométrique, généralement de 20 à 70 nm. Ces particules, majoritairement sphériques, sont liées en agrégats qui interagissent fortement entre eux pour former des agglomérats pouvant atteindre 500 nm. Ces derniers sont utilisés en très grands volumes depuis plusieurs décennies, principalement comme pigments et agents de renforcement dans le caoutchouc, notamment pour les pneus.

L'utilisation intensive et l'exposition environnementale et professionnelle aux nanomatériaux, notamment les nanoparticules manufacturées, ont soulevé des préoccupations importantes concernant leurs impacts sur la santé (162). En effet, dû à leur petite taille, le rapport volume/surface leur ouvre les voies sur de nombreuses applications mais peut également contribuer à leur toxicité.

Particle Type	ENM	UFP
Sources	Engineered (controlled synthesis)	Incidental (combustion)
Morphology	Regular (sphere, tube, cube, rod, wire, plate)	Irregular
Homogeneity	Yes	No
Organic Chemical Content	Low	High
Metal Impurity	Varies	High
ROS Generation	Varies	Yes
Exposure Route	Inhalation, skin, ingestion, injection	Inhalation
Adverse Health Effects	Unknown	Yes

Tableau 4 : **Comparaison des caractéristiques des nanoparticules manufacturées et des particules ultrafines.** Tiré de Li *et al*, 2016. Les nanoparticules manufacturées (ENM) et les particules ultrafines (UFP) sont décrites en fonction de leurs sources, de leur morphologie, de leur homogénéité et de leur composition.

3. Impact de la pollution particulaire sur la santé

Les particules atmosphériques sont en suspension dans l'air, par conséquent, le système respiratoire représente leur principale voie d'entrée dans l'organisme. Les muqueuses nasales et pulmonaires y sont alors fortement exposées. Ces organes sont protégés contre les grosses particules par plusieurs mécanismes de défenses situés dans différentes zones des voies respiratoires. Toutefois, les particules les plus fines peuvent échapper à ces contrôles, pénétrer plus profondément l'arbre bronchique, traverser l'épithélium et rejoindre le système sanguin. Ainsi, les risques sur la santé semblent essentiellement reliés aux maladies respiratoires et cardiovasculaires.

a. Données épidémiologiques

Les études épidémiologiques ont permis d'identifier un lien entre l'exposition à la pollution particulaire et la morbidité ainsi que la mortalité chez l'homme. En effet, l'exposition aux particules atmosphériques a été identifiée comme étant la cause de nombreux effets sur la santé engendrant une augmentation des admissions à l'hôpital, des visites aux urgences, des symptômes respiratoires ou encore une exacerbation des maladies respiratoires et cardiovasculaires chroniques (163–165).

Une étude réalisée par Janssen *et al.* a montré que les taux de PM₁₀ et de PM_{2,5} étaient associés de manière significative à toutes les causes de décès confondues mais également à des causes spécifiques comme la mortalité par défaillance respiratoire. Par exemple, une augmentation des particules de 10 µg/m³ par rapport à la veille a été associée à un risque de mortalité

supplémentaire de 0,8% toutes causes confondues pour les $PM_{2,5}$ et de 0,6% pour les PM_{10} (166). Similairement, une autre étude a rapporté qu'une augmentation des particules PM_{10} et $PM_{2,5}$ entraîne un risque accru de mortalité pour les maladies cardiovasculaires et respiratoires. Ces risques semblent plus élevés pour les $PM_{2,5}$ que pour les PM_{10} (167). En ce qui concerne les $PM_{0,1}$, il existe peu d'études relatives à la mortalité. Cependant, une étude effectuée entre 1995 et 2001 a montré une association significative entre une concentration élevée de particules ultrafines et la mortalité globale et cardio-respiratoire (168).

Les personnes souffrant d'asthme et de problèmes cardiaques sont particulièrement susceptibles à la pollution particulaire. Les particules atmosphériques ont été reliées à une augmentation du risque d'hospitalisation pour infarctus du myocarde chez les personnes âgées et à une aggravation de l'insuffisance cardiaque congestive (169–172). Par ailleurs, les PM_{10} favorisent la progression de l'athérosclérose, un processus responsable d'une grande partie des maladies cardiovasculaires (173). Cela pourrait expliquer le lien entre la pollution atmosphérique et la mortalité excessive pour cette pathologie. Une relation positive a également été montrée entre les PM_{10} et les hospitalisations pour maladies respiratoires (174). De plus, une exposition aux particules ambiantes $PM_{0,1}$ a été associée à une toux, une réduction du débit expiratoire (175) et à une augmentation de l'utilisation de médicaments (176) chez les personnes souffrant d'asthme. Les visites chez le médecin pour les maladies respiratoires ont également été associées à une augmentation du niveau des $PM_{0,1}$ (177).

Par ailleurs, les enfants semblent plus vulnérables face aux effets de la pollution atmosphérique. Ainsi, Tecer *et al.* ont constaté une recrudescence de 18% des admissions d'enfants asthmatiques avec une augmentation concomitante de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ des $PM_{2,5-10}$ (178). Si les enfants sont exposés à un niveau excessif de $PM_{2,5}$ (par exemple, $65\mu\text{g}/\text{m}^3$ pendant 24h), ils ont un risque plus élevé de présenter des symptômes respiratoires, une réduction de la fonction pulmonaire et d'utiliser des médicaments contre l'asthme. De plus, une exposition aux particules fines et ultrafines chez les femmes enceintes augmente le risque pour le nouveau-né d'avoir un faible poids à la naissance, en particulier lorsque les femmes vivent à moins de 50 mètres d'un axe routier à trafic élevé (179).

La pollution atmosphérique affecte également les fonctions métaboliques. Une étude réalisée par Zanobetti et Schwartz, a montré que les diabétiques ont plus de risque d'être admis à l'hôpital pour des problèmes cardiaques lors d'une augmentation de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ des PM_{10} que des personnes non diabétiques (180). De surcroît, une exposition aux $PM_{0,1}$ provenant du trafic routier augmente le risque d'hypertension et de diabète. Une étude a montré que ces particules affectent la tolérance au glucose chez les patients diabétiques (181).

Les effets de la pollution atmosphériques sur la santé sont largement admis grâce aux différentes études épidémiologiques et toxicologiques. Cependant, l'impact d'une exposition chronique aux particules sur l'organisme reste plus difficile à évaluer.

b. Impact sur l'appareil respiratoire

i. Description de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire peut être séparé en deux parties d'un point de vue fonctionnel. La première partie correspond à la **zone de conduction** qui forme un chemin afin de faire circuler l'air jusqu'aux sites où se déroulent les échanges gazeux. Cette partie commence au niveau de la cavité nasale et se poursuit jusqu'au début des bronchioles. La **zone respiratoire** est le lieu où l'échange gazeux se réalise, elle débute au canal alvéolaire et s'achève aux alvéoles. L'appareil respiratoire peut également se scinder en deux d'un point de vue anatomique: les voies aériennes supérieures qui comprennent les organes situés à l'extérieur du thorax (le nez, la bouche, le pharynx et le larynx) et les voies aériennes inférieures qui elles comprennent les organes à l'intérieur du thorax (la trachée, les bronches, les bronchioles, les canaux alvéolaires et les alvéoles) (182) (**Figure 11**).

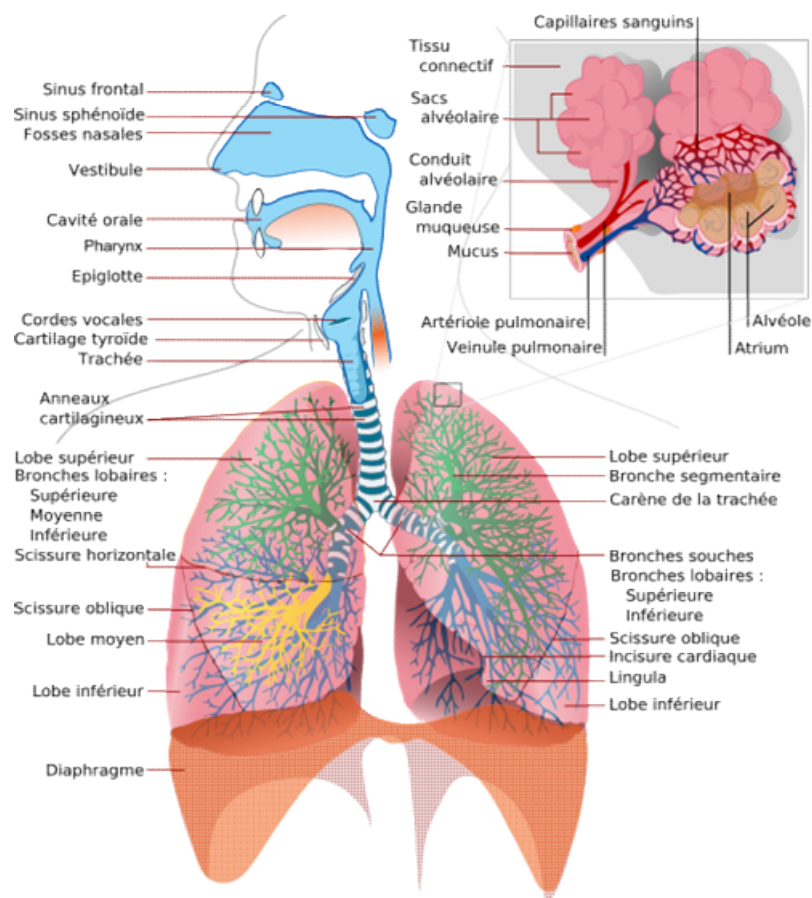


Figure 13 : **Schéma anatomique de l'appareil respiratoire.** L'appareil respiratoire se compose des voies

aériennes supérieures (le nez, la bouche, le pharynx et le larynx) et des voies aériennes inférieures (la trachée, les bronches, les bronchioles, les canaux alvéolaires et les alvéoles).

Les poumons sont deux organes similaires mais asymétriques qui sont situés dans la cavité thoracique. Chez l'homme, le poumon droit possède trois lobes tandis que le poumon gauche n'en comprend que deux. La trachée se divise en deux bronches appelées bronches primaires et dont chacune se situe dans un poumon. Ces bronches primaires se subdivisent en bronches lobaires secondaires. Ainsi, le poumon droit possède trois bronches lobaires et le poumon gauche deux. Chaque bronche lobaire se divise ensuite en plusieurs bronches segmentaires tertiaires qui à leur tour se déploient en bronchioles. Il existe 20 à 25 générations de bronchioles conductrices après les bronches segmentaires. Lorsque les bronchioles deviennent moins larges, elles deviennent des bronchioles terminales. Ces dernières se divisent encore pour former plusieurs générations de bronchioles respiratoires qui donnent naissance aux canaux alvéolaires et aux sacs alvéolaires. C'est au niveau des alvéoles que les échanges gazeux avec le sang se réalisent. Chez un adulte, les poumons sont constitués d'environ 300 millions d'alvéoles (183).

ii. Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire

Un adulte inhale en moyenne 10 000 à 20 000 litres d'air par jour. Ainsi, le système respiratoire est exposé à un grand nombre de particules présentes dans l'atmosphère. Une fraction va venir se déposer dans les différentes régions des voies respiratoires. Les principaux mécanismes de dépôt des particules sont les suivants (184) (**Figure 12**) :

- **Impaction**: les particules ont tendance à maintenir leur trajectoire existante. Elles sont dans l'incapacité de suivre un changement soudain de direction du flux de gaz au niveau des bifurcations des voies aériennes. Ainsi, elles se heurtent aux parois au niveau des bifurcations bronchiques. Ce mécanisme affecte principalement les particules de plus de 5 μm .
- **Interception**: les particules, tout en suivant le flux principal, entrent en contact avec la paroi des voies respiratoires en raison de leur forme et de leur taille. Ce mécanisme est négligeable pour les particules sphériques alors qu'il est dominant pour les particules allongées telles que les fibres.
- **Sédimentation gravitationnelle**: Sous l'action de la gravité, les particules sédimentent sur les parois des voies respiratoires. Cela se produit principalement au niveau des petites voies aériennes où la distance à parcourir par les particules avant de toucher les parois est faible. Ce mécanisme de dépôt est le plus efficace pour les particules dont la taille est comprise entre 1 et 8 μm .

- **Diffusion brownienne:** lorsque la vitesse de l'air est faible, au niveau des bronchioles et des alvéoles, les particules ont des trajectoires aléatoires. Ces mouvements sont provoqués par la collision des molécules de gaz avec la surface des particules. Ce mécanisme concerne les particules possédant un diamètre inférieur à $0,5 \mu\text{m}$.
- **Interaction électrostatique:** les particules chargées électriquement sont attirées vers les parois respiratoires. Le dépôt des particules chargées peut être plus important que les particules neutres.

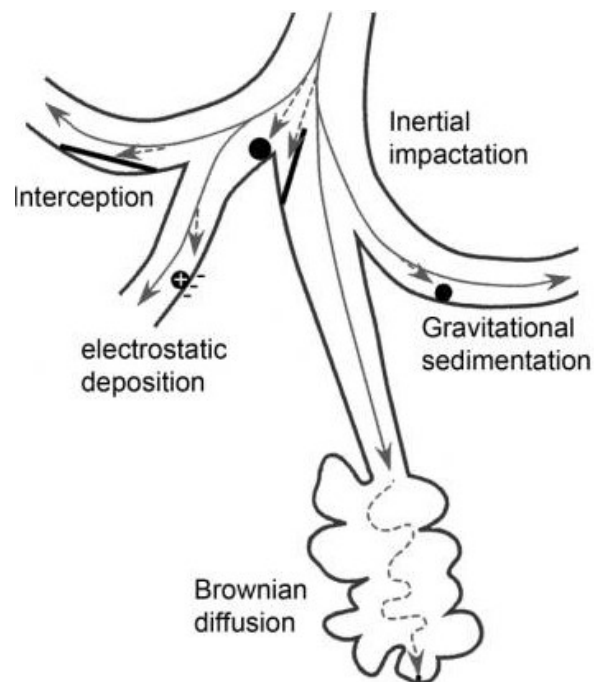


Figure 14 : **Schéma des différents mécanismes de dépôts des particules dans les voies respiratoires.** Tiré de Fröhlich et Salar-Behzadi, 2014. Les particules peuvent se déposer au niveau des voies respiratoires par différents mécanismes : l'Interception, l'impaction, la sédimentation gravitationnelle et la diffusion brownienne.

La taille des particules est probablement le principal facteur influençant à la fois le nombre de particules et la région des voies respiratoires dans laquelle elles se déposent (185). Les particules dont le diamètre aérodynamique est supérieur à $10 \mu\text{m}$ se déposent au niveau du segment nasopharyngé où elles sont ensuite évacuées grâce au système mucociliaire ou encore par déglutition. Les particules possédant un diamètre aérodynamique de $2,5$ à $10 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5-10}$) pénètrent principalement jusqu'au segment trachéo-bronchique. Elles ont un effet principalement sur les voies respiratoires supérieures. Quant aux particules fines ($\text{PM}_{2,5}$), elles sont capables de pénétrer profondément dans le poumon et d'aller se déposer au niveau des petites voies aériennes ainsi que dans les alvéoles. En ce qui concerne les particules ultrafines ($\text{PM}_{0,1}$), elles se comportent différemment dans la mesure où elles se déposent tout le long de l'appareil respiratoire, c'est-à-dire à la fois dans les régions nasopharyngées, trachéo-bronchiques et

alvéolaires (186) (**Figure 13**). D'autres paramètres influencent également le dépôt des particules, comme les caractéristiques propres des particules (la forme, la charge de surface et l'hygroscopicité) (185), l'activité physique de la personne ainsi que son âge et son sexe (187). Par ailleurs, le dépôt de particules peut être augmenté lorsque les patients présentent une obstruction pulmonaire (188).

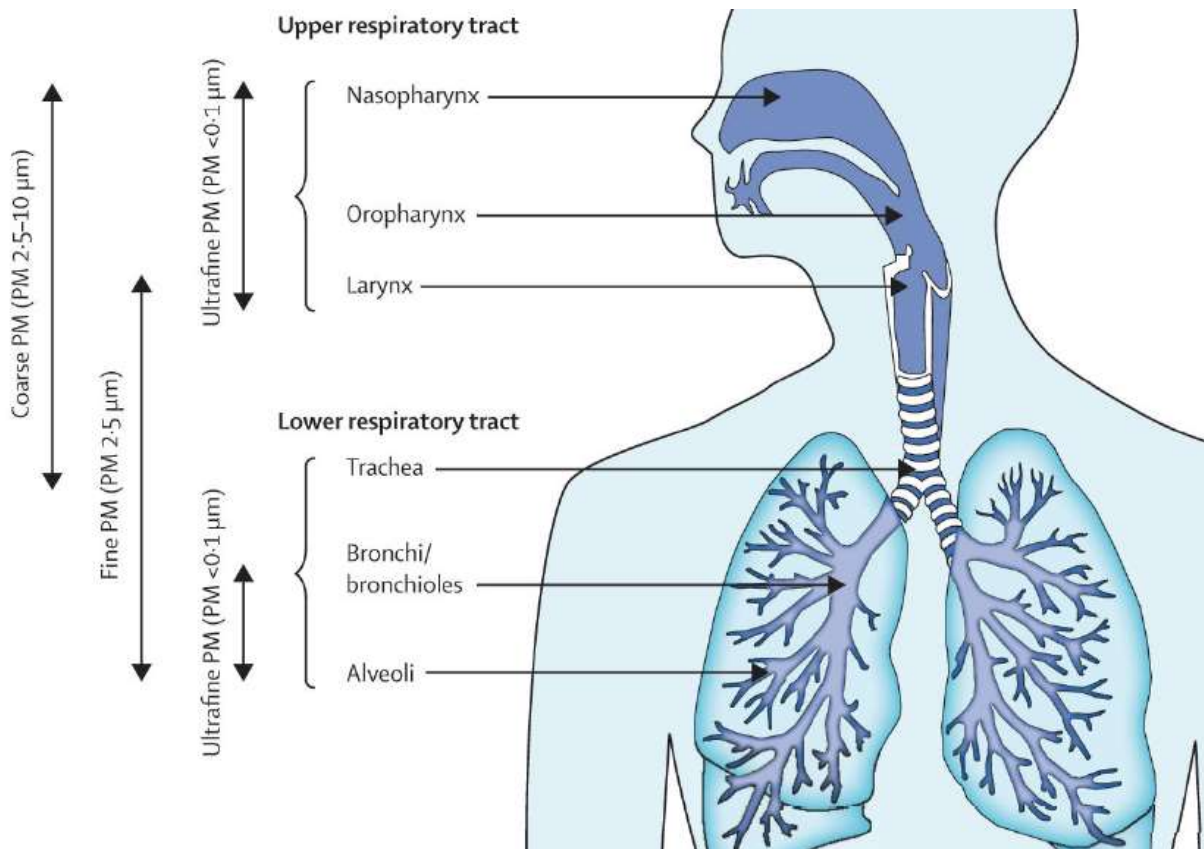


Figure 15 : **Schéma des dépôts de particules par compartiment.** Tiré de Balmes *et al*, 2014. Les particules se déposent au niveau des voies aériennes en fonction de leur taille : les PM_{10} se déposent jusqu'au segment trachéo-bronchique, les $PM_{2,5}$ se déposent au niveau des voies aériennes inférieures, les $PM_{0,1}$ se déposent sur l'ensemble de l'appareil respiratoire jusqu'aux alvéoles.

iii. Influence de la pollution particulaire sur l'asthme

Les particules inhalées sont susceptibles d'induire des dommages au niveau de l'appareil respiratoire. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques, *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées afin de comprendre leurs effets, notamment sur les pathologies respiratoires telles que l'asthme.

Plusieurs études suggèrent un rôle des polluants atmosphériques dans le développement de l'asthme chez l'enfant. En effet, il existe une association entre l'intensité du trafic routier et l'incidence de la respiration sifflante et de l'asthme chez l'enfant. Les enfants qui vivent à proximité de routes à fort trafic ont plus de risque de développer une respiration sifflante (189,190). Cependant, ces études reposent sur des mesures indirectes de la pollution atmosphériques qui prennent en compte la distance entre le domicile ou l'école et les routes à

fort trafic. De plus, dans ces études, il est difficile d'identifier une seule substance comme étant la cause de la maladie car la circulation routière est une source multiple de particules telles que les pneus, les freins et la poussière de route remise en suspension. Néanmoins, des études spécifiquement liées à la pollution particulaire ont été menées chez l'enfant. Une étude a montré une association positives entre les exacerbations de l'asthme lors des visites pédiatriques aux urgences et les $PM_{2,5}$ (191). Similairement, une exposition aux $PM_{0,1}$ a été associé une exacerbation de l'asthme chez l'enfant (192).

L'âge auquel l'individu est exposé à la pollution particulaire atmosphérique pourrait être un facteur important sur l'incidence de l'asthme. Des études publiées à ce jour suggèrent qu'une exposition aux polluants atmosphériques au cours des premières années de la vie jouerait un rôle majeur dans le développement ultérieur de l'asthme. Plusieurs études ont montré qu'une exposition à la pollution atmosphérique, comme les $PM_{2,5}$, au cours de la première année de vie pourrait contribuer au développement de l'asthme tout au long de l'enfance et de l'adolescence (193,194). De plus, une méta-analyse récente a montré des associations significatives entre les expositions au NO_2 , aux $PM_{2,5}$ et aux PM_{10} et le risque de développer un asthme pendant l'enfance et l'adolescence (195). Par ailleurs, une étude *in vivo* a démontré qu'une exposition aux particules (collectées dans la ville de Pékin) chez des jeunes souris augmente le développement de l'asthme chez l'adulte (196). Ainsi, ces données suggèrent que la pollution atmosphérique, et notamment particulaire, contribue au développement de l'asthme chez l'enfant.

La question concernant la contribution de l'exposition prénatale à la pollution atmosphérique sur le développement de l'asthme chez les enfants reste actuellement controversée. Hehua *et al.* ont analysé les études épidémiologiques publiées jusqu'à juin 2017 qui examinent l'association entre l'exposition prénatale à tous les polluants atmosphériques, à l'exception de la fumée de tabac, et l'incidence de l'asthme de la naissance à 14 ans. Des associations significativement positives entre l'exposition prénatale au NO_2 et PM_{10} et le développement de l'asthme chez l'enfant ont été observées, mais pas pour les $PM_{2,5}$ (197). Le développement de modèles animaux avec une exposition aux particules atmosphériques in utero n'apporte pas de conclusion définitive à cette question. En effet, Sharkhuu *et al.* ont montré qu'une exposition in utero aux particules de diesel (DEP) n'a eu aucun effet majeur sur la réponse inflammatoire allergique pulmonaire chez les petits des mères exposées (198). Pourtant, une autre étude *in vivo* a montré qu'une exposition aux particules urbaines chez la mère induit une augmentation de la réponse Th2 chez les petits des femelles exposées (199).

Les effets de la pollution particulaire sur l'induction de l'asthme chez l'adulte n'ont été que peu étudiés. La plupart des études chez l'adulte s'intéresse à l'impact de la pollution sur l'exacerbation d'un asthme préexistant. Des études ont trouvés une association entre une exposition à court terme aux PM_{10} et un risque d'exacerbations ou d'aggravation des symptômes (200,201).

Cependant, les études n'ont pas montré d'association significative chez les personnes âgées de 15 à 64 ans (202). Les résultats chez l'adulte sont assez contradictoires, probablement en raison de l'absence d'une bonne méthode de mesure d'exposition. De plus, pour enquêter sur le rôle des particules atmosphériques dans le développement de l'asthme chez l'adulte, il est important de prendre en compte d'autres facteurs tels que le tabagisme, l'obésité ou encore l'exposition professionnelle aux polluants.

L'exposition chronique aux particules chez les personnes asthmatiques reste actuellement peu évaluée, en particulier pour les particules ultrafines. Or, des preuves expérimentales suggèrent que les PUFs sont potentiellement plus dangereuses que les PM_{10} et les $PM_{2,5}$ en raison de leurs caractéristiques telles que leur composition chimique, leur taille, leur grande surface spécifique mais également leur capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène ainsi que leur capacité à pénétrer profondément dans le système respiratoire. La taille des PUFs leur permet d'échapper aux différents mécanismes de clairance du poumon, ce qui peut entraîner une rétention des particules à long terme (203). Kawanaka *et al.* ont montré que les PUFs contribuaient pour 23 à 30% des dépôts alvéolaires d'hydrocarbures aromatiques polycycliques provenant des sources situées en bordure de route alors que les PUFs ne représentent que 2,3% de la masse totale des particules. Cela suggère que la grande surface spécifique de ces particules inhalées permet de délivrer une quantité nettement plus importante de produits chimiques dangereux, ce qui pourrait causer une inflammation aiguë mais également chronique (204). Plusieurs études ont montré un lien entre les particules ultrafines issues de la pollution urbaine et l'asthme chez les enfants (205,206). Néanmoins, peu d'études se sont intéressées aux expositions chroniques aux PUFs dans l'asthme allergique.

II. Pollution aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

a. Généralités

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des molécules composées essentiellement d'atomes de carbone et d'hydrogène, dont la structure comprend au minimum deux cycles aromatiques condensés.

Les HAPs sont des composés organiques avec une faible solubilité dans l'eau et une faible volatilité. La solubilité aqueuse des HAPs diminue à chaque cycle aromatique supplémentaire. Néanmoins, ils sont solubles dans les composants organiques puisqu'ils sont très lipophiles (207). Ces composés sont stables mais leur biodégradabilité varie en fonction des conditions du milieu. Par ailleurs, les HAPs sont capables de s'absorber sur des matrices solides et notamment

sur les matières organiques. Une fois émis dans l'atmosphère, les HAPs ont tendance à s'accumuler dans les différents compartiments solides de l'environnement (sol, sédiment, matières en suspension) (207).

b. Sources atmosphériques

Les HAPs présents dans l'atmosphère sont majoritairement formés lors de la combustion incomplète des matières organiques. Les sources peuvent être d'origines naturelles telles que les feux de forêt et les éruptions volcaniques mais sont principalement d'origines anthropiques.

Il existe diverses sources anthropiques parmi lesquelles on distingue les émissions domestiques. Ces émissions sont associées à la combustion du fioul, de bois, de charbon et de gaz naturel mais aussi d'autres substances organiques comme le tabac (208).

Les transports sont également responsables de l'émission des HAPs dans l'atmosphère. La plupart des études montrent que les émissions de gaz d'échappement des véhicules (diesel, essence avec ou sans plomb) sont de grands contributeurs de HAPs dans les zones urbaines (209). L'abrasion des pneus, des freins et de la surface des routes constituent également une source d'émission en HAPs supplémentaire tout comme les trains, les bateaux et les avions (208).

Les industries représentent une autre source anthropique de HAPs. Les principales émissions industrielles regroupent la production d'aluminium, l'incinération des déchets, la fabrication du ciment et des pneus, les centrales électriques ainsi que les activités industrielles pétrochimiques. Les sources agricoles sont également à prendre en compte avec la combustion à ciel ouvert de la biomasse afin de préparer les sols (208).

c. Concentrations atmosphériques

Les concentrations en HAPs dans l'atmosphère sont très variables. Dans un lieu très reculé, tel que le Groenland, les concentrations peuvent être de quelques dizaines de pg/m^3 (210) tandis que dans un lieu fortement urbanisé, comme en Argentine, elles peuvent atteindre jusqu'à quelques centaines de ng/m^3 (211). Ainsi, les concentrations peuvent être différentes selon le site de prélèvement et elles sont d'autant plus importantes lorsque la source est proche.

Par ailleurs, des variations sont généralement observées dans le temps et l'espace :

- A l'échelle saisonnière : les concentrations en HAPs sont majoritairement plus importantes pendant l'hiver. Cette augmentation peut s'expliquer notamment par l'utilisation du chauffage domestique durant la période hivernale (208).

- A l'échelle journalière : les concentrations diurnes sont supérieures à celles nocturnes, cela est principalement dû à une diminution des sources la nuit (212). De plus, des pics de concentration de HAPs en matinée et en fin de journée sont observés, résultant d'une circulation automobile plus importante (213).
- A l'échelle spatiale : les concentrations en HAPs peuvent varier significativement selon la distance entre la zone source et la zone réceptrice. Les HAPs ont tendance à se trouver en plus grande concentration dans les environnements urbains que dans les environnements ruraux car la plupart des sources de HAPs sont situées dans ou à proximité des centres urbains (208).

d. Partition gaz/particules

Les HAPs présents dans l'atmosphère, existent à la fois en phase gazeuse et en phase particulaire. La distribution des HAPs entre les deux phases est dépendante de leurs caractéristiques physico-chimiques, du type de particules sur lesquels ils sont adsorbés mais également des conditions environnementales.

Les HAPs les plus légers sont majoritairement présents dans l'atmosphère sous forme gazeuse alors que les plus lourds sont davantage associés à la phase particulaire. Ainsi, les composés possédant deux cycles aromatiques, comme le naphthalène, sont présents en phase gazeuse tandis que les composés possédant 5 à 6 cycles aromatiques, tels que le Benzo(a)pyrène (B(a)P), sont présents en phase particulaire. Les composés constitués de 3 à 5 cycles se répartissent entre les deux phases (208). La température ambiante influence également la partition gaz/particule des HAPs. En effet, ils seront préférentiellement en phase particulaire à faible température et inversement (214).

Dans l'atmosphère, les HAPs sont préférentiellement associés aux particules inhalables dont le diamètre est inférieur à 2,5 μm . Diverses études granulométriques ont montré que les HAPs les plus légers sont préférentiellement adsorbés sur les particules les plus grosses, alors que les plus lourds sont essentiellement associés aux particules fines et ultrafines (215,216). Ces différences peuvent s'expliquer par un processus de volatilisation et de réadsorption. Les HAPs légers, et donc plus volatils, émis à l'état gazeux peuvent s'associer à l'ensemble des particules, se volatiliser, puis se réadsorber sur d'autres particules. Alors que les HAPs les plus lourds (moins volatils) s'adsorbent essentiellement sur les particules fines et ultrafines avec lesquelles ils ont été émis (216).

La distribution des HAPs particulaires dans l'atmosphère est étroitement liée au transport atmosphérique des particules. Les HAPs associés aux grandes particules se déposent rapidement près de la source tandis que les HAPs associés aux particules plus fines peuvent être

transportés plusieurs jours et sur de longues distances (217). De surcroît, la répartition des HAPs particulaires dans les différentes parties des voies respiratoires ainsi que leur potentiel impact sont fortement liés à la taille des particules (204).

e. Métabolisme des HAPs

Les HAPs sont généralement des composés lipophiles qui peuvent facilement traverser les membranes cellulaires par diffusion passive. La cellule déclenche alors une succession d'activités enzymatiques afin de rendre ces composés plus hydrophiles et de faciliter leur élimination. A leur entrée dans la cellule, les HAPs sont considérés comme des molécules pro-carcinogènes car ils n'induisent pas directement de dommages à l'ADN. Ce sont les métabolites formés après leur métabolisation qui pourraient réagir avec l'ADN (218). La détoxification des HAPs fait intervenir des enzymes métaboliques, telles que le CYP1A1 appartenant à la famille des cytochromes P450. Ce dernier constitue un gène cible de la voie de signalisation AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). Par ailleurs, certains HAPs carcinogènes tels que le B(a)P sont des ligands de l'AhR (219).

La voie de signalisation génomique de l'AhR est actuellement très bien décrite. En absence de ligand, l'AhR est présent dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe inactif composé de plusieurs protéines chaperonnes incluant HSP90 (Heat shock protein 90), p23 ainsi que la protéine AIP (AhR-interacting protein). La liaison entre le ligand et l'AhR induit un changement de conformation du récepteur. Le complexe formé du ligand, de l'AhR, et des protéines HSP90 et p23 est alors transloqué dans le noyau. Les protéines chaperonnes se dissocient et l'AhR/ligand se lie à sa protéine partenaire ARNT (AhR Nuclear Translocator). L'hétérodimère AhR lié au ligand/ARNT se fixe sur des séquences d'ADN spécifiques appelées Dioxin Responsive Elements (DRE) situées en amont des gènes cibles. Ces derniers incluent CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, et l'AhR repressor (AhRR). La voie de signalisation AhR peut être régulée à 3 niveaux : la dégradation protéasomique de l'AhR, le métabolisme des ligands par CYP1A1 et la perturbation du complexe AhR/ARNT par l'AhRR (**Figure 16**) (220). Certains gènes, tels que le CYP1A1, sont impliqués dans l'élimination des xénobiotiques. Cette protéine métabolise certains HAPs et notamment le B(a)P. Les métabolites formés sont majoritairement éliminés par voie urinaire et par les fèces. Néanmoins, certains d'entre eux peuvent se lier à l'ADN de manière covalente (adduits à l'ADN) et ainsi induire un effet génotoxique. Denissenko *et al.* ont montré que le B(a)P se liait au gène suppresseur p53 au niveau des cellules épithéliales bronchiques et pouvait induire des mutations qui ont été liées au cancer du poumon chez l'homme (221).

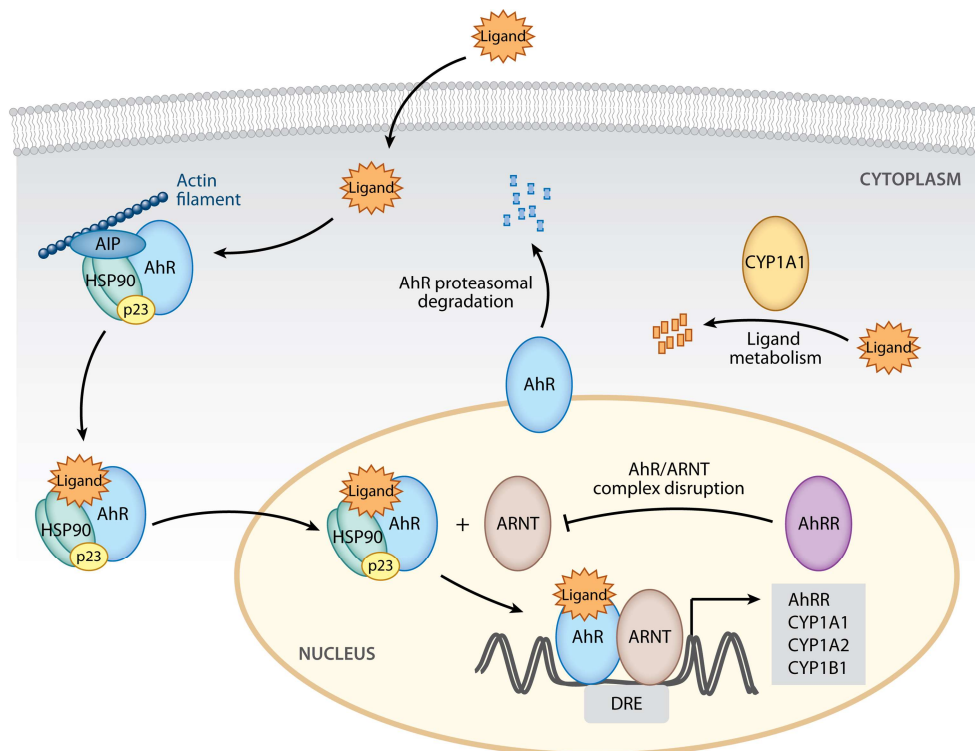


Figure 16 : **Voie de signalisation génomique de l’AhR.** Tiré de Stockinger *et al*, 2014. Lorsqu’un ligand traverse la membrane plasmique, il se lie à l’aryl hydrocarbon receptor (AhR). Cela permet la translocation du complexe ligand-récepteur dans le noyau et la dissociation du complexe récepteur comprenant l’heat shock protein 90 (HSP90), l’AhR-interacting protein (AIP) et la p23. Dans le noyau, l’AhR s’hétérodimérise avec son partenaire AhR Nuclear Translocator (ARNT). L’hétérodimère se fixe à des séquences d’ADN spécifiques situées dans les régions promotrices des gènes cibles appelées Dioxin Responsive Elements (DRE). AhR-ARNT induit la transcription des gènes cibles tels que les cytochromes P450 (CYP)1A1, CYP1A2, CYP1B1, et l’AhR repressor (AhRR).

Il est important de souligner la présence de multiples voies non génomiques concernant l’AhR. En effet, la tyrosine kinase c-Src participe au complexe cytosolique de l’AhR, et sa libération du complexe pourrait entraîner l’activation de la Focal Adhesion Kinase (FAK) impliquée dans l’adhésion cellulaire. L’activation de la protéine c-Src pourrait aussi s’accompagner de l’activation de MAP kinase. Ces processus peuvent converger afin de réguler des processus physiopathologiques tels que l’inflammation. En effet, un afflux de calcium provoque l’activation de la protéine kinase C qui phosphoryle une enzyme cytosolique, la phospholipase A2, avec la production d’acide arachidonique. L’activation en parallèle des MAP kinases par la protéine c-Src conduit à la transcription de la cyclo-oxygénase 2 qui utilise l’acide arachidonique pour produire des prostaglandines entraînant une inflammation. De plus, l’AhR interagit avec Wnt/ β -caténine, ER-alpha ou NF-kB et module leurs actions. Cependant, ces facteurs de transcription ont également un impact sur la voie signalisation de l’AhR, puisque par exemple, la β -caténine est maintenant décrite comme un coactivateur de ce récepteur (222). Enfin, l’AhR posséderait une activité ubiquitine ligase en se liant aux enzymes d’activation de l’ubiquitine E1 et de conjugaison de l’ubiquitine E2. Ce complexe ciblerait, par exemple, les récepteurs à l’oestrogène pour une

dégradation protéasomique. Cependant, la pertinence de cette voie sur la réponse immunitaire est encore inconnue (223). Il est concevable que les multiples voies génomiques et non génomiques de l'Ahr convergent vers la détoxification, l'homéostasie des composés liposolubles et le contrôle de la prolifération cellulaire.

2. Impact des HAPs sur la santé

L'exposition aux HAPs se produit lors de l'inhalation de l'air, l'ingestion d'aliments mais également par voie cutanée. Leur impact sur la santé humaine dépend principalement de la durée, de la voie d'exposition, de la quantité ou de la concentration des HAPs auxquels nous sommes exposés, ainsi que de leur toxicité. Divers autres facteurs peuvent également moduler les effets sur la santé, notamment l'état de santé préexistant et l'âge.

a. Données épidémiologiques

Les différentes études ont permis de mettre en évidence un lien entre une exposition aux HAPs et des effets néfastes sur la santé. Cependant, la toxicité des HAPs varie fortement entre les différents composés. Elle peut être aiguë, faible ou modérée selon le composé. Les risques toxiques associés aux HAPs sont généralement liés à une exposition chronique car les concentrations retrouvées dans l'environnement sont relativement faibles. Les risques les plus importants sur la santé humaine sont liés à des effets mutagènes et cancérigènes.

Parmi les différents HAPs identifiés à ce jour, 16 d'entre eux ont été déclarés comme des polluants prioritaires par l'US-EPA (Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis) et l'EEA (l'Agence de l'Environnement Européenne) en raison de leur stabilité dans l'environnement et de leur toxicité.

En effet, certains composés ont été classés comme cancérigènes probables ou possibles pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (224). Parmi les différents HAPs, la toxicité du B(a)P est la mieux évaluée, sa capacité à induire un cancer du poumon a été reconnue. Ce dernier a donc été classé comme cancérigène avéré pour l'homme par le CIRC.

b. Impact des HAPs sur l'asthme allergique

Les différentes études menées sur les HAPs ont permis d'évaluer leur rôle sur les maladies allergiques et sur l'appareil respiratoire. Ainsi, plusieurs études ont montré qu'ils ont des effets néfastes sur la santé respiratoire chez les enfants. Une exposition prénatale aux HAPs suivie

d'une exposition postnatale à la fumée de tabac (comprenant entre autres des HAPs) a été associée à une augmentation de la toux et à une respiration sifflante à l'âge de 12 mois ainsi qu'à des problèmes respiratoires et à un asthme à l'âge de 24 mois (225). Des études ont également lié la présence de HAPs à des effets indésirables sur une pathologie respiratoire telle que l'asthme. Une exposition aux HAPs a été associée à une augmentation de la respiration sifflante dans une cohorte d'enfants asthmatiques (226). Une autre étude a également montré que les taux du biomarqueur urinaire des HAPs, 1-OHP (1-hydroxypyrene) étaient liés à ceux de marqueurs de stress oxydatif mais également à ceux des IgE chez les enfants. De plus, les niveaux d'1-OHP urinaire étaient associés de manière significative à l'asthme. Cette étude a estimé que 35% des effets dus à une exposition aux HAPs étaient médiés par le stress oxydatif (227). Similairement, Han *et al.* ont montré une corrélation entre les métabolites des HAPs dosés dans les urines et une réduction du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) chez les enfants asthmatiques présentant une insuffisance pour la vitamine D (228).

Dans l'atmosphère, les HAPs peuvent être adsorbés par les particules en suspension. Or, l'exacerbation des maladies respiratoires a été associée à la pollution particulaire PM_{2,5} et PM₁₀. Les matières particulaires sont généralement rejetées dans l'air à partir de sources telles que la combustion du charbon et du bois, des gaz d'échappement des véhicules mais également de divers procédés industriels. Ces émissions comprennent des particules de carbone associées à des HAPs (229). Ces derniers font partis des composés les plus importants trouvés sur les PM_{2,5}. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les particules sont capables de pénétrer dans le poumon en fonction de leur taille. Par conséquent, les HAPs pourraient être transportés plus loin dans l'appareil respiratoire et ainsi induire des dommages plus importants. Une implication des particules diesel (DEP), comprenant de nombreux HAPs adsorbés à leur surface, a été montrée sur l'exacerbation de maladies respiratoires allergiques comme l'asthme. En effet, des études *in vitro* montrent que les particules diesel (DEP) peuvent cibler plusieurs types cellulaires et peuvent potentiellement agir à plusieurs étapes de la réponse immune. Ainsi, des cellules B humaines mises en culture avec de l'IL-4 et un anti-CD40 en présence de DEP montrent une augmentation de la production d'IgE (230). De plus, les cellules mononuclées du sang périphérique de sujet allergique co-cultivées avec les DEP et l'allergène montrent une augmentation de la production d'IL-8, de RANTES et de TNF- α (231). Les études avec les cellules épithéliales bronchiques (BEC) montrent qu'elles sont affectées par une exposition aux DEP, en particulier chez les personnes asthmatiques. En effet, les cellules épithéliales bronchiques de patients asthmatiques mis en culture libèrent de façon constitutive de plus grandes quantités d'IL-8, GM-CSF, RANTES et d'ICAM-1 par rapport aux cellules de sujets non asthmatiques. L'exposition à de faibles concentrations de DEP (10 $\mu\text{g/ml}$) augmente de manière significative la libération de ces cytokines par les BEC de sujets asthmatiques, tandis que des concentrations plus élevées de DEP (50-100 $\mu\text{g/ml}$) sont nécessaires pour provoquer une augmentation significative d'IL-8 et de GM-CSF pour les BEC de sujets non asthmatiques (232).

Un certain nombre d'études ont évalué l'impact du DEP *in vivo* dans des modèles murins d'asthme allergique aux acariens. Ainsi, chez les jeunes souris comme chez les souris adultes, la co-exposition au DEP avec l'HDM augmente la sensibilisation allergique ainsi que les IgE spécifiques à l'HDM, l'inflammation pulmonaire, l'hyperréactivité des voies aériennes, la métaplasie des cellules caliciformes, les cytokines Th2 et Th17 caractéristiques d'un asthme plus sévère (233). Cette aggravation liée à la co-exposition au DEP et à l'allergène est inhibée par l'anti-IL-17 neutralisant, démontrant l'implication de cette cytokine dans les effets du DEP (234). D'autres auteurs ont également montré que lors d'une exposition avec un allergène d'acarien, les particules diesel agissent comme un adjuvant en augmentant la réponse humorale IgE et les cytokines Th2 au niveau pulmonaire (235). De plus, la co-exposition du DEP avec l'HDM entraîne la persistance de cellules effectrices/mémoires Th2/Th17 dans les poumons, la rate et les ganglions lymphatiques des souris adultes et nouveau-nées. Une réexposition à l'HDM induit une hyperréactivité des voies respiratoires et une augmentation des cytokines Th2 chez les souris préalablement co-exposées à l'HDM et au DEP. Ces résultats suggèrent que l'exposition au DEP entraîne une accumulation de cellules mémoires Th2/Th17 spécifiques de l'allergène potentialisant les réponses secondaires et favorisant le développement de l'asthme allergique (236).

Les PM_{2.5} et les PUFs sont généralement composées de noyaux de carbone associés à divers composés organiques, métaux, ions et matériaux biologiques. Parmi ces composants, les HAPs tels que le B(a)P, sont présents à la surface de ces particules. En effet, le B(a)P est capable de se lier aux particules et notamment celles composées de carbone. Des modèles animaux ont été développés afin de mieux comprendre l'impact des HAPs sur l'appareil respiratoire et l'allergie. Ainsi, Wang et al. ont montré qu'une co-exposition au B(a)P avec l'allergène majeur d'acarien Der f 1 mène à une augmentation de l'hyperréactivité bronchique et de l'inflammation pulmonaire par rapport à l'allergène seul. De surcroît, le B(a)P augmente le stress oxydatif induit par Der f 1 (237). Similairement, une étude a montré que l'administration d'une faible dose de B(a)P avec de l'OVA augmente l'inflammation allergique des voies respiratoires en favorisant une réponse Th2 (238). Ces données suggèrent un potentiel impact des particules composées de HAPs, notamment le B(a)P, sur les maladies respiratoires allergiques. Actuellement peu d'études ont été réalisées afin d'évaluer la combinaison des particules de carbone en présence du B(a)P sur ces pathologies respiratoires comme l'asthme.

Les HAPs sont également connus pour leur capacité à activer la voie de signalisation AhR impliquée dans la détoxification des xénobiotiques. Ce récepteur AhR est exprimé par un grand nombre de cellules immunes, notamment les macrophages, les cellules dendritiques, certaines populations lymphocytaires mais également par les cellules épithéliales bronchiques. Comme vu dans le chapitre I.III.1, les cellules épithéliales des voies respiratoires sont capables de moduler

l'inflammation allergique par la production d'alarmines telles que l'IL-33, l'IL-25 et TSLP. Ces dernières activent les lymphocytes Th2 et les ILC2 médiatrices de l'inflammation Th2 dans le tissu pulmonaire. Plusieurs études ont montré une production de TSLP et d'IL-33 par des lignées cellulaires épithéliales exposées au B(a)P avec un allergène d'acarien, et cela de manière dépendante de la voie de signalisation AhR (237,239). En effet, l'AhR est capable de se lier aux promoteurs des alarmines et d'activer leur transcription (240). L'asthme se caractérise également par une hypersécrétion de mucus localisée dans les voies respiratoires. Cette production passe par les cellules sécrétrices de mucus située dans l'épithélium bronchique. Wong *et al.* ont montré une augmentation de l'expression de la mucine Muc5ac, via la voie de signalisation AhR, en réponse à une exposition aux particules urbaines sur une lignée cellulaire épithéliale humaine (241). Cependant, dans un modèle murin, une exposition aux particules issues de l'environnement en l'absence d'allergène n'entraîne pas l'expression ni la production de Muc5ac. Néanmoins, la présence de ces particules chez les souris sensibilisées à l'HDM induit une augmentation de la production de mucus par rapport aux souris sensibilisées à l'HDM seul (242). De plus, Wang *et al.* ont montré une hyperplasie des cellules caliciformes, productrices de mucus, lors d'une exposition au B(a)P dans un modèle murin sensibilisé à Der f (237). Ainsi, l'ensemble de ces études suggèrent une potentielle implication de l'épithélium pulmonaire dans l'exacerbation de l'asthme Th2 lors d'une exposition au B(a)P.

Les cellules dendritiques (DC) et les macrophages, cellules présentatrices d'antigènes, jouent un rôle majeur dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives. Une étude a montré une modification des DC en réponse à une exposition aux particules collectées de l'environnement. En effet, Castañeda *et al.* ont observé une augmentation de la maturation et de la capacité de présentation des DCs *in vitro*, lors d'un traitement aux particules avec de l'OVA, et cela de manière dépendante de l'AhR (243). De plus, l'administration d'un HAP, l'indéno[1,2,3-cd]pyrène, augmente l'inflammation allergique induite par un allergène dans un modèle murin. Cette augmentation s'est révélée dépendante de l'activation d'AhR (244). Concernant les macrophages, une étude *in vitro* a montré une augmentation de la polarisation Th2 et Th17 en réponse à une co-exposition au PUFs avec l'OVA. Cette réponse est dépendante de la voie de signalisation AhR/Jag1 (245). Plusieurs études *in vivo* dans des modèles aigus d'asthme montrent que la coexposition aux polluants entraîne, via la voie AhR, une augmentation de l'inflammation principalement liée aux éosinophiles accompagnée d'une augmentation de l'hyperréactivité bronchique (237,242,245) Cependant, aucune étude ne s'est intéressée au rôle de l'AhR en exposition chronique aux polluants dans un modèle d'asthme. Ainsi, ces données suggèrent que les HAPs et les particules atmosphériques contenant potentiellement des HAPs seraient capables d'activer la voie de signalisation AhR. Celle-ci pourrait être impliquée dans l'exacerbation de l'asthme observée dans ces différentes études.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La pollution atmosphérique constitue un problème majeur pour la santé publique à cause de la diminution de la qualité de l'air qu'elle entraîne. Elle est soupçonnée de participer à l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques, notamment l'asthme, ces dernières décennies. La progression continue de l'urbanisation favorise l'exposition aux polluants atmosphériques. Ceux-ci, directement rejetés dans l'atmosphère, sont en grande partie liés à l'activité humaine avec le trafic routier et l'industrie. Ils comprennent des gaz comme les oxydes d'azote et le monoxyde d'azote, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des particules de tailles variables ainsi que d'autres polluants.

Les particules atmosphériques peuvent être classées selon leur diamètre aérodynamique en PM_{10} ($\leq 10\mu m$), $PM_{2,5}$ ($\leq 2,5\mu m$) et $PM_{0,1}$ ($\leq 0,1\mu m$). Parmi ces composés, les $PM_{0,1}$, également appelées particules ultrafines sont potentiellement les plus dangereuses en raison de leur petite taille, de leur grande surface spécifique et de leurs dépôts dans les voies respiratoires, en particulier dans les petites voies aériennes et les alvéoles. Par ailleurs, une étude a démontré que les particules ultrafines contribuaient aux dépôts alvéolaires de HAPs provenant de sources situées au bord des routes. Or, certains HAPs, tels que le benzo(a)pyrène, sont connus pour être nocifs pour la santé et notamment pour l'appareil respiratoire. Une étude a montré qu'une co-exposition au benzo(a)pyrène avec un allergène d'acarien mène à une augmentation de l'inflammation et de l'hyperréactivité bronchique par rapport à l'allergène seul. Les mécanismes impliqués dans les pathologies respiratoires restent peu élucidés, en particulier lors d'une exposition aux particules ultrafines couplées au B(a)P sur la réponse inflammatoire. Ainsi, durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées aux effets combinés d'une exposition au B(a)P avec des particules de carbone sur la réponse inflammatoire dans l'asthme allergique. En effet, nous avons souhaité avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la vulnérabilité des maladies respiratoires allergiques induite par la pollution particulaire atmosphérique. Pour cela, nous avons utilisé un modèle simplifié de particules issues d'un processus industriel et possédant un diamètre inférieur à $0,1\mu m$. La composition, la taille et la solubilité des particules sont homogènes par comparaison aux particules ultrafines collectées dans l'environnement. Par conséquent, nous utiliserons le terme « nanoparticules » pour la suite de la thèse.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons développé un modèle murin d'asthme allergique induit par l'allergène d'acarien, *Dermatophagoïdes pteronyssinus*. Notre étude a porté sur les effets d'une exposition chronique aux nanoparticules de carbone couplées au benzo(a)pyrène en présence de l'allergène sur la réponse inflammatoire dans l'asthme. Nous nous sommes posé plusieurs questions : Les nanoparticules sont-elles prises en charge par les cellules immunitaires ? Ont-elles un impact sur la fonction respiratoire et/ou l'inflammation pulmonaire dans un modèle d'asthme allergique ? Quelles sont les cellules inflammatoires impliquées au niveau pulmonaire après une co-exposition aux nanoparticules avec l'allergène ?

Le benzo(a)pyrène sur les nanoparticules modifie-t-il la composition du recrutement cellulaire dans le poumon ?

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons développé un modèle murin d'asthme allergique avec de faibles doses de l'allergène d'acarien, *Dermatophagoïdes farinae*. L'objectif de ce modèle est d'évaluer le potentiel effet adjuvant des nanoparticules couplées au B(a)P sur la réaction inflammatoire allergique de type Th2. Ainsi, nous avons développé un modèle murin d'asthme allergique avec des doses faibles (sub-optimales) d'allergène afin de pouvoir visualiser une potentielle augmentation de l'inflammation par les nanoparticules. Nous nous sommes demandés si la présence de nanoparticules pourrait modifier la réponse inflammatoire même lors d'une exposition à de faibles quantités d'allergène ? Si elles étaient capables d'avoir un effet adjuvant lors d'une co-exposition à l'allergène sur le recrutement cellulaire et la polarisation des cellules Th2 ? Si le benzo(a)pyrène lié aux nanoparticules avait un effet sur les paramètres de l'asthme ?

RESULTATS

Partie 1 : Impact d'une exposition chronique aux nanoparticules couplées au benzo(a)pyrène sur la réponse inflammatoire dans un modèle murin d'asthme aux acariens

Ce travail a fait l'objet d'une lettre à l'éditeur soumise le 28/05/2020 (soumission n°ALL-2020-00679 et reviewing favorable le 03/07/2020), intitulé "Chronic exposure to benzo(a)pyrene coupled nanoparticles worsens inflammation in a mite-induced asthma mouse model".

Actuellement, il existe peu de données concernant les effets d'une exposition chronique aux PUFs atmosphériques sur la santé respiratoire. Dans cette étude, nous avons voulu explorer leurs effets lors d'une exposition chronique dans un modèle expérimental d'asthme à l'acarien *Dermatophagoïdes pteronyssinus*. Pour cela nous avons utilisé un modèle simplifié de particules comprenant des nanoparticules (NP) de carbones couplées ou non au benzo(a)pyrène.

1. Matériels et Méthodes

Animaux et modèle d'asthme allergique

Des souris femelles C57BL/6 J âgées de 6 semaines ont été obtenues des Laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Cette étude a été approuvée par le comité local d'investigation (N° APAFIS#7874-2016070417344442v3) selon les directives gouvernementales N°86/609/CEE et la directive européenne 2010/63/UE. Les souris ont été hébergées dans un établissement accrédité de l'Institut Pasteur de Lille dans des conditions standards et exemptes de pathogènes.

Revêtement des particules de noir de carbone

Les nanoparticules de carbone (13 nm de diamètre) ont été fournies par le Dr Sophie Lanone de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale et ont été caractérisées précédemment par Belade *et al.* (246) (Tableau 1). Une collaboration a été réalisée avec l'équipe du Dr Nicolas Visez du laboratoire de physico-chimie de l'atmosphère (PC2A) de l'université des sciences et Technologies de Lille afin de coupler une partie de ces nanoparticules avec du B(a)P. Une solution de B(a)P (Sigma-Aldrich, Lyon, France) à une concentration de 5,55 mg/ml a été préparée avec le solvant dichlorométhane (Sigma Aldrich). Une masse de 1 g de nanoparticules de carbone a été mélangée à 10 ml de cette solution. Le solvant a été complètement évaporé à température ambiante dans un évaporateur rotatif (environ 3 heures). Après récupération des nanoparticules couplées, un contrôle de la quantité de B(a)P restant sur les parois du ballon de l'évaporateur rotatif a été effectué par analyse GC-MS (GC Perkin Elmer 680, MS Perkin Elmer

600C). Le B(a)P non présent sur les parois est supposé recouvrir les nanoparticules. En effet, l'analyse directe du B(a)P adsorbé sur les nanoparticules est rendue difficile par son extraction non totale sur ce support. La concentration finale de B(a)P était de 55,5 mg/g de nanoparticules. Les nanoparticules ont été stockées dans un flacon brun à -20°C.

Données du fournisseur			Données issues de la caractérisation physico-chimique	
Taille des particules (nm)	Forme	Pureté (%)	Aire de la surface spécifique (m ² /g)	Granulométrie (nm)
13	Ronde	99	373.1 ± 10.5	1033.4 ± 88.1 ^a

Tableau 1 : **Caractérisation physico-chimique des nanoparticules.** Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM. ^a mesurée dans le tampon physiologique.

Protocole expérimental

Après une anesthésie gazeuse à l'isoflurane, les souris ont été sensibilisées par voie intra-nasale avec 25 µg de Der p (*Dermatophagoides pteronyssinus*) (Stallergenes Greer, Boston, USA) pendant 3 jours consécutifs avec ou sans 18 µg de nanoparticules seules (NP-Ø) ou couplées au B(a)P (NP-B(a)P). Cette dose correspond à 1 µg de B(a)P. Douze jours après, des provocations ont été effectuées par voie intra-nasale dans les mêmes conditions 3 jours par semaine pendant 4 semaines (Figure 1A).

Les souris ont été euthanasiées 24 heures après la dernière intra-nasale par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (Euthasol Vet.[®], Laboratoires TVM, France). Le LBA, le sérum et les tissus pulmonaires ont été prélevés pour les analyses. L'activité du B(a)P sur les nanoparticules a été confirmée par l'expression du gène cible *Cyp1a1* dans les tissus pulmonaires (Figure 1B).

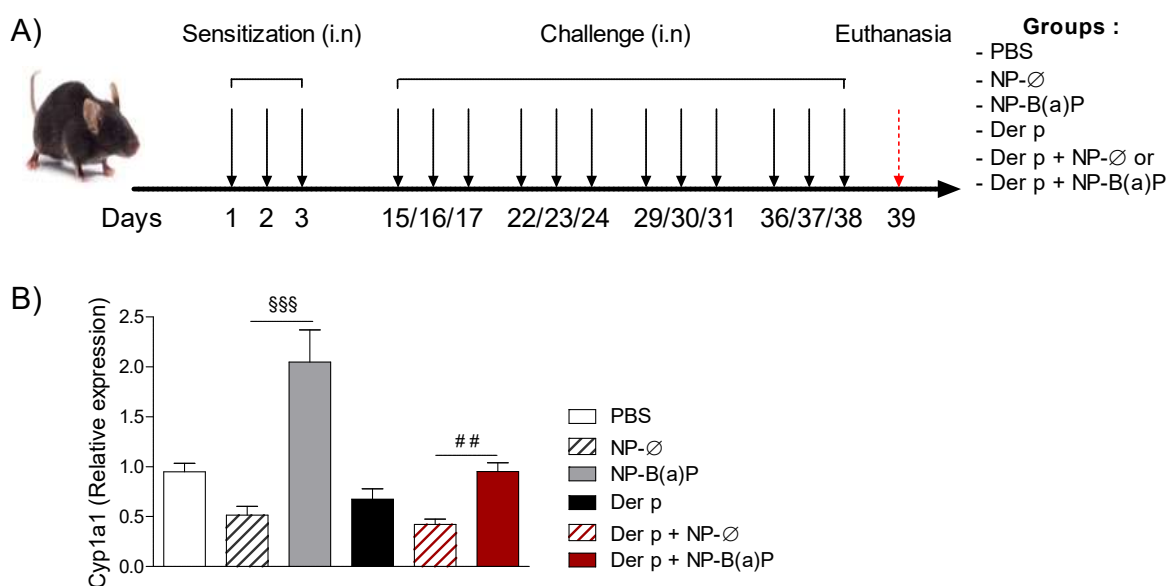


Figure 1 : **Modèle murin expérimental d'asthme et activité du B(a)P.** (A) Modèle expérimental d'exposition chronique aux nanoparticules de carbones couplées au B(a)P dans l'asthme allergique chez la souris. (B)

L'expression relative de l'ARNm de *Cyp1a1* dans les tissus pulmonaires a été mesurée par qRT-PCR. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=10-21 souris par groupe) ; §§§ p<0,001 entre NP-Ø et NP-B(a)P et ## p<0,01 entre Der p + NP-Ø et Der p + NP-B(a)P).

Mesure des anticorps sériques

Les taux d'IgE et d'IgG1 spécifiques de Der p ont été déterminés par un test immuno-enzymatique (ELISA) en utilisant 100 µg/ml de Der p (Stallergenes Greer) adsorbé dans des puits. Après incubation avec le sérum dilué, les anticorps IgE et IgG1 spécifiques ont été détectés par des anti-IgE (Gentaure) ou anti-IgG1 (ThermoFisher scientifique) biotinylés. La liaison de la Streptavidin-HRP (Horse Radish Peroxidase) a été révélée par la solution de substrat TMB (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) et la valeur de la DO à 450 nm a été déterminée.

Composition du lavage broncho-alvéolaire

Un volume total de 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) froid (Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) a été utilisé pour laver les poumons. Le nombre total de leucocytes a été compté et les cellules cytocentrifugées (Shandon cytopspin 4 ; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) ont été colorées au May-Grünwald Giemsa (Microm Microtech, Brignais, France). Les cellules ont été identifiées comme macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes par des procédures hématologiques standards. Au moins 300 cellules ont été comptées sous un grossissement de 400x.

Mesure de la résistance pulmonaire

Les souris ont été anesthésiées (5 ml/kg de 10 % de médétomidine (Pfizer) et de 10 % de kétamine (Merial)) 72h après la dernière intra-nasale et immédiatement intubées avec un cathéter de 18G, suivi d'une ventilation mécanique. La fréquence respiratoire a été fixée à 150 respirations/min avec un volume courant de 0,2 ml et une pression expiratoire positive de 2 ml d'H₂O a été appliquée. Les souris ont été exposées au PBS, puis à des concentrations croissantes de métacholine (0-100mg/ml de PBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en utilisant un nébuliseur ultrasonique (Aeroneb, Aerogen, Galway, Irlande). Pour chaque dose, 10 cycles de nébulisation et de mesures ont été effectués. La nébulisation a été effectuée au cours du premier cycle et consistait en 20 bouffées par 10 s, chaque bouffée d'aérosol durant 10 ms. Pour chaque cycle, des mesures ont été obtenues pendant 15 s, suivies d'une ventilation pendant 5 s. La résistance pulmonaire de base (Rrs) a été rétablie avant l'administration des doses croissantes de métacholine. Seules les valeurs de résistance correspondant à des valeurs de COD > 0,95 ont été conservées. Pour chaque dose, la valeur de résistance maximale mesurée a été prise.

Histologie sur des coupes de tissus pulmonaires

Le poumon gauche, non lavé, a été fixé dans l'Antigenfix (Diapath, Microm Microtech, France) pendant 4 heures à température ambiante, suivi par des bains d'alcool (30-100%) et de Diasolv

(Microm Microtech) pour la déshydratation. Après inclusion dans la paraffine, les poumons ont été coupés (5 µm) avec un Microtome (Microm HM355S Thermoscientific). Les sections ont été colorées à l'acide périodique de Schiff (Microm Microtech) et à l'hématoxyline et l'éosine (Diapath, Microm Microtech) pour visualiser respectivement la production de mucus et l'infiltrat cellulaire. Les images ont été acquises sur un microscope optique AxioPlan2 (Zeiss) avec le logiciel Zen Pro associé.

Analyse de l'expression des gènes

L'ARN a été extrait du poumon à l'aide du kit RNA Nucleospin (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon les instructions du fabricant. L'ARN extrait a été retrotranscrit à l'aide du kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, États-Unis), conformément aux recommandations du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée par la technique PrimeTime qPCR Probe Assay (Integrated DNA technologies, Leuven, Belgique) basée sur des tests de nucléase 5'. Les cycles de PCR quantitative ont été réalisés sur le système de PCR en temps réel 12K Flex de QuanStudio (Thermofisher Scientific) avec les étapes suivantes : un cycle à 95°C pendant 3 min suivi de 45 cycles de 95°C pendant 5 s et de 60°C pendant 30 s. Le gène Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (*rplp0*) a été utilisé comme gène de référence afin de normaliser les niveaux de transcription.

Les niveaux relatifs d'ARNm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ont été déterminés en comparant les seuils de cycle de PCR (Ct) pour le gène d'intérêt et de *rplp0* (ΔCt) et les valeurs ΔCt pour les groupes traités et les groupes témoins ($\Delta\Delta Ct$). Les amorces (Integrated DNA technologies) utilisées pour la qPCR sont indiquées dans le Tableau 2.

Cible	Référence
<i>Cyp1a1</i>	Mm.PT.58.32054918
<i>Infγ</i>	Mm.PT.58.41769240
<i>Il-4</i>	Mm.PT.58.7882098
<i>Il-5</i>	Mm.PT.58.41498972
<i>Il-10</i>	Mm.PT.58.13531087
<i>Il-13</i>	Mm.PT.58.31366752
<i>Il-17</i>	Mm.PT.58.6531092
<i>Muc5ac</i>	Mm.PT.58.42279692
<i>Muc5b</i>	Mm.PT.58.30457752
<i>Rplp0</i>	Mm.PT.58.43894205
<i>Ccl2</i>	Mm.PT.58.42151692
<i>Ccl3</i>	Mm.PT.58.29283216
<i>Cxcl1</i>	Mm.PT.58.42076891
<i>Il-6</i>	Mm.PT.10005566

Tableau 2 : Amorces prime time assay utilisées pour la PCR quantitative.

Cytométrie en flux

La circulation a été lavée en perfusant le cœur avec 10 ml de PBS. Les poumons ont été prélevés et digérés avec 1 mg/mL de collagénase de type IV (Life Technologies, Courtaboeuf, France) en RPMI (Life Technologies) pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont été lavées au PBS avec 2% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio scientifique, Courtaboeuf, France) et centrifugées à 2000 rpm pendant 15 min sur un gradient de densité de Percoll (D = 1075 g/mL ; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Les érythrocytes ont été lysés dans un tampon de lyse (155 mmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L KHCO₃, et 0,5 mmol/L EDTA). Les cellules ont été lavées avec du PBS/SVF 2% et filtrées sur une membrane de 100 µm de porosité. Les cellules pulmonaires totales vivantes ont été comptées sur cellules de Thoma après coloration au bleu trypan.

Les cellules ont été incubées avec un marqueur de viabilité (Zombie aqua™ Fixable Viability Kit, Biolegend, Ozyme, Saint-Cyr-L'Ecole, France) pendant 30 min à 4°C puis avec des anticorps conjugués comme présenté dans les Tableaux 3 et 4. Les cellules ont été lavées et remises en suspension dans du PBS/SVF 2% et analysées en cytométrie en flux (LSRFortessa®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) avec le logiciel BD FACSDiva™. Les stratégies d'analyse des populations cellulaires sont présentées dans la Figure 2 pour les cellules T et la Figure 3 pour les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Protéine cible	Conjugé	Espèce cible	Fournisseur
TCRβ	APC-Vio770	Souris	Miltenyi Biotech
TCRγ/δ	Vioblue	Souris	
CD4	PE-Vio770	Souris	
CD25	APC	Souris	
CD8a	BV605	Souris	Ozyme (Biolegend)
CD5	PerCP-Cy5.5	Souris	
NK1.1	FITC	Souris	
CD45	PE-Cy5	Souris	

Tableau 3 : **Anticorps de cytométrie en flux pour l'analyse des populations de cellules.**

Protéine cible	Conjugué	Espèce cible	Fournisseur
LY6C	BV605	Souris	BD Biosciences
CD64	BV786	Souris	
CD103	PerCP-Cy5.5	Souris	
CD86	AF700	Souris	
CD11c	PE-Cy7	Souris	
CD11b	V450	Souris	
CD45	PE-Cy5	Souris	
Siglec F	PE-CF594	Souris	
F4/80	PE	Souris	Miltenyi Biotech
CMHII	FITC	Souris	
CCR2	BV650	Souris	Ozyme (Biolegend)
CD206	APC	Souris	
LY6G	APC-Cy7	Souris	

Tableau 4 : Anticorps de cytométrie en flux pour l'analyse des populations de cellules présentatrices d'antigènes.

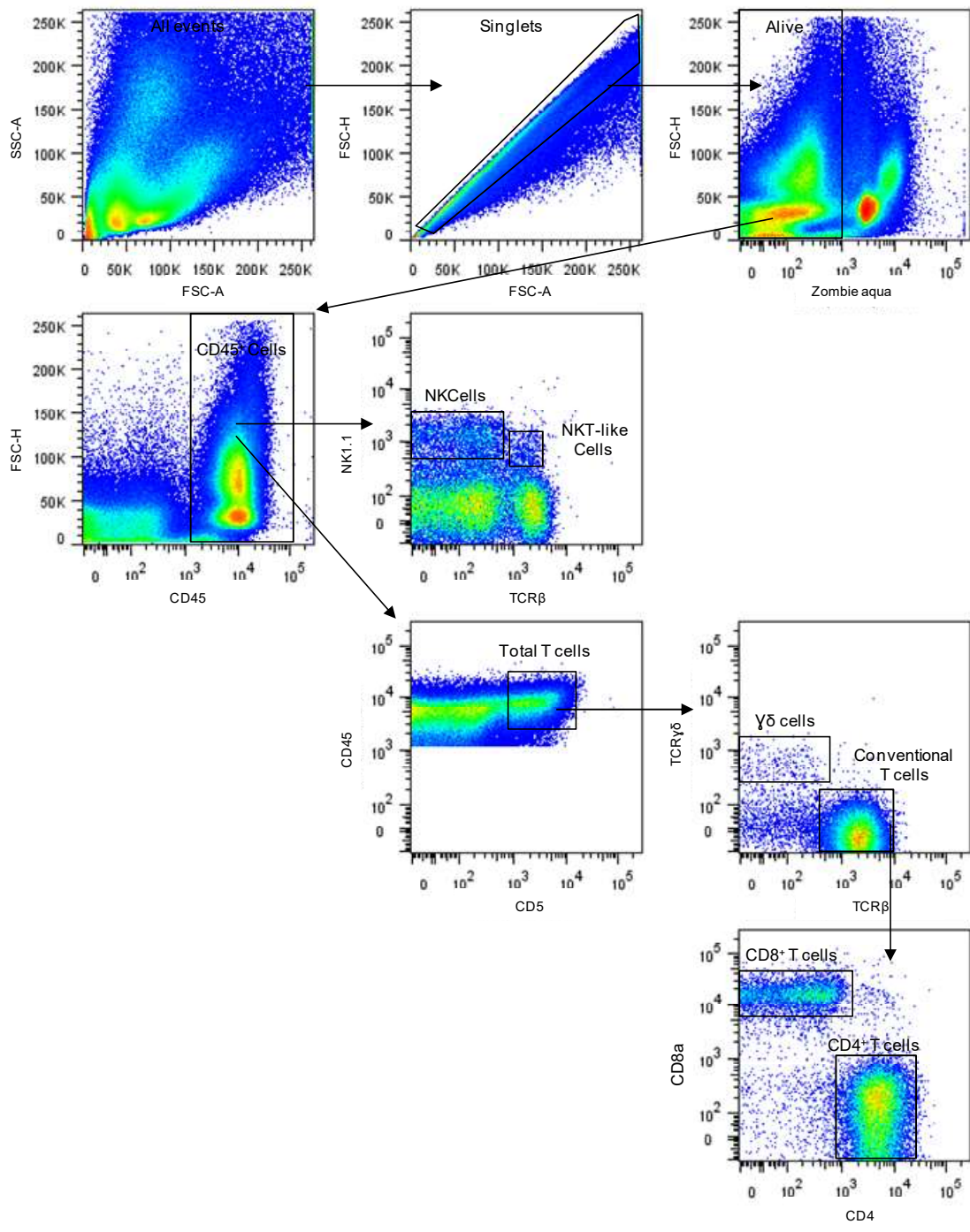


Figure 2 : Stratégie de sélection en cytométrie en flux pour les cellules T infiltrant le poumon.

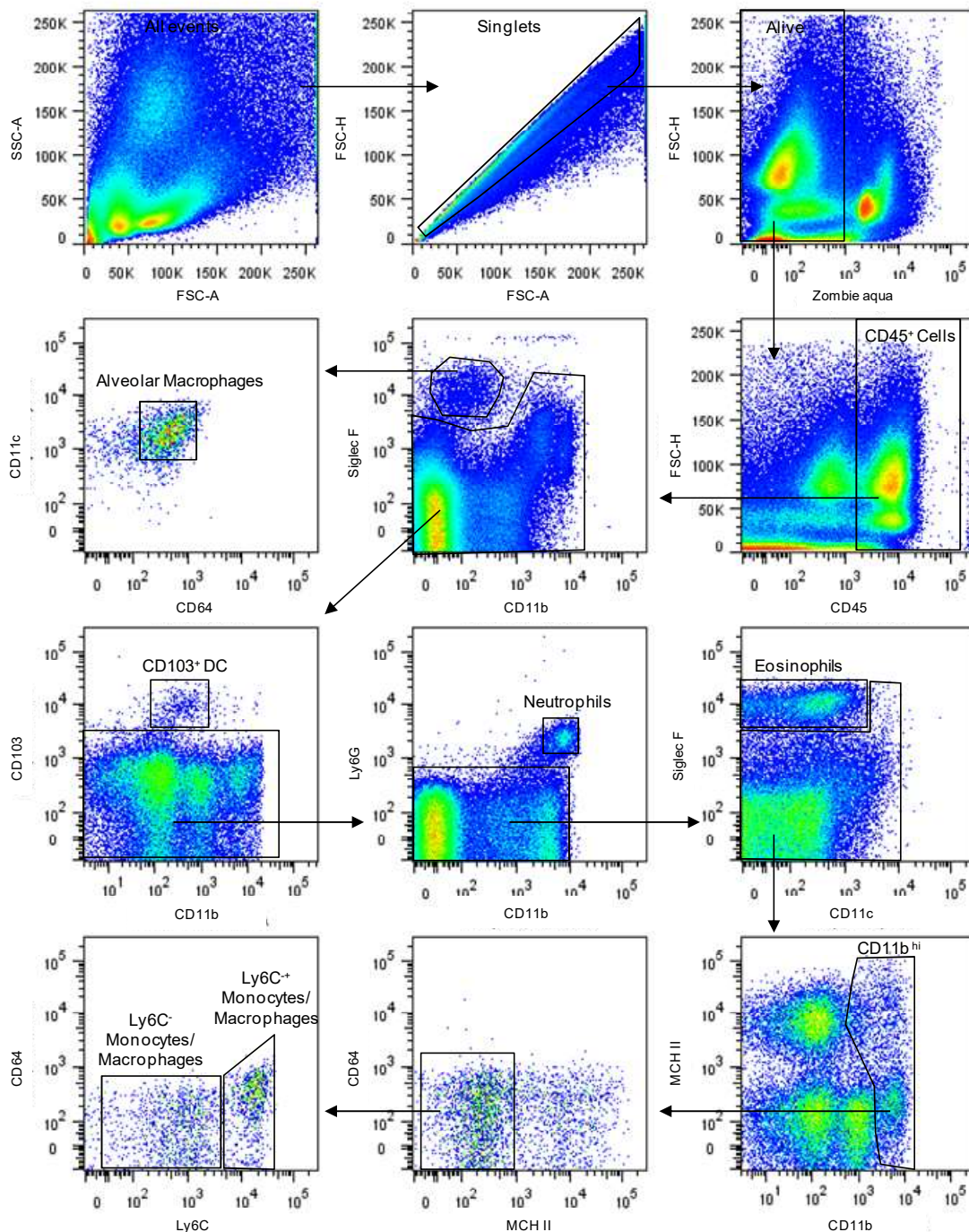


Figure 3 : Stratégie de sélection en cytométrie en flux pour les cellules présentatrices d'antigènes infiltrant le poumon.

Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Toutes les expériences ont été réalisées au moins deux fois. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique Kruskal-Wallis avec le test post-hoc de Dunns dans le logiciel GraphPad prism. Les comparaisons ont été faites entre les trois groupes

Der p ou entre les groupes Der p et les groupes témoins (logiciel GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA). La valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

2. Résultats

1. L'exposition chronique aux nanoparticules couplées au B(a)P modifie la résistance de voies aériennes et l'inflammation tissulaire pulmonaire chez les souris sensibilisées à Der p

L'effet des nanoparticules couplées au B(a)P (NP-B(a)P) sur la fonction respiratoire a été analysé grâce à l'évaluation de la résistance pulmonaire (Figure 4A). Chez les souris non sensibilisées, les nanoparticules non couplées au B(a)P (NP-Ø) n'ont aucun effet, alors que les NP-B(a)P augmentent de manière significative la résistance des voies aériennes par rapport au groupe PBS. Cependant, l'hyperréactivité bronchique (HRB) induite par les NP-B(a)P est significativement plus faible que celle induite par le Der p. Comme attendu, les souris sensibilisées à Der p ont une HRB augmentée par rapport au groupe contrôle traité au PBS. La co-exposition de Der p avec les NP-Ø ou les NP-B(a)P inhibe de manière significative l'HRB induite par Der p. Néanmoins, l'HRB augmente chez les souris co-sensibilisées avec Der p et les NP-B(a)P par rapport au groupe contrôle PBS alors qu'elle est abolie dans le groupe Der p + NP-Ø (Figure 4A). Ces résultats suggèrent que les nanoparticules inhibent l'HRB induite par Der p et que le B(a)P possède son propre effet sur l'HRB indépendamment de l'inflammation allergique.

Les IgE et IgG1 spécifiques à Der p mesurées dans les sérums sont significativement augmentées chez les souris sensibilisées par rapport au groupe contrôle PBS (Figure 4B). Aucune différence n'est observée entre les groupes Der p, qu'ils aient reçu ou non des nanoparticules.

Nous avons ensuite évalué l'effet des NP-B(a)P sur l'inflammation dans le LBA. Le nombre total de cellules et plus précisément les nombres d'éosinophiles, de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes sont augmentés dans tous les groupes sensibilisés à Der p par rapport au groupe PBS (Figure 4C). Les souris non sensibilisées traitées avec les NP-Ø ou les NP-B(a)P ont le même profil inflammatoire que les souris contrôles PBS. Il est intéressant de noter que la co-exposition de Der p avec les nanoparticules ne modifie pas le nombre de cellules totales par rapport au Der p seul, ni la composition cellulaire du LBA. Cependant, les NP-Ø et les NP-B(a)P sont détectées dans les macrophages chez les souris ayant reçu des nanoparticules, par rapport aux groupes PBS et Der p (Figure 4D).

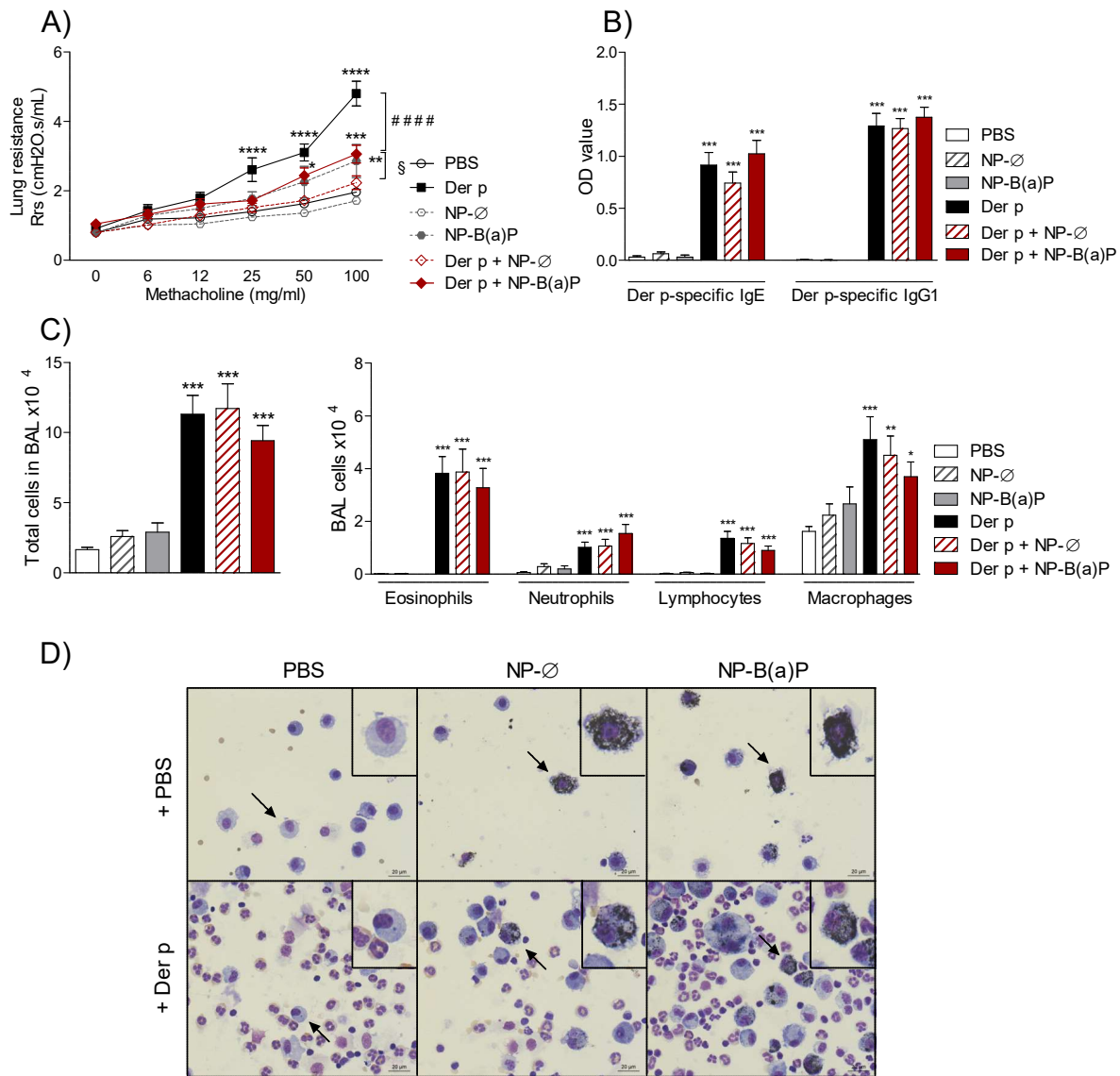


Figure 4 : **Effets d'une administration chronique de NP-B(a)P sur les caractéristiques de l'asthme allergique.** (A) Résistance respiratoire (Rrs) à la suite de doses croissantes de métacholine. (B) IgE et IgG1 spécifiques du Der p dans les sérums. (C) Nombre de cellules inflammatoires dans le lavage broncho-alvéolaire exprimé en nombre total de cellules et en nombre différentiel de cellules après coloration par le May Grünwald-Giemsa. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=10-21 souris par groupe); * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 vs PBS ; § p<0,05 entre Der p + NP-∅ et Der p + NP-B(a)P, ##### p<0,001 entre Der p et Der p + NP-B(a)P). (D) Détection des nanoparticules dans les cellules inflammatoires du lavage broncho-alvéolaire à la suite de la coloration au May Grünwald-Giemsa (barre d'échelle : 20 μ m).

Étonnamment, ces résultats ne sont pas appuyés par l'infiltration cellulaire dans le tissu pulmonaire. Dans les suspensions cellulaires pulmonaires, une augmentation du nombre total de cellules est mise en évidence chez les souris sensibilisées à Der p (Figure 5A), et cela est majoré chez les souris Der p + NP-B(a)P. Cette inflammation majeure est confirmée sur des sections histologiques de poumon colorées avec l'hématoxyline et l'éosine, où des infiltrats plus importants sont observés autour des bronchioles et des vaisseaux sanguins dans les groupes

Der p + NP-Ø et Der p + NP-B(a)P par rapport aux souris sensibilisées à Der p (Figure 5B). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'une co-exposition aux nanoparticules avec Der p ne modifie pas la réponse humorale, mais augmente l'inflammation pulmonaire dans les tissus mais pas dans le LBA.

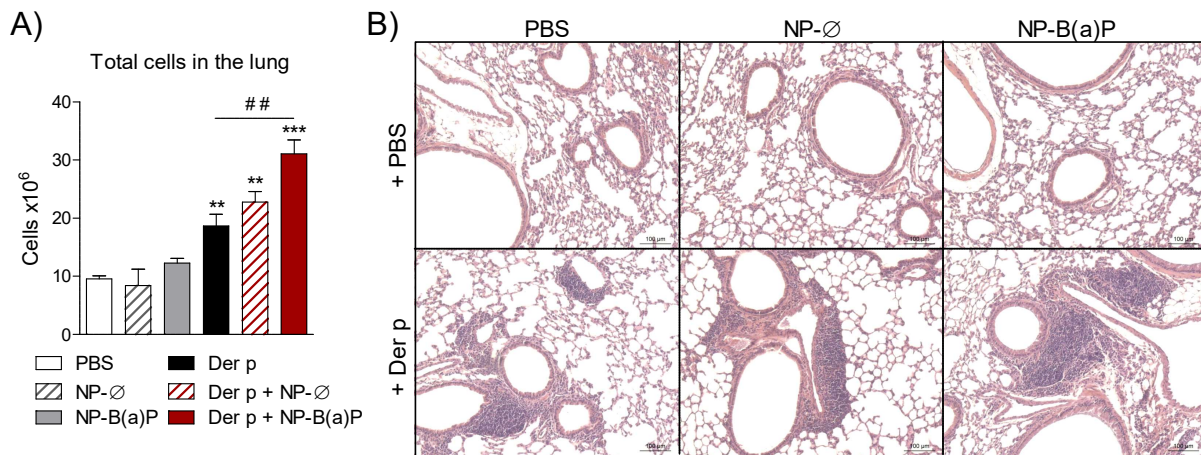


Figure 5 : **Effets d'une administration chronique de NP-B(a)P sur l'inflammation tissulaire du poumon dans un modèle d'asthme allergique.** (A) Nombre de cellules totales issues de la suspension cellulaire obtenue après digestion enzymatique du poumon. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=10-21 souris par groupe); * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 par rapport au PBS; ## p<0,01 entre Der p et Der p + NP-B(a)P). (E) Sections histologiques de poumons colorées avec l'hématoxyline et l'éosine (barre d'échelle : 100 μ m)).

2. L'exposition chronique aux nanoparticules couplées au B(a)P augmente l'expression des cytokines Th2 chez les souris sensibilisées à Der p

Nous nous sommes intéressés par la suite à l'expression des cytokines Th1, Th17 et Th2 dans le tissu pulmonaire afin de caractériser l'inflammation induite par les nanoparticules. Les niveaux d'ARNm pour l'*Ifn γ* sont légèrement augmentés dans les poumons de souris co-exposées à Der p avec les NP-B(a)P par rapport au groupe contrôle PBS (Figure 6A). En ce qui concerne les niveaux d'ARNm de l'*Il-17*, ils sont fortement augmentés dans tous les groupes Der p par rapport au groupe contrôle PBS. Cependant, l'expression de l'*Il-17* n'est pas modulée par la présence de nanoparticules (Figure 6B). Quant-aux niveaux d'ARNm codant pour les cytokines Th2, comprenant l'*Il-4*, l'*Il-5*, l'*Il-13* et l'*Il-10*, ils sont significativement augmentés chez les souris sensibilisées à Der p par rapport au groupe contrôle PBS. Les NP-Ø avec Der p ne modifient pas le niveau d'expression de ces cytokines. En revanche, l'exposition aux NP-B(a)P chez les souris sensibilisées à Der p accentue l'expression des cytokines Th2 par rapport au groupe Der p (Figure 6C-F). Ces résultats suggèrent que les NP-B(a)P exacerbent la réponse Th2 induite par Der p.

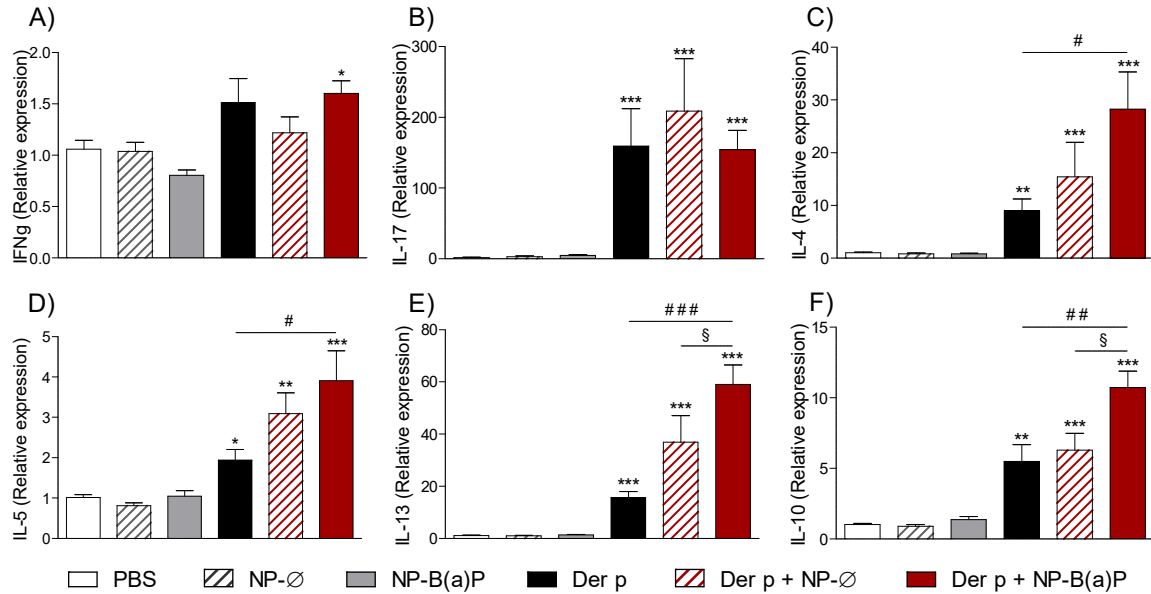


Figure 6 : Augmentation de l'expression de cytokines Th2 dans les tissus pulmonaires à la suite d'une exposition chronique de NP-B(a)P dans le modèle d'asthme. L'expression relative par rapport à *rplp0* des ARNm de l'IFN- γ (A), de l'IL-17a (B), de l'IL-4 (C), de l'IL-5 (D), de l'IL-13 (E) et de l'IL-10 (F) a été mesurée dans les tissus pulmonaires. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=10-21 souris par groupe; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs PBS ; § p<0,05 entre Der p + NP- \emptyset et Der p+NP-B(a)P, # p<0. 05, ## p<0,01, ### p<0,001 entre Der p et Der p + NP-B(a)P).

L'asthme allergique étant caractérisé par une production excessive de mucus participant à l'obstruction des voies respiratoires, nous avons analysé les mucines. L'exposition à Der p et la co-exposition à Der p avec les nanoparticules induisent la production de mucus sans différence entre les groupes (Figure 7A). Ces données sont confirmées par l'analyse de l'expression des mucines *Muc5b* et *Muc5ac*, qui sont induites sans différence significative entre les groupes Der p (Figure 7B et C).

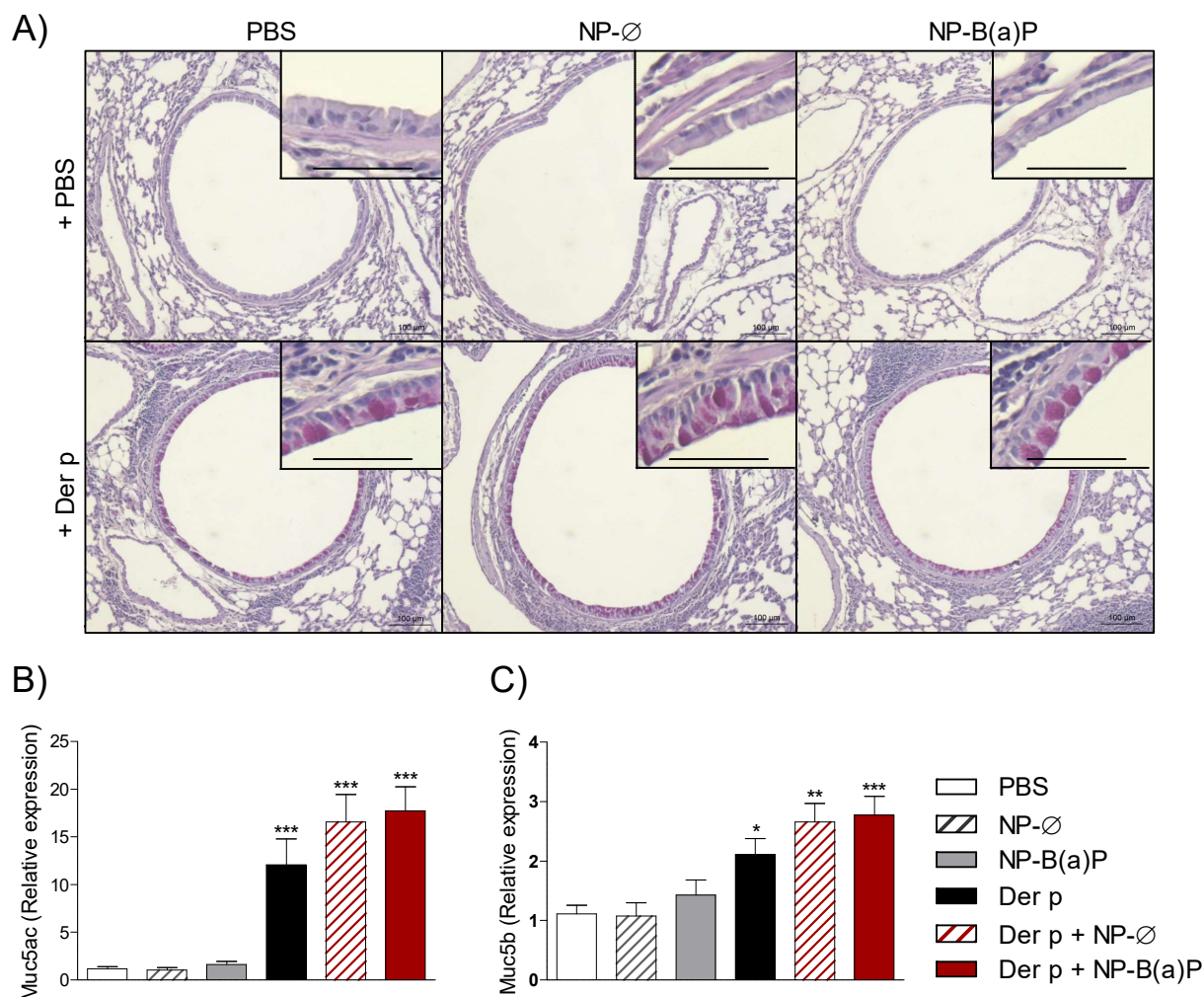


Figure 7 : **Effets d'une administration chronique de NP-B(a)P sur la production de mucus dans le modèle d'asthme.** (A) Sections histologiques de poumon colorées avec l'acide périodique de Schiff (barre d'échelle : 100 µm). L'expression relative par rapport à *rplp0* des ARNm de Muc5ac (B), de Muc5b (C) a été mesurée dans les tissus pulmonaires. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=10-21 souris par groupe; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs PBS).

3. L'exposition chronique aux nanoparticules couplées au B(a)P modifie l'inflammation tissulaire pulmonaire

Suite à l'augmentation du nombre de cellules totales dans le tissu pulmonaire, nous avons identifié les différentes populations inflammatoires par cytométrie en flux. Nos résultats montrent une augmentation significative des éosinophiles, des monocytes/macrophages Ly6C⁻ et des cellules T CD4⁺ chez les souris sensibilisées à Der p par rapport au groupe contrôle PBS (Figure 8A, D, F respectivement). Le même profil de cellules recrutées est observé chez les souris Der p + NP-Ø, néanmoins, une augmentation légère mais significative des cellules NKT-like est observée par rapport au groupe PBS (Figure 8E). Il est intéressant de noter que les NP-B(a)P

modifient de manière significative le recrutement cellulaire induit par Der p. En effet, les monocytes/macrophages Ly6C⁺ ainsi que les Ly6C⁻ sont significativement augmentés chez les souris Der p + NP-B(a)P par rapport aux souris Der p (Figure 8C, D). De surcroît, nous observons un recrutement significatif des neutrophiles, des cellules NKT-like et des cellules T CD8⁺ dans les tissus pulmonaires des souris Der p + NP-B(a)P, alors que ces cellules ne sont pas retrouvées chez les souris Der p (Figure 8B, E, G). Ces résultats montrent que l'administration des NP-B(a)P augmente et modifie l'inflammation pulmonaire induite par Der p.

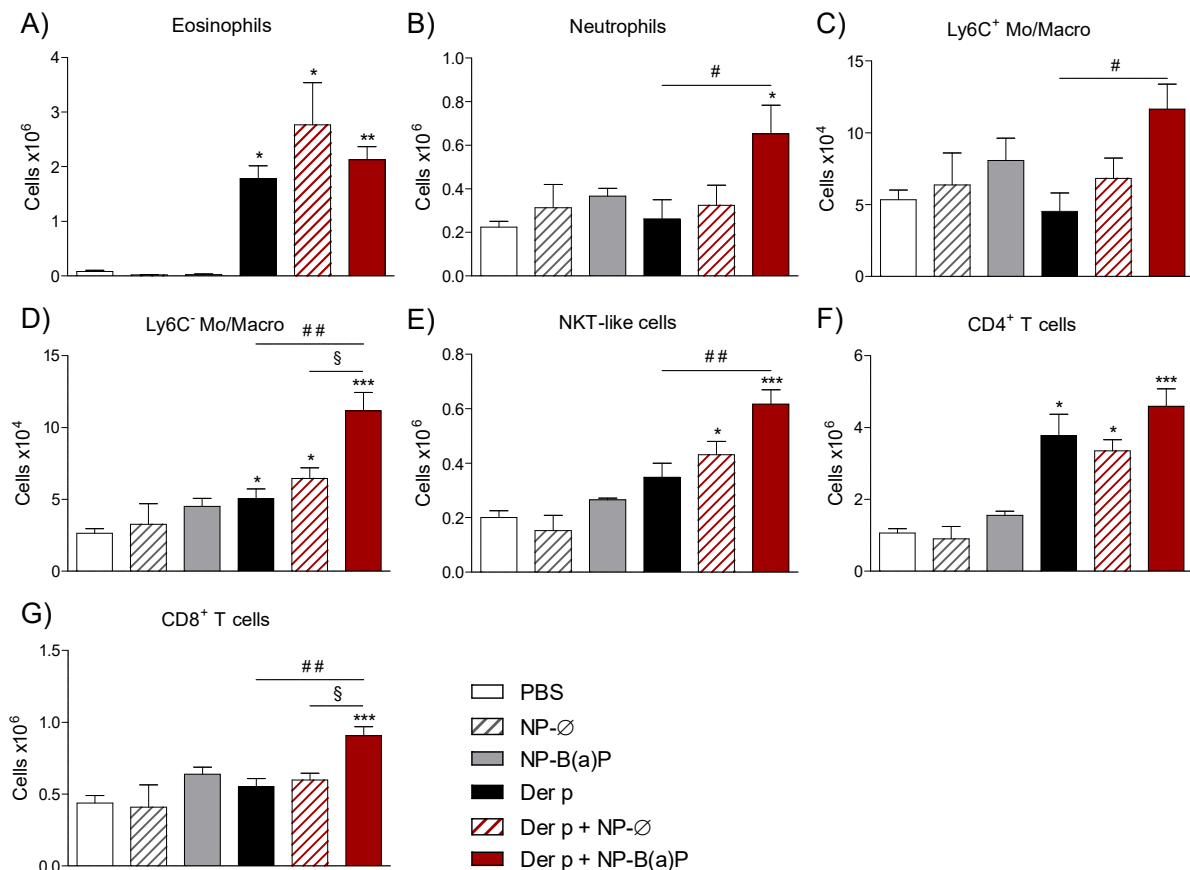


Figure 8 : **Modification de l'infiltrat inflammatoire pulmonaire par l'administration chronique de NP-B(a)P dans l'asthme.** Les cellules pulmonaires ont été déterminées à l'aide de marqueurs de surface avec une analyse par cytométrie en flux. (A) Eosinophiles, (B) Neutrophiles, (C) Monocytes/Macrophages Ly6C⁺, (D) Monocytes/Macrophage Ly6C⁻, (E) cellules NKT-like, (F) cellules T CD4⁺, (G) cellules T CD8⁺. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=4-12 souris par groupe); * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs PBS. § p<0,05 entre Der p + NP-Ø et Der p + NP-B(a)P, # p<0,05, ## p<0,01 entre Der p and Der p + NP-B(a)P).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de la protéine inflammatoire IL-6 et des chimiokines CCL2, CCL3 et CXCL1 impliquées dans le recrutement cellulaire afin de comprendre l'inflammation observée dans le tissu pulmonaire. Les taux d'ARNm codant pour *Ccl2*, *Ccl3* et *Cxcl1* mais pas pour l'*Il-6* sont augmentés chez les souris sensibilisées à Der p par rapport au groupe PBS (Figure 9). Les NP-Ø avec Der p ne modifient pas l'expression de ces différentes

protéines par rapport à Der p. En revanche, une exposition aux NP-B(a)P chez les souris sensibilisées augmente de manière significative les taux d'ARNm codant pour l'*Il-6*, *Ccl2* et *Ccl3* par rapport au groupe Der p (Figure 9A, B, C). Cependant, aucune différence n'est constatée entre les groupes Der p et Der p + NP-B(a)P pour l'expression de *Cxcl1* (Figure 9D).

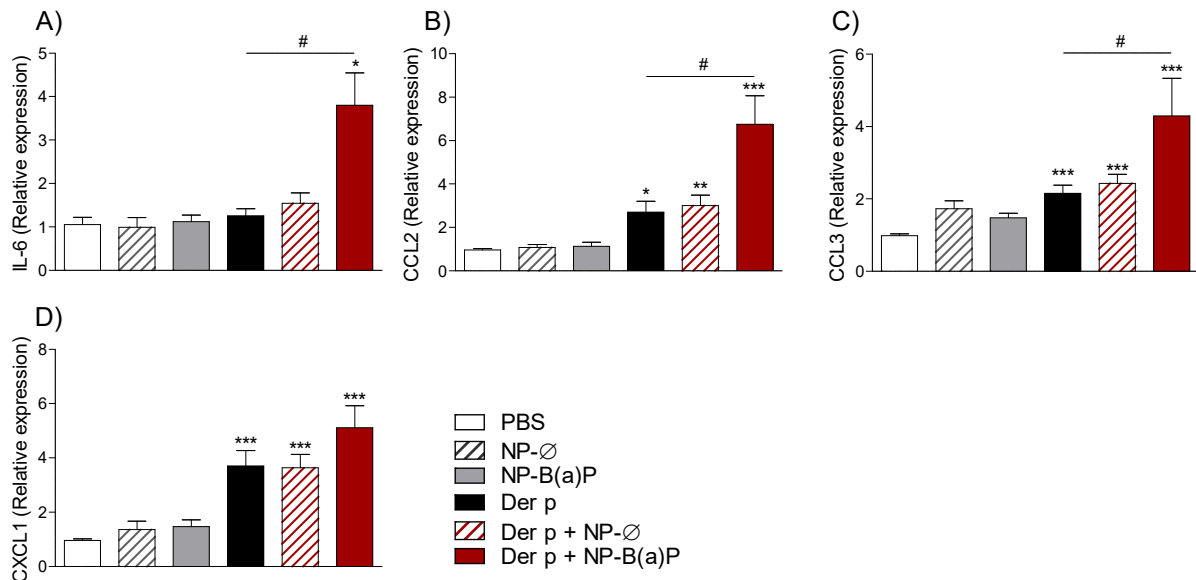


Figure 9 : **Augmentation de l'expression de chimiokines dans les tissus pulmonaires à la suite d'une exposition chronique de NP-B(a)P dans l'asthme.** L'expression relative par rapport à *rplp0* des ARNm de l'*IL-6* (A), *CCL2* (B), *CCL3* (C) et *CXCL1* (D) a été mesurée dans les tissus pulmonaires. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 2 expériences distinctes (n=10-21 souris par groupe; * p<0,05, *** p<0,001 vs, # p<0,05 entre Der p et Der p + NP-B(a)P).

En résumé :

- Les Macrophages prennent en charge les NP.
- La co-exposition des NP avec l'allergène Der p ne modifie ni la réponse humorale ni l'infiltrat inflammatoire induit par Der p dans le LBA.
- La co-exposition des NP avec Der p diminue l'HRB induit par Der p, tandis que les NP-B(a)P seules l'augmentent par rapport au groupe PBS.
- Le B(a)P sur les NP a un effet adjuvant sur l'expression des cytokines Th2 et le recrutement du nombre de cellules totales dans le tissu pulmonaire chez les souris sensibilisées à Der p.
- Le B(a)P sur les NP a un effet synergique sur la composition des cellules recrutées dans le tissu pulmonaire chez les souris sensibilisées à Der p, avec un recrutement de neutrophiles, de Macrophages/monocytes, de cellules NKT-like et de cellules T CD8⁺.

Partie 2 : Impact des nanoparticules couplées au benzo(a)pyrène sur la réponse inflammatoire dans un modèle murin d'asthme à faible exposition aux acariens

Dans cette étude, nous avons voulu évaluer le potentiel effet adjuvant des nanoparticules couplées au B(a)P sur la réaction inflammatoire allergique de type Th2. Ainsi, un modèle expérimental d'asthme murin a été développé avec une faible dose d'allergène. Nous avons également utilisé un modèle simplifié de particules ultrafines pour cette étude. Les effets des NP-B(a)P ont été évalués sur un modèle murin d'asthme murin induit par l'allergène d'acarien *Dermatophagoïdes farinae*. Cette partie est actuellement constituée de résultats préliminaires.

1. Matériels et Méthodes

Animaux et modèle d'asthme allergique

Des souris femelles C57BL/6 J âgées de 6 semaines ont été obtenues des Laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Cette étude a été approuvée par le comité local d'investigation (N° APAFIS#7874-2016070417344442v3) selon les directives gouvernementales N°86/609/CEE et la directive européenne 2010/63/UE. Les souris ont été hébergées dans un établissement accrédité de l'Institut Pasteur de Lille dans des conditions standards et exemptes de pathogènes.

Revêtement des particules noires de carbone

Les nanoparticules de carbone commerciales possédant un diamètre de 33 nm (Sigma-Aldrich, Lyon, France) ont été caractérisées (Tableau 1) par l'équipe du Dr Nicolas Visez du laboratoire de physico-chimie de l'atmosphère (PC2A) de l'université des sciences et Technologies de Lille. Cette équipe a également couplée une partie de ces nanoparticules avec du B(a)P. Une solution de B(a)P (Sigma-Aldrich, Lyon, France) à une concentration de 5,5 mg/ml a été préparée avec du dichlorométhane (Sigma Aldrich) comme solvant. Une masse de 1 g de nanoparticules de carbone a été mélangée à 10 ml de cette solution. Le solvant a été complètement évaporé à température ambiante dans un évaporateur rotatif (environ 3 heures). Après récupération des nanoparticules couplées, un contrôle de la quantité de B(a)P restant sur les parois du ballon de l'évaporateur rotatif a été effectué par analyse GC-MS (GC Perkin Elmer 680, MS Perkin Elmer 600C). Le B(a)P non présent sur les parois est supposé recouvrir les nanoparticules. En effet, l'analyse directe du B(a)P adsorbé sur les nanoparticules est rendue difficile par son extraction non totale sur ce support. La concentration finale de B(a)P sur les nanoparticules était de 46,8 mg/g. Les nanoparticules ont été stockées dans un flacon brun à -20°C.

Données du fournisseur			Données issues de la caractérisation physico-chimique	
Taille des particules (nm)	Forme	Pureté (%)	Aire de la surface spécifique (m ² /g)	Granulométrie (nm)
33	ND	99	322	1254,3 ± 242,5 ^a

Tableau 1 : **Caractérisation physico-chimique des nanoparticules.** Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM. ND : Non Déterminé, ^a mesurée dans le tampon physiologique.

Protocole expérimental

Après une anesthésie au gaz isoflurane, les souris ont été sensibilisées par voie intra-nasale avec 2 µg de Der f (*Dermatophagoides farinae*) (Stallergenes, Antony, France) pendant 4 jours consécutifs avec ou sans la présence de 21 µg de nanoparticules seules (NP-Ø) ou couplées au B(a)P (NP-B(a)P). Cette dose correspond à 1 µg de B(a)P. Dix jours après, des provocations ont été effectuées par voie intra-nasale dans les mêmes conditions 5 jours par semaine pendant 3 semaines (Figure 1A).

Les souris ont été euthanasiées 24 heures après la dernière intra-nasale par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (Euthasol Vet.[®], Laboratoires TVM, France). Le LBA, le sérum et les tissus pulmonaires ont été prélevés pour les analyses. L'activité du B(a)P sur les nanoparticules a été confirmée par l'expression du gène cible *Cyp1a1* dans les tissus pulmonaires (Figure 1B).

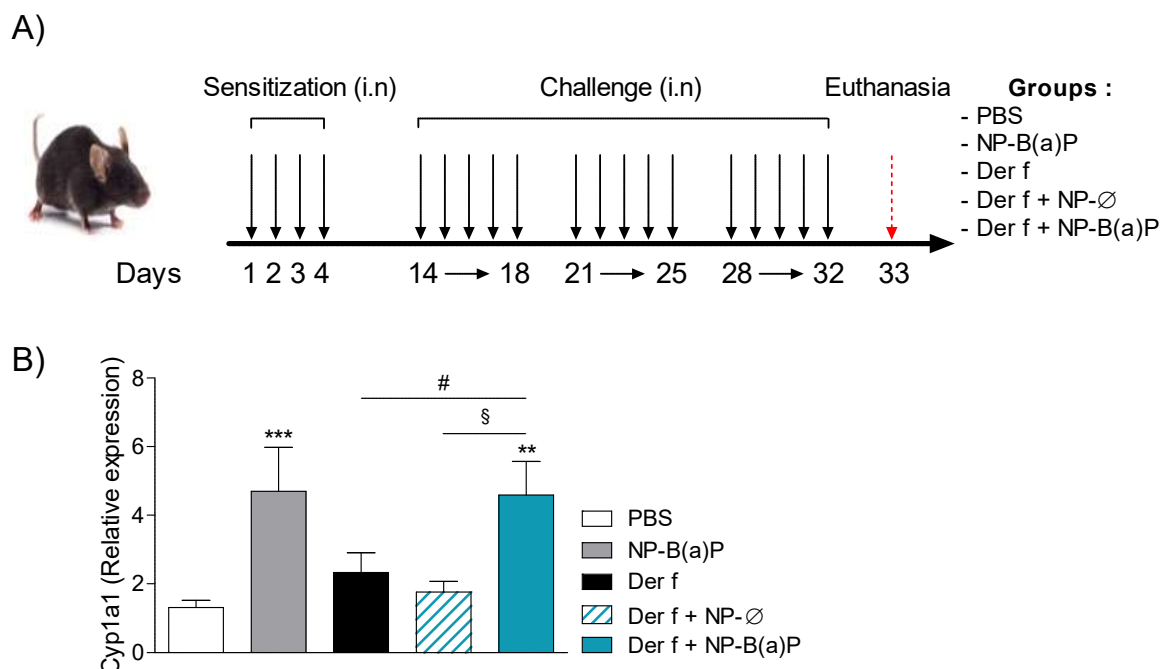


Figure 1 : **Modèle murin expérimental d'asthme et activité du B(a)P.** (A) Modèle expérimental d'exposition chronique aux nanoparticules de carbones couplées au B(a)P dans l'asthme allergique chez la souris. (B) L'expression relative de l'ARNm de *Cyp1a1* dans les tissus pulmonaires a été mesurée par qRT-PCR. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes ± SEM (données provenant de 3 expériences)

distinctes (n=12-19 souris par groupe) ; ** p<0.01, ***p<0,001 vs PBS, § p<0,05 entre Der f + NP-Ø et Der f + NP-B(a)P, # p<0,05 entre Der f et Der f + NP-B(a)P).

Mesure des anticorps sériques

Les taux d'IgE totales sériques ont été déterminés par ELISA. Des plaques 96 puits (Corning, Avon, France) ont été adsorbées avec un anticorps anti-IgE (2 µg/ml, clone R35-72, BD Biosciences). Les sérums et la gamme ont été incubés 1h à température ambiante puis marqués avec un anticorps anti-IgE de souris biotinylé (2 µg/ml, BD Biosciences). La détection a été réalisée par l'ajout de la streptavidine-HRP suivit du substrat TMB. La réaction colorimétrique a été arrêtée avec de l'acide sulfurique H₂SO₄ et la densité optique a été évaluée à 450nm grâce au lecteur de plaque MultiskanAccent (ThermoFisher).

Analyse de l'expression de l'IL-33

L'extraction d'ARN du poumon et la rétro-transcription sont identiques à celles décrites précédemment. La PCR en temps réel a été réalisée avec les amorces pour l'*il-33* (sens : 5'-TGAGACTCCGTTCTGGCCTCACC-3' ; anti-sens : 5'-CGCAGCAAATGCTTGGATACTGCC-3') et les amorces pour le gène de référence *hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) (sens : 5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3' ; anti-sens : 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'). L'amplification a été effectuée sur le StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) et analysée sur le logiciel StepOne Software v2. Une fois l'amplification PCR terminée, une analyse de la courbe de fusion a été effectuée, confirmant la présence d'un seul amplicon. Les qPCR pour tous les autres gènes ont été réalisées grâce à la technologie PrimeTime Assays qPCR Probes (Integrated DNA technologies, Louvain, Belgique) comme précédemment décrit.

L'analyse du lavage broncho-alvéolaire, de l'histologie ainsi que la cytométrie en flux ont été effectués comme décrit précédemment.

Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyennes ± erreur standard de la moyenne (SEM). Toutes les expériences ont été réalisées au moins trois fois. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique Kruskal-Wallis avec le test post-hoc de Dunns dans le logiciel GraphPad prism. Les comparaisons ont été faites entre les groupes Der f ou entre les groupes Der f et les groupes témoins (logiciel GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA). La valeur p <0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

2. Résultats

1. L'exposition aux nanoparticules augmente l'inflammation pulmonaire dans le LBA chez les souris sensibilisées à une faible dose de Der f

Nous avons évalué l'effet des nanoparticules sur l'inflammation dans les LBA. Le nombre total de cellules inflammatoires et plus précisément le nombre d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes sont augmentés dans le groupe Der f par rapport au groupe PBS (Figure 2A). Les souris non sensibilisées traitées avec les NP-Ø ou NP-B(a)P ont le même profil inflammatoire que les souris contrôles PBS. En revanche, la co-exposition de Der f avec les nanoparticules couplées ou non au B(a)P induit une forte augmentation du nombre de cellules totales dans le LBA par rapport au Der f seul. Cette augmentation est principalement liée à une augmentation du nombre d'éosinophiles (Figure 2A). De plus, les NP-Ø et les NP-B(a)P sont détectées dans les macrophages chez les souris ayant reçu des nanoparticules, par rapport aux groupes PBS et Der f (Figure 2B).

Cet infiltrat inflammatoire s'accompagne d'une augmentation de la production d'IgE totales chez les groupes sensibilisés avec une majoration significative avec les nanoparticules (Figure 2C).

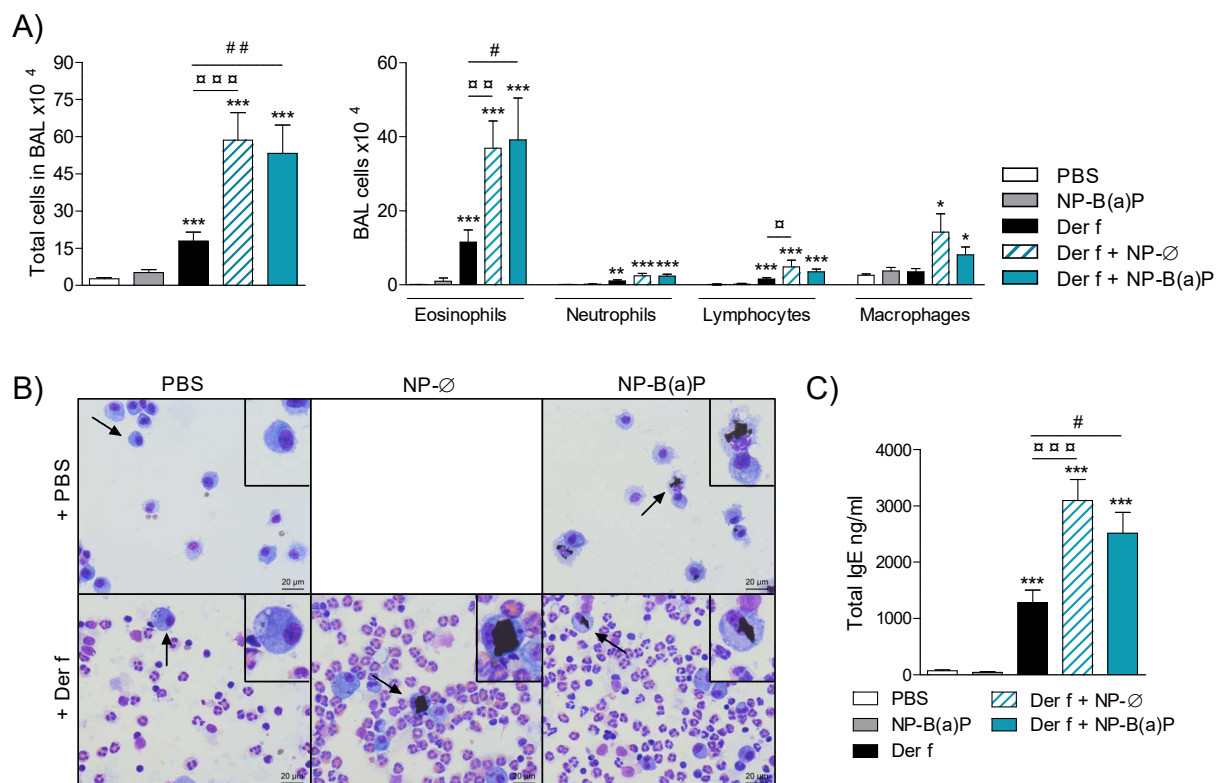


Figure 2 : Effets de l'administration de nanoparticules sur les caractéristiques de l'asthme allergique dans un modèle à faible dose d'allergène. (A) Nombre de cellules inflammatoires dans le lavage broncho-alvéolaire exprimé en nombre total de cellules et en nombre différentiel de cellules colorées au May Grünwald-Giemsa. (B) Détection des nanoparticules dans les cellules inflammatoires du lavage broncho-alvéolaire par coloration au May Grünwald-Giemsa (barre d'échelle : 20µm). (C) Quantité d'IgE totales dans les sérums. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes \pm SEM (données

provenant de 3 expériences distinctes (n=12-19 souris par groupe); * p<0,05 , ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 vs PBS ; # p<0,05, ## p<0,01 entre Der f et Der f + NP-B(a)P, ☐☐ p<0,01, ☐☐☐ p<0,001 entre Der f et Der f + NP-Ø).

2. Les nanoparticules favorisent l'expression des cytokines Th2 chez les souris sensibilisées à une faible dose de Der f

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des cytokines Th1, Th17 et Th2 dans le tissu pulmonaire afin de caractériser l'inflammation induite par les nanoparticules. Les taux d'ARNm pour l'*Ifn γ* sont augmentés dans les poumons de souris exposées à Der f avec ou sans les nanoparticules par rapport au groupe contrôle PBS (Figure 3A). Pour l'ARNm de l'*Il-17*, les taux sont fortement augmentés dans tous les groupes Der f par rapport au groupe contrôle PBS. La co-exposition de Der f avec les nanoparticules ne module pas cette expression (Figure 3B). En ce qui concerne les ARNm codant pour les cytokines Th2, notamment l'*Il-4*, l'*Il-13* et l'*Il-10*, leurs taux sont significativement augmentés chez les souris sensibilisées à Der f par rapport au groupe contrôle PBS. Les NP-Ø augmentent significativement l'expression des cytokines Th2 chez les souris sensibilisées à Der f par rapport au groupe Der f. De plus, les taux d'ARNm codant de l'*Il-5* sont augmentés par la co-exposition des NP-Ø avec Der f par rapport au PBS. En revanche, l'exposition aux NP-B(a)P chez les souris sensibilisées à Der f ne module pas l'expression des cytokines Th2 par rapport au group Der f seul. Il est intéressant de constater que le B(a)P sur les nanoparticules induit des différences significatives chez les souris sensibilisées à Der f concernant l'expression des taux d'*Il-33*. Ainsi, chez les souris sensibilisées, l'expression de l'*Il-10* est plus importante pour les NP-Ø, alors que l'expression de l'*Il-33* est plus importante pour les NP-B(a)P (Figure 3C-F). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les nanoparticules exacerbent la réponse Th2 induite par Der f avec des mécanismes différents pour les NP-Ø et les NP-B(a)P.

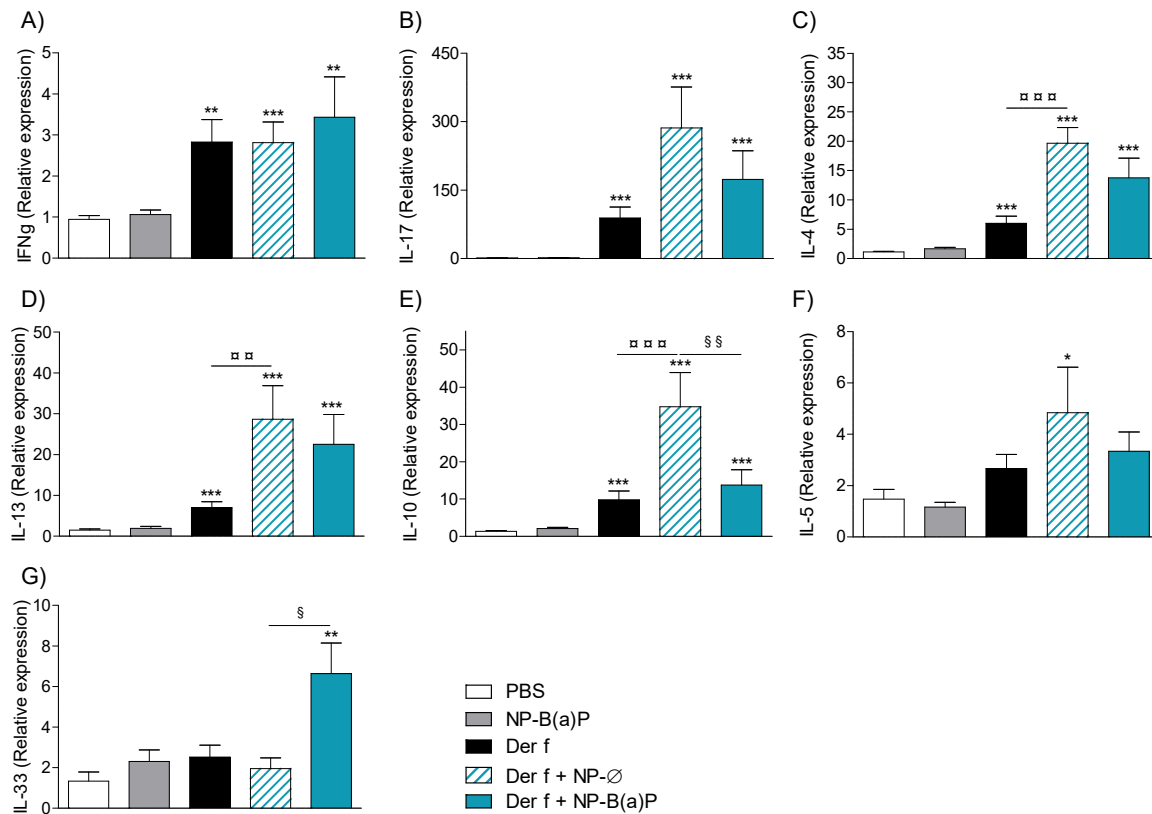


Figure 3 : **Effets de l'administration de nanoparticules sur l'expression des cytokines dans un modèle à faible dose d'allergène** L'expression relative par rapport au gène de référence *rplp0* ou *hprt1* des ARNm de l'IFN- γ (A), de l'IL-17a (B), de l'IL-4 (C), de l'IL-13 (D), de l'IL-10 (E), de l'IL-5 (F) et de l'IL-33 (G) a été mesurée dans les tissus pulmonaires. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 3 expériences distinctes (n=12-19 souris par groupe; * p<0,05, *** p<0,001 vs PBS ; § p<0,05, §§ p<0,01 entre Der f + NP-Ø et Der f+NP-B(a)P, □ p<0,01, □□ p<0,001 entre Der f et Der f + NP-Ø).

Dans l'asthme allergique, la production de mucus participe à l'obstruction bronchique. Ainsi, les taux d'ARNm pour les mucines, *Muc5ac* et *Muc5b*, ont été analysés. L'exposition à Der f et la co-exposition avec les nanoparticules ont induit l'expression de ces deux mucines sans différence entre les groupes (Figure 4A et B). Ces résultats suggèrent que les nanoparticules ne modulent pas la production de mucus.

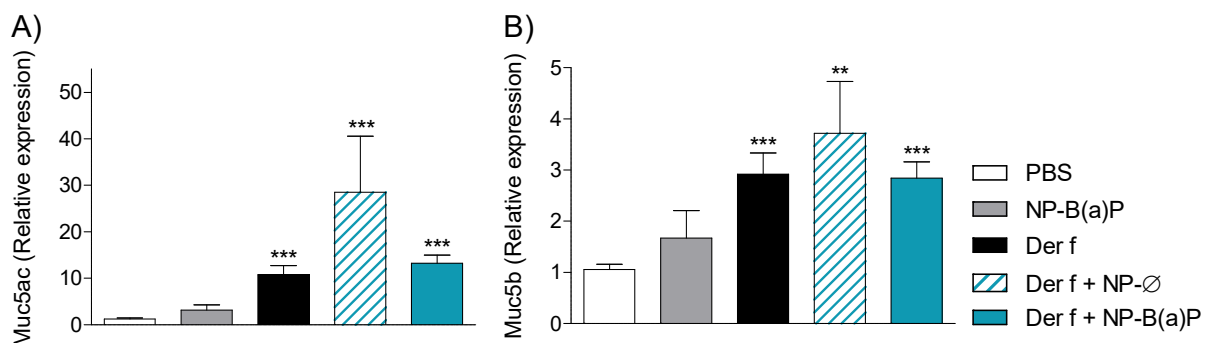


Figure 4 : **Effets de l'administration des nanoparticules sur la production de mucus dans un modèle à faible dose d'allergène.** L'expression relative par rapport au gène de référence *rplp0* des ARNm de

Muc5ac (A), de Muc5b (B) a été mesurée dans les tissus pulmonaires. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 3 expériences distinctes (n=12-19 souris par groupe; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs PBS).

3. Les nanoparticules couplées au B(a)P semblent amplifier l'inflammation tissulaire pulmonaire chez les souris sensibilisées à une faible dose de Der f

Comme il existait une différence entre le LBA et le poumon dans notre étude précédente, nous avons évalué dans cette étude l'infiltrat pulmonaire par cytométrie en flux. Ainsi dans un premier temps, nous avons analysé le nombre total de cellules dans les suspensions cellulaires obtenues à la suite de la digestion des poumons, puis nous avons identifiés les différentes populations inflammatoires par cytométrie en flux. Ces résultats préliminaires montrent que la sensibilisation à Der f ne semble pas moduler la quantité totale de cellules bien que les éosinophiles semblent présents en plus grande quantité au niveau du tissu pulmonaire (Figure 5B). La présence des NP- \emptyset chez les souris sensibilisées à Der f ne semble pas modifier la réponse induite par Der f (Figure 5). En revanche, les NP-B(a)P semblent moduler le recrutement cellulaire pulmonaire induit par Der f dans le tissu pulmonaire. En effet, le nombre de cellules totales semble augmenté par rapport au groupe de souris traitées au PBS. Les éosinophiles, les neutrophiles, les cellules dendritiques ainsi que les cellules NKT-like et les cellules T CD4⁺ semblent augmentés par la co-exposition aux NP-B(a)P avec Der f (Figure 5A-F). Ces résultats suggèrent que la présence du B(a)P sur les nanoparticules induit une plus forte inflammation localisée dans le tissu. Néanmoins, ces résultats nécessitent d'être confirmés.

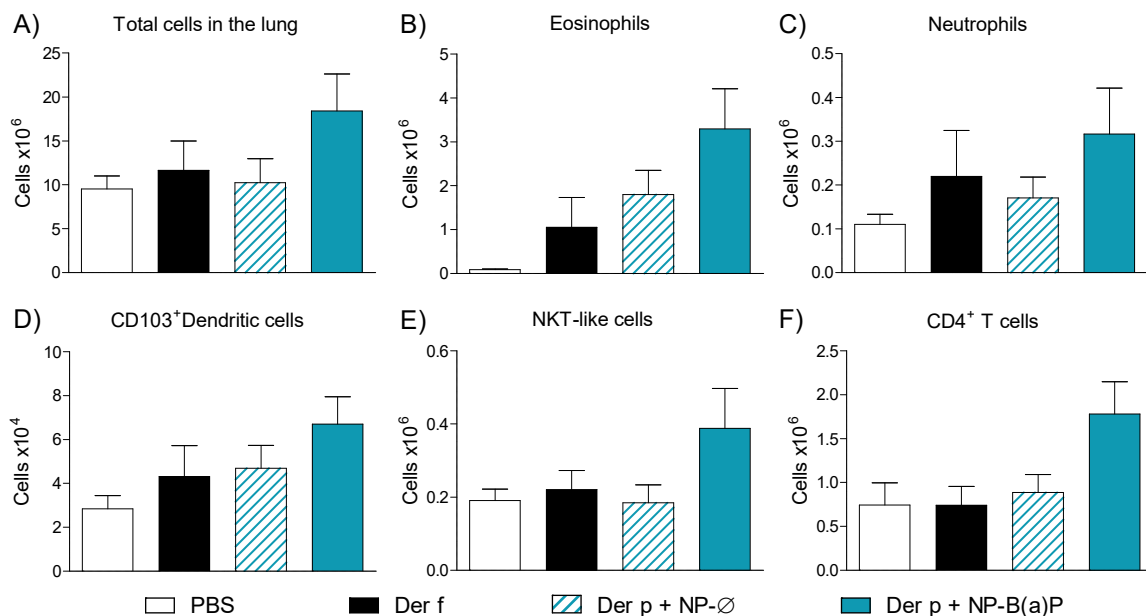


Figure 5 : **Effet d'une exposition aux nanoparticules sur les cellules infiltrant le tissu pulmonaire dans un modèle à faible dose d'allergène.** Les cellules pulmonaires ont été extraites par digestion enzymatique puis phénotypées à l'aide de marqueurs de surface avec une analyse par cytométrie en flux. (A) Cellules totales dans

le poumon, (B) Eosinophiles, (C) Neutrophiles, (D) Cellules dendritiques CD103⁺, (E) cellules NKT-like, (F) cellules T CD4⁺. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM (données provenant de 1 (n=5 souris par groupe)).

En résumé :

- **Les Macrophages prennent en charge les NP.**
- **Les NP ont un effet adjuvant sur la réponse humorale et l'infiltrat inflammatoire dans le LBA chez les souris sensibilisées à Der f.**
- **Les NP, sans le B(a)P, ont un effet adjuvant sur l'expression des cytokines Th2 chez les souris sensibilisées à Der f.**
- **Le B(a)P sur les NP ne potentialisent ni les effets des NP ni de l'allergène, hormis l'expression de la cytokine IL-33.**
- **Les NP-B(a)P semblent augmenter l'inflammation tissulaire pulmonaire induite par Der f.**

DISCUSSION

Les expositions environnementales peuvent avoir une influence considérable sur le phénotype des maladies allergiques, et notamment l'asthme. La prévalence de cette maladie n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies et les modifications génétiques ne peuvent expliquer ce phénomène à elles seules (20,247). La tendance mondiale à l'urbanisation et la démographie croissante contribuent à des changements dans les modes de vie (alimentation, temps passé à l'intérieur, activité physique) et modifient les expositions environnementales (pollution de l'air, tabagisme, moisissures, infections) (22). La pollution atmosphérique est soupçonnée d'être en partie responsable de l'augmentation de la prévalence de l'asthme. De nombreuses études ont associé la pollution atmosphérique liée au trafic routier à un risque de développer de l'asthme chez l'enfant (195). Les voitures à moteur produisent une variété de polluants atmosphériques comprenant entre autres le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, les composés organiques volatils et semi-volatils (dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques) et des particules de tailles variables ainsi que d'autres polluants.

Des études épidémiologiques et *in vivo* ont démontré qu'une exposition aux particules atmosphériques peut favoriser la sensibilisation à l'allergène (242,248) et provoquer une exacerbation de l'asthme (191). Les PUFs sont potentiellement les plus nocives en raison de leurs tailles et de leurs dépôts dans les voies respiratoires. Une étude a démontré qu'elles contribuaient au dépôt alvéolaire des HAPs provenant de sources situées en bord de routes (204), ce qui pourrait favoriser l'inflammation. Nous avons évalué l'impact des nanoparticules (NP) de carbone, couplées à un HAP, sur la réponse inflammatoire dans deux modèles expérimentaux d'asthme allergique chez la souris.

Influence des NP de carbone couplées au B(a)P sur la réponse inflammatoire dans le LBA

Les macrophages ont pour rôle d'éliminer toutes les matières étrangères par phagocytose afin de maintenir une homéostasie. Nous avons constaté dans nos deux modèles que les NP, qu'elles soient couplées ou non au B(a)P, sont prises en charge par les macrophages car nous pouvons les observer dans le cytoplasme de ces cellules. Nos données sont en accord avec la littérature puisque Chen *et al.* ont également montré que les macrophages étaient chargés de NP à la suite d'une exposition aux NP de carbone chez la souris (249). Chez l'homme, *in vitro*, la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter des particules atmosphériques a également été montrée (250). De plus, Huang *et al.* ont montré une activation de ces macrophages alvéolaires en réponse à une exposition à différentes particules collectées dans l'environnement. Ces cellules activées produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6 (251,252) et subissent une apoptose. Cependant, la capacité à induire l'apoptose et l'inflammation varie en fonction des particules (251). Il serait donc intéressant d'explorer le devenir des NP au sein des

macrophages mais également la réaction de ces cellules suite à la phagocytose des NP. Et notamment, évaluer la capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires mais aussi la viabilité en réponse à une exposition aux NP.

L'inflammation des voies respiratoires est l'une des caractéristiques importantes dans la physiopathologie de l'asthme allergique. De façon surprenante, nos résultats ont montré qu'une exposition chronique aux NP avec l'allergène d'acarien Der p ne modifiait ni l'infiltrat inflammatoire dans le LBA, ni la réponse humorale induite par l'allergène. Pourtant, les différentes études menées sur les NP, dont celles composées de carbone, suggèrent un rôle adjuvant sur la réponse inflammatoire en présence d'un allergène. En effet, deux études réalisées chez la souris, ont montré une augmentation de l'infiltrat inflammatoire dans le LBA ainsi que des IgE spécifiques lors d'une co-exposition à l'OVA avec des NP de carbone (diamètre 14 nm). Cette augmentation était significative par rapport à une exposition à l'OVA seule (253,254). Cependant, cet effet adjuvant n'a pas été retrouvé lors de l'administration de NP de carbone possédant un diamètre de 56 nm (253). Ces données sont discordantes avec nos premiers résultats qui ne montrent pas de modification de l'inflammation dans le LBA, ni des IgE sériques. Toutefois, notre modèle d'exposition aux NP en présence d'une faible dose de Der f, présente un effet adjuvant des NP sur la réponse inflammatoire et humorale.

Wang *et al.* ont montré qu'une exposition au B(a)P, sous forme soluble, chez des souris sensibilisées à l'allergène d'acarien Der f mène à une augmentation de l'inflammation pulmonaire dans le LBA et à des IgE spécifiques par rapport à une exposition à l'allergène seul (237). De plus, l'administration de particules de diesel avec un allergène d'acarien Der p entraîne une augmentation du nombre de cellules totales dans le LBA ainsi qu'une augmentation des IgE spécifiques. Les particules diesel comprennent un mélange complexe de différentes tailles de NP avec divers HAPs à leur surface (235). Ainsi, nous nous attendions à une potentialisation de la réponse inflammatoire chez les souris sensibilisées à Der p et exposées aux NP de carbone couplées au B(a)P. Pourtant, dans nos deux modèles, la présence du B(a)P sur les NP n'a pas eu d'effet supplémentaire sur le recrutement cellulaire dans le LBA ou sur la réponse humorale.

La divergence de nos résultats avec ceux issus de la littérature pourrait s'expliquer par la variation de plusieurs paramètres. En effet, la taille, la composition et la dose de NP ainsi que la nature et la dose d'allergène pourraient influencer la réponse inflammatoire.

Tout d'abord, la dose de NP administrée semble impacter la réponse induite par l'allergène. Haar *et al.* ont montré une augmentation du nombre de cellules totales dans le LBA à la suite d'une co-exposition d'OVA avec 200 µg de NP de carbone par rapport à l'OVA seule, alors qu'une dose de 2 ou 20 µg n'induisait aucun effet (255). Une autre étude avec des NP de silice a montré une augmentation de la réponse inflammatoire allergique dose-dépendante de l'administration des

NP lors d'une co-exposition avec de l'OVA chez la souris. Cette étude a également montré une augmentation significative des IgE sériques spécifiques, de l'infiltration des éosinophiles dans le LBA ainsi que de l'expression des cytokines Th2 et Th17, par rapport aux souris sensibilisées à l'OVA (256).

De plus, la composition des NP pourrait influencer la réponse inflammatoire induite par l'allergène. Par exemple, l'administration de NP de dioxyde de titane ou d'argent chez des souris sensibilisées à l'OVA entraîne une diminution de l'inflammation dans le LBA et des cytokines Th2 (257,258). Au contraire, l'administration de NP de silice avec l'OVA augmente la réponse inflammatoire induite par l'OVA (256).

La taille des NP pourrait également jouer un rôle sur l'inflammation dans les modèles expérimentaux d'asthme chez la souris. En effet, l'étude menée par Inoue *et al.* a montré un effet adjuvant des NP de carbone avec un diamètre de 14 nm sur la réponse inflammatoire induite par l'OVA alors que cet effet était absent avec les NP de 56 nm (253).

Par ailleurs, le moment où les NP sont administrées pourrait changer les réponses dans un modèle d'asthme murin. En effet, Alessandrini *et al.* ont montré une différence sur le recrutement de cellules inflammatoires dans le LBA de souris exposées à des PUF de carbone avant ou après l'administration de l'allergène. Dans leur modèle, les souris ont été sensibilisées par l'OVA avec de l'alun par voie intra-péritonéale. Une exposition aux PUFs a été réalisée 24, 96 ou 168 heures avant l'administration de l'OVA par aérosol ou 24 ou 72 heures après la provocation à l'OVA. Les auteurs ont constaté une augmentation significative de l'infiltration de cellules inflammatoires et des cytokines IL-5 et IL-13 dans le LBA lorsque l'inhalation de PUFs était réalisée 24 heures avant la provocation allergénique. En revanche, l'exposition aux PUFs après une provocation allergique n'entraînait que des effets modérés, tels qu'un retard de l'infiltrat inflammatoire et une réduction des cytokines dans le LBA (259). Cette étude suggère que les effets provoqués par les particules diffèrent en fonction du moment de l'exposition. Il est donc probable qu'une co-administration de l'allergène avec des NP présente également une réponse inflammatoire différente.

L'allergène utilisé dans les différents modèles expérimentaux d'asthme mis au point chez la souris pourrait également moduler la réponse inflammatoire et ainsi influencer l'impact de la pollution particulaire obtenue dans ces modèles. Par exemple, les allergènes d'acariens *Dermatophagoïdes farinae* et *pteronysinus* contiennent des protéases (260). Il a été montré *in vitro* que la protéine Der p1, possédant une activité enzymatique, induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8 par les cellules épithéliales (261). Ainsi le mécanisme d'action des allergènes d'acarien et de l'OVA serait potentiellement différent puisque l'OVA ne contient pas de protéases. De plus, la dose d'allergène d'OVA ou d'acarien pourrait également être un paramètre pouvant influencer la réponse inflammatoire puisque nous avons montré des réponses différentes en fonction de la dose d'acariens administrée. Ainsi, la variabilité de ces paramètres pourrait influencer la réponse inflammatoire.

Influence des NP de carbone couplées au B(a)P sur la résistance des voies aériennes

Nos résultats ont montré une dissociation entre l'inflammation présente dans le LBA et la résistance des voies aériennes lors d'une exposition chronique aux NP chez les souris sensibilisées à Der p. En effet, l'exposition chronique aux NP, qu'elles soient couplées ou non au B(a)P, a entraîné une diminution significative de la résistance des voies aériennes chez les souris sensibilisées à Der p. Toutefois, l'exposition aux NP-B(a)P en l'absence de l'allergène montre une augmentation significative de l'HRB par rapport aux souris traitées avec du PBS. Ces données suggèrent que le B(a)P induit une résistance des voies aériennes indépendamment de Der p. Ces résultats n'étaient pas attendus puisque des études ont montré une augmentation de la résistance des voies respiratoires lors de l'exposition aux particules de diesel dans des modèles murins (233,235). Par ailleurs, il nous est difficile de comparer nos résultats avec des études similaires puisque la plupart des études évaluant l'impact des NP, dont celles de carbone, dans des modèles d'asthme murin n'ont pas analysé ce paramètre. Parmi les deux études évaluant l'HRB après une exposition à des NP de carbone, Lindner *et al.* ont démontré qu'une dose unique de NP, couplées ou non au B(a)P, n'aggravait pas la résistance des voies respiratoires. Néanmoins, leur modèle de souris n'a pas montré de modification de l'inflammation après une exposition aux NP (262). Quant à Inoue *et al.*, ils ont observé une augmentation significative de la résistance des voies aériennes en réponse à l'administration d'OVA avec des NP de 56 nm, par rapport à l'OVA seule. Néanmoins, cette augmentation n'était plus significative par rapport à l'administration d'OVA lorsqu'ils ont utilisé des NP de 14 nm (263). Étonnamment, dans leur étude précédente concernant ces NP, ils ont démontré un effet adjuvant des NP de 14 nm sur l'infiltrat inflammatoire par rapport à l'administration de l'OVA. Or, ce n'était pas le cas avec celles de 56 nm (253).

L'inhibition de l'hyperréactivité bronchique dans notre modèle pourrait s'expliquer par les paramètres liés aux NP, comme leur taille ou encore la dose administrée. Néanmoins, une altération du fonctionnement des cellules musculaires lisses (CML) qui sont impliquées dans l'HRB, pourrait être induite à la suite de l'adjonction de NP. En effet, une étude *in vitro* a montré que des NP d'argent induisent des effets cytotoxiques et anti-prolifératifs sur les CML des voies respiratoires (264). De plus, une exposition *in vitro* aux NP d'oxyde de zinc entraîne une diminution de la viabilité des CML des voies aériennes de manière dose-dépendante. Cette exposition altère la contractilité des CML (265). Ces données suggèrent que les NP de carbone pourraient avoir un impact sur les CML des voies respiratoires, et ainsi altérer la viabilité et/ou la contractilité des cellules musculaires lisses des voies respiratoires. Ceci expliquerait la diminution de la résistance induite par l'administration de Der p. Il serait donc intéressant d'explorer cette hypothèse.

Influence des NP de carbone couplées au B(a)P sur la réponse inflammatoire tissulaire

Les différentes études menées sur les NP de carbone dans les modèles expérimentaux d'asthme allergique suggèrent qu'elles ont un rôle adjuvant sur l'inflammation induite par l'allergène. Or, dans notre premier modèle d'asthme, une exposition chronique aux NP avec l'allergène n'a montré aucun effet supplémentaire sur la réponse inflammatoire dans le LBA et sur la réponse humorale. Nous avons alors souhaité explorer le compartiment tissulaire afin de mieux comprendre l'impact des nanoparticules dans notre modèle.

Etonnamment, les résultats concernant l'inflammation retrouvée dans le LBA n'ont pas été appuyés par l'analyse de l'infiltrat cellulaire dans le tissu pulmonaire. En effet, nous avons constaté une augmentation de l'inflammation tissulaire nettement plus importante après une co-exposition aux NP-B(a)P avec l'allergène Der p par rapport à l'allergène seul. La caractérisation du profil cytokinique inflammatoire dans le tissu pulmonaire a montré une potentialisation de l'expression des cytokines Th2 lors d'une exposition chronique aux NP couplées au B(a)P chez les souris sensibilisées à Der p. Cet effet adjuvant n'a pas été retrouvé en l'absence du B(a)P sur les NP. Ainsi, il semblerait que le B(a)P participe à l'amplification de la réponse cytokinique pulmonaire. Pourtant, les différentes études menées sur les NP de carbones suggèrent que les NP elles-mêmes, ont un rôle adjuvant sur la réponse cytokines Th2 (253–255). Toutefois, dans le deuxième modèle d'asthme induit par une faible dose d'allergène Der f, ce sont les NP elles-mêmes qui potentialisent l'expression des cytokines Th2 par rapport à l'administration de l'allergène seul. La co-exposition des NP couplées au B(a)P ne présente pas d'effet adjuvant supplémentaire. Néanmoins, cette co-administration avec les NP-B(a)P induit une augmentation de l'expression de l'alarmine *IL-33*, également pro-Th2, par rapport à la co-administration aux NP non couplées au B(a)P avec Der f. Ainsi, la présence du B(a)P sur les NP pourrait également favoriser la voie Th2 chez les souris sensibilisées à Der f, mais par une voie différente. Cette cytokine, connue pour être produite par l'épithélium bronchique, est capable d'activer les cellules ILC2 impliquées dans la réponse Th2 dans l'asthme à éosinophiles. L'*IL-33* pourrait donc participer à l'exacerbation de la réponse Th2 induite par les NP couplées au B(a)P.

L'identification des différentes populations cellulaires recrutées dans le tissu pulmonaire a montré des différences significatives lors d'une exposition chronique aux NP. En effet, le nombre de neutrophiles a été augmenté dans le groupe co-exposé à Der p avec les NP-B(a)P, alors que le nombre d'éosinophiles restait inchangé. Dans les études réalisées chez l'homme, le nombre de neutrophiles est augmenté dans les expectorations de patients asthmatiques sévères (78). Turan *et al.* ont identifié un groupe de patients asthmatiques présentant une association entre un niveau élevé d'*IL-6* et un niveau élevé de neutrophiles dans les expectorations, indépendamment de la présence des éosinophiles (266). Il est intéressant de noter que l'allergène Der p peut activer les

cellules épithéliales des voies respiratoires humaines, entraînant la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 (267). L'IL-6 est une cytokine possédant un effet pléiotropique sur la réponse immune, l'inflammation et l'hématopoïèse, tandis que l'IL-8, ou *Cxcl1* chez la souris, intervient dans le recrutement des neutrophiles (268). Dans notre modèle, nous avons observé une augmentation significative de l'expression d'IL-6 et de *Cxcl1* dans le poumon en réponse à une exposition chronique à Der p avec les NP-B(a)P. Il est intéressant de souligner que cette augmentation est significativement plus importante par rapport à Der p pour l'expression d'IL-6. Nos résultats ont également démontré une augmentation du nombre de macrophages/monocytes Ly6C⁺ lors d'une co-exposition à Der p avec les NP-B(a)P par rapport à l'allergène seul. Les monocytes Ly6C⁺, également appelés monocytes classiques, sont caractérisés par une forte expression de CCR2, récepteur pour la chimiokine CCL2/MCP-1. Dans notre modèle, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *Ccl2* en réponse à une exposition chronique à Der p avec les NP-B(a)P par rapport à Der p seul. Une étude a montré que le blocage de la voie de signalisation CCL2/CCR2 dans un modèle murin d'asthme allergique à l'OVA empêchait le recrutement de monocytes inflammatoires et avait un effet protecteur par l'inhibition des réponses Th2 (269). Cela suggère que CCL2 pourrait participer au recrutement de monocytes Ly6C⁺ en prenant part à l'inflammation Th2 dans notre modèle. De même, l'augmentation de la chimiokine pro-inflammatoire *Ccl3/MIP-1 α* , par l'administration des NP-B(a)P avec Der p conforterait l'augmentation des monocytes observée. En effet, cette chimiokine est également impliquée dans le recrutement des monocytes.

Kaplanski *et al.* ont proposé un mécanisme dans lequel l'IL-6 pourrait jouer un rôle dans le recrutement de monocytes (Figure 14) (270). L'activation des cellules endothéliales par des molécules pro-inflammatoires mène à la sécrétion d'IL-8, d'IL-6 ainsi qu'à l'expression de molécules d'adhésion. Les neutrophiles, exprimant le récepteur à l'IL-6, sont alors recrutés au site inflammatoire. Le récepteur IL-6R α peut être clivé de la membrane des neutrophiles pour devenir un récepteur soluble, qui se trouve à des concentrations élevées dans les fluides inflammatoires enrichis en neutrophiles (271). Le complexe IL-6/IL-6R α soluble peut activer les cellules endothéliales pour qu'elles sécrètent la chimiokine CCL2 (272). Cette dernière intervient dans le recrutement des monocytes, ainsi, nos résultats pourraient concorder avec le mécanisme établi par Kaplanski *et al.* Par ailleurs, nos résultats suggèrent une implication du B(a)P dans le recrutement cellulaire observé dans notre modèle puisque les NP, en l'absence de B(a)P, n'induisent pas la même inflammation tissulaire.

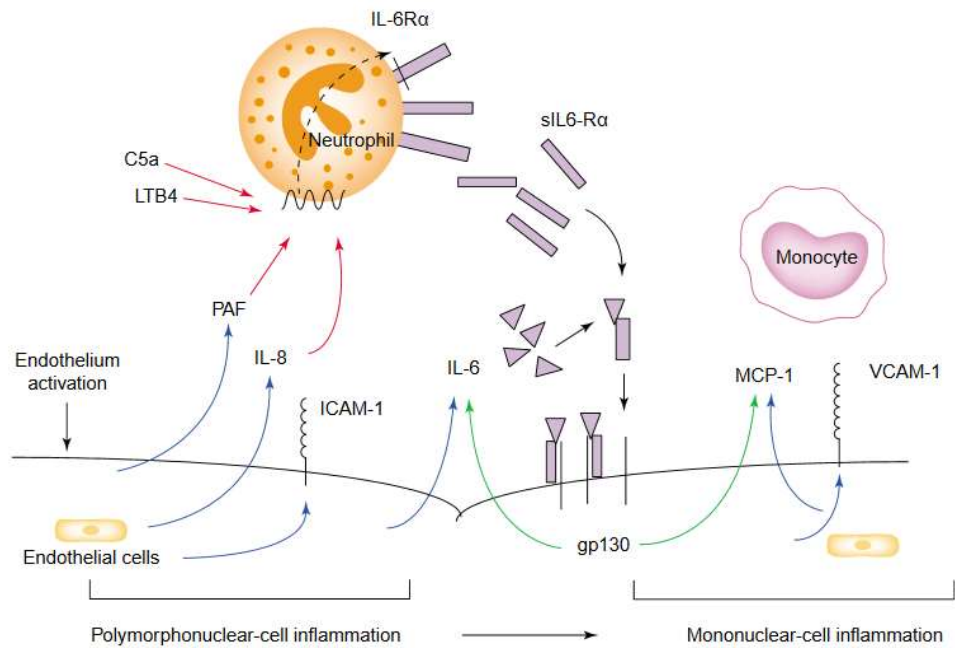


Figure 17: **Schéma du mécanisme potentiel de recrutement des monocytes par la voie IL-6.** Tiré de Kaplanski *et al*, 2003. L'activation endothéliale par des molécules pro-inflammatoires conduit à la sécrétion de PAF, d'IL-8 et d'IL-6, ainsi qu'à l'expression de molécules d'adhésions. Les chimio-attractants, provenant de l'endothélium ou d'autres sources cellulaires recrutent les neutrophiles et induisent le clivage de l'IL-6R α présent au niveau de leur membranes. La combinaison de sIL-6R α avec l'IL-6 permet de se lier au gp130 présent sur la membrane des cellules endothéliales. Cela augmente la sécrétion d'IL-6 et de MCP-1 par les cellules endothéliales mais pas l'IL-8, favorisant ainsi le passage du recrutement des neutrophiles à celui des monocytes. ICAM, intercellular adhesion molecule; IL, interleukin; MCP, monocyte chemotactic protein; PAF, platelet activating factor; sIL-6R, soluble IL-6 receptor; VCAM, vascular-cell adhesion molecule.

Nous avons également observé une augmentation des macrophages/monocytes Ly6C⁻ en réponse à une co-exposition à Der p avec les NP-B(a)P par rapport à l'exposition à Der p. Les monocytes Ly6C⁺ sont capables de se différencier en monocytes Ly6C⁻ dans la circulation. Ces cellules, également appelées monocytes non classiques, jouent un rôle dans l'élimination des cellules endothéliales endommagées, préservant ainsi l'intégrité du système vasculaire (49). Leur rôle dans l'asthme est actuellement indéterminé, ce qui pourrait être une nouvelle voie à explorer.

De manière intéressante, les cellules NKT-like et T CD8⁺ ont été augmentées par l'administration de Der p avec les NP-B(a)P. Ces augmentations ne sont pas retrouvées par l'administration de NP en l'absence de B(a)P, suggérant un effet du B(a)P sur ces recrutements cellulaires. Les cellules NKT-like sont connues pour agir comme des sentinelles afin de déclencher des mécanismes de défense précoce. Elles sécrètent également des médiateurs cytotoxiques et des cytokines pro-inflammatoires (134). Actuellement, le rôle des cellules NKT-like dans l'asthme allergique demeure inconnu. Néanmoins, une étude a montré une augmentation de la production de TNF- α par les cellules NKT-like dans le sang périphérique de patients asthmatiques non éosinophiliques par rapport aux sujets sains (273). Nos résultats suggèrent que ces cellules sont potentiellement intéressantes dans l'exacerbation de l'asthme induite par la pollution.

Concernant les cellules T CD8⁺, celles-ci sont caractérisées par différentes sous-populations telles que Tc1, Tc2 ou encore Tc17. Dans notre étude, aucune modification significative de l'expression de l'*Ifn-γ* ou de l'*Il-17* n'a été constatée chez les souris sensibilisées à Der p exposées aux NP-B(a)P par rapport à l'allergène Der p. Il est donc probable que les cellules Tc1 produisant de l'IFN-γ et Tc17 produisant de l'IL-17 ne soient pas impliquées. En revanche, les cytokines Th2 ont été fortement augmentées lors d'une co-exposition chronique aux NP-B(a)P avec Der p. Comme le nombre de cellules T CD4⁺ n'a pas été modifié par cette co-stimulation, il est possible que les cellules Tc2 CD8⁺, produisant de l'IL-5 et de l'IL-13 (110), participent à l'augmentation de l'inflammation de type Th2 observée. Il est intéressant de souligner que des études chez l'homme ont montré une association entre les cellules T CD8⁺ et l'asthme (107,118). L'impact des NP de carbone sur les cellules T CD8⁺ dans l'asthme allergique n'a pas encore été évalué. Néanmoins, une étude *in vitro* a montré que des cellules dendritiques myéloïdes traitées avec des particules collectées dans l'environnement, augmentent la différenciation des cellules T CD8⁺ et la production de cytokines inflammatoires dont l'IFN-γ (274). En présence de NP avec un allergène, les cellules T CD8⁺ pourraient s'orienter vers un profil Tc2 et ainsi expliquer nos résultats.

L'ensemble de nos résultats suggère qu'une exposition chronique au NP-B(a)P avec Der p pourrait avoir un effet adjuvant sur l'infiltrat inflammatoire tissulaire et sur la réponse cytokinique Th2. Cette co-exposition pourrait également avoir un effet synergique sur le profil inflammatoire dans le tissu pulmonaire. En effet, nous avons constaté une augmentation des neutrophiles, des monocytes/macrophages mais également des cellules NKT-like et T CD8⁺. Ces cellules n'étaient pas ou peu recrutées avec l'allergène seul. De manière inattendue, nous avons constaté une dissociation entre l'inflammation présente dans le LBA et celle du tissu pulmonaire. Plusieurs explications pourraient contribuer à la rétention des cellules au niveau du tissu. La présence de molécules de structures telles que le collagène pourrait bloquer l'infiltrat inflammatoire dans le tissu. Or, l'analyse de l'expression des molécules de collagène ainsi que le dépôt de collagène sur des coupes histologiques de poumon colorées à Rouge Sirius n'ont montré aucune différence entre les groupes (données non montrées). Cette dissociation fait donc intervenir un autre mécanisme, que nous n'avons pas encore élucidé. Nos résultats concernant l'inflammation présente dans le LBA ne concordent pas avec la littérature. Cependant, la variabilité des paramètres pourrait en partie expliquer ces différences. En ce qui concerne l'inflammation localisée dans le tissu pulmonaire, il nous est difficile de comparer nos résultats avec la littérature. En effet, très peu d'études ont évalué les différentes populations recrutées lors d'une exposition aux NP dans l'asthme allergique ou uniquement quelques populations ciblées. Koike *et al.* ont montré une augmentation du nombre de cellules présentatrices d'antigène dans le tissu pulmonaire chez la souris à la suite d'une exposition à l'OVA avec des NP de carbone, possédant un diamètre de 14 nm, par rapport à une exposition à l'OVA. En revanche, ils n'ont pas retrouvé

cet effet lorsqu'ils ont utilisé des NP de carbone avec un diamètre de 56 nm (275). De plus, une étude a montré une augmentation des cellules T CD4⁺ activées et des cellules dendritiques en réponse à une co-administration de particules de diesel avec un allergène d'acarien en comparaison à l'administration de l'allergène seul (235).

Une exposition aux NP de carbone dans un modèle expérimental d'asthme induit par une faible dose d'allergène, suggère un rôle adjuvant des NP sur l'inflammation dans le LBA. Cet effet adjuvant semble également présent sur la réponse humorale et sur l'expression des cytokines Th2. Étrangement, la présence du B(a)P sur les NP n'a pas modifié la réponse induite par les NP seules. Or, l'activité du B(a)P sur le récepteur cible AhR a été confirmée par l'expression du gène *Cyp1a1*. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être approfondis et complétés.

Les deux modèles d'asthme murin mis en place ont permis d'observer un impact différent des NP. En effet, une exposition chronique aux NP, couplées ou non au B(a)P, en présence d'une forte quantité d'allergène d'acarien (25 µg) n'a montré aucun effet supplémentaire sur l'inflammation dans le LBA par rapport à l'allergène. Au contraire, l'exposition de NP en présence d'une faible quantité d'allergène sub-optimale (2 µg) a induit une augmentation de cette inflammation principalement composée d'éosinophiles. Dans ce modèle à faible exposition en allergène, nous souhaitons évaluer l'effet adjuvant des NP sur l'inflammation Th2. Ainsi, les résultats obtenus ont permis d'observer que les NP sont capables d'avoir un effet adjuvant sur l'inflammation dans le LBA, et plus particulièrement sur le recrutement des éosinophiles, dans le LBA. Cependant, la présence du B(a)P n'a pas modifié la réponse induite par les NP. Malgré ces différences entre les deux modèles, nous pouvons penser que les macrophages ont potentiellement un rôle dans les deux études respectives puisqu'ils sont chargés en NP. Comme les différentes études *in vitro* le suggèrent, les macrophages pourraient potentiellement être activés par les NP et ainsi orienter la réponse inflammatoire. Nous avons également observé des différences sur la réponse cytokinique Th2 tissulaire entre les deux modèles. D'une part, nous observons un effet adjuvant des NP-B(a)P, et non des NP-Ø, en présence d'une forte quantité d'allergène tandis qu'un effet adjuvant des NP-Ø est constaté dans le modèle avec une faible quantité d'allergène. Cet effet n'est pas retrouvé avec les NP-B(a)P. Néanmoins, la co-exposition des NP-B(a)P avec l'allergène à faible dose (2 µg) induit l'expression de la cytokine pro-Th2, IL-33. Ainsi, le B(a)P aurait un effet dans les deux modèles sur la réponse Th2, mais par de mécanismes différents.

Les données de l'inflammation tissulaire sont actuellement difficiles à comparer entre les deux modèles puisque l'infiltrat cellulaire doit être confirmé pour le modèle à faible exposition en allergène. De même, l'hyperréactivité bronchique devra être réalisée afin de déterminer l'impact des NP sur la fonction respiratoire.

Néanmoins, l'ensemble des résultats sur les deux modèles suggèrent un potentiel rôle du B(a)P sur la réponse inflammatoire Th2. Ainsi, la composition des NP serait susceptible de modifier les

réponses inflammatoires induites par l'allergène. Il est intéressant de souligner la potentielle implication de la voie de signalisation AhR dans nos modèles. En effet, le B(a)P est un ligand connu de l'AhR et dans nos deux modèles, l'expression du gène cible de l'AhR *Cyp1a1* est activé par les NP couplées au B(a)P. Des études *in vivo* ont montré qu'une co-exposition aux particules issues de l'environnement ou au B(a)P en présence d'un allergène entraîne une augmentation de l'inflammation dans des modèles aigus d'asthme, et cela de manière dépendant de la voie AhR (237,242,245). Cette voie de signalisation pourrait donc jouer un rôle dans le recrutement cellulaire observé dans nos modèles. De surcroît, Podechard *et al.* ont montré *in vitro* une augmentation de la cytokine IL-8, participant au recrutement de neutrophiles, par des macrophages primaires humains stimulées au B(a)P de manière dépendante de la voie signalisation AhR. Les auteurs ont également observé une augmentation de CXCL1 lors d'une exposition au B(a)P, une protéine homologue de l'IL-8 chez la souris, induisant le recrutement de neutrophile dans le BAL (276). De même, une augmentation de la cytokine IL-33 par une lignée cellulaire épithéliales a été observée en réponse à un traitement au B(a)P de manière dépendante de l'AhR (237). Similairement, Weng *et al.* ont montré une augmentation de l'IL-33 produite par des cellules épithéliales bronchiques de patients asthmatiques exposées aux DEP, via la voie de signalisation AhR (240). Or dans nos modèles murins nous avons observé soit une augmentation de CXCL1 avec un recrutement de neutrophile soit une augmentation de l'expression de l'IL-33. Ces études conforteraient la potentielle implication de la voie de l'AhR dans les réponses inflammatoires induites dans nos modèles. Toutefois, ce mécanisme devra être évalué soit en utilisant l'antagoniste d'AhR (le CH223191) *in vivo* ou des souris déficientes pour l'AhR.

Les limites des études des NP dans l'asthme allergique

La grande variabilité des protocoles ainsi que les paramètres associés mis en place afin d'évaluer les effets des NP sur l'asthme, rendent difficiles la comparaison directe de nos résultats avec la littérature. L'utilisation d'un protocole standard permettrait d'obtenir des informations plus pertinentes pour comprendre l'impact des NP sur la santé humaine. De surcroît, il est important de souligner que l'obstruction réversible des voies respiratoires est la principale observation utilisée pour diagnostiquer les patients asthmatiques. *In vivo*, l'évaluation de l'HRB permet de refléter ce paramètre. Or, une importante lacune concernant la compréhension des effets des NP sur l'HRB est actuellement constatée.

Par ailleurs, les doses de NP dans les différentes études sont extrêmement variables et ne sont pas forcément représentatives de l'exposition humaine. Dans nos études, les doses de NP administrées aux souris sont nettement supérieures à ce que l'on peut retrouver dans l'atmosphère et donc aux doses inhalées chez l'homme. Cependant, Wu *et al.* ont montré qu'une instillation par voie intranasale de NP entraînait seulement un dépôt d'environ 28 % de la dose

dans le poumon et qu'une grande partie de NP se retrouvait dans l'estomac (277). Les doses de NP que nous avons administrées restent relativement faibles par rapport aux études dans lesquelles les souris sont exposées à 50 µg ou encore à 200 µg de NP.

Les études réalisées afin de définir l'impact de la pollution particulaire dans l'asthme allergique se sont développées ces dernières décennies. Les NP, issues de processus industriels, ont largement été utilisées dans les modèles expérimentaux d'asthme chez la souris. Cependant, les NP ne reflètent pas l'hétérogénéité des PUFs provenant de l'atmosphère. En effet, la composition chimique des PUF atmosphériques est particulièrement complexe et est en lien direct avec les sources d'émissions (157). De plus, les particules peuvent transporter des polluants aérobiologiques, notamment les allergènes de pollens (156). La collecte de PUF dans l'environnement n'étant pas évidente à réaliser, cela expliquerait le nombre limité d'études effectués sur des modèles expérimentaux chez les animaux. Néanmoins, des études ont mis en place des modèles murins afin de mieux comprendre le rôle des PUFs dans une pathologie respiratoire telle que l'asthme. Une étude a montré une augmentation du nombre de cellules totales dans le LBA par rapport à l'allergène d'acarien lors d'une exposition aux PUFs (collectées dans la ville de Fresno, en Californie) durant la phase de sensibilisation dans un modèle d'asthme allergique (278). Similairement, Li *et al.* ont démontré une augmentation du nombre d'éosinophiles dans le LBA ainsi qu'une augmentation des IgE après l'administration de PUF (collectées dans la ville de Los Angeles) avec l'OVA chez la souris. Cependant, ni les autres types cellulaires, ni même le nombre de cellule totale dans le LBA n'ont été modifié par les PUF avec l'OVA dans cette étude (279). Ces données confortent l'idée que les PUF ont un impact sur l'asthme.

L'utilisation de NP dans les études *in vivo* et *in vitro* pose des problèmes lors de l'analyse des protéines. En effet, les protéines sont capables de se fixer à la surface des particules en se liant faiblement ou fortement, ce qui forme une couche superficielle appelée "couronne" autour de la NP (280). Une étude a montré que des NP de carbone interagissent avec de l'albumine de sérum bovin et des protéines issues du fluide de LBA (281). Dans nos modèles, une partie des NP est restée dans le poumon. Lors du broyage des poumons, les NP présentes dans le lysat, sont au contact des protéines extraites. Par conséquent, il nous est impossible de doser les cytokines dans nos modèles. Nous avons testé la capacité de nos NP à adsorber les différentes cytokines. Pour cela, nous avons mis les cytokines recombinantes d'intérêts en présence de NP, puis nous avons effectué le dosage ELISA adéquat sur les surnageants. Nous avons constaté une forte diminution du taux de cytokine détecté dans le surnageant en présence des NP par rapport à celles sans les NP (données non montrées).

Bien que les modèles animaux soient largement utilisés dans l'évaluation de l'impact des PUFs et des NP dans l'asthme allergique, il est important de souligner l'importance de la transposition à l'homme. En effet, comme vu dans le chapitre 1.IV, les modèles murins ont leurs limites et ne miment pas complètement la pathologie humaine. De plus, l'asthme étant une pathologie complexe, il est nécessaire d'effectuer une approche multiple afin de mieux comprendre cette complexité. Ainsi, des études *in vitro* réalisées à partir de prélèvements humains pourraient conforter les résultats obtenus *in vivo* et améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'aggravation de l'asthme induit par la pollution chez les patients asthmatiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'augmentation constante de la prévalence de l'asthme est un véritable problème de santé publique et la pollution particulaire est suspectée d'y jouer un rôle. La recherche nous permet de comprendre le potentiel impact des particules atmosphériques dans cette pathologie. Néanmoins, le mécanisme précis reste encore incertain, et notamment dans le cas des PUFs.

Ces PUFs possèdent des caractéristiques bien définies et sont potentiellement les plus dangereuses par rapport aux particules grossières et fines. Elles sont également responsables du dépôt de HAPs dans le poumon. Au laboratoire, nous nous intéressons à leurs potentiels rôles sur l'asthme allergique et pour cela nous avons mis en place différents modèles d'études impliquant des NP liées à un HAP. Ce travail de thèse nous a permis de constater que les macrophages sont capables de prendre en charge les NP de carbone. Nous avons également observé un effet synergique entre les NP couplées au B(a)P et l'allergène Der p sur la réponse inflammatoire du tissu pulmonaire lors d'une exposition chronique à ces dernières. Dans ce modèle, un effet adjuvant a également été constaté sur l'expression des cytokines Th2 dans le poumon. Ces résultats montrent un effet spécifique du B(a)P sur ces réponses puisque ces dernières sont différentes en l'absence de ce HAP. En revanche, la co-exposition des NP couplées avec le B(a)P avec l'allergène n'a pas modifié la réponse humorale et inflammatoire du LBA induite par Der p. Ainsi, les perspectives de ces travaux sont d'explorer la manière dont les macrophages réagissent face à ces NP. Il serait intéressant de savoir combien de temps les NP persistent dans les macrophages et le temps de clairance de ces particules. Certaines données de la littérature montrent un effet de NP sur la survie des macrophages (282). Il serait donc intéressant d'évaluer cette survie dans notre modèle. De même, l'évaluation des ganglions lymphatiques serait intéressante afin de savoir si les NP y sont emmenées, et si elles affectent l'inflammation Th2. Par ailleurs, la dissociation entre l'inflammation dans le LBA et l'infiltrat tissulaire nécessite des études complémentaires. L'absence de remodelage dans notre modèle ne permet pas d'expliquer ce phénomène. Il est donc possible qu'un autre mécanisme intervienne et potentiellement au niveau des cellules épithéliales bronchiques en jouant sur l'expression des molécules de jonction comme montré par Tan *et al.* (283). La présence du B(a)P semble jouer sur les réponses inflammatoires induites par les NP, ainsi, il serait intéressant d'évaluer la voie de signalisation AhR et sa potentielle implication.

Concernant le modèle expérimental induit par une faible dose d'allergène Der f, nous avons constaté des effets différents sur les paramètres inflammatoires. Un effet adjuvant des NP a été constaté sur l'infiltrat inflammatoire du LBA, sur la réponse humorale ainsi que cytokinique Th2. Dans ce modèle, il s'agit des NP elles-mêmes qui apportent cet effet. Le B(a)P présent sur les NP ne potentialise ni l'effet des NP, ni l'effet de Der f et ne module pas la réponse inflammatoire. Néanmoins, le B(a)P pourrait induire la voie Th2 par l'intermédiaire de l'IL-33. Ces résultats préliminaires doivent être approfondis par l'étude de l'hyperréactivité bronchique et par la confirmation des cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire.

Ce travail de thèse met en lumière la difficulté de l'étude des NP sur la santé humaine. La modification de certains paramètres est susceptible de changer la réponse provoquée par les NP chez des souris sensibilisées à un allergène. La grande variabilité des protocoles disponible dans la littérature ne favorise pas la compréhension de l'impact des NP sur l'asthme allergique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brannan JD. Bronchial hyperresponsiveness in the assessment of asthma control: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. août 2010;138(2 Suppl):11S-17S.
2. Chung KF. Asthme corticorésistant et corticodépendant : quelles solutions ? *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 1 janv 2005;45(1):17-24.
3. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 4 mai 2012;18(5):716-25.
4. Begne C, Chanez P. Les phénotypes de l'asthme. *Rev Mal Respir Actual*. 1 mai 2015;7(2):69-71.
5. Wenzel SE. Complex phenotypes in asthma: current definitions. *Pulm Pharmacol Ther*. déc 2013;26(6):710-5.
6. Kuruvilla ME, Lee FE-H, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. avr 2019;56(2):219-33.
7. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2010;181(4):315-23.
8. Shaw DE, Sousa AR, Fowler SJ, Fleming LJ, Roberts G, Corfield J, et al. Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *Eur Respir J*. nov 2015;46(5):1308-21.
9. Loza MJ, Djukanovic R, Chung KF, Horowitz D, Ma K, Branigan P, et al. Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. *Respir Res*. 15 déc 2016;17(1):165.
10. Karta MR, Broide DH, Doherty TA. Insights into Group 2 Innate Lymphoid Cells in Human Airway Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. janv 2016;16(1):8.
11. Chang Y-J, DeKruyff RH, Umetsu DT. The role of type 2 innate lymphoid cells in asthma. *J Leukoc Biol*. 2013;94(5):933-40.
12. Schleich FN, Chevremont A, Paulus V, Henket M, Manise M, Seidel L, et al. Importance of concomitant local and systemic eosinophilia in uncontrolled asthma. *Eur Respir J*. juill 2014;44(1):97-108.
13. Zhang X-Y, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, et al. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. sept 2014;44(9):1137-45.
14. Stokes JR, Casale TB. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 2016;117(2):121-5.
15. Delmas M-C, Fuhrman C. L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives. *Rev Mal Respir*. 1 févr 2010;27(2):151-9.
16. Koppelman GH, Los H, Postma DS. Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *Eur Respir J*. 1 janv 1999;13(1):2-4.
17. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. mars 2008;8(3):169-82.

18. Tumes DJ, Papadopoulos M, Endo Y, Onodera A, Hirahara K, Nakayama T. Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma. *Immunol Rev.* 2017;278(1):8-19.
19. Toskala E, Kennedy DW. Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol.* sept 2015;5 Suppl 1:S11-16.
20. Burbank AJ, Sood AK, Kesic MJ, Peden DB, Hernandez ML. Environmental determinants of allergy and asthma in early life. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2017;140(1):1-12.
21. Guarnieri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet Lond Engl.* 3 mai 2014;383(9928):1581-92.
22. Rodriguez A, Vaca M, Oviedo G, Erazo S, Chico ME, Teles C, et al. Urbanisation is associated with prevalence of childhood asthma in diverse, small rural communities in Ecuador. *Thorax.* déc 2011;66(12):1043-50.
23. Baxi SN, Phipatanakul W. The role of allergen exposure and avoidance in asthma. *Adolesc Med State Art Rev.* avr 2010;21(1):57-71, viii-ix.
24. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol.* juill 2015;136(1):38-48.
25. Tischer CG, Hohmann C, Thiering E, Herbarth O, Müller A, Henderson J, et al. Meta-analysis of mould and dampness exposure on asthma and allergy in eight European birth cohorts: an ENRIECO initiative. *Allergy.* 2011;66(12):1570-9.
26. Thacher JD, Gruzieva O, Pershagen G, Melén E, Lorentzen JC, Kull I, et al. Mold and dampness exposure and allergic outcomes from birth to adolescence: data from the BAMSE cohort. *Allergy.* juin 2017;72(6):967-74.
27. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 19 avr 2002;296(5567):490-4.
28. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat Immunol.* oct 2017;18(10):1076-83.
29. Edwards MR, Strong K, Cameron A, Walton RP, Jackson DJ, Johnston SL. Viral infections in allergy and immunology: How allergic inflammation influences viral infections and illness. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2017;140(4):909-20.
30. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? *J Allergy Clin Immunol.* juin 2010;125(6):1202-5.
31. Rosenberg SL, Miller GE, Brehm JM, Celedón JC. Stress and asthma: novel insights on genetic, epigenetic, and immunologic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2014;134(5):1009-15.
32. Sutherland ER. Linking obesity and asthma. *Ann N Y Acad Sci.* avr 2014;1311:31-41.
33. Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):869-74.
34. Haggerty CL, Ness RB, Kelsey S, Waterer GW. The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol.* mars 2003;90(3):284-91; quiz 291-3, 347.

35. Torday JS, Rehan VK. An epigenetic 'smoking gun' for reproductive inheritance. *Expert Rev Obstet Gynecol.* 1 mars 2013;8(2):99-101.
36. Kobayashi Y, Bossley C, Gupta A, Akashi K, Tsartsali L, Mercado N, et al. Passive smoking impairs histone deacetylase-2 in children with severe asthma. *Chest.* févr 2014;145(2):305-12.
37. Brandt EB, Biagini Myers JM, Ryan PH, Khurana Hershey GK. Air pollution and allergic diseases. *Curr Opin Pediatr.* déc 2015;27(6):724-35.
38. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med.* mai 2012;18(5):673-83.
39. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 24 juill 2008;454(7203):445-54.
40. González-de-Olano D, Álvarez-Twose I. Mast Cells as Key Players in Allergy and Inflammation. *J Investig Allergol Clin Immunol.* déc 2018;28(6):365-78.
41. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* nov 2001;1(2):108-16.
42. Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2011;242(1):205-19.
43. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol.* 2018;11(1):21-34.
44. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2007;120(6):1279-84.
45. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* janv 2011;12(1):21-7.
46. Castillo EF, Zheng H, Yang XO. Orchestration of epithelial-derived cytokines and innate immune cells in allergic airway inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;39:19-25.
47. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 16 oct 2018;49(4):595-613.
48. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* juin 2017;17(6):349-62.
49. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2015;35(6):1306-16.
50. Carlin LM, Stamatides EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell.* 11 avr 2013;153(2):362-75.
51. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.* 17 avr 2009;324(5925):392-7.
52. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 24 janv 2013;38(1):79-91.

53. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol.* 1 janv 2011;30(1):16-34.
54. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 14 oct 2011;11(11):723-37.
55. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 17 juill 2014;41(1):21-35.
56. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu Q-L, Gao P. Macrophage Polarization and Allergic Asthma. *Transl Res J Lab Clin Med.* janv 2018;191:1-14.
57. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
58. Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J Transl Med.* 15 2017;15(1):36.
59. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 1 mars 2012;122(3):787-95.
60. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 nov 2009;183(10):6469-77.
61. Dasgupta P, Keegan AD. Contribution of Alternatively Activated Macrophages to Allergic Lung Inflammation: A Tale of Mice and Men. *J Innate Immun.* août 2012;4(5-6):478-88.
62. Girodet P-O, Nguyen D, Mancini JD, Hundal M, Zhou X, Israel E, et al. Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* oct 2016;55(4):467-75.
63. Goleva E, Hauk PJ, Hall CF, Liu AH, Riches DWH, Martin RJ, et al. Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2008;122(3):550-559.e3.
64. Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med.* 16 févr 2006;354(7):697-708.
65. Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, et al. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest.* févr 2008;133(2):420-6.
66. Kim Y-K, Oh S-Y, Jeon SG, Park H-W, Lee S-Y, Chun E-Y, et al. Airway Exposure Levels of Lipopolysaccharide Determine Type 1 versus Type 2 Experimental Asthma. *J Immunol.* 15 avr 2007;178(8):5375-82.
67. Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front Pharmacol.* 2013;4:46.
68. Hassani M, Koenderman L. Immunological and hematological effects of IL-5(R α)-targeted therapy: An overview. *Allergy.* 2018;73(10):1979-88.

69. Bakakos A, Loukides S, Bakakos P. Severe Eosinophilic Asthma. *J Clin Med.* 2 sept 2019;8(9).
70. Nakagome K, Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol.* 2018;9:2220.
71. Decot V, Capron M. [Eosinophils: structure and functions]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. janv 2006;35(1 Pt 2):113-24.
72. MacKenzie JR, Mattes J, Dent LA, Foster PS. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 sept 2001;167(6):3146-55.
73. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem.* 20 juin 2014;289(25):17406-15.
74. Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest.* avr 1993;91(4):1314-8.
75. Kariyawasam HH, Robinson DS. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Curr Opin Immunol.* déc 2007;19(6):681-6.
76. Venge P. The eosinophil and airway remodelling in asthma. *Clin Respir J.* mai 2010;4 Suppl 1:15-9.
77. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* nov 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
78. Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2014;133(6):1557-1563.e5.
79. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* mars 2000;161(3 Pt 1):769-74.
80. Lavinskiene S, Bajoriuniene I, Malakauskas K, Jeroch J, Sakalauskas R. Sputum neutrophil count after bronchial allergen challenge is related to peripheral blood neutrophil chemotaxis in asthma patients. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* nov 2014;63(11):951-9.
81. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma--a review. *Respir Physiol Neurobiol.* avr 2015;209:13-6.
82. Pothoven KL, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Harris KE, Biyasheva A, et al. Neutrophils are a major source of the epithelial barrier disrupting cytokine oncostatin M in patients with mucosal airways disease. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2017;139(6):1966-1978.e9.
83. Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedán A, Tsourouktsoglou T-D, Ching YM, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type 2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med.* juin 2017;23(6):681-91.
84. Barbaro MPF, Spanevello A, Palladino GP, Salerno FG, Lacedonia D, Carpagnano GE. Exhaled matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in different biological phenotypes of asthma. *Eur J Intern Med.* janv 2014;25(1):92-6.

85. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, et al. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. févr 1998;157(2):505-11.
86. Ventura I, Vega A, Chacón P, Chamorro C, Aroca R, Gómez E, et al. Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy*. juill 2014;69(7):898-905.
87. Koga H, Miyahara N, Fuchimoto Y, Ikeda G, Waseda K, Ono K, et al. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir Res*. 24 janv 2013;14:8.
88. Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, et al. Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. déc 2004;287(6):L1293-1302.
89. Ray A, Kolls JK. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol*. 2017;38(12):942-54.
90. Ronchetti S, Ricci E, Migliorati G, Gentili M, Riccardi C. How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. *Int J Mol Sci*. 17 déc 2018;19(12).
91. Magombedze G, Reddy PBJ, Eda S, Ganusov VV. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front Physiol*. 2013;4:206.
92. Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Curr Opin Immunol*. déc 2012;24(6):700-6.
93. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol*. 11 sept 2018
94. Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol*. nov 2013;34(11):521-30.
95. Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol Rev*. 2017;278(1):145-61.
96. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. mars 2008;8(3):183-92.
97. Saatian B, Rezaee F, Desando S, Emo J, Chapman T, Knowlden S, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 cause barrier dysfunction in human airway epithelial cells. *Tissue Barriers*. 1 avr 2013;1(2):e24333.
98. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. sept 2001;108(3):430-8.
99. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, et al. TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1 mai 2009;123(5):1185-7.
100. Barczyk A, Pierzchala W, Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med*. 1 juin 2003;97(6):726-33.

101. Chien J-W, Lin C-Y, Yang KD, Lin C-H, Kao J-K, Tsai Y-G. Increased IL-17A secreting CD4+ T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. sept 2013;43(9):1018-26.
102. Pène J, Chevalier S, Preisser L, Vénéreau E, Guilleux M-H, Ghannam S, et al. Chronically Inflamed Human Tissues Are Infiltrated by Highly Differentiated Th17 Lymphocytes. *J Immunol*. 1 juin 2008;180(11):7423-30.
103. Chesné J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in severe asthma. Where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2014;190(10):1094-101.
104. Loubaki L, Hadj-Salem I, Fakhfakh R, Jacques E, Plante S, Boisvert M, et al. Co-culture of human bronchial fibroblasts and CD4+ T cells increases Th17 cytokine signature. *PloS One*. 2013;8(12):e81983.
105. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 sept 2008;181(6):4089-97.
106. van Rensen ELJ, Sont JK, Evertse CE, Willems LNA, Mauad T, Hiemstra PS, et al. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 oct 2005;172(7):837-41.
107. Hilvering B, Hinks T, Stöger L, Marchi E, Salimi M, Shrimanker R, et al. Synergistic activation of pro-inflammatory type-2 CD8+ T lymphocytes by lipid mediators in severe eosinophilic asthma. *Mucosal Immunol*. sept 2018;11(5):1408-19.
108. Chung EH, Jia Y, Ohnishi H, Takeda K, Leung DYM, Sutherland ER, et al. LeukotrieneB4 receptor 1 is Differentially Expressed on Peripheral T Cells of Steroid-Sensitive and -Resistant Asthmatics. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. mars 2014;112(3):211-216.e1.
109. Ohnishi H, Miyahara N, Dakhama A, Takeda K, Mathis S, Haribabu B, et al. Corticosteroids enhance CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and allergic inflammation by upregulating leukotriene B4 receptor 1. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2008;121(4):864-871.e4.
110. Mittrücker H-W, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. déc 2014;62(6):449-58.
111. Cho S-H, Stanciu LA, Begishvili T, Bates PJ, Holgate ST, Johnston SL. Peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell type 1 and type 2 cytokine production in atopic asthmatic and normal subjects. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. mars 2002;32(3):427-33.
112. Magnan AO, Mély LG, Camilla CA, Badier MM, Montero-Julian FA, Guillot CM, et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. juin 2000;161(6):1790-6.
113. Shirai T, Inui N, Suda T, Chida K. Correlation between peripheral blood T-cell profiles and airway inflammation in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. sept 2006;118(3):622-6.
114. Grob M, Schmid-Grendelmeier P, Joller-Jemelka HI, Ludwig E, Dubs RW, Grob PJ, et al. Altered intracellular expression of the chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta and IL-8 by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in mild allergic asthma. *Allergy*. mars 2003;58(3):239-45.

115. Cho S-H, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 févr 2005;171(3):224-30.
116. Sawicka E, Noble A, Walker C, Kemeny DM. Tc2 cells respond to soluble antigen in the respiratory tract and induce lung eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Immunol.* 2004;34(9):2599-608.
117. Miyahara N, Takeda K, Kodama T, Joetham A, Taube C, Park J-W, et al. Contribution of Antigen-Primed CD8+ T Cells to the Development of Airway Hyperresponsiveness and Inflammation Is Associated with IL-13. *J Immunol.* 15 févr 2004;172(4):2549-58.
118. Stanciu LA, Shute J, Promwong C, Holgate ST, Djukanović R. Increased levels of IL-4 in CD8+ T cells in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* sept 1997;100(3):373-8.
119. Stoeckle C, Simon H-U. CD8(+) T cells producing IL-3 and IL-5 in non-IgE-mediated eosinophilic diseases. *Allergy.* déc 2013;68(12):1622-5.
120. Gelfand EW, Joetham A, Wang M, Takeda K, Schedel M. Spectrum of T Lymphocyte Activities Regulating Allergic Lung Inflammation. *Immunol Rev.* juill 2017;278(1):63-86.
121. Gelfand EW, Hinks TSC. Is there a role for type 2 CD8+ T cells in patients with steroid-resistant asthma? *J Allergy Clin Immunol.* sept 2019;144(3):648-50.
122. Hinks TSC, Hoyle RD, Gelfand EW. CD8+ Tc2 cells: underappreciated contributors to severe asthma. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 31 déc 2019;28(154).
123. Srenathan U, Steel K, Taams LS. IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol Lett.* oct 2016;178:20-6.
124. Li K, Wang Z, Cao Y, Bunjhoo H, Zhu J, Chen Y, et al. The study of the ratio and distribution of Th17 cells and Tc17 cells in asthmatic patients and the mouse model. *Asian Pac J Allergy Immunol.* juin 2013;31(2):125-31.
125. Li P, Yang Q-Z, Wang W, Zhang G-Q, Yang J. Increased IL-4- and IL-17-producing CD8+ cells are related to decreased CD39+CD4+Foxp3+ cells in allergic asthma. *J Asthma Off J Assoc Care Asthma.* 2018;55(1):8-14.
126. Shibata K. Close link between development and function of gamma-delta T cells. *Microbiol Immunol.* avr 2012;56(4):217-27.
127. Zuany-Amorim C, Ruffié C, Hailé S, Vargaftig BB, Pereira P, Pretolani M. Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation. *Science.* 22 mai 1998;280(5367):1265-7.
128. Kanehiro A, Lahn M, Mäkelä MJ, Dakhama A, Fujita M, Joetham A, et al. Tumor Necrosis Factor- α Negatively Regulates Airway Hyperresponsiveness through $\gamma\delta$ T Cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 déc 2001;164(12):2229-38.
129. Glanville N, Message SD, Walton RP, Pearson RM, Parker HL, Laza-Stanca V, et al. $\gamma\delta$ T cells suppress inflammation and disease during rhinovirus-induced asthma exacerbations. *Mucosal Immunol.* nov 2013;6(6):1091-100.
130. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The production of IgE. *Immunobiol Immune Syst Health Dis 5th Ed*
131. Bao Y, Cao X. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J Autoimmun.* déc 2014;55:10-23.

132. Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 déc 2005;175(11):7103-7.
133. Lindell DM, Berlin AA, Schaller MA, Lukacs NW. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PLoS One*. 3 sept 2008;3(9):e3129.
134. Rijavec M, Volarevic S, Osolnik K, Kosnik M, Korosec P. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respir Med*. oct 2011;105 Suppl 1:S20-25.
135. Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. mai 2003;9(5):582-8.
136. Woo YD, Koh J, Kang H-R, Kim HY, Chung DH. The invariant natural killer T cell-mediated chemokine X-C motif chemokine ligand 1-X-C motif chemokine receptor 1 axis promotes allergic airway hyperresponsiveness by recruiting CD103+ dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(6):1781-1792.e12.
137. Koh Y-I, Shim J-U. Association between sputum natural killer T cells and eosinophilic airway inflammation in human asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(3):239-48.
138. Pham-Thi N, de Blic J, Le Bourgeois M, Dy M, Scheinmann P, Leite-de-Moraes MC. Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2006;117(1):217-8.
139. Vijayanand P, Seumois G, Pickard C, Powell RM, Angco G, Sammut D, et al. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 5 avr 2007;356(14):1410-22.
140. McKnight CG, Morris SC, Perkins C, Zhu Z, Hildeman DA, Bendelac A, et al. NKT cells contribute to basal IL-4 production but are not required to induce experimental asthma. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188221.
141. Das J, Eynott P, Jupp R, Bothwell A, Kaer LV, Shi Y, et al. Natural killer T cells and CD8+ T cells are dispensable for T cell-dependent allergic airway inflammation. *Nat Med*. déc 2006;12(12):1345-6.
142. Marqués-García F, Marcos-Vadillo E. Review of Mouse Models Applied to the Study of Asthma. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2016;1434:213-22.
143. Rydell-Törmänen K, Johnson JR. The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. *Mouse Cell Cult*. 9 nov 2018;1940:3-22.
144. Kianmeher M, Ghorani V, Boskabady MH. Animal Model of Asthma, Various Methods and Measured Parameters: A Methodological Review. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2016;445-65.
145. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of IL-4- or IL-13-Mediated Signaling. *J Immunol*. 15 déc 1999;163(12):6448-54.
146. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. sept 2011;32(9):402-11.

147. Gubernatorova EO, Namakanova OA, Tumanov AV, Drutskaya MS, Nedospasov SA. Mouse models of severe asthma for evaluation of therapeutic cytokine targeting. *Immunol Lett.* 2019;207:73-83.
148. Tsuda A, Henry FS, Butler JP. Particle transport and deposition: basic physics of particle kinetics. *Compr Physiol.* oct 2013;3(4):1437-71.
149. Nemmar A, Holme JA, Rosas I, Schwarze PE, Alfaro-Moreno E. Recent Advances in Particulate Matter and Nanoparticle Toxicology: A Review of the In Vivo and In Vitro Studies. *BioMed Res Int*
150. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A.* 25 oct 2002;65(20):1513-30.
151. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* juin 2004;16(6-7):437-45.
152. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* 14 août 2006;3:11.
153. Raes F, Dingenen RV, Vignati E, Wilson J, Putaud J-P, Seinfeld JH, et al. Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmos Environ.* 26 juill 2000;34(25):4215-40.
154. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol.* 2016;7:3.
155. Kelly FJ, Fussell JC. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos Environ.* 1 déc 2012;60:504-26.
156. Kim K-H, Kabir E, Kabir S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int.* janv 2015;74:136-43.
157. Alleman LY, Lamaison L, Perdrix E, Robache A, Galloo J-C. PM10 metal concentrations and source identification using positive matrix factorization and wind sectoring in a French industrial zone. *Atmospheric Res.* 1 juin 2010;96(4):612-25.
158. Yang X, Jiang L, Zhao W, Xiong Q, Zhao W, Yan X. Comparison of Ground-Based PM2.5 and PM10 Concentrations in China, India, and the U.S. *Int J Environ Res Public Health.* 02 2018;15(7).
159. Kwon H-S, Ryu MH, Carlsten C. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Exp Mol Med.* mars 2020;52(3):318-28.
160. Union PO of the E. Industrial emissions of nano- and ultrafine particles : final report. 2013
161. Calderón-Garcidueñas L, González-Maciel A, Mukherjee PS, Reynoso-Robles R, Pérez-Guillé B, Gayosso-Chávez C, et al. Combustion- and friction-derived magnetic air pollution nanoparticles in human hearts. *Environ Res.* 1 sept 2019;176:108567.
162. Li N, Georas S, Alexis N, Fritz P, Xia T, Williams MA, et al. A Work Group Report on Ultrafine Particles (AAAAI) Why Ambient Ultrafine and Engineered Nanoparticles Should Receive Special Attention for Possible Adverse Health Outcomes in Humans. *J Allergy Clin Immunol.* août 2016;138(2):386-96.

163. Perez L, Tobías A, Querol X, Pey J, Alastuey A, Díaz J, et al. Saharan dust, particulate matter and cause-specific mortality: a case-crossover study in Barcelona (Spain). *Environ Int.* 1 nov 2012;48:150-5.
164. Guaita R, Pichiule M, Maté T, Linares C, Díaz J. Short-term impact of particulate matter (PM_{2.5}) on respiratory mortality in Madrid. *Int J Environ Health Res.* août 2011;21(4):260-74.
165. Halonen JI, Lanki T, Yli-Tuomi T, Tiittanen P, Kulmala M, Pekkanen J. Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly. *Epidemiol Camb Mass.* janv 2009;20(1):143-53.
166. Janssen N a. H, Fischer P, Marra M, Ameling C, Cassee FR. Short-term effects of PM_{2.5}, PM₁₀ and PM_{2.5-10} on daily mortality in The Netherlands. *Sci Total Environ.* 1 oct 2013;463-464:20-6.
167. Zanobetti A, Schwartz J. The Effect of Fine and Coarse Particulate Air Pollution on Mortality: A National Analysis. *Environ Health Perspect.* juin 2009;117(6):898-903.
168. Stölzel M, Breitner S, Cyrys J, Pitz M, Wölke G, Kreyling W, et al. Daily mortality and particulate matter in different size classes in Erfurt, Germany. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* août 2007;17(5):458-67.
169. Wellenius GA, Bateson TF, Mittleman MA, Schwartz J. Particulate Air Pollution and the Rate of Hospitalization for Congestive Heart Failure among Medicare Beneficiaries in Pittsburgh, Pennsylvania. *Am J Epidemiol.* 1 juin 2005;161(11):1030-6.
170. Zanobetti A, Schwartz J. The Effect of Particulate Air Pollution on Emergency Admissions for Myocardial Infarction: A Multicity Case-Crossover Analysis. *Environ Health Perspect.* août 2005;113(8):978-82.
171. Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, et al. Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admission for Cardiovascular and Respiratory Diseases. *JAMA J Am Med Assoc.* 8 mars 2006;295(10):1127-34.
172. Bai L, Weichenthal S, Kwong JC, Burnett RT, Hatzopoulou M, Jerrett M, et al. Associations of Long-Term Exposure to Ultrafine Particles and Nitrogen Dioxide With Increased Incidence of Congestive Heart Failure and Acute Myocardial Infarction. *Am J Epidemiol.* 01 2019;188(1):151-9.
173. Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 20 mars 2002;39(6):935-42.
174. Johnston FH, Bailie RS, Pilotto LS, Hanigan IC. Ambient biomass smoke and cardiorespiratory hospital admissions in Darwin, Australia. *BMC Public Health.* 13 sept 2007;7:240.
175. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med.* avr 1997;155(4):1376-83.
176. von Klot S, Wölke G, Tuch T, Heinrich J, Dockery DW, Schwartz J, et al. Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J.* sept 2002;20(3):691-702.
177. Díaz-Robles LA, Fu JS, Vergara-Fernández A, Etcharren P, Schiappacasse LN, Reed GD, et al. Health risks caused by short term exposure to ultrafine particles generated by

- residential wood combustion: a case study of Temuco, Chile. *Environ Int.* mai 2014;66:174-81.
178. Tecer LH, Alagha O, Karaca F, Tuncel G, Eldes N. Particulate matter (PM(2.5), PM(10-2.5), and PM(10)) and children's hospital admissions for asthma and respiratory diseases: a bidirectional case-crossover study. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(8):512-20.
 179. Laurent O, Hu J, Li L, Cockburn M, Escobedo L, Kleeman MJ, et al. Sources and contents of air pollution affecting term low birth weight in Los Angeles County, California, 2001-2008. *Environ Res.* oct 2014;134:488-95.
 180. Zanobetti A, Schwartz J. Are diabetics more susceptible to the health effects of airborne particles? *Am J Respir Crit Care Med.* 1 sept 2001;164(5):831-3.
 181. Sun Y, Song X, Han Y, Ji Y, Gao S, Shang Y, et al. Size-fractioned ultrafine particles and black carbon associated with autonomic dysfunction in subjects with diabetes or impaired glucose tolerance in Shanghai, China. *Part Fibre Toxicol.* 25 mars 2015;12:8.
 182. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth.* sept 2015;59(9):533-41.
 183. Amador C, Weber C, Varacallo M. Anatomy, Thorax, Bronchial. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls*
 184. Darquenne C. Aerosol deposition in health and disease. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* juin 2012;25(3):140-7.
 185. Elder A, Nordberg GF, Kleinman M. Chapter 3 - Routes of Exposure, Dose, and Toxicokinetics of Metals**This chapter is based on the chapter Routes of Exposure, Dose, and Metabolism of Metals by W.S. Beckett, G.F. Nordberg, and T.W. Clarkson in the third edition of this handbook. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, éditeurs. *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015
 186. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect.* juill 2005;113(7):823-39.
 187. Majid H, Madl P. Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases Part-I. *theHealth.* 4 mai 2011;2:51-6.
 188. Kim CS, Kang TC. Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. *Am J Respir Crit Care Med.* mars 1997;155(3):899-905.
 189. McConnell R, Berhane K, Yao L, Jerrett M, Lurmann F, Gilliland F, et al. Traffic, susceptibility, and childhood asthma. *Environ Health Perspect.* mai 2006;114(5):766-72.
 190. Venn AJ, Lewis SA, Cooper M, Hubbard R, Britton J. Living near a main road and the risk of wheezing illness in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 déc 2001;164(12):2177-80.
 191. Bouazza N, Foissac F, Urien S, Guedj R, Carbajal R, Tréluyer J-M, et al. Fine particulate pollution and asthma exacerbations. *Arch Dis Child.* 2018;103(9):828-31.
 192. Li Q, Yi Q, Tang L, Luo S, Tang Y, Zhang G, et al. Influence of Ultrafine Particles Exposure on Asthma Exacerbation in Children: A Meta-Analysis. *Curr Drug Targets.* 2019;20(4):412-20.

193. Gehring U, Beelen R, Eeftens M, Hoek G, de Hoogh K, de Jongste JC, et al. Particulate Matter Composition and Respiratory Health: The PIAMA Birth Cohort Study. *Epidemiology*. mai 2015;26(3):300–309.
194. Carlsten C, Dybuncio A, Becker A, Chan-Yeung M, Brauer M. Traffic-related air pollution and incident asthma in a high-risk birth cohort. *Occup Environ Med*. avr 2011;68(4):291-5.
195. Khreis H, Kelly C, Tate J, Parslow R, Lucas K, Nieuwenhuijsen M. Exposure to traffic-related air pollution and risk of development of childhood asthma: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int*. 1 mars 2017;100:1-31.
196. Mei M, Song H, Chen L, Hu B, Bai R, Xu D, et al. Early-life exposure to three size-fractionated ultrafine and fine atmospheric particulates in Beijing exacerbates asthma development in mature mice. *Part Fibre Toxicol*. 14 2018;15(1):13.
197. Hehua Z, Qing C, Shanyan G, Qijun W, Yuhong Z. The impact of prenatal exposure to air pollution on childhood wheezing and asthma: A systematic review. *Environ Res*. 2017;159:519-30.
198. Sharkhuu T, Doerfler DL, Krantz QT, Luebke RW, Linak WP, Gilmour MI. Effects of prenatal diesel exhaust inhalation on pulmonary inflammation and development of specific immune responses. *Toxicol Lett*. 16 juin 2010;196(1):12-20.
199. Yoshida S, Takano H, Nishikawa M, Miao H, Ichinose T. Effects of fetal exposure to urban particulate matter on the immune system of male mouse offspring. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(8):1238-43.
200. Zheng X, Ding H, Jiang L, Chen S, Zheng J, Qiu M, et al. Association between Air Pollutants and Asthma Emergency Room Visits and Hospital Admissions in Time Series Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138146.
201. Weinmayr G, Romeo E, De Sario M, Weiland SK, Forastiere F. Short-Term Effects of PM10 and NO2 on Respiratory Health among Children with Asthma or Asthma-like Symptoms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect*. avr 2010;118(4):449-57.
202. Zhang S, Li G, Tian L, Guo Q, Pan X. Short-term exposure to air pollution and morbidity of COPD and asthma in East Asian area: A systematic review and meta-analysis. *Environ Res*. juill 2016;148:15-23.
203. Möller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, et al. Deposition, Retention, and Translocation of Ultrafine Particles from the Central Airways and Lung Periphery. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2008;177(4):426-32.
204. Kawanaka Y, Tsuchiya Y, Yun S-J, Sakamoto K. Size Distributions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Atmosphere and Estimation of the Contribution of Ultrafine Particles to Their Lung Deposition. *Environ Sci Technol*. 1 sept 2009;43(17):6851-6.
205. Evans KA, Halterman JS, Hopke PK, Fagnano M, Rich DQ. Increased ultrafine particles and carbon monoxide concentrations are associated with asthma exacerbation among urban children. *Environ Res*. févr 2014;129:11-9.
206. Lavigne E, Donelle J, Hatzopoulou M, Van Ryswyk K, van Donkelaar A, Martin RV, et al. Spatiotemporal Variations in Ambient Ultrafine Particles and the Incidence of Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 2019;199(12):1487-95.

207. Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Pet.* 1 mars 2016;25(1):107-23.
208. Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ.* 1 avr 2008;42(13):2895-921.
209. Marr LC, Kirchstetter TW, Harley RA, Miguel AH, Hering SV, Hammond SK. Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Motor Vehicle Fuels and Exhaust Emissions. *Environ Sci Technol.* 1 sept 1999;33(18):3091-9.
210. Jaffrezo JL, Clain MP, Masclat P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the polar ice of greenland. Geochemical use of these atmospheric tracers. *Atmos Environ.* 1 avr 1994;28(6):1139-45.
211. Orazi MM, Arias AH, Oliva AL, Ronda AC, Marcovecchio JE. Characterization of atmospheric and soil polycyclic aromatic hydrocarbons and evaluation of air-soil relationship in the Southwest of Buenos Aires province (Argentina). *Chemosphere.* 1 févr 2020;240:124847.
212. Kakimoto H, Kitamura M, Matsumoto Y, Sakai S, Kanoh F, Murahashi T, et al. Comparison of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Kanazawa, Sapporo and Tokyo. *J Health Sci.* 2000;46(1):5-15.
213. Junker M, Kasper M, Rössli M, Camenzind M, Künzli N, Monn Ch, et al. Airborne particle number profiles, particle mass distributions and particle-bound PAH concentrations within the city environment of Basel: an assessment as part of the BRISKA Project. *Atmos Environ.* 1 janv 2000;34(19):3171-81.
214. Eiguren-Fernandez A, Miguel AH, Froines JR, Thurairatnam S, Avol EL. Seasonal and Spatial Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vapor-Phase and PM_{2.5} in Southern California Urban and Rural Communities. *Aerosol Sci Technol.* 1 mai 2004;38(5):447-55.
215. Allen JO, Dookeran NM, Taghizadeh K, Lafleur AL, Smith KA, Sarofim AF. Measurement of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with a Size-Segregated Urban Aerosol. *Environ Sci Technol.* 1 juill 1997;31(7):2064-70.
216. Allen JO, Dookeran NM, Smith KA, Sarofim AF, Taghizadeh K, Lafleur AL. Measurement of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Size-Segregated Atmospheric Aerosols in Massachusetts. *Environ Sci Technol.* 1 févr 1996;30(3):1023-31.
217. Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water Air Soil Pollut.* 1 déc 1991;60(3):279-300.
218. Alexandrov K, Rojas M, Satarug S. The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicol Lett.* 15 sept 2010;198(1):63-8.
219. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *J Biol Chem.* 6 avr 2004;279(23):23847-50.
220. Stockinger B, Meglio PD, Gialitakis M, Duarte JH. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *Annu Rev Immunol.* 21 mars 2014;32(1):403-32.

221. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53. *Science*. 18 oct 1996;274(5286):430-2.
222. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. déc 2018;7:1-9.
223. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity. *Pharmacol Rev*. oct 2013;65(4):1148-61.
224. IARC. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1–42
225. Miller RL, Garfinkel R, Horton M, Camann D, Perera FP, Whyatt RM, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke, and respiratory symptoms in an inner-city birth cohort. *Chest*. oct 2004;126(4):1071-8.
226. Gale SL, Noth EM, Mann J, Balmes J, Hammond SK, Tager IB. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and wheeze in a cohort of children with asthma in Fresno, CA. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. juill 2012;22(4):386-92.
227. Wang I-J, Karmaus WJJ, Yang C-C. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. *Int Arch Occup Environ Health*. avr 2017;90(3):297-303.
228. Han Y-Y, Rosser F, Forno E, Celedón JC. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, vitamin D, and lung function in children with asthma. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(10):1362-8.
229. Tobiszewski M, Namieśnik J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. mars 2012;162:110-9.
230. Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol*. janv 1995;95(1 Pt 1):103-15.
231. Fahy O, Hammad H, Sénéchal S, Pestel J, Tonnel AB, Wallaert B, et al. Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the map kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. août 2000;23(2):247-54.
232. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Sagai M, et al. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. nov 1998;102(5):771-82.
233. Kim BG, Lee PH, Lee SH, Kim YE, Shin MY, Kang Y, et al. Long-Term Effects of Diesel Exhaust Particles on Airway Inflammation and Remodeling in a Mouse Model. *Allergy Asthma Immunol Res*. mai 2016;8(3):246-56.
234. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. nov 2013;132(5):1194-1204.e2.
235. Acciani TH, Brandt EB, Khurana Hershey GK, Le Cras TD. Diesel exhaust particle exposure increases severity of allergic asthma in young mice. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. déc 2013;43(12):1406-18.

236. Brandt EB, Biagini Myers JM, Acciani TH, Ryan PH, Sivaprasad U, Ruff B, et al. Exposure to allergen and diesel exhaust particles potentiates secondary allergen-specific memory responses, promoting asthma susceptibility. *J Allergy Clin Immunol.* août 2015;136(2):295-303.e7.
237. Wang E, Liu X, Tu W, Do DC, Yu H, Yang L, et al. Benzo(a)pyrene facilitates dermatophagoides group 1 (Der f 1)-induced epithelial cytokine release through aryl hydrocarbon receptor in asthma. *Allergy.* 2019;74(9):1675-90.
238. Yanagisawa R, Koike E, Win-Shwe T-T, Ichinose T, Takano H. Low-dose benzo[a]pyrene aggravates allergic airway inflammation in mice. *J Appl Toxicol JAT.* 2016;36(11):1496-504.
239. Tajima H, Tajiki-Nishino R, Watanabe Y, Kurata K, Fukuyama T. Activation of aryl hydrocarbon receptor by benzo[a]pyrene increases interleukin 33 expression and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *J Appl Toxicol*
240. Weng C-M, Wang C-H, Lee M-J, He J-R, Huang H-Y, Chao M-W, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation by diesel exhaust particles mediates epithelium-derived cytokines expression in severe allergic asthma. *Allergy.* 2018;73(11):2192-204.
241. Wong PS, Vogel CF, Kokosinski K, Matsumura F. Arylhydrocarbon Receptor Activation in NCI-H441 Cells and C57BL/6 Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* févr 2010;42(2):210-7.
242. Castañeda AR, Vogel CFA, Bein KJ, Hughes HK, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Ambient particulate matter enhances the pulmonary allergic immune response to house dust mite in a BALB/c mouse model by augmenting Th2- and Th17-immune responses. *Physiol Rep.* 2018;6(18):e13827.
243. Castañeda AR, Pinkerton KE, Bein KJ, Magaña-Méndez A, Yang HT, Ashwood P, et al. Ambient particulate matter activates the aryl hydrocarbon receptor in dendritic cells and enhances Th17 polarization. *Toxicol Lett.* août 2018;292:85-96.
244. Wong T-H, Lee C-L, Su H-H, Lee C-L, Wu C-C, Wang C-C, et al. A prominent air pollutant, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, enhances allergic lung inflammation via aryl hydrocarbon receptor. *Sci Rep*
245. Xia M, Harb H, Saffari A, Sioutas C, Chatila TA. A Jagged 1–Notch 4 molecular switch mediates airway inflammation induced by ultrafine particles. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2018;142(4):1243-1256.e17.
246. Belade E, Armand L, Martinon L, Kheuang L, Fleury-Feith J, Baeza-Squiban A, et al. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* févr 2012;26(1):57-66.
247. Platts-Mills TAE. The allergy epidemics: 1870-2010. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2015;136(1):3-13.
248. Zhang J, Fulgar CC, Mar T, Young DE, Zhang Q, Bein KJ, et al. TH17-Induced Neutrophils Enhance the Pulmonary Allergic Response Following BALB/c Exposure to House Dust Mite Allergen and Fine Particulate Matter From California and China. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 01 2018;164(2):627-43.
249. Chen S, Yin R, Mutze K, Yu Y, Takenaka S, Königshoff M, et al. No involvement of alveolar macrophages in the initiation of carbon nanoparticle induced acute lung inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol.* 21 2016;13(1):33.

250. Mukae H, Hogg JC, English D, Vincent R, Van Eeden SF. Phagocytosis of particulate air pollutants by human alveolar macrophages stimulates the bone marrow. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 1 nov 2000;279(5):L924-31.
251. Huang Y-CT, Li Z, Harder SD, Soukup JM. Apoptotic and Inflammatory Effects Induced by Different Particles in Human Alveolar Macrophages. *Inhal Toxicol*. 1 janv 2004;16(14):863-78.
252. Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 déc 2011;257(2):209-26.
253. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, et al. Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice. *Respir Res*. 2005;6(1):106.
254. Haar CD, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1469-79.
255. de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. oct 2005;87(2):409-18.
256. Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, Zhang Q, Bramble LA, Lewandowski RP, et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol*. 1 juill 2013;10:26.
257. Rossi EM, Pykkänen L, Koivisto AJ, Nykäsenoja H, Wolff H, Savolainen K, et al. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol*. 25 nov 2010;7:35.
258. Park HS, Kim KH, Jang S, Park JW, Cha HR, Lee JE, et al. Attenuation of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:505-15.
259. Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, et al. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2006;117(4):824-30.
260. Randall TA, London RE, Fitzgerald MC, Mueller GA. Proteases of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int J Mol Sci*
261. King C, Brennan S, Thompson PJ, Stewart GA. Dust Mite Proteolytic Allergens Induce Cytokine Release from Cultured Airway Epithelium. *J Immunol*. 1 oct 1998;161(7):3645-51.
262. Lindner K, Webering S, Stroebele M, Bockhorn H, Hansen T, König P, et al. Low Dose Carbon Black Nanoparticle Exposure Does Not Aggravate Allergic Airway Inflammation in Mice Irrespective of the Presence of Surface Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Nanomater Basel Switz*. 31 mars 2018;8(4).
263. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Abe S, Yoshino S, et al. Effects of Nanoparticles on Lung Physiology in the Presence or Absence of Antigen. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 1 oct 2007;20(4):737-44.
264. Ramírez-Lee MA, Rosas-Hernández H, Salazar-García S, Gutiérrez-Hernández JM, Espinosa-Tanguma R, González FJ, et al. Silver nanoparticles induce anti-proliferative

- effects on airway smooth muscle cells. Role of nitric oxide and muscarinic receptor signaling pathway. *Toxicol Lett.* 13 janv 2014;224(2):246-56.
265. Berntsen P, Park CY, Rothen-Rutishauser B, Tsuda A, Sager TM, Molina RM, et al. Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. *J R Soc Interface.* 6 juin 2010;7 Suppl 3:S331-340.
266. Turan N, Edwards MJ, Bates S, Shaw D, Chung KF, Loza MJ, et al. IL-6 pathway upregulation in subgroup of severe asthma is associated with neutrophilia and poor lung function. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2018;48(4):475-8.
267. Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JAB, Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy CMA.* 28 mars 2006;4:5.
268. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* oct 2014
269. Jiang S, Wang Q, Wang Y, Song X, Zhang Y. Blockade of CCL2/CCR2 signaling pathway prevents inflammatory monocyte recruitment and attenuates OVA-Induced allergic asthma in mice. *Immunol Lett.* 2019;214:30-6.
270. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 1 janv 2003;24(1):25-9.
271. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation. *Immunity.* 1 juin 2001;14(6):705-14.
272. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity.* 1 mars 1997;6(3):315-25.
273. Hodge S, Hodge G, Simpson JL, Yang IA, Upham J, James A, et al. Blood cytotoxic/inflammatory mediators in non-eosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* janv 2016;46(1):60-70.
274. Pfeffer PE, Ho TR, Mann EH, Kelly FJ, Sehlstedt M, Pourazar J, et al. Urban particulate matter stimulation of human dendritic cells enhances priming of naive CD8 T lymphocytes. *Immunology.* avr 2018;153(4):502-12.
275. Koike E, Takano H, Inoue KI, Yanagisawa R, Sakurai M, Aoyagi H, et al. Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles increases the number of antigen-presenting cells in murine lung. *Int J Immunopathol Pharmacol.* mars 2008;21(1):35-42.
276. Podechard N, Lecureur V, Le Ferrec E, Guenon I, Sparfel L, Gilot D, et al. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett.* 15 mars 2008;177(2):130-7.
277. Wu L, Rodríguez-Rodríguez C, Cun D, Yang M, Saatchi K, Häfeli UO. Quantitative comparison of three widely-used pulmonary administration methods in vivo with radiolabeled inhalable nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* juill 2020;152:108-15.
278. Carosino CM, Bein KJ, Plummer LE, Castañeda AR, Zhao Y, Wexler AS, et al. Allergic airway inflammation is differentially exacerbated by daytime and nighttime ultrafine and

submicron fine ambient particles: heme oxygenase-1 as an indicator of PM-mediated allergic inflammation. *J Toxicol Environ Health A*. 2015;78(4):254-66.

279. Li N, Wang M, Bramble LA, Schmitz DA, Schauer JJ, Sioutas C, et al. The Adjuvant Effect of Ambient Particulate Matter Is Closely Reflected by the Particulate Oxidant Potential. *Environ Health Perspect*. juill 2009;117(7):1116-23.
280. Kharazian B, Hadipour NL, Ejtehadi MR. Understanding the nanoparticle–protein corona complexes using computational and experimental methods. *Int J Biochem Cell Biol*. 1 juin 2016;75:162-74.
281. Chen T-T, Chuang K-J, Chiang L-L, Chen C-C, Yeh C-T, Wang L-S, et al. Characterization of the interactions between protein and carbon black. *J Hazard Mater*. 15 janv 2014;264:127-35.
282. Reisetter AC, Stebounova LV, Baltrusaitis J, Powers L, Gupta A, Grassian VH, et al. Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *J Biol Chem*. 17 juin 2011;286(24):21844-52.
283. Tan H-TT, Hagner S, Ruchti F, Radzikowska U, Tan G, Altunbulakli C, et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy*. 2019;74(2):294-307.

ANNEXES

**Chronic exposure to benzo(a)pyrene-coupled nanoparticles
worsens inflammation in a mite-induced asthma mouse
model**

Journal:	<i>Allergy</i>
Manuscript ID	ALL-2020-00679
Wiley - Manuscript type:	Letter to the Editor
Date Submitted by the Author:	28-May-2020
Complete List of Authors:	Carrard, Julie; INSERM U1019, Pulmonary Immunity Marquillies, Philippe; INSERM U1019, Team pulmonary Immunity Pichavant, Muriel; INSERM U1019-CNRS UMR8204 - CIIL, Institut Pasteur de Lille Visez, Nicolas; UMR 8522, PC2A - Physicochimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère Lanone, Sophie; INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale equipe 4 Tsicopoulos, Anne; Pasteur Lille, Pulmonary Immunity Chenivresse, Cecile; CHU Lille, Service de Pneumologie et Immuno-allergologie Scherpereel, Arnaud; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Pulmonary and Thoracic Oncology de NADAI, Patricia; INSERM U1019, Pulmonary immunity
Keywords:	asthma, endotypes, inflammation, T cells, mucosal immunity, macrophages, interleukins

Chronic exposure to benzo(a)pyrene-coupled nanoparticles worsens inflammation in a mite-induced asthma mouse model

To the editor,

Asthma is a highly prevalent chronic inflammatory disease of the airways characterized by airway hyperresponsiveness (AHR) and mucus hyperproduction. In the last decades, asthma has been affecting approximately 20% of the population worldwide and genetic changes alone cannot explain this rapid increase. During the same period, increased vehicular traffic and other combustion processes have resulted in a significant increase in ambient particle matter (PM) that can bind polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on their surface. PAHs from diesel exhaust and other sources were shown to play a role in the exacerbation of allergic immune responses in human.⁽¹⁾ In acute asthma models, co-exposure to the PAH, benzo(a)pyrene (B(a)P), and ovalbumin enhances the production of allergen-specific IgE, systemic Th2 response, and airway inflammation in mice.⁽²⁾

Nanoparticles ($\leq 0.1 \mu\text{m}$), that represent only 2.3% of total PM mass, contribute to 23-30% of the PAHs alveolar deposition coming from roadside sources. Moreover, their small size allows evading clearance from the lung, leading to long-term retention.⁽³⁾ This suggests that nanoparticles are significant contributors of PAHs deposition in the lung and thus, may contribute to acute and chronic inflammation. However, few studies have evaluated the impact of chronic exposure to this pollutant on allergic asthma. Therefore, we established a murine allergic asthma model using the house dust mite (HDM) allergen, to explore the impact of chronic exposure to nanoparticles coupled to PAHs on airway inflammation (Figure S1A for exposure model). In this study, we used carbon black nanoparticles from printers uncoated as reference (NP- \emptyset) and B(a)P-coated (NP-B(a)P) as a model of nano-particulate pollutant.

We analyzed the effects of chronic exposure to NP-B(a)P on different asthma parameters. As expected, exposure to HDM induced allergic asthma including increased AHR (Figure S1B), HDM-specific IgE and IgG1 in sera (Figure S1C) and pulmonary inflammation, characterized by elevated total cell numbers in the broncho-alveolar lavage (BAL) composed of eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages compared to PBS control mice (Figure 1A). Neither NP- \emptyset nor NP-B(a)P nanoparticles alone induced airway inflammation. However, NP-B(a)P but not NP- \emptyset increased AHR in non-sensitized mice, suggesting that B(a)P has a specific effect on AHR independently of HDM. In HDM-sensitized mice, HDM-induced AHR was abolished by NP- \emptyset and decreased by NP-B(a)P although this one remained increased compared to the PBS control group. Surprisingly, both nanoparticles co-exposed with HDM did not modify inflammatory cell recruitment in the BAL (Figure 1A). However this result was not supported by cellular infiltration of lung tissue as shown by hematoxylin and eosin histological stain (Figure S1D) and total lung single cell suspension (Figure 1B). Indeed, increased total cell numbers were majored in the lungs of HDM+NP-B(a)P mice compared to HDM-sensitized mice (Figure 1B). This cellular infiltration was mainly due to a significant increase of eosinophils, Ly6C⁻ monocytes/macrophages and CD4⁺ T cells in HDM-sensitized mice

1
2
3 compared to the PBS group (Figure 1B). Interestingly, NP-B(a)P significantly modifies the HDM-
4 induced cell recruitment. Indeed, Ly6C⁺ as well as Ly6C⁻ monocytes/macrophages were significantly
5 elevated in HDM+NP-B(a)P compared to HDM-sensitized mice. Moreover, neutrophils, NKT-like cells
6 and CD8⁺ T cells, not recruited in HDM-sensitized mice, were significantly increased in lungs from
7 HDM+NP-B(a)P mice (Figure 1B). NKT-like cells differ from classical NKT by recognizing antigen
8 presented through major histocompatibility complex and not through CD1d, and can be either CD4⁺,
9 CD8⁺, or double-negative T cells expressing NK-cell markers. In our study, NKT-like cells may
10 participate in the increase of CD8⁺ T cells in HDM+NP-B(a)P mice.⁽⁴⁾ Altogether, these results show
11 that NP-B(a)P administration increased lung inflammation and shifted the immune response due to
12 HDM sensitization. Since pulmonary inflammation was increased in HDM-sensitized mice exposed
13 NP-B(a)P, we analyzed the expression of cytokines in the lung tissue to better characterize the NPs-
14 induced inflammation. As the nanoparticles adsorbed cytokines, we were unable to measure them by
15 conventional enzyme-linked immunosorbent assay, so we use quantitative RT-PCR. Levels of
16 mRNA coding for IFN- γ and IL-17 cytokines were not modulated between HDM groups (figures 2A
17 and 2B). This suggests that Tc1 and Tc17 CD8⁺ T cells did not participate to the increase of CD8⁺ T
18 cells observed in HDM+NP-B(a)P exposed mice. However, type 2 cytokines including IL-4, IL-5, IL-13
19 and IL-10 were significantly increased in HDM-sensitized mice compared to PBS control group and
20 NP-B(a)P exposure majored these increased expressions in HDM+NP-B(a)P compared to HDM group
21 (Figure 2C-F). These results suggest that NP-B(a)P can exacerbate the type 2 response induced by
22 HDM and that increased in CD8⁺ T cells could include a population of Tc2 cells since CD4⁺ T cells
23 were not increased. As IL-13 and IL-4 participate to mucus production by bronchial epithelium, lung
24 sections were stained with periodic acid-Schiff reagent and mRNA encoding for Muc5b and Muc5ac
25 mucins were evaluated. Mucus production was induced but not significantly different between all HDM
26 groups (Figure S2).

27
28
29 A study previously showed that higher neutrophil counts were associated with high level of IL-6
30 regardless of eosinophils in sputum.⁽⁵⁾ Moreover, IL-6 can play a role on dendritic cell activation
31 leading to CD4⁺ T cells differentiation toward Th2⁽⁶⁾ but also in monocyte recruitment *in vivo* through
32 induction of C-chemokine ligand 2 (CCL2).⁽⁷⁾ Ly6C⁺ monocytes also called classical monocytes highly
33 express CCR2, the receptor for CCL2, and are highly recruited in lungs of mice co-exposed with HDM
34 and NP-B(a)P. Accordingly, we have observed a significant increase in *il-6* and *cc12* mRNA expression
35 in the lung in response to HDM+NP-B(a)P exposure (Figure S3A and B). In human studies, the
36 percentage of neutrophils in the airways and CD8⁺ T cells frequencies were found to be increased in
37 severe forms of asthma and these cell types are described as resistant to corticosteroids.^(8, 9) Therefor,
38 the recruitment of these cells suggests that HDM+NP-B(a)P co-exposure may participate to the
39 induction of severe cortico-resistant asthma endotype.

40
41
42 In conclusion, our results suggest that chronic exposure to NP-B(a)P can synergize with allergen to
43 potentiate type 2 inflammation and switch lung inflammation toward a mixed pattern including
44 neutrophils, NKT-like and CD8⁺ T cells. A better understanding of mechanisms responsible for these
45 modifications is required in order to develop effective drugs to treat specifically this asthma endotype.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Ple C, Fan Y, Ait Yahia S, Vorng H, Everaere L, Chenivesse C, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons reciprocally regulate IL-22 and IL-17 cytokines in peripheral blood mononuclear cells from both healthy and asthmatic subjects. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122372.
2. Yanagisawa R, Koike E, Win-Shwe TT, Ichinose T, Takano H. Low-dose benzo[a]pyrene aggravates allergic airway inflammation in mice. *J Appl Toxicol*. 2016;36(11):1496-504.
3. Li N, Georas S, Alexis N, Fritz P, Xia T, Williams MA, et al. A work group report on ultrafine particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):386-96.
4. Rijavec M, Volarevic S, Osolnik K, Kosnik M, Korosec P. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respir Med*. 2011;105 Suppl 1:S20-5.
5. Turan N, Edwards MJ, Bates S, Shaw D, Chung KF, Loza MJ, et al. IL-6 pathway upregulation in subgroup of severe asthma is associated with neutrophilia and poor lung function. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(4):475-8.
6. Lin YL, Chen SH, Wang JY. Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(1):51-9.
7. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003;24(1):25-9.
8. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma--a review. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015;209:13-6.
9. Hinks TSC, Hoyle RD, Gelfand EW. CD8(+) Tc2 cells: underappreciated contributors to severe asthma. *Eur Respir Rev*. 2019;28(154).

Authors

Julie Carrard¹, Philippe Marquillies¹, Muriel Pichavant¹, Nicolas Visez², Sophie Lanone³, Anne Tsicopoulos^{1,4}, Cécile Chenivesse^{1,4}, Arnaud Scherpereel⁵, Patricia de Nadaï^{1*}

1. Univ Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – center for infection and Immunity of Lille, France
2. Univ. Lille, CNRS, UMR 8522 - PC2A - Physicochimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère, Lille, France
3. Inserm U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB) Equipe 04, Créteil, France.
4. CHU Lille, Service de Pneumologie et Immuno-allergologie, Centre constitutif des Maladies Pulmonaires Rares, Lille, France ; CRISALIS/F-CRIN network
5. Pulmonary and Thoracic Oncology Dept, CHU Lille, France.

* : corresponding author : Dr Patricia de Nadaï

Center for Infection and Immunity of Lille,
Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette,
59000, Lille, France
Phone: (33) 3 20 87 71 83
e-mail :patricia.de-nadai@pasteur-lille.fr

Acknowledgements

We would like to thank Dr Catherine Duez for the critical reading of this article.

1
2
3 We would also like to thank the BioImaging Center Lille Nord-de-France (Bicel) for the microscopy and
4 flow cytometry part, especially Sophie Salome-Desnoullez, Elisabeth Werkmeister and H el ene
5 Bauderlique and the staff of the animal facility of Lille Pasteur Institute.

6
7 J. Carrard is supported by a grant from University of Lille.
8
9

10 **Conflicts of interest**

11
12 Pr. Scherpereel reports personal fees from Astra-Zeneca, BMS, MSD, Roche, outside the submitted
13 work. Pr. Chenivresse reports grants from AstraZeneca, Sant elys, personal fees from ALK-Abello,
14 AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, GlaxoSmithKlein, Novartis, Roche, Sanofi, and TEVA, non-
15 financial support from ALK-Abello, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Chiesi, GlaxoSmithKlein,
16 MEDA Pharma, Medexact, Novartis, Pierre Fabre, Pfizer, outside the submitted work. All others
17 authors declare that they have no relevant conflicts of interest.
18
19
20
21

22 **Authors' contribution**

23 JC, PdN, SL, CC, AT and AS contributed to conception and design of the study. JC, MP and PdN
24 performed in vivo experiments and analysis. PM performed in vivo experiments. NV performed
25 nanoparticle coating, drafted the associated methods, and revised the manuscript. JC and PdN
26 drafted the manuscript. MP, CC and AT have substantially revised the manuscript. All authors read
27 and approved the manuscript.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1_ALL-2020-00473

Allergy

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

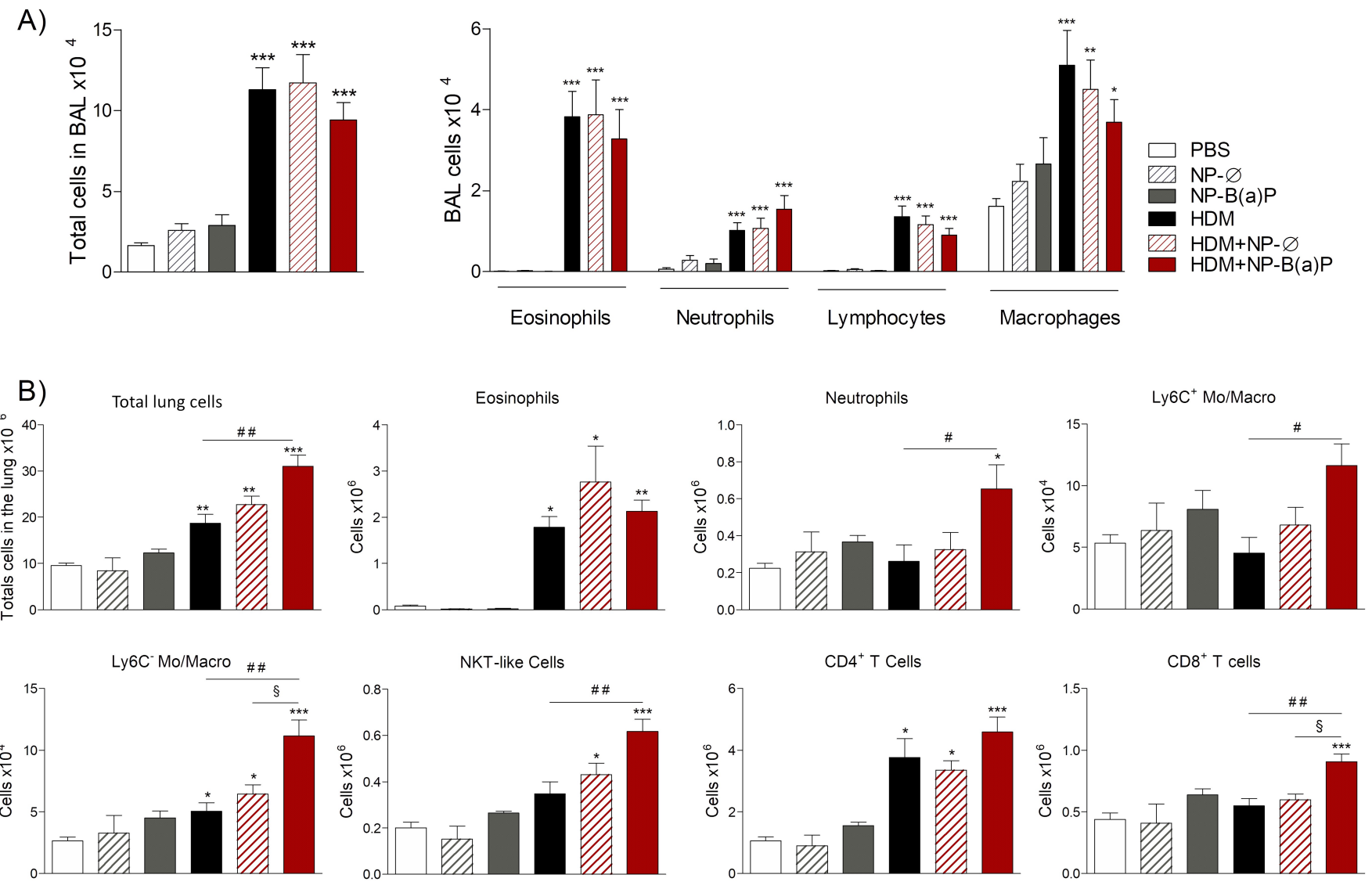


Figure 1: HDM+NP-B(a)P chronic administration modifies lung tissue cells but not BAL cell count.

(A) Total cell, eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages absolute numbers in BALF. (B) Total cells from lung single cell suspensions and eosinophils, neutrophils, Ly6C+ and Ly6C- macrophages/monocytes, NKT-like, CD4+ and CD8+ T cells identified by flow cytometry. Data are representatives of two independent experiments (n=10-21 mice per group) and expressed as means ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs PBS; § p<0.05 between HDM+NP-∅ and HDM+NP-B(a)P, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 between HDM and HDM+NP-B(a)P.

Figure 2_J. Carrad et al_ALL_2020_00473

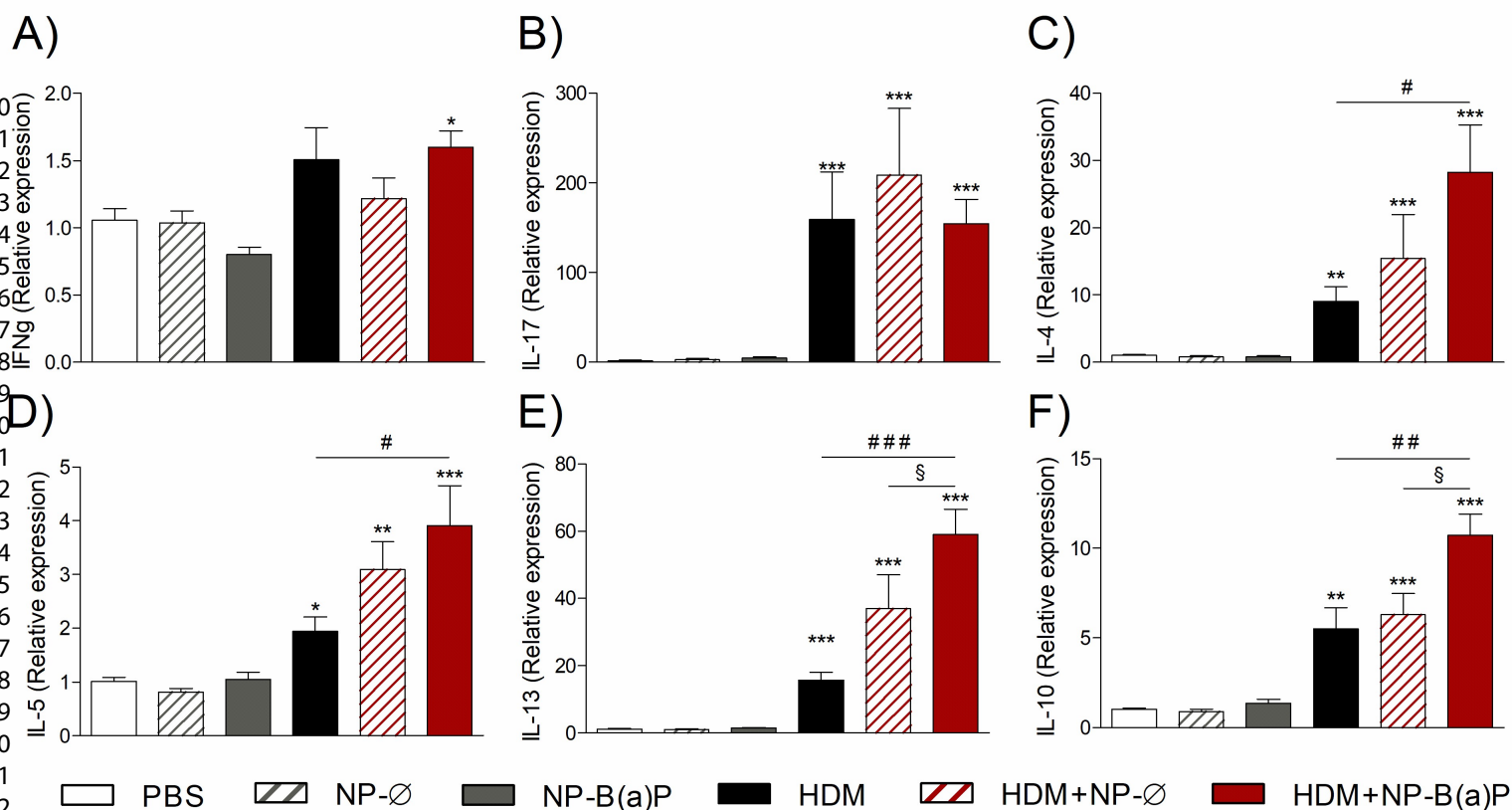


Figure 2: HDM+NP-B(a)P chronic administration increases Th2 cytokines expression in the lung.

Relative expression compared to RPLPO house keeping gene of IFN-g (A), IL-17a (B), IL-4 (C), IL-5 (D), IL-13 (E) and IL-10 (F) mRNA in lung tissues. Data are representatives of two independent experiments (n=10-21 mice per group) and expressed as means \pm SEM.

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs PBS; § P < 0.05 between HDM+NP-∅ and HDM+NP-B(a)P
P < 0.05, ## P < 0.01, #### P < 0.001 between HDM and HDM+NP-B(a)P

Chronic exposure to benzo(a)pyrene-coupled nanoparticles worsens inflammation in HDM-induced asthma mouse model

Julie Carrard¹, Philippe Marquillies¹, Muriel Pichavant¹, Nicolas Visez², Sophie Lanone³, Anne Tsicopoulos^{1,4}, Cécile Chenivesse^{1,4}, Arnaud Scherpereel⁵, Patricia de Nadaï^{1*}

1. Univ Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – center for infection and Immunity of Lille, France
2. Univ. Lille, CNRS, UMR 8522 - PC2A - Physicochimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère, Lille, France
3. Inserm U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB) Equipe 04, Créteil, France.
4. CHU Lille, Service de Pneumologie et Immuno-allergologie, Centre constitutif des Maladies Pulmonaires Rares, Lille, France ; CRISALIS/F-CRIN network
5. Pulmonary and Thoracic Oncology Dept, CHU Lille, France.

* : corresponding author : Dr Patricia de Nadaï

MATERIAL AND METHODS

Carbon black nanoparticle coating

Carbon nanoparticles were kindly provided by Dr Sophie Lanone from Institut Mondor de Recherche Biomédicale and previously characterized by Belade *et al.*¹ A part of these nanoparticles was coupled to B(a)P. A solution of B(a)P (Sigma-Aldrich, Lyon, France) at a concentration of 5.55 mg/ml was prepared with dichloromethane (Sigma Aldrich) as solvent. A mass of 1 g of carbon nanoparticles was mixed with 10 ml of this solution, and the solvent was completely evaporated at room temperature in a rotary evaporator (about 3 hours for total evaporation). After recovery of the coated nanoparticles, a control of the amount of B(a)P remaining on the walls of the flask of the rotary evaporator was carried out by GC-MS analysis (GC Perkin Elmer 680, MS Perkin Elmer 600C The B(a)P not present on the walls is supposed to cover the particles; direct analysis of the B(a)P adsorbed on the nanoparticles is indeed made difficult by its non-total extraction on this support. The final B(a)P concentration on the nanoparticles was 55.5 mg/g. Nanoparticles were stored in brown vial at -20°C.

Animals

C57BL/6 J Female mice (6 weeks old) were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Animal study was approved by the local investigational review board (N° APAFIS#7874-2016070417344442v3) in an accredited establishment at the Institut Pasteur de Lille according to governmental guidelines N°86/609/CEE and the European directive 2010/63/EU. Mice were housed under standard conditions in a pathogen-free facility.

Experimental protocol

After isoflurane gas anesthesia, mice were sensitized intranasally by 25 µg of HDM (Stallergenes Greer, Boston, USA) for 3 consecutive days with or without the presence of 18 µg of uncoated or B(a)P-coupled nanoparticles corresponding to 1 µg of B(a)P. Twelve days after, mice were challenged intranasally in the same conditions 3 days a week during 4 weeks. Mice were euthanized 24 hours after the last intranasal by injection of Euthasol lethal dose. The model for chronic exposure is shown in figure S1A. BAL fluids, blood samples and lung tissues were collected for further analyses.

BAL fluid collection

A total volume of 1 mL of ice-cold phosphate buffer saline (PBS) (Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) was used to wash the lungs. Total leukocyte numbers were counted, cytocentrifuged (Shandon cytopsin 4; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and stained with May-Grünwald Giemsa (Microm Microtech, Brignais, France). Cells were identified as macrophages, eosinophils, neutrophils and lymphocytes by standard hematological procedures and at least 300 cells were counted under x400 magnification.

Serum antibodies measurement

HDM-specific IgE and IgG₁ levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using 100 µg/ml HDM (Stallergenes Greer) coated in wells. After incubation with diluted serum, specific IgE and IgG₁ antibodies were detected by biotinylated goat anti-IgE (Gentaure) or IgG₁ (ThermoFisher scientific). Binding of Streptavidin-Horse Radish Peroxidase was revealed by TMB substrate solution (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) and the OD value at 450 nm was determined.

Airway hyperresponsiveness measurement

Airway hyperresponsiveness (AHR) was assessed using flexiVent invasive method (SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada). Mice were anesthetized (5 ml/kg body weight of 10% medetomidine (Pfizer) and 10% ketamine (Merial)) and immediately intubated with an 18-gauge catheter, followed by mechanical ventilation. Respiratory frequency was set at 150 breaths/min with a tidal volume of 0.2 ml, and a positive-end expiratory pressure of 2 ml H₂O was applied. Mice were exposed to nebulized PBS followed by increasing concentrations of nebulized metacholine (0-100mg/ml in PBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) using an ultrasonic nebulizer (Aeroneb, Aerogen, Galway, Ireland). For each dose, 10 cycles of nebulization and measurements were performed. Nebulization was done during the first cycle and consisted of 20 puffs per 10 s, with each puff of aerosol delivery lasting 10 ms. For each cycle, measurements were obtained for 15 s followed by ventilation for 5s. Baseline lung resistance (Rrs) was restored before administration of the subsequent doses of methacholine. Only resistance values corresponding to COD values > 0.95 were kept. For each dose, the maximum resistance value measured was taken.

Histology on lung tissue sections

Left lung was fixed in Antigenfix (Diapath, Microm Microtech, France) during 4 hours at room temperature followed by alcohol (30-100%) and Diasolv (Microm Microtech) baths for dehydration. After paraffin inclusion, Paraffin-embedded lungs were sliced (5 μm) with a Microtom (Microm HM355S ThermoScientific). Sections were stained using periodic acid–Schiff (Microm Microtech) for mucus production and Hematoxylin & Eosin (Diapath, Microm Microtech) for cellular infiltration. Images were acquired on an AxioPlan2 (Zeiss) light microscope with Zen Pro software.

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR

RNA was extracted from lung with a nucleospin RNA mini kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), according to the manufacturer's instructions. The real-time RT-qPCR was performed in Prime time assay PCR Master Mix (Integrated DNA technologies, Leuven, Belgium) using QuanStudio 12K Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). The quantitative RT-PCR cycling were : one cycle at 95°C for 3 min followed by 45 cycles composed by 95°C for 5 s and 60°C for 30 s. Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) were determined by comparing the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and *rplp0* (ΔCt) and ΔCt values for treated and control groups ($\Delta\Delta\text{Ct}$). The primers (Integrated DNA technologies) used for RT-qPCR are shown in Table S1. Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 gene (*Rplp0*) was used as a reference gene in order to normalize the transcript levels.

Supp. Tab. S1: Prime time assay used for the quantitative PCR

Target	Catalogs	Target	Catalogs
<i>cyp1a1</i>	Mm.PT.58.32054918	<i>il-10</i>	Mm.PT.58.13531087
<i>cyp1a2</i>	Mm.PT.58.18171461	<i>il-13</i>	Mm.PT.58.31366752
<i>cyp1b1</i>	Mm.PT.58.43705524	<i>il-17</i>	Mm.PT.58.6531092
<i>ifn-γ</i>	Mm.PT.58.41769240	<i>muc5ac</i>	Mm.PT.58.42279692
<i>il-4</i>	Mm.PT.58.7882098	<i>muc5b</i>	Mm.PT.58.30457752
<i>il-5</i>	Mm.PT.58.41498972	<i>rplp0</i>	Mm.PT.58.43894205

Flow Cytometry experiments

Circulation was washed by heart perfusion with 10 ml of PBS. Total lungs were digested by 1 mg/mL type IV collagenase (Life Technologies, Courtaboeuf, France) in RPMI (Life Technologies) for 30 min at 37°C. Cells were washed with PBS with 2% fetal bovine serum (FBS) (Eurobio scientific, Courtaboeuf, France) and centrifuged at 2000 rpm for 15 min on a Percoll density gradient (D = 1075 g/mL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Erythrocytes were lysed in lysis buffer (155 mmol/L NH_4Cl , 10 mmol/L KHCO_3 , and 0.5 mmol/L EDTA). Cells were washed with PBS/FBS 2% and filtered on a 100- μm -pore membrane. Alive total lung cells were counted after Trypan Blue staining. Cells were incubated with viability marker (Zombie aqua™ Fixable Viability Kit,

Biolegend, Ozyme, Saint-Cyr-L'Ecole, France) and incubated for 30 min at 4°C with conjugated antibodies as presented in supplemental data Table S2 and S3. The cells were washed and resuspended in PBS/Fetal Bovine Serum 2% and analyzed by flow cytometry (LSRFortessa®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) with the BD FACSDiva™ Software.

Supp. Tab. S2 : Flow cytometry antibodies for T cells staining

Protein Target	Conjugate	Species Target	Company
TCR β	APC-Vio770	Mouse	Miltenyi Biotech
TCR γ/δ	Vioblue	Mouse	
CD4	PE-Vio770	Mouse	
CD25	APC	Mouse	
CD8a	BV605	Mouse	
CD5	PerCP-Cy5.5	Mouse	Ozyme (Biolegend)
NK1.1	FITC	Mouse	
CD45	PE-Cy5	Mouse	

Supp. Tab. S3 : Flow cytometry antibodies for antigen presenting cells staining

Protein Target	Conjugate	Species Target	Company
LY6C	BV605	Mouse	BD Biosciences
CD64	BV786	Mouse	
CD103	PerCP-Cy5.5	Mouse	
CD86	AF700	Mouse	
CD11c	PE-Cy7	Mouse	
CD11b	V450	Mouse	
CD45	PE-Cy5	Mouse	
Siglec F	PE-CF594	Mouse	
F4/80	PE	Mouse	
CMHII	FITC	Mouse	Miltenyi Biotech
CCR2	BV650	Mouse	Ozyme (Biolegend)
CD206	APC	Mouse	
LY6G	APC-Cy7	Mouse	

Statistical analysis

The data are presented as the means \pm Standard error of the mean (SEM). All experiments were carried out at least twice. The comparisons between groups were performed using Kruskal-Wallis nonparametric test with Dunns post-hoc test in GraphPad Prism between HDM groups or between HDM and controls groups (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). p -value <0.05 were considered as statistically significant.

SUPPLEMENTARY RESULTS

Nanoparticles coupled to B(a)P activate AhR signaling pathway

We first aimed at characterizing the molecular pathway triggered by NPs coupled to B(a)P. B(a)P is known to activate AhR signaling pathway and especially cytochrome transcription.(2) Therefore, we evaluated the expression of three *cyp* genes *cyp1a1*, *cyp1a2* and *cyp1b1* in total lung extract. NP-B(a)P significantly increased *cyp1a1* but not *cyp1a2* and *cyp1b1* expression compared to uncoated NPs (NP- \emptyset). Interestingly, chronic exposure to HDM alone did not induce *cyp* genes transcription (Figure S4).

The co-exposure of mice with NP-B(a)P and HDM (HDM+NP-B(a)P) also increased *cyp1a1* but not *cyp1a2* and *cyp1b1* expression compared to NP- \emptyset with HDM (HDM+NP- \emptyset). However, the presence of HDM tended to decrease *cyp1a1* expression compared to NP-B(a)P alone (Figure S4). These results show that B(a)P fixed on the NPs is able to activate AhR signaling pathway.

SUPPLEMENTARY REFERENCE

1. Belade, E. *et al.* A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **26**, 57–66 (2012).
2. Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:403-32.

Figure S1_ALL-2020-00473

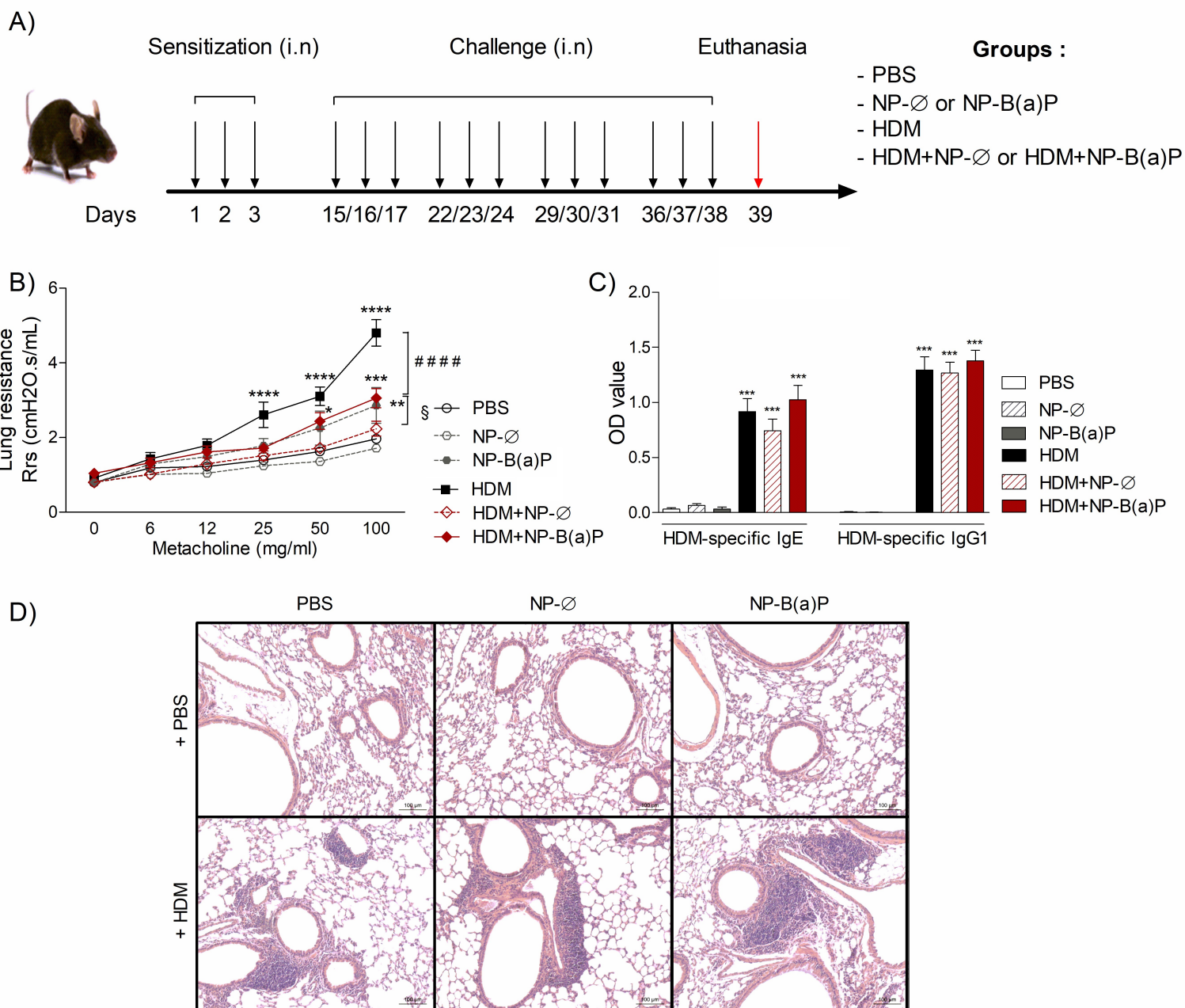


Figure S1: Experimental model and impact of nanoparticles on allergic asthma features.

(A) Experimental model of chronic exposure to allergen and nanoparticles coupled to benzo(a)pyrene in mice. (B) Respiratory resistance (Rrs) following increasing doses of methacholine. (C) HDM-specific IgE and IgG1 in sera. (D) Paraffin-embedded sections of lung stained with H&E (scale bar: 100 μ m). Data are representatives of two independent experiments and expressed as means \pm SEM from 10 to 21 mice per group; §§§ P <0.001 between NP- \emptyset and NP-B(a)P and ## P <0.01 between HDM+NP- \emptyset and HDM+NP-B(a)P).

Figure S2_ALL-2020-00473

Allergy

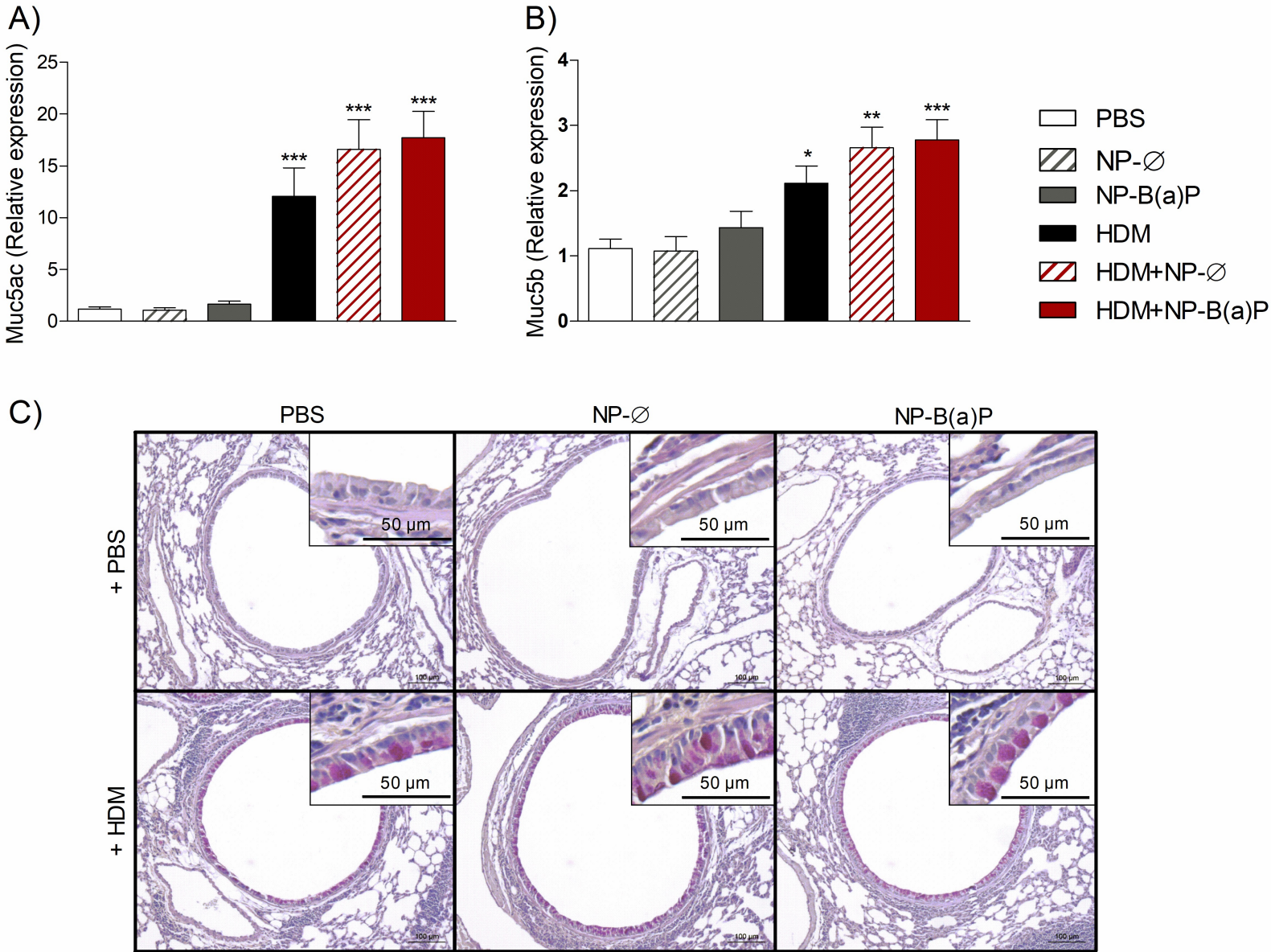


Figure S2: Effects of HDM+NP-B(a)P chronic administration on mucus production.

Relative expression compared to RPLP0 house keeping gene of Muc5ac (A) and Muc5b (B) mRNA measured in the lung tissues. (C) Paraffin-embedded lung sections were stained with Periodic acid Schiff (PAS) to analyze mucus production (scale bar :100 μm). The values are expressed as the mean±SEM (Data from 2 separate experiments (n=10–21mice per group) ; * P <0.05 , ** P<0.01, *** P<0.001 vs PBS)

Figure S3_ALL-2020-00473

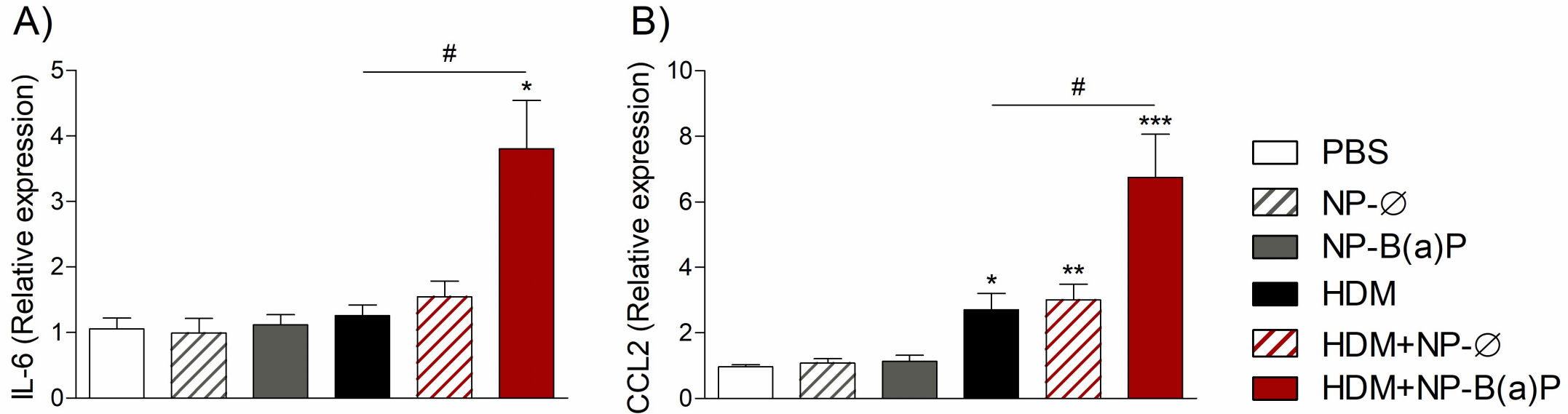


Figure S3: HDM+NP-B(a)P chronic exposure increases IL-6 and CCL2 expression in the lung.

Relative expression compared to RPLP0 house keeping gene of IL-6 (A) and CCL2 (B) mRNA were measured in lung tissues. The values are expressed as the mean±SEM (Data from 2 separate experiments (n=10–21mice per group) ; * P <0.05 , ** P<0.01, *** P<0.001 vs PBS. # P<0.05 between HDM and HDM+NP-B(a)P).

Allergy Figure S4_J. Carrard et al._ALL-2020-00473

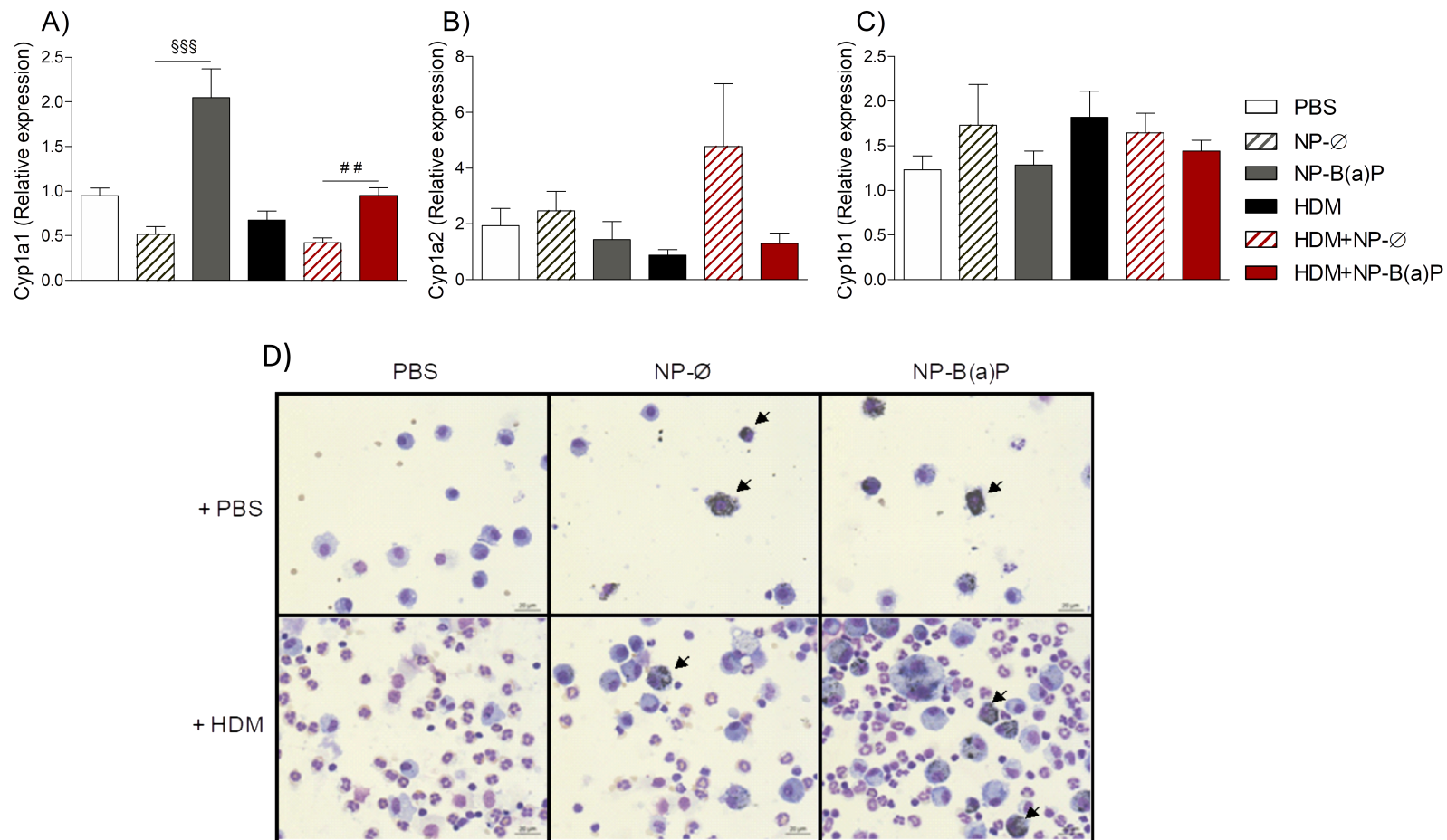


Figure S4: Impact of nanoparticles on cytochrome genes expression and detection of nanoparticles in BAL macrophages.

Relative expression, to the house keeping gene RPLP0, of Cyp1a1 (A), Cyp1a2 (B), Cyp1b1 (C) mRNA in the lung tissues were measured using qRT-PCR. (D) Inflammatory cell in bronchoalveolar lavage fluid were identified after cytocentrifugation and staining with May Grünwald-Giemsa staining (scale bar, 100 μ m). The values are expressed as the mean \pm SEM (Data from 2 separate experiments (n=10–21 mice per group)); $\xi\xi\xi$ P < 0.001 between NP-∅ and NP-B(a)P and $\#\#$ P < 0.01 between HDM+NP-∅ and HDM+NP-B(a)P).