



HAL
open science

Implication du récepteur NOD1 dans l'asthme allergique aux acariens & Impact fonctionnel des bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques sévères selon leur statut tabagique

Camille Audousset

► To cite this version:

Camille Audousset. Implication du récepteur NOD1 dans l'asthme allergique aux acariens & Impact fonctionnel des bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques sévères selon leur statut tabagique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS050 . tel-03991626

HAL Id: tel-03991626

<https://theses.hal.science/tel-03991626>

Submitted on 16 Feb 2023

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

Soutenue publiquement le 18 Octobre 2021

par

Camille Audousset

**Implication du récepteur NOD1 dans l'asthme allergique aux
acariens
&
Impact fonctionnel des bouchons de mucus dans les voies
aériennes de patients asthmatiques sévères selon leur statut
tabagique**

Le jury est composé par :

Présidente :

Madame la Professeure Cécile CHENIVESSE, CHU de Lille

Rapporteurs :

Madame la Docteure Maria LEITE DE MORAES, Directrice de Recherche, Hôpital Necker, Paris

Monsieur le Professeur Pierre-Régis BURGEL, Hôpital Cochin, Paris

Examineurs :

Monsieur le Professeur James MARTIN, Laboratoire Meakins-Christies Montréal

Monsieur le Docteur Ivo GOMPERTS BONECA, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

Directrice de Thèse :

Madame la Docteure Anne TSICOPOULOS, Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Lille

Centre d'infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 9017

Institut Pasteur de Lille, Equipe 13 « Immunité pulmonaire »

Université de Lille 2, Nord de France

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	4
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES FIGURES	8
RESUME	9
INTRODUCTION	11
I. L'ASTHME ALLERGIQUE	11
A. L'ASTHME : UNE PROBLEMATIQUE DE SANTE PUBLIQUE	11
B. L'ASTHME : DEFINITION ET PRESENTATIONS CLINIQUES	14
C. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE	16
II. FACTEURS DE RISQUE ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES A L'ASTHME ALLERGIQUE	31
A. GENERALITES	31
B. ROLE DE L'ENVIRONNEMENT MICROBIEN EXOGENE DANS L'ASTHME	33
C. ROLE DE L'ENVIRONNEMENT MICROBIEN ENDOGENE DANS LA PATHOGENESE DE L'ASTHME	35
D. ROLE DE L'ENVIRONNEMENT ALLERGENIQUE : L'ACARIEN UN PNEUMALLERGENE MAJEUR DE L'ASTHME ALLERGIQUE	37
III. ROLE DE L'IMMUNITE INNEE ET DU RECEPTEUR NOD1 DANS L'ASTHME ALLERGIQUE	42
A. PRESENTATION GENERALE DE L'IMMUNITE INNEE	42
B. LES NOD-LIKE RECEPTEURS (NLRs) : UNE FAMILLE DE RECEPTEUR INTRACELLULAIRE DE L'IMMUNITE INNEE	43
C. CARACTERISTIQUES ET FONCTIONNEMENT DE DEUX RECEPTEURS NLRC : NOD1 ET NOD2	45
D. ROLE PUTATIF DES RECEPTEURS NOD1 ET NOD2 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME	56
PREMIERE PARTIE : LA DETECTION PAR NOD1 DU MICROBIOTE DERIVANT DES ACARIENS FAVORISE L'ASTHME ALLERGIQUE EXPERIMENTAL	60
OBJECTIF DE TRAVAIL	60
MATERIELS ET METHODES	61
RESULTATS	70
PARTIE 2 : IMPACT FONCTIONNEL DES BOUCHONS DE MUCUS DANS LES VOIES AERIENNES CHEZ PATIENTS ASTHMATIQUE EN FONCTION DE LEUR STATUT TABAGIQUE	91
HYPOTHESES DE TRAVAIL	91
MATERIEL ET METHODE	94
RESULTATS	101
DISCUSSION	111
PARTIE 1 : ROLE DU RECEPTEUR NOD1 DANS L'ASTHME ALLERGIQUE AUX ACARIENS	111
PARTIES 2 : IMPACT FONCTIONNEL DES BOUCHONS DE MUCUS DANS LES VOIES AERIENNES DE PATIENTS ASTHMATIQUES	115
PERSPECTIVES	122
PARTIE 1 : POURSUITE DES INVESTIGATIONS CONCERNANT L'IMPLICATION DU RECEPTEUR NOD1 DANS L'ASTHME	122
PARTIE 2 : IMPACT FONCTIONNEL DES BOUCHONS DE MUCUS DANS LES VOIES AERIENNES DES PATIENTS	128
BIBLIOGRAPHIE	131

Liste des abréviations, sigles et acronymes

ARNm	: ARN messenger
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
BPCO	: Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
CARD	: Caspase Activation and Recruitment Domains
CD	: Cellules Dendritiques
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CT	: Computerized Tomography
CVF	: Capacité Vitale Forcée
DAMPs	: Damage-Associated Molecular Patterns
Der f	: Dermatophagoides farinae
Der p	: Dermatophagoides pteronyssinus
EPO	: Eosinophile Peroxydase
FeNO	: Fractional Exhaled Nitric Oxide
HDM	: House Dust Mite
HEK	: Human Embryonic Kidney
Ig	: Immunoglobuline
ILC	: Innate Lymphoid Cells
INF	: Interféron
IR	: Indice de Réactivité
LBA	: Lavage broncho-alvéolaire
LRR	: Leucine-Rich Repeats domain
LT	: Lymphocyte
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinases
MDP:	: Muramyl dipeptide
MPO	: Myéloperoxydase
MS	: Mucus Score
MUC	: Mucines
Nf- κ B	: Nuclear Factor-Kappa B
NLR	: Nod-like receptor
NOD1	: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NOD2	: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OMV	: Outer membrane vesicles
OVA	: Ovalbumine
PAMPs	: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR2	: Protease-Activated Receptor-2
PEPT	: Peptide Transporter
PG	: Peptidoglycane
PNE	: Polynuclaire Eosinophile
PNN	: Polynucléaire Neutrophile
PPR	: Pattern Recognition Receptor
RB	: Remodelage bronchique
RIP2K	: Sérine / thréonine-protéine kinase 2
ROR	: RAR-related Orphan Receptor
ROS	: Reactive Oxygen Species
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF	: Transforming Growth Factor
Th	: T helper
TLR	: Toll-like Receptors
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TSLP	: Thymic Stromal Lymphopietin
UPR	: Unfolded Protein Response
VEMS	: Volume Expiratoire Maximal par Seconde

WT : Wild Type

Liste des figures

	Page
Figure 1: Tendance évolutive de la prévalence de l'asthme en fonction du produit intérieur brut des pays.	12
Figure 2: Evolution et disparité de la prévalence de l'asthme et des symptômes asthmatiques chez les enfants et les jeunes adultes selon les pays	14
Figure 3: Rôles des cellules épithéliales (CE) des voies aériennes dans l'induction d'une réponse allergique asthmatique par les cellules dendritiques	21
Figure 4 : Rôles respectifs des lymphocytes Th2 et des ILC2s dans deux phénotypes asthmatiques distincts : l'asthme allergique éosinophilique et l'asthme non allergique éosinophilique	22
Figure 5: Interactions entre le remodelage bronchique asthmatique et l'inflammation de type 2	24
Figure 6 : Les modifications de l'histologie bronchique chez les asthmatiques sévères conduisent à une réduction de la lumière des voies aériennes comparativement aux sujets sains	25
Figure 7: Bouchons de mucus et obstruction des voies aériennes distales et proximales chez les patients asthmatiques	28
Figure 8: Un score élevé de mucus est associé à une obstruction bronchique plus sévère et une inflammation de type 2	29
Figure 9 : Maturation et homéostasie du système immunitaire d'enfants asthmatiques ou sains selon leurs expositions environnementales	32
Figure 10: Le microbiote digestif et respiratoire est une interface entre la génétique de l'hôte, ses expositions environnementales et la pathologie asthmatique	34
Figure 11: Identification par séquençage haut débit* de la structure des allergènes canoniques de <i>D. Farinae</i>	39
Figure 12: Composition du microbiome digestif de <i>Dermatophagoïdes farinae</i>	41
Figure 13 : Tableau résumant les caractéristiques de la famille des Nod Like récepteurs	44
Figure 14: Structure et fonction des différents domaines composant les récepteurs NOD1 et NOD2	46
Figure 15: Structure des ligands de NOD1 et NOD2 dérivant respectivement des peptidoglycanes de bactéries gram négatives et gram positives	47
Figure 16: Mécanismes d'internalisation des ligands de NOD1 et de NOD2 dans le compartiment cytoplasmique	49
Figure 17: Voies d'activation et de signalisation de NOD1 et de NOD2	52
Figure 18: La signalisation par Nod1 aggrave la réponse allergique des voies respiratoires induite par les acariens	74
Figure 19: La signalisation Nod1 exacerbe la réponse allergique des voies respiratoires induite par les acariens via Ripk2	75
Figure 20: Le microbiote intestinal dysbiotique causé par une déficience en Nod1 n'a pas d'impact sur la réponse allergique des voies respiratoires induite par les acariens	77
Figure 21: Les muropeptides associés aux acariens sont détectés par NOD1 dans les cellules épithéliales via RIPK2	80
Figure 22: Nod1 exprimé par les cellules de structure régule l'inflammation allergique des voies respiratoires induite par les acariens chez des souris chimériques générées par transplantation de moelle osseuse	83
Figure 23: L'intensité de la réponse allergique des voies respiratoires est diminuée suite à une exposition à des acariens appauvris en PG	84
Figure 24: Description de la méthodologie pour l'utilisation du mucus score à partir d'un scanner thoracique	98
Figure 25: Analyse quantitative des voies aériennes à partir du logiciel d'analyse VIDA	99

	Page
Figure 26: Diagramme de flux de la sélection des scanners inclus dans l'étude à partir des cohortes de patients asthmatiques « Difficult Asthma » et « ACO ».	101
Figure 27: Les bouchons de mucus sont fréquents et distribués de façon homogène dans les segments pulmonaires chez les asthmatiques quel que soit le statut tabagique	104
Figure 28: Les bouchons de mucus sont associés à un syndrome obstructif bronchique plus sévère	105
Figure 29: Le score de mucus est associé au pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations et au FeNO chez les asthmatiques non-fumeurs	107
Figure 30: La galectine 10 est un marqueur de substitution de l'inflammation éosinophilique chez les patients asthmatiques mais n'est pas liée à la formation des bouchons de mucus dans les voies aériennes	108
Figure 31: L'administration d'un inhibiteur spécifique de la RIPK2 pendant la phase d'initiation d'un asthme allergique aux acariens réduit l'inflammation pulmonaire, l'inflammation de type 2 et l'hyperréactivité des voies aériennes chez les souris traitées	123
Figure 32: Schéma représentatif des trois voies de la réponse au stress protéique (UPR)	125
Figure 33: Les bouchons de mucus dans les voies aériennes sont stables au cours du temps et leur évolution est corrélée à la fonction respiratoire	129
Figure E1 : La voie de signalisation de Nod1 aggrave la réponse allergique des voies respiratoires induite par HDM	87
Figure E2 : Les mucopeptides associés aux acariens sont détectés par NOD1 dans les cellules épithéliales via RIPK2	88
Figure E3 : L'intensité de l'inflammation allergique asthmatique des voies respiratoires est diminuée après provocation avec des acariens appauvris en PG dans le protocole sous-optimal mais pas à avec des acariens pauvres en LPS dans le protocole optimal	89

Liste des figures

	Page
Tableau 1 : Caractéristiques globales des patients asthmatiques selon les catégories de score de mucus	102
Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des patients asthmatiques selon leur statut tabagique	103
Tableau 3 : Corrélation entre le score de mucus et les différents paramètres spirométriques	116
Tableau 4 : Comparaison des coefficients de concordance inter-évaluateur de l'établissement des scores de mucus chez les patients asthmatiques.	121

Résumé

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes responsable d'une morbi-mortalité significative et définie par une association entre des symptômes cliniques et une obstruction bronchique variable. Les caractéristiques cardinales de l'asthme sont une hyper-réactivité des voies aériennes, une inflammation bronchique associée à une modification de la structure des bronches dont une hyperproduction de mucus.

L'ensemble de ces caractéristiques aboutit à de nombreuses présentations cliniques, appelées des phénotypes asthmatiques, qui sont la conséquence de multiples mécanismes physiopathologiques distincts. Le phénotype asthmatique le plus fréquent est l'asthme allergique dont les acariens représentent l'un des principaux pneumallergènes. L'hétérogénéité de cette pathologie requiert une approche globale incluant des travaux fondamentaux et une approche clinique translationnelle. Ces deux approches ont été développées dans cette thèse.

Dans la première partie, l'implication d'un récepteur de l'immunité innée, le récepteur Nod1, dans l'asthme allergique aux acariens a été investiguée. Ce récepteur reconnaît des fragments de peptidoglycanes bactériens et participe à la réponse immune. Il est également impliqué dans la régulation du microbiote digestif. Chez les souris Nod1^{-/-}, les paramètres allergiques asthmatiques induits par les acariens sont réduits comparativement aux souris sauvages. Cette atténuation de la réponse allergique asthmatique n'est pas liée à une modification de la flore digestive des souris Nod1^{-/-}. En revanche, les extraits d'acariens contiennent une flore microbienne, principalement composée de bacille gram négatif, susceptible d'activer directement le récepteur Nod1 au niveau de l'épithélium des voies respiratoires. Cette activation participe à l'exacerbation de la réponse allergique asthmatique induite aux acariens et offre une nouvelle perspective thérapeutique dans le traitement de l'asthme allergique aux acariens.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'impact fonctionnel de bouchons de mucus présents dans les voies aériennes de patients asthmatiques en fonction de leur statut tabagique en utilisant des outils précédemment développés. La présence de bouchons de mucus est fréquente quel que soit le statut tabagique des asthmatiques. Une corrélation inverse a été retrouvée entre le nombre de segments pulmonaires présentant au moins un bouchon de mucus et l'obstruction des voies aériennes. Cette caractéristique clinique est corrélée au pourcentage de polynucléaires éosinophiles dans les expectorations. Chez les patients ayant un antécédent de tabagisme, la présence d'occlusions des voies aériennes est associée au pourcentage de neutrophiles. Les bouchons de mucus apparaissent comme un marqueur de sévérité de l'asthme et sont corrélés à différents types d'inflammation bronchique selon le statut tabagique.

Cette thèse a contribué à faire avancer les connaissances fondamentales et clinico-fonctionnelles dans l'asthme. Ces résultats invitent à poursuivre les investigations dans ces différents domaines.

Mots clefs : Asthme, Allergies, Acariens, NOD1, Peptidoglycanes, Bouchons de mucus

Summary

Asthma is a chronic inflammatory airway disease responsible for significant morbidity and mortality defined by an association between clinical symptoms and variable airway obstruction. The cardinal features of asthma are airway hyperresponsiveness, bronchial inflammation associated with changes in the structure of the bronchi including overproduction of mucus. Taken together, these characteristics result in numerous clinical presentations, called asthmatic phenotypes, which are the consequence of multiple distinct pathophysiological mechanisms. The most common asthma phenotype is allergic asthma, of which house dust mites are one of the main pneumallergens. The heterogeneity of this pathology requires a comprehensive approach including fundamental work and translational clinical approach. These two approaches have been developed in this thesis.

In the first part, the involvement of an innate immunity receptor, the Nod1 receptor, in house dust mite allergic asthma was investigated. This receptor recognizes fragments of bacterial peptidoglycans and participates in the immune response. It is also involved in the regulation of the digestive microbiota. In Nod1^{-/-} mice, the mite-induced asthmatic allergic parameters are reduced compared to wild type mice. This attenuation of the allergic asthmatic response is not linked to a change in the digestive flora of Nod1^{-/-} mice. In contrast, mite extracts contain microbial flora, mainly composed of gram-negative bacillus, capable of directly activating the Nod1 receptor in the epithelium of the respiratory tract. This activation contributes to the exacerbation of the allergic asthmatic response induced by house dust mites and offers a new therapeutic perspective in the treatment of allergic asthma to house dust mites.

The second part of this work is devoted to the functional impact of mucus plugs present in the airways of asthma patients according to their smoking status using previously developed tools. The presence of mucus plugs was common regardless of the smoking status of the asthmatics. An inverse correlation was found between the number of lung segments with at least one mucus plug and airway obstruction. This clinical feature was correlated with the percentage of eosinophils in the sputum. In patients with a history of smoking, the presence of airway obstructions was correlated with the percentage of neutrophils. Mucus plugs appear to be a marker of asthma severity and are correlated with different types of bronchial inflammation depending on smoking status.

This PhD has helped advance fundamental and clinical-functional knowledge in asthma. These results invite further investigations in these different fields.

Keywords: Asthma, Allergies, House Dust Mites, NOD1, Peptidoglycans, Mucus plugs

Introduction

I. L'asthme allergique

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes associant des symptômes respiratoires évocateurs et des critères fonctionnels respiratoires. Les symptômes évocateurs d'un asthme ne sont pas spécifiques de la pathologie. Ils sont le plus souvent des sifflements expiratoires, une toux ou une dyspnée. Ces symptômes varient au cours du temps et peuvent être déclenchés par des expositions environnementales comme les allergènes, des infections ou la pollution. L'absence de spécificité de ces symptômes nécessite la mise en évidence de critères fonctionnels respiratoires associés pour poser le diagnostic. Sur le plan fonctionnel respiratoire, l'asthme est caractérisé par une variabilité des débits expiratoires étant le plus souvent mis en évidence au décours d'une spirométrie (1).

a. L'asthme : une problématique de santé publique

L'asthme est l'une des pathologies chroniques non contagieuses les plus répandues à l'échelle mondiale et toucherait environ 334 millions de personnes. L'incidence annuelle mondiale est estimée à 75 000 cas (2). Les projections épidémiologiques prédisent une augmentation de 100 millions de patients en plus d'ici à 2025 (3). La prévalence de cette pathologie évaluée sur un questionnaire d'auto déclaration du diagnostic d'asthme posé par un médecin est de 4.3 % (95 % CI 4,2-4,4) avec une importante variation de cette estimation entre les pays à faibles ou forts revenus par habitant. (4).

A partir des années 1990, des études épidémiologiques ont évalué la prévalence mondiale de l'asthme. Ces travaux ont mis en évidence une disparité de la prévalence de cette pathologie à travers le monde dans les populations pédiatriques (5) et adultes (6). A titre d'exemple, aux Etats-Unis, la prévalence de l'asthme est passée de 3,6 % en 1980 à 5,8 % en 2003 (7). Une disparité spatiale de la distribution de cette pathologie a également été mise en évidence. En effet, la prévalence de l'asthme est plus élevée dans les pays à haut revenu par habitant tel que l'Australie (21,0 %) et plus faible dans les pays où les revenus sont plus faibles comme la Chine (0,2 %) (Figure 1 et 2) (4).

Cette disparité de distribution est particulièrement retrouvée dans les populations pédiatriques présentant des symptômes évocateurs d'asthme avec une prévalence allant de 2,8% en Indonésie à 37,6% au Costa Rica chez les sujets âgés de 6 à 7 ans (8).

De plus, la cinétique de la prévalence asthmatique varie également en fonction du pays considéré. Dans les pays à haut revenu cette dernière est élevée mais stable voire en

décroissance dans certains pays alors qu'elle continue à augmenter dans les pays à moyen ou faible revenu par habitant (9).

Cette inégalité de distribution géographique mondiale est également confirmée à une échelle locale avec une prévalence plus faible dans un environnement rural par rapport à un environnement urbain au sein d'un pays comme la Chine (10). Cette disparité suggère un impact de l'environnement dans la pathogénèse asthmatique. Ce point sera spécifiquement discuté dans un prochain paragraphe.

La prévalence varie également en fonction du genre. Dans l'enfance, le risque de développer un asthme chez les garçons est plus élevé que chez les filles. Cependant, pendant et après l'adolescence, les femmes sont plus atteintes que les hommes (3). Après l'âge de 35 ans, l'asthme est 20 % plus fréquent chez les femmes que chez les hommes avec une incidence plus forte d'asthme non allergique (11).

Les cinétiques de la prévalence de l'asthme et d'autres pathologies allergiques tels que la rhino conjonctivite allergique ou l'atopie, ont des évolutions discordantes selon les pays considérés. Au Royaume-Uni (12) et en Australie (13), la prévalence de la positivité des tests cutanés et de l'asthme sont toutes les deux en augmentation alors qu'en Allemagne (14) et à Hong Kong (15) l'augmentation des prick tests n'est pas associée à une augmentation de la prévalence de l'asthme.

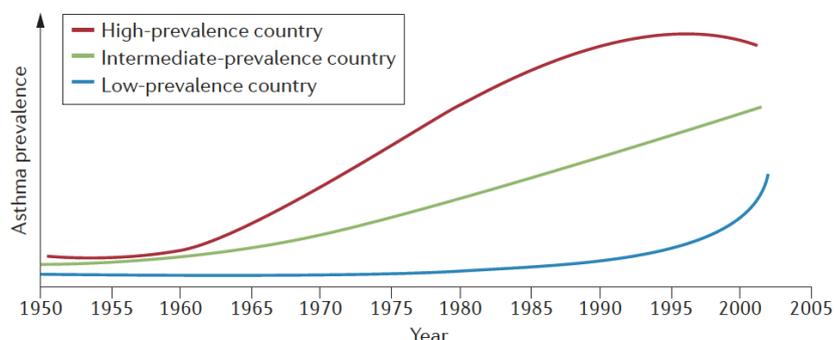


Figure 1: Tendance évolutive de la prévalence de l'asthme en fonction du produit intérieur brut des pays.

La prévalence de l'asthme semble atteindre un plateau dans les pays ayant un produit intérieur brut élevé alors que cette prévalence est toujours croissante dans les pays à PIB moyen ou faible. (Bousquet et al., 2005)

Cependant, l'estimation et l'évolution de la prévalence de la pathologie asthmatique doit être considérée avec prudence compte tenu des difficultés diagnostiques de l'asthme et des critères pris en compte pour retenir le diagnostic. Par exemple, dans la population adulte, la prévalence de l'asthme est respectivement estimée à 4,3 %, 4,5 %, et 8,6 % en fonction des définitions utilisées : question d'auto-déclaration d'un asthme diagnostiqué par un médecin, asthme clinique ou traité comme tel ou antécédents d'épisodes de sifflements respiratoires (4). L'exhaustivité de ce type de recueil repose sur la reconnaissance des symptômes par la

population et le corps médical. Elle pourrait être sous estimée dans les pays où l'information et l'accès aux soins sont moins disponibles.

En dépit des limitations présentées ci-dessus, la prévalence et la sévérité de l'asthme sont responsables d'une importante morbi-mortalité et d'un coût socio-économique significatif pour la société.

Concernant la morbidité liée à l'asthme, cette pathologie est classée en 2016 comme étant la 16^{ème} étiologie d'années de vie avec une incapacité, et la 28^{ème} cause de charges liées aux pathologies évaluées par les années de vie corrigées de l'incapacité sur les 328 pathologies recensées (2). En dépit d'une prévalence plus faible dans les pays ayant un produit intérieur brut bas, le contrôle de l'asthme est sous optimal (10) et responsable d'une importante mortalité évitable, le plus souvent par un manque d'accès à un traitement de fond (3). En Europe, plus précisément en Italie, le coût moyen global de la prise en charge d'un patient asthmatique est estimé à 1 260 euros par an. Le coût moyen des traitements, stratifié sur la sévérité de l'asthme, est multiplié par un facteur 4 entre les patients ayant un asthme intermittent par rapport aux patients ayant un asthme sévère passant de 720 euros à 3328 euros par an et par patient (16). Aux Etats-Unis en 2013, le coût global de l'asthme a été estimé à 81.9 billions de dollars. Ces coûts sont en augmentation depuis 2002 (17). Sur la période de 2008 à 2013, l'asthme aurait été responsable de coûts liés à des arrêts de travail, de coûts médicaux ou liés à une mortalité de respectivement 3 billions, 50.3 billions et 29 billions de dollars (18) et représenterait la troisième cause d'hospitalisation pour les moins de 18 ans en 2003 (7).

La morbi-mortalité et les coûts socio-économiques sont en grande partie générés par les patients asthmatiques non contrôlés malgré une pression thérapeutique maximale (16,19). Ces patients sont, par définition, des asthmatiques sévères et représentent environ 5 à 10 % des patients asthmatiques (19,20). Les patients asthmatiques sévères ont une altération de leurs qualité de vie, une augmentation du nombre d'hospitalisations et d'effets secondaires liés à la corticothérapie systémique comparativement aux patients ayant un asthme contrôlé (21).

En France en 2012, la prévalence de l'asthme chez l'adulte était estimée à 7,4% de la population âgée de plus de 15 ans (22). Chez les enfants d'âge scolaire, la prévalence de l'asthme était de 11 % en 2012-2013 ce qui représentait une augmentation par rapport à 2005 (23). De façon cohérente avec les données internationales, l'asthme était associé à un faible niveau socio-économique au sein de la population adulte et pédiatrique en France (22,23). En 2005, 1 129 décès ont été attribués à l'asthme (24). Cette mortalité par asthme fatal en France est en diminution au cours des dernières décennies. L'impact médico-économique du contrôle de l'asthme a été évalué en France. Une amélioration du contrôle de cette pathologie permettrait une réduction du coût de cette dernière pour la société (25).

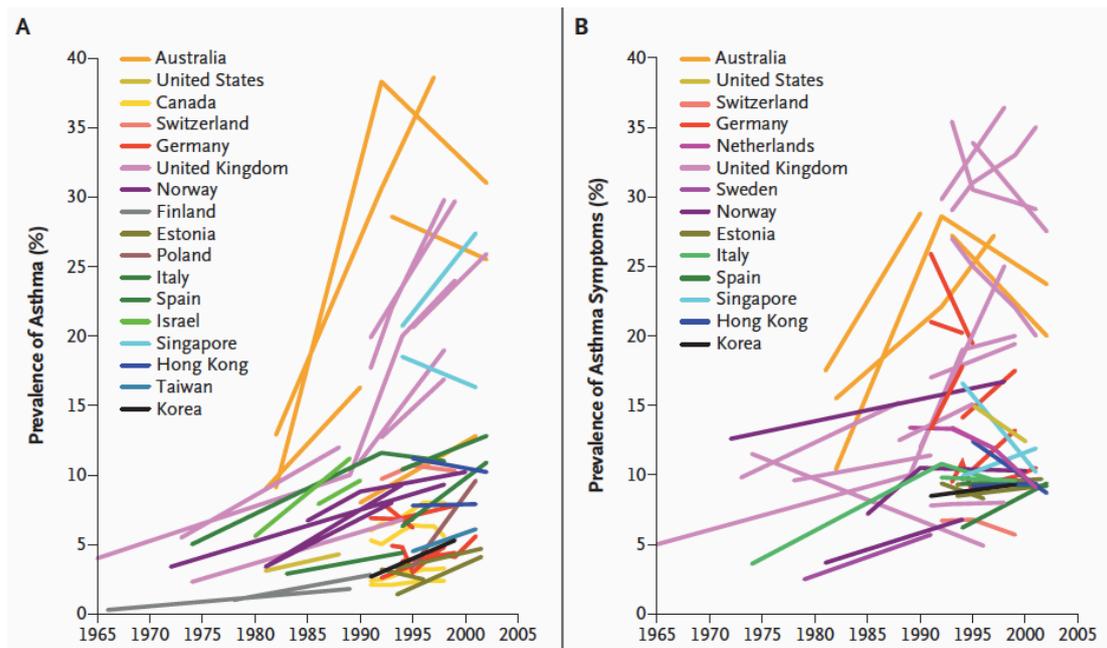


Figure 2: Evolution et disparité de la prévalence de l'asthme et des symptômes asthmatiques chez les enfants et les jeunes adultes selon les pays. (Eder et al., 2006)

La prévalence, l'incidence et les coûts médico-sociétaux liés à l'asthme ont fait évoquer à certains auteurs le concept d'une « « épidémie asthmatique » (26). Même si l'utilisation du terme épidémie est discutable et que la prévalence de l'asthme semble stagner dans certains pays à hauts revenus, il n'en reste pas moins que l'impact médico-économique de cette pathologie reste majeur au niveau de la santé mondiale. Une meilleure compréhension de la physiopathologie asthmatique est nécessaire pour mieux appréhender sa complexité et développer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans la prochaine partie nous aborderons le diagnostic de l'asthme, ses différentes présentations et sa physiopathologie.

b. L'asthme : définition et présentations cliniques

Les connaissances et les concepts développés dans le domaine de l'asthme ont subi plusieurs changements de paradigme depuis l'avènement des études génétiques, génomiques et les premiers essais cliniques utilisant des thérapies ciblées. En dépit de ces avancées, il n'existe pas à l'heure actuelle de « gold standard » pour le diagnostic d'asthme. Le diagnostic reste fondé sur une approche probabiliste en considérant une association de symptômes respiratoires non-spécifiques et une limitation des débits expiratoires. Le diagnostic est difficile compte tenu du caractère hétérogène de cette pathologie, de

l'inconstance des symptômes et de la possibilité que l'ensemble des critères ne soit pas retrouvable au moment de l'investigation.

Les symptômes évocateurs d'asthme sont non spécifiques. Les plus fréquents sont la toux, la dyspnée, les sifflements expiratoires et la sensation d'oppression thoracique. L'absence de spécificité de cette symptomatologie rend nécessaire la mise en évidence d'une variabilité des débits expiratoires pour asseoir le diagnostic. La méthodologie la plus communément utilisée pour évaluer cette obstruction bronchique est la spirométrie. Une limitation des débits expiratoires est définie pour une mesure du volume maximal expiré en une seconde (VEMS ou FEV1 en anglais) rapporté sur la capacité vitale forcée (CVF ou FVC en anglais) inférieure à la valeur prédite pour l'âge, le sexe, la taille et l'ethnie (27).

La variabilité des débits expiratoires peut-être explorée par différentes méthodologies. La plus fréquente est la mesure de la réversibilité à des broncho-dilatateurs de courte durée d'action. Chez l'adulte, une augmentation de 12 % du VEMS et de 200 mL ou, chez l'enfant une augmentation de 12 % du VEMS, 10 à 15 minutes après l'administration de β_2 mimétique de courte durée d'action définit une réversibilité des débits expiratoires (28). Des tests de provocation peuvent être utilisés pour objectiver cette variabilité des débits expiratoires. Par exemple, une chute du VEMS de 20% après une exposition directe à un agoniste non-sélectif des récepteurs muscariniques, la métacholine, permet de poser le diagnostic d'une hyper-réactivité bronchique (29). D'autres méthodologies peuvent être utilisées pour mettre en évidence cette variabilité, mais elles n'entrent pas dans le champ de cette étude.

Chez la plupart des patients, l'asthme est contrôlé par l'administration conjointe de corticostéroïdes inhalés qui réduisent l'inflammation des voies aériennes conductrices et par l'action de broncho-dilatateurs de courte ou de longue durée d'action de type β_2 adrénergique. Cette thérapeutique permet une relaxation de la cellule musculaire lisse bronchique (30). Une minorité de patients, entre 5 à 10 %, présente une forme clinique d'asthme réfractaire aux corticostéroïdes inhalés à forte dose. Après avoir éliminé les diagnostics différentiels et optimisé les facteurs de non-contrôle de l'asthme, le diagnostic d'asthme sévère est retenu pour ces patients (20).

L'avènement des premières immunothérapies ciblées contre la cytokine IL-5 dans l'asthme ont révélé de façon fracassante le caractère hétérogène de cette pathologie (31). L'inflammation sous tendant les symptômes asthmatiques dépend de multiples voies biologiques. Afin d'appréhender cette complexité, des ensembles regroupant certaines caractéristiques observables de la pathologie ont été mis au point. Ils constituent des « phénotypes ».

L'identification de ces phénotypes peut être réalisée par les cliniciens en caractérisant des groupes de patients présentant les mêmes traits cliniques. Les premiers phénotypes

asthmatiques a été identifié en 1947 avec la description d'asthme « extrinsèque » à début précoce associé à des pathologies allergiques et des asthmes « intrinsèque » à début tardif sans sensibilisation allergénique (32). L'étude de la cytologie des expectorations a permis d'identifier différents profils d'inflammation : éosinophilique, neutrophilique, mixte ou paucigranulocytaire (33). Cette hétérogénéité de l'inflammation des voies aériennes asthmatiques a été confirmée par des études transcriptomiques réalisées à partir de biopsies bronchiques. Cette approche a permis d'identifier des profils inflammatoires de type 2 élevé (T2 High) ou bas (T2 Low) définissant chacun deux phénotypes asthmatiques distincts (34). Le contrôle du profil inflammatoire des cellules présentes dans les voies aériennes des patients asthmatiques est assuré par les lymphocytes T (35). Les différents sous types d'asthme sont associés à différents sous types de lymphocytes. Les CD4+ de type Th2 prédominent dans l'asthme allergique éosinophilique (36) alors que l'association de cellules de type Th1 et Th17 sont retrouvées dans l'asthme neutrophilique (37).

La méthodologie pour identifier et regrouper les caractéristiques des patients asthmatiques a évolué avec le temps. Une approche statistique systématique non biaisée par analyse en cluster a émergé à partir de cohortes multicentriques aux Etats-Unis et en Europe (19,38). Ces études ont identifié de nombreux phénotypes dont les plus couramment décrits sont : l'asthme précoce avec sensibilisation allergique, l'asthme éosinophilique de début tardif non allergique, l'asthme tardif avec inflammation neutrophilique et limitation des débits expiratoires fixés (19). Les voies biologiques sous-tendant les phénotypes sont appelées endotypes. Ces derniers se caractérisent par une multitude d'interactions entre l'hôte, ses expositions environnementales, ses susceptibilités génétiques, la présentation clinique et une réponse spécifique aux différentes thérapeutiques (39,40). Pour la suite de ce travail, nous allons nous concentrer sur le phénotype asthmatique le plus fréquent et le mieux décrit : l'asthme allergique éosinophilique.

c. Physiopathologie de l'asthme allergique

i. Pathogénèse de l'asthme

Sur le plan physiopathologique, l'asthme se caractérise par une obstruction et un rétrécissement des voies aériennes responsables des symptômes perçus par le patient. Les déterminants de l'obstruction des voies aériennes asthmatiques sont nombreux : l'inflammation bronchique, l'œdème épithélial, l'influx de cellules inflammatoires (éosinophiles, neutrophiles, mastocytes) et le remodelage bronchique (9,41). Cette réduction du calibre des voies aériennes est variable dans le temps. Cette réversibilité est liée à

l'hyper-réactivité bronchique en réponse à différentes stimulations. La cellule musculaire lisse bronchique asthmatique a tendance à se contracter pour des stimuli non spécifiques tel que l'air froid, l'exercice ou les allergènes (42). Cette contraction est amplifiée par une co-localisation avec les cellules mastocytaires (43) et par la transduction d'un stress mécanique (44) qui induit une réduction de la lumière des voies aériennes. L'administration d'un broncho-dilatateur de courte durée d'action de type bêtamimétique permet une relaxation de la cellule musculaire lisse (45). Certains patients présentent une obstruction persistante des voies aériennes malgré une corticothérapie inhalée à forte dose et l'administration de broncho-dilatateur. Cette obstruction persistante est multifactorielle et s'inscrit dans un processus de remodelage des voies aériennes (41). Ce mécanisme implique de profondes modifications de l'architecture des bronches dont les déterminants et l'impact fonctionnel respiratoire seront discutés plus loin dans ce document.

La pathogénèse de l'asthme se caractérise par une inflammation des voies aériennes conductrices et un remodelage des voies aériennes. Les caractéristiques de ces deux composantes varient en fonction de l'endotype asthmatique et aboutissent *in fine* à des phénotypes asthmatiques différents. Dans ce travail, nous nous focaliserons sur l'inflammation de type 2 dans l'asthme allergique.

ii. L'inflammation de type 2 dans l'asthme

L'inflammation dans les voies aériennes conductrices est une des caractéristiques cardinales de l'asthme. L'inflammation de type 2 est retrouvée chez approximativement la moitié des patients (36) soit chez environ 50 % des asthmatiques à l'âge adulte et plus de 80 % des enfants asthmatiques (9).

L'inflammation de type 2 est un modèle de réponse inflammatoire caractérisée par la sécrétion des cytokines prototypique IL-4, IL-5, IL-13 et dont l'éosinophile est la cellule inflammatoire archétypale (46). Néanmoins, l'inflammation de type 2 implique d'autres types cellulaires tels que les mastocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (47). Ce type d'inflammation résulte d'une activation du système immunitaire inné, via les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) ainsi que de l'immunité adaptative via les lymphocytes T CD4+ (48).

Plusieurs phénotypes asthmatiques ont été associés à l'inflammation de type 2 (49). Les patients asthmatiques peuvent être dichotomisés en patients avec inflammation T2 « high » ou « low » en fonction de la présence ou de l'absence de marqueurs de l'inflammation de type 2. Le phénotype T2 « high » est caractérisé par une hyper-éosinophilie, sanguine et/ou bronchique associée à une augmentation de bio-marqueurs spécifiques d'une inflammation de type 2 tel que la périostine et la fraction exhalée de

monoxyde d'azote (FeNO) (50–52). Une signature d'inflammation T2 « high » ou « low » a également été mise en évidence par analyse de l'expression génique sur des expectorations induites (53) ou sur des biopsies bronchiques de patients asthmatiques (54).

Dans l'asthme de type T2 « high » (36) et dans l'asthme allergique (55), l'initiation de la réponse immune de type 2 débute par le relargage d'IL-25, l'IL-33 et de Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) par l'épithélium respiratoire (Figure 3 et 4). Ces cytokines sont regroupées sous le nom d'alarmines épithéliales. Elles participent à l'activation en aval des lymphocytes T et des ILC2s (38,49).

L'IL-33 appartient à la famille des cytokines IL-1. Suite à une agression cellulaire ou à un processus de mort cellulaire, l'IL-33 est libérée et se fixe sur son récepteur ST2 à la surface des cellules du système immunitaire. Cette reconnaissance induit la production de cytokines pro-inflammatoires et une réponse inflammatoire T2 médiée (56). L'action conjointe de l'IL-25 et de l'IL-33 sur les lymphocytes T naïfs conduit à une différenciation de type Th2 (57). Le TSLP promeut un environnement de type Th2 en activant les cellules dendritiques (38).

Les ILC2s ne possèdent pas de récepteurs antigène spécifique, mais comme les cellules Th2, elles réagissent aux alarmines épithéliales (42,58). Ces cellules se développent à partir de progéniteurs lymphoïdes communs en réponse à l'IL-7 et l'IL-33 de façon dépendante du facteur de transcription GATA-3 et ROR- α . L'activation des ILC2 est renforcée par une stimulation par l'IL-25 et l'IL-33 produits par une agression épithéliale (59).

Ainsi, chez des souris RAG déficientes, c'est à dire ne produisant pas de cellules lymphocytaires T ou B matures, l'exposition à certains allergènes comme les acariens ou un champignon (*Alternaria alternata*) conduit à une éosinophilie des voies aériennes et la production de cytokine de type 2 indépendamment de la réponse immune adaptative (42,60). L'activation des ILC2s qui participent à leur tour à la production de cytokines de type 2 telles que IL-5 IL-9, IL-13 et amplifie la réaction inflammatoire de type 2 (61) (Figure 4). Des travaux établissent que les ILC2s pourraient également indirectement participer à la réponse allergique. L'agression tissulaire générée par les protéases contenues dans certains allergènes, comme *A. Alternata*, conduit à la libération d'IL-33 par l'épithélium respiratoire. Cette cytokine active ensuite les ILC2s qui secondairement induisent une hyper-éosinophilie et une hyper-réactivité bronchique (60). L'IL-5 qui est impliquée dans le recrutement et l'activation des éosinophiles, induit la production de mucus et la contraction des cellules musculaires lisses. La cytokine IL-13 participe à la contraction musculaire lisse bronchique, à la production de mucus et au remodelage des voies aériennes (45). Les biomarqueurs utilisés pour identifier les phénotypes T2 élevés, tels que le FeNO ou la périostine, sont essentiellement produits par les cellules épithéliales exprimant le récepteur IL-4Ra et répondant à l'IL-4 et l'IL-13 (50,51). Les cytokines archétypales de type 2 et les éosinophiles interagissent et participent avec d'autres cellules dans la réaction allergique asthmatique.

iii. Inflammation allergique asthmatique

L'asthme allergique est caractérisé par une inflammation de type 2 associée à une sensibilisation allergénique définie par un test cutané positif à un extrait d'allergène ou la présence d'IgE spécifiques dirigées contre un allergène protéique (42). La réponse allergique se décompose en deux étapes successives : une phase de sensibilisation asymptomatique puis une phase effectrice après réexposition au même allergène. L'exposition à un allergène chez les sujets non atopique induit une production d'IL-10 par les cellules dendritiques aboutissant *in fine* à une induction de tolérance et la génération de cellules régulatrices (62). Au niveau de l'épithélium des voies aériennes et de la sous-muqueuse, des cellules présentatrices de l'antigène (et de l'allergène), les cellules dendritiques, sont présentes.

Les cellules dendritiques ont la capacité de capter les allergènes dans les voies aériennes, de les dégrader en peptides de petite taille puis de les présenter au LT naïfs via le complexe majeur d'histocompatibilité de type II et de classe I (CMH de type II et I) (35). La captation de l'allergène au niveau de l'épithélium respiratoire est un processus actif. Des interactions de co-stimulation entre ces cellules sont également nécessaires au sein des ganglions lymphoïdes pour une réaction allergique efficiente (63). Ces interactions aboutissent à la polarisation des LTs naïfs en LT de type Th2 qui participent à leur tour à la synthèse de cytokines prototypiques de l'inflammation de type T2 telles que IL-3, IL-5, IL-9, IL-13 et la synthèse de granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). La polarisation des cellules Th2 CD4⁺ est dépendante de l'IL-4 ou de l'IL-13 qui activent la phosphorylation du facteur de transcription GATA3 et du facteur de transcription STAT6 (35,64). L'ensemble de ces médiateurs inflammatoires participe et amplifie la réponse inflammatoire de type 2 (65) (Figure 3 et 4).

Les aéro-allergènes les plus communs, comme les acariens ou les moisissures, ont la capacité d'altérer l'intégrité de la barrière épithéliale et de faciliter la reconnaissance des allergènes par les cellules dendritiques (66) (Figure 3). De plus, les acariens ont la capacité d'amplifier la réponse immune initiée par les cellules dendritiques via l'activation de récepteurs de l'immunité innée comme le TLR4 et les récepteurs aux lectines exprimés par les CD et les cellules épithéliales (Figure 3) (67).

Suite à ce premier contact, les CD quiescentes évoluent et expriment de nouveaux marqueurs de co-stimulation permettant l'établissement d'un contact étroit entre ces dernières et les lymphocytes T naïfs (68). La synthèse d'IL-4 par les LT de type Th2 induit une commutation de classe vers les IgE et la production d'IgE spécifiques dirigées contre l'antigène (69). Cette commutation de classe des IgE est un prérequis pour l'atopie. Les IgE spécifiques se fixent sur les récepteurs membranaires de haute affinité FcεR1 des

mastocytes et favorisent la reconnaissance de l'allergène suite à une seconde exposition (35)

Après cette phase de sensibilisation asymptomatique, une réexposition à cet allergène conduit au déclenchement d'une réponse inflammatoire allergique IgE médiée. Les IgE spécifiques présentes à la surface des mastocytes, des basophiles et des CD80 vont reconnaître l'allergène. Cette phase effectrice se décompose en deux étapes : une phase précoce puis tardive. Dans les 5 à 90 minutes qui suivent l'exposition, la reconnaissance par les récepteurs IgE de haute affinité localisés sur les mastocytes et les basophiles du complexe allergène-IgE induit une dégranulation et le relargage de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine, de prostaglandine D et de leucotriènes C₄ (70). Ces substances vont provoquer une broncho-constriction aiguë médiée par les mastocytes. Cette phase est suivie d'une seconde réponse tardive liée à l'infiltration et l'activation de cellules innées dont les éosinophiles conduisant à une amplification de l'inflammation via la production de cytokine de type 2 et de leucotriènes (71). Cette réponse effectrice en deux étapes ne s'applique que pour les exacerbations déclenchées par une exposition à un allergène (72).

En réponse à un stimulus allergénique déclenché par la reconnaissance de l'allergène par son IgE spécifique, l'inflammation est amplifiée et orchestrée par les cytokines de type 2 comme l'IL-4, IL-5, IL-13 (Figure 4).

Ainsi, l'inhibition ou la déficience en IL-4, IL-5 et IL-13 est associée à une réduction des caractéristiques cardinales de l'asthme comme l'éosinophilie sanguine et pulmonaire, l'hyper-réactivité des voies aériennes, la production de mucus et le remodelage des voies aériennes dans des modèles murins d'asthme induit à l'ovalbumine (73–75).

L'asthme allergique est souvent associé à des comorbidités comme la dermatite atopique, la rhino-conjonctivite allergique et les allergies alimentaires (76). Par exemple, l'atopie est retrouvée chez environ 50 à 60 % des adultes et des enfants asthmatiques (77). La survenue séquentielle et graduelle de symptômes allergiques a été décrite chez les enfants sous le nom de « marche atopique ». La pathologie débute par une sensibilisation allergénique souvent associée à un eczéma au cours des premières années de vie puis secondairement d'une rhinite allergique pouvant évoluer vers un asthme (78).

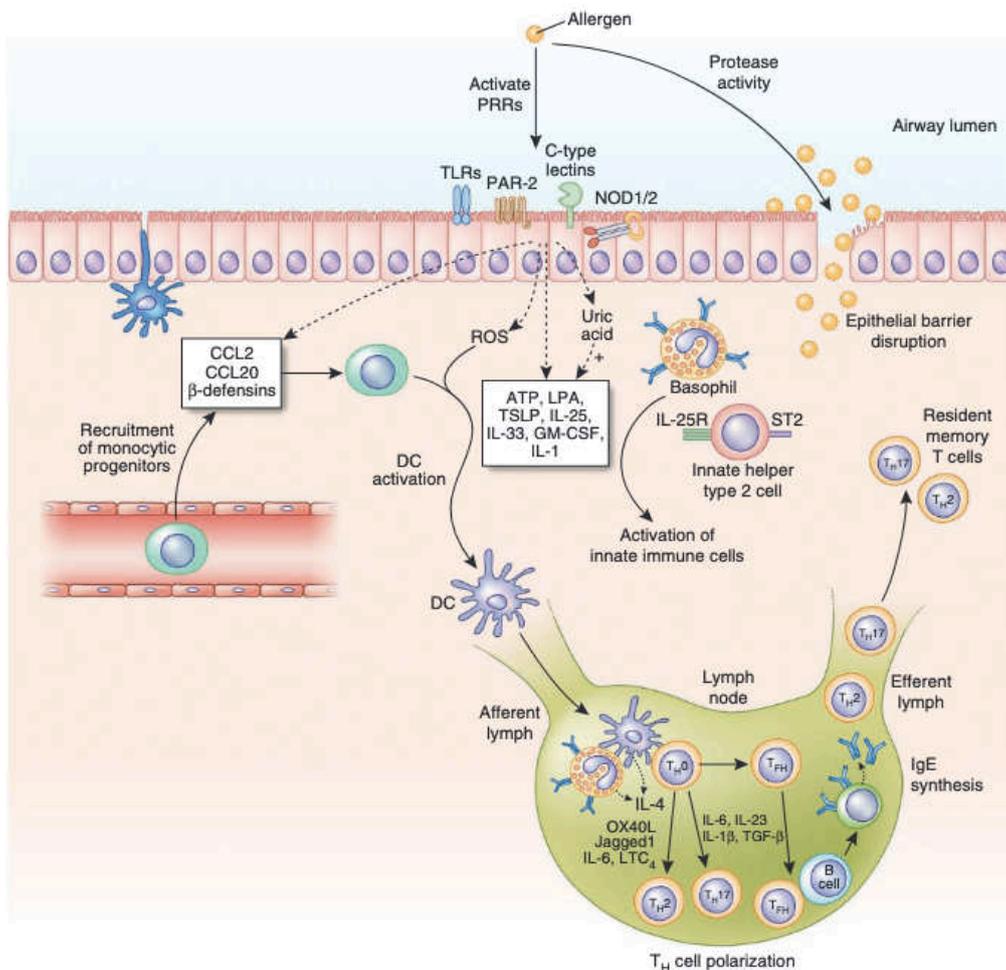


Figure 3: Rôles des cellules épithéliales (CE) des voies aériennes dans l'induction d'une réponse allergique asthmatique par les cellules dendritiques.

L'exposition de l'épithélium respiratoire à des aéro-allergènes, comme les acariens, active les récepteurs de l'immunité innée des cellules épithéliales et des CD. L'activation des PRR au niveau de la CE conduit à la synthèse de chimiokines (CCL2, CCL20), de β-defensines participant au recrutement de progéniteurs des cellules dendritiques dans le poumon. Les CE produisent également des cytokines et des signaux de danger (ATP, Acide urique) qui participent à la maturation des pré-CDs en cCDs-CD11b⁺ activés. L'activation directe des cCDs est favorisée par l'altération de l'intégrité de l'épithélium respiratoire, via le clivage des jonctions serrées, par les protéases présentes dans les allergènes. Les CD matures migrent ensuite vers les ganglions de drainage lymphatique ou elles interagissent avec les cellules T naïves en les différenciant en cellules Th2, Th17 et en ThFH (Follicular helper). Cette sous-catégorie de cellules favorise ensuite la différenciation des LB en plasmocytes et la synthèse d'IgE totales et spécifiques.

NOD1/2 : nucleotide oligomerization domain, PAR-2 : protease activated receptor 2 (Lambrecht et al., 2015)

L'inflammation allergique et l'inflammation de type 2 sont des déterminants importants de l'asthme allergique et de sa sévérité. L'histoire naturelle des maladies inflammatoires chroniques des voies aériennes est marquée par un changement structurel de la paroi. Cette modification de l'architecture implique de multiples caractéristiques regroupées sous le terme de remodelage bronchique (RB) (79). Dans la prochaine partie, nous allons définir ce processus puis se focaliser plus spécifiquement sur l'hypersécrétion de mucus et son impact fonctionnel.

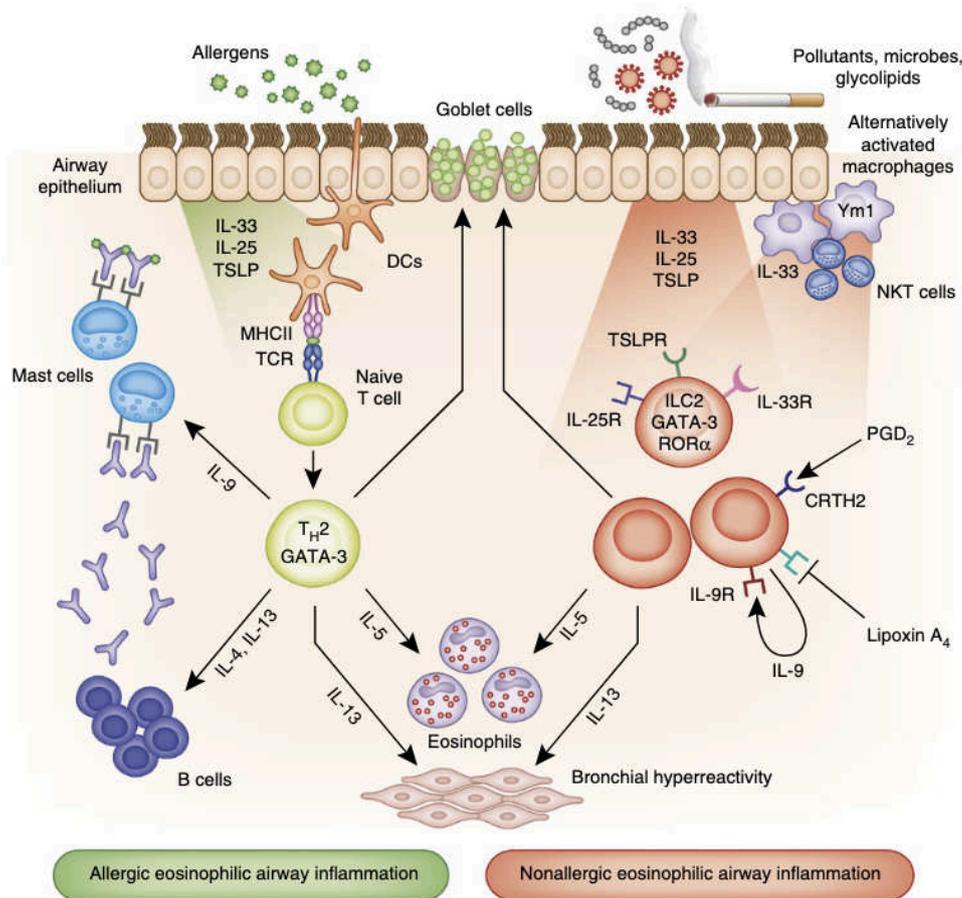


Figure 4 : Rôles respectifs des lymphocytes Th2 et des ILC2s dans deux phénotypes asthmatiques distincts : l’asthme allergique éosinophilique et l’asthme non allergique éosinophilique.

- A gauche, dans l’asthme allergique, la cellule dendritique capte au niveau de la lumière de l’épithélium bronchique l’allergène puis le présente au LT naïf. Chez les sujets atopiques, cette présentation va aboutir à une polarisation Th2 et la production de cytokines IL-4, IL-13 et IL-5 aboutissant respectivement au switch de classe vers les IgE, une hyper-réactivité bronchique et la survie des PNE.
- A droite, dans l’asthme éosinophilique non allergique, l’inflammation de type 2 n’est pas dépendante de la réponse immunitaire adaptative. Les alarmines sécrétées par l’épithélium respiratoire induisent la prolifération des ILC2s. Ces cellules de l’immunité innée synthétisent de l’IL-4 et de l’IL-13 indépendamment de la présence d’un allergène. La synthèse de ces cytokines aboutit à une éosinophilie et une hyper-réactivité bronchique.

MHCII : complexe majeur d’histocompatibilité de type II, TSLPR : récepteur pour le TSLP, NKT : cellule tueuse naturelle T. (Lambrecht et al., 2015 adapté de Brusselle and al., 2013)

iv. Remodelage des voies aériennes

L’asthme est caractérisé sur le plan histopathologique par une inflammation des voies aériennes conductrices et une modification anormale de la structure de la paroi bronchique. L’épaississement de la paroi bronchique est la principale caractéristique du remodelage bronchique dans l’asthme. Le remodelage bronchique (RB) est défini par une altération de l’épithélium des voies aériennes conductrices, une hyperplasie des cellules caliciformes, une fibrose sous épithéliale associée à une modification de la composition de la matrice

extracellulaire, une augmentation des cellules musculaires lisses bronchiques et un développement de la vascularisation bronchique (80).

Dans le RB asthmatique, l'intégrité de l'épithélium bronchique est altérée avec une desquamation des cellules épithéliales (41). L'épithélium respiratoire est hyperplasique avec une augmentation du nombre de cellules caliciformes et une réduction du nombre de cellules ciliées. Il en résulte une altération de l'intégrité des jonctions serrées, une altération des mécanismes de réparation et une réduction de l'efficacité du transport muco-ciliaire. Cette perte d'intégrité de l'épithélium augmente l'exposition des cellules immunes avec des substances inhalées et favoriserait la sensibilisation allergique (81). L'hyperplasie de cellules productrices de mucus est associée à une augmentation de la production et du stockage des mucines (82).

L'épaississement de la membrane basale réticulaire, ou *lamina-reticularis*, est une des caractéristiques cardinales du remodelage bronchique. Il est secondaire à une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine ou les protéoglycanes (41). Cette tendance est accrue dans l'asthme sévère par rapport à l'asthme modéré ou à la BPCO (83).

Un dépôt accru de collagène de type I, III, V ainsi que de la fibronectine et de la tenascin C a été observé dans la *lamina-reticularis* de biopsies bronchiques de patients asthmatiques (84,85). A contrario dans la membrane basale, la *lamina densa* et la *lamina rare* sont principalement composées du collagène IV qui n'est pas augmenté chez les asthmatiques. Ces protéines extracellulaires sont produites par des cellules de structure : les fibroblastes et les myofibroblastes en réponse aux signaux épithéliaux (86). Cette synthèse accrue de protéines extracellulaires est favorisée par une modification du phénotype de fibroblastes en myo-fibroblastes, une différenciation épithélio-mésenchymateuse et un environnement cytokinique pro-inflammatoire incluant le TGF- β (41).

Le RB est aussi associé à une augmentation du nombre (hyperplasie) et de la taille des cellules musculaires lisses bronchiques (hypertrophie) (87). Les caractéristiques contractiles de ces cellules sont modifiées avec une hyper-contractilité notamment amplifiée par la co-localisation avec les mastocytes (43).

Ces remaniements affectent également le système vasculaire avec une augmentation du nombre et du calibre des vaisseaux (88). Cette néo-vascularisation pourrait faciliter le recrutement de cellules inflammatoires (89).

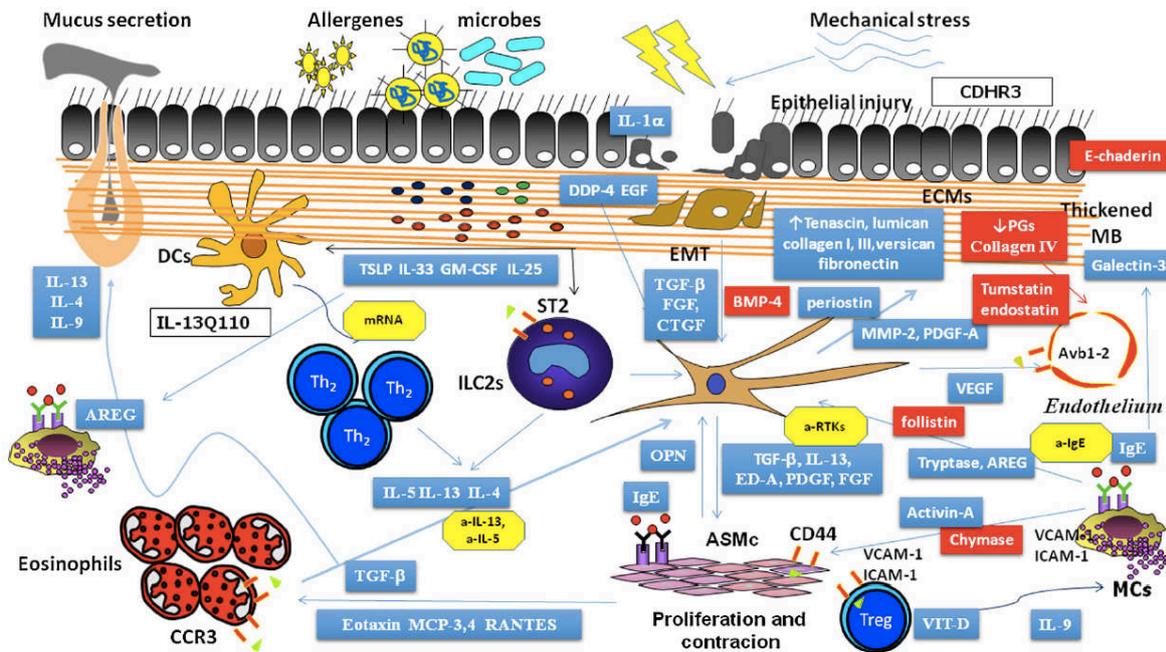


Figure 5: Interactions entre le remodelage bronchique asthmatique et l'inflammation de type 2 et Th2

L'exposition de l'épithélium bronchique à des agressions (allergènes, microbes, stress mécanique) induit la libération d'alarmines épithéliales. Ces médiateurs conduisent à une activation des ILC2s et/ou une polarisation par les CD d'une réponse Th2 aboutissant à la production de cytokines de type 2. Les PNEs sont recrutés au niveau de l'espace sous épithélial et agissent de concert avec l'épithélium endommagé pour induire une activation et une transformation des fibroblastes, une synthèse des protéines de la matrice extra-cellulaire et une prolifération/hypertrophie des cellules musculaires lisses. Cet environnement inflammatoire de type 2 promeut la sécrétion de mucus, l'activation des CML et de l'angiogenèse. Un processus pro-fibrotique est initié via un déséquilibre entre les facteur pro-fibrosant (en bleu) et anti-fibrosant (en rouge). Les cibles thérapeutiques susceptibles d'intervenir dans cette cascade pro-fibrotique sont identifiées en jaune. (Guida and A.M. Riccio., 2013)

Abréviations : a-IL-13 pour: anti IL-13, idem pour les autres cibles thérapeutiques, mRNA = : ARNm messenger

Le RB est un processus complexe et multifactoriel (Figure 5). L'inflammation allergique et asthmatique implique de nombreuses cellules du système immunitaire (les éosinophiles, les neutrophiles, les mastocytes) et des cellules de structure (les cellules épithéliales, endothéliales ou les fibroblastes). L'inflammation de type 2, via ses cytokines archétypales l'IL-13 et IL-4, participe à la production de mucus et à la métaplasie glandulaire de l'épithélium respiratoire (90). Les éosinophiles contiennent également de nombreuses molécules susceptibles de participer au remodelage des voies aériennes en particulier via la production de TGF-β (91). Ces cellules seraient l'une des principales sources de TGF-β dans l'asthme (91). Cette cytokine participe, entre autres, à la prolifération et la régulation des fibroblastes produisant les protéines de la matrice extra-cellulaire ainsi qu'à la production de mucines (92). Les interactions entre le remodelage bronchique et l'inflammation de type 2 sont extrêmement complexes et sommairement résumées dans la figure 5.

Néanmoins, le RB, n'est pas uniquement identifié comme une conséquence de l'inflammation de type 2. Elle peut également être associée à des endotype de type non T2, en particulier en cas d'inflammation neutrophilique et/ou Th17 (93). De plus, le RB, évalué par une augmentation de la masse musculaire lisse bronchique, peut-être retrouvé en amont

d'une inflammation bronchique asthmatique chez les enfants d'âge scolaire présentant des sifflements (94). Ces données suggèrent que le RB ne serait pas uniquement une conséquence de l'inflammation.

L'ensemble des modifications associées au remodelage bronchique aboutit, entre autres, à la réduction de la lumière des voies aériennes notamment via la synthèse accrue de mucus et sa stagnation (Figure 6). Cette amputation de la lumière des voies aériennes est responsable d'une partie de la symptomatologie ressentie par les patients.

L'hyperproduction de mucus est une des caractéristiques de l'asthme dépendante à la fois de l'inflammation bronchique et du remodelage bronchique. Nous allons aborder dans la prochaine partie les déterminants de cette production de mucus ainsi que son impact fonctionnel.

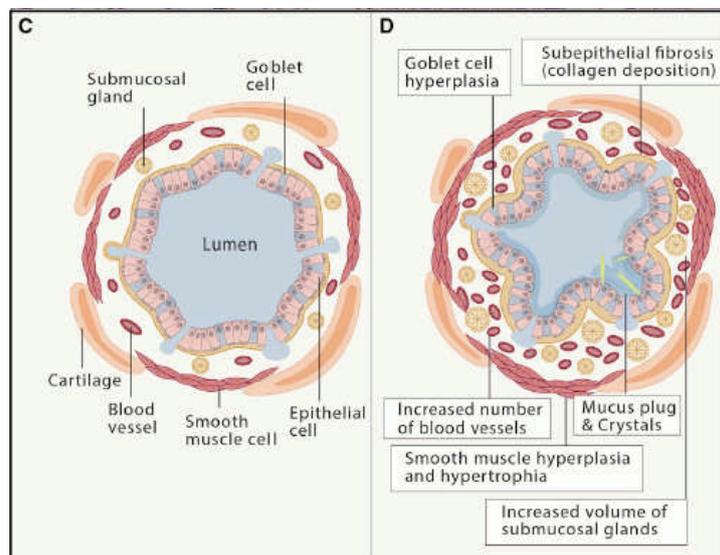


Figure 6 : Les modifications de l'histologie bronchique chez les asthmatiques sévères conduisent à une réduction de la lumière des voies aériennes comparativement aux sujets sains

La figure C représente une section transversale de bronche d'un sujet sain. La figure D représente une section transversale d'une bronche d'un patient asthmatique sévère. Elle comporte l'ensemble des caractéristiques secondaires à un RB: augmentation de l'épaisseur de la membrane basale, hypertrophie des cellules musculaires lisses, fibrose sous épithéliale, hyperplasie des cellules caliciformes. L'ensemble de ces caractéristiques altère la perméabilité des voies aériennes chez les sujets asthmatiques avec une réduction de la lumière bronchique et participe à la formation de bouchons de mucus. (D'après Wadsworth et al., 2011).

v. Hyperproduction de mucus dans l'asthme et ses conséquences fonctionnelles

Le rôle du mucus et de la clairance mucociliaire est la protection et le drainage des voies aériennes respiratoires. Le maintien des voies aériennes non obstruées et indemnes d'infection est dépendant des battements ciliaires et des propriétés physico-chimiques du mucus (90). Au niveau des bronches, la couche de mucus capte les particules inhalées et

contribue à leur expulsion. Le mucus est physiologiquement composé de 97 % d'eau et de 3 % de solide comprenant des mucines, des protéines non muciniques, de l'ADN, des ions, des lipides et des débris cellulaires (95). Les mucines sont des protéines hautement glycosylées. Dans les voies aériennes humaines, il existe trois types de mucines : avec un domaine transmembranaire attaché à la surface des cellules (MUC1, MUC4, MUC16, MUC20), sécrétées ne polymérisant pas et sécrétées polymérisant sous forme de gel (MUC5B, MUC5AC). Ces deux dernières mucines sont les plus abondamment sécrétées dans les voies aériennes chez l'Homme et la souris (90,95). Les propriétés viscoélastiques du mucus sont assurées par MUC5B et MUC5AC via leur organisation en maillage réticulé. Les monomères de mucines peuvent former via des ponts disulfures entre leurs parties N terminale et C terminale une polymérisation « linéaire ». Des liaisons disulfures collatérales entre les mucines sont également possibles via la présence de résidus cystéines au sein du polymère. Ces ponts disulfures collatéraux forment l'organisation réticulée (96). Cette structure confère les propriétés visco-élastiques du mucus. La rupture des ponts disulfures par la N-acétyl-cystéine réduit la viscosité et l'élasticité du mucus (97) alors que l'augmentation des ponts disulfures via l'oxydation des résidus cystéines augmente ces paramètres (98,99).

La physiopathologie de l'asthme est associée à une hyper production de mucus et une altération qualitative de la composition du mucus (82). Dans l'asthme allergique, l'inflammation de type T2 participe activement à la promotion et la persistance d'une hyperproduction de mucus (82). Chez les sujets sains, MUC5AC est produit par les cellules caliciformes dans les voies aériennes proximales. À l'inverse, MUC5B est synthétisée à la fois par les cellules sécrétoires épithéliales de surface et par les glandes sous-muqueuses (100). Au cours d'une métaplasie glandulaire allergique, la production totale de mucines augmente, mais dans des proportions différentes. La production de MUC5AC s'accroît d'un facteur 40 à 200 fois par rapport au niveau basal dans les mêmes cellules synthétisant MUC5B chez l'Homme et la souris (50,101,102). Parallèlement dans un modèle murin comparable, Muc5B est régulée à la hausse d'un facteur 3 à 10 (103,104). Une augmentation de MUC5B dans l'asthme ou après exposition à la fumée de cigarette a également été retrouvée (105,106). Il en résulte une augmentation globale de la production de mucines et une modification du ratio MUC5AC/MUC5B. L'inversion de ce ratio a été retrouvée chez l'Homme (107,108) et dans les modèles murins d'asthme (82). L'accroissement du ratio MUC5AC/MUC5B affecte les propriétés visco-élastiques du mucus et altère le transport mucociliaire en restant accroché au collet des glandes sous-muqueuses des patients asthmatiques (107).

La synthèse de mucine, et notamment de MUC5AC, est finement régulée. Différents stimuli inflammatoires participent à l'augmentation de la production de mucus. Dans le cadre de

l'asthme allergique, l'IL-13 est un puissant inducteur de la synthèse de MUC5AC chez l'Homme (109) et la souris (110). Les cytokines IL-4, IL-9, IL-17 participent également à la régulation à la hausse de cette mucine (111). L'inflammation par le biais de l'IL-1 β (112), des infections virales (113) et de l'exposition à l'acroléine, contenue dans la fumée de cigarette (114) sont impliqués dans la production de MUC5AC.

Le mucus des voies aériennes de sujets sains comporte 3 % de solide et à la consistance d'un blanc d'œuf cru. L'augmentation de la concentration de solide au sein du mucus, dont principalement des mucines, est responsable d'une augmentation de 15 % de la viscosité et de l'élasticité du mucus. L'augmentation de la viscosité du mucus altère l'écoulement du mucus au sein des voies aériennes. Une élasticité accrue rend la toux moins efficace (115).

Ainsi, les changements de la composition du mucus chez les asthmatiques modifient les caractéristiques rhéologiques de ce dernier. Les expectorations d'asthmatiques au cours d'une exacerbation de l'asthme présentent une augmentation du *moduli elastic* (G') et du *moduli visqueux* (G'') comparativement aux sujets sains (116).

L'impact clinique et fonctionnel de cette hyperproduction de mucus est suspecté depuis de nombreuses années. Depuis les années 1960, les autopsies de patients décédant d'un asthme aigu fatal ont révélé la présence de nombreux bouchons de mucus obstruant les voies aériennes (117,118). L'analyse de la composition de ces bouchons muqueux a révélé une composition faite de 25 % de mucines et <1 % d'ADN (119). Plus récemment, l'analyse de moulages des voies aériennes, réalisée par comblement de ces dernières via l'application de silicone en pression négative sur des explants pulmonaires, a mis en évidence une obstruction proximale et distale des voies aériennes chez les patients décédés d'un asthme aigu grave. Ce travail a été l'un des premiers à objectiver une obstruction distale des voies aériennes respiratoires, potentiellement par des bouchons de mucus chez les patients asthmatiques décédés d'une cause extra-respiratoire (Figure 7) (120). Ce type d'étude n'a pas permis d'évaluer l'impact fonctionnel des bouchons de mucus sur les capacités respiratoires de patients asthmatiques.

Le développement de nouveaux outils diagnostiques, comme le scanner thoracique haute résolution, a rendu possible l'identification de bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients ayant une pathologie bronchique chronique (99,121). L'équipe du Pr. J. Fahy a développé un score visuel semi-quantitatif fondé sur l'anatomie broncho-pulmonaire. Chaque poumon comporte 10 segments pulmonaires délimités par la segmentation bronchique. La présence d'au moins un bouchon de mucus par segment pulmonaire est comptée pour un point. Le score final varie donc de 0 (absence de bouchon muqueux dans les deux poumons) à 20 (chaque segment pulmonaire comporte au moins un bouchon muqueux). La méthodologie détaillée pour l'utilisation de ce score est présentée dans la figure 24.

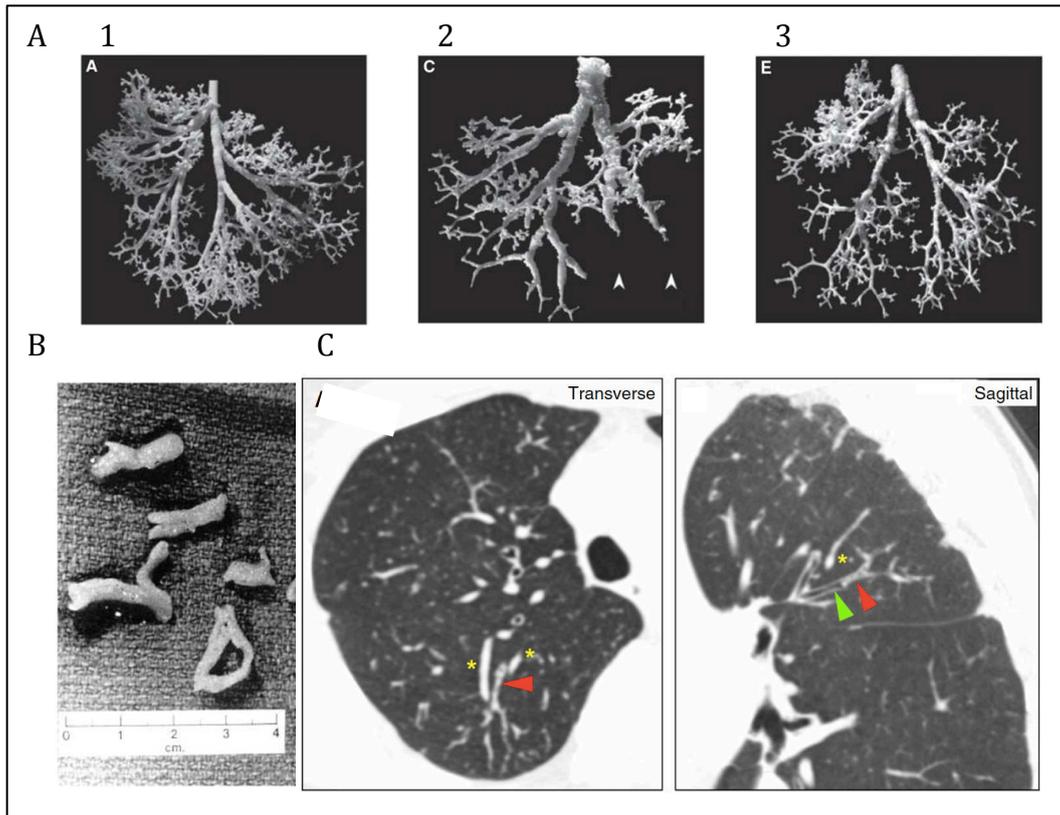


Figure 7: Bouchons de mucus et obstruction des voies aériennes distales et proximales chez les patients asthmatiques

- A. Moulage en silicone des voies aériennes du lobe inférieur droit réalisé à partir d'explants pulmonaire de patients sains (A.1), de sujet asthmatique décédé d'une crise d'asthme aiguë (A.2) ou d'un sujet asthmatique décédé d'une cause extra-respiratoire (A.3). Une obstruction proximale des voies aériennes (flèche blanche) est retrouvée sur l'explant pulmonaire suite au décès par asthme fatal. Chez les patients asthmatiques décédés d'une cause extra-respiratoire (A.3) le moulage relève une perte des voies aériennes distales comparativement aux moulages des sujets sains (A.1).
- B. Bouchons de mucus extraits des voies aériennes d'un patient décédé d'une exacerbation aiguë d'asthme
- C. Identification de bouchons de mucus dans les voies aériennes d'asthmatique en scanner thoracique haute définition en coupe transversale et en sagittal. La bronche vide (flèche verte) est complètement obstruée par un bouchon (flèche rouge). Cette interruption de la lumière bronchique permet de différencier les bronches obstruées des vaisseaux sanguins pulmonaires (étoiles jaunes)
(figure adaptée d'après Dunican et al., 2018b).

Ce travail a révélé dans une cohorte de patients asthmatiques, comportant 60 % d'asthmatiques sévères, que 58 % des asthmatiques avaient au moins un bouchon muqueux dans leur voies aériennes contre moins de 5 % chez les sujets sains (99). Une corrélation entre le score de mucus, l'obstruction bronchique et l'inflammation de type 2 a été mise en évidence (Figure 8). Ces corrélations ont été confirmées sur une cohorte de patients asthmatiques sévères (122). De plus, l'impact fonctionnel des bouchons de mucus sur la ventilation pulmonaire a été mis en évidence en utilisant une imagerie par résonance magnétique thoracique avec inhalation de gaz traceur. Le pourcentage du défaut de

ventilation post broncho-dilatateur est significativement corrélé avec le score de mucus (122).

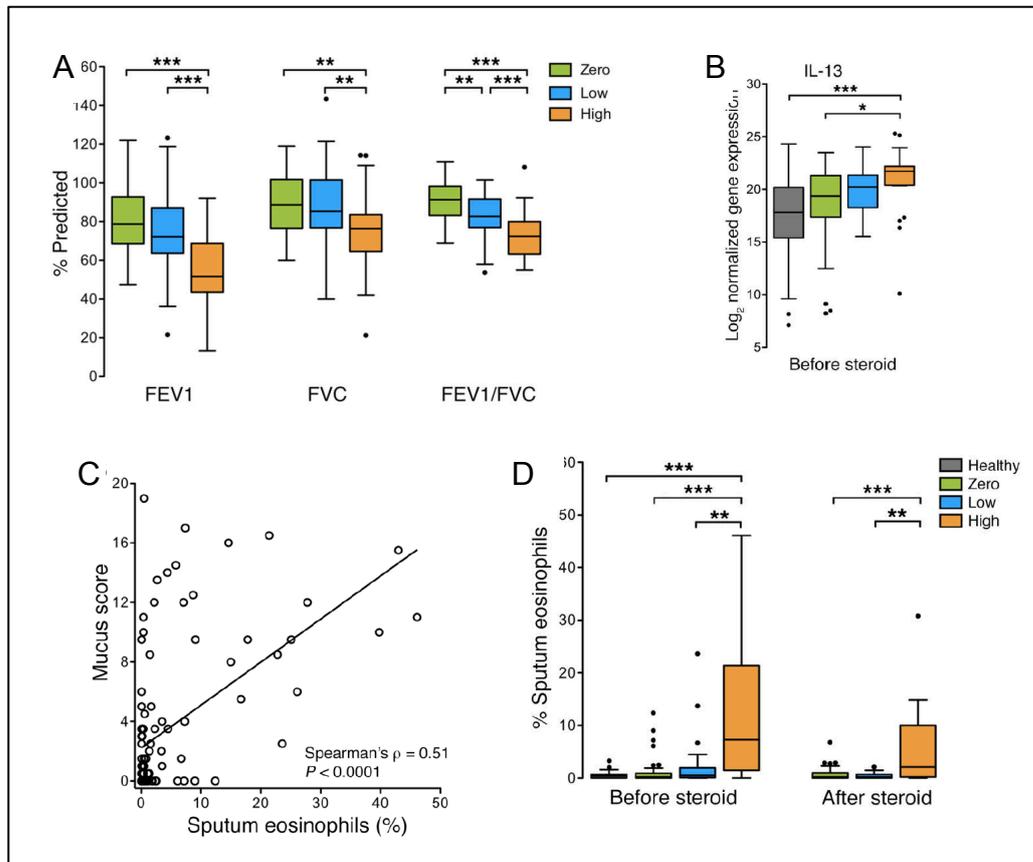


Figure 8: Un score élevé de mucus est associé à une obstruction bronchique plus sévère et une inflammation de type 2.

- Les patients présentant un score de mucus élevé (orange) ou bas (bleu) ont une obstruction plus marquée des voies aériennes (VEMS/CVF en %) et des paramètres spirométriques plus altérés (VEMS et CVF en % de la théorique) que les patients asthmatiques n'ayant pas de bouchon de mucus (vert)
- L'expression d'IL-13 dans les expectorations de patients asthmatiques est augmentée dans le groupe ayant un score de mucus élevé par rapport aux sujets sains (gris) et n'ayant pas de bouchons muqueux (vert)
- Une corrélation positive et significative entre le score de mucus et le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations de patients asthmatiques est retrouvée (Ronds vides)
- Le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations du sous-groupe ayant un score de mucus élevé est augmenté par rapport aux autres sous-groupes avant un traitement par corticostéroïde systémique (Before steroid) et après l'administration d'un traitement par corticostéroïde systémique (After steroid)

(figure adaptée d'après Dunican et al., 2018a).

Néanmoins, d'autres déterminants du remodelage bronchique contribuent également à la limitation des débits expiratoires dans l'asthme. Par exemple, la masse musculaire lisse bronchique est l'un des paramètres le plus corrélé à l'obstruction bronchique évaluée en spirométrie (123). La vascularisation pulmonaire, évaluée par la mesure du VEGF dans les

expectorations pourrait également jouer un rôle modéré dans l'obstruction des voies aériennes (88).

L'intérêt de l'identification des bouchons muqueux dans les voies aériennes au cours des pathologies respiratoires chroniques est double. Ces bouchons pourraient constituer une cible thérapeutique à part entière et faire l'objet de traitements spécifiques par mucolytiques. L'objectif clinique pourrait être une amélioration de la fonction respiratoire. Une autre approche serait de considérer ces derniers comme un biomarqueur spécifique de certains phénotypes de pathologies respiratoires chroniques comme la BPCO ou l'asthme (124).

II. Facteurs de risque environnementaux associés à l'asthme allergique

a. Généralités

À la naissance, le système immunitaire adaptatif est immature. En cas d'infection, la réponse immunitaire du nouveau-né repose sur les anticorps maternels et sur le système immunitaire inné (125). L'immunité du nouveau-né est caractérisée par une polarisation de type T2 prédominante. Cette particularité est nécessaire pour éviter le rejet du fœtus par le système immunitaire de la mère. Les cellules dendritiques des nouveau-nés ont une capacité altérée à produire des cytokines pro-inflammatoires et des cytokines de type 1 (126). Néanmoins, la maturation progressive du système immunitaire tend à corriger cette polarisation de type 2 prédominante (Figure 9). La persistance de cette dernière au delà de l'âge de 2,5 ans est un facteur prédictif majeur de survenue d'un asthme à l'âge pédiatrique (127). La maturation et l'évolution du système immunitaire adaptatif sont progressives et façonnées par les expositions environnementales infectieuses, allergéniques et les prédispositions génétiques (Figure 9).

Sur le plan physiopathologique, l'asthme est aussi caractérisé par de multiples interactions entre le patrimoine génétique d'un individu et les expositions environnementales. L'identification, l'intégration et la compréhension de ces interactions dans la pathogénèse de l'asthme sont difficiles (128). En effet, une exposition environnementale, par exemple l'exposition à la fumée de cigarette, interagit avec de multiples gènes. De façon concomitante, un gène peut interagir avec différentes expositions (128,129). La complexité des phénotypes asthmatiques est déterminée par la réponse génétique d'un individu à certaines de ces expositions environnementales. Les deux périodes critiques au cours desquelles les expositions environnementales semblent avoir le plus d'impact sur la survenue d'un asthme sont la période prénatale et l'enfance (130). La complexité de ces interactions et le rôle des expositions environnementales est illustrée par les nombreux gènes faiblement associés à l'asthme avec un odds ratio proche de un (131). En considérant les interactions entre ces génotypes et des expositions environnementales spécifiques, les facteurs de risques et protecteurs deviennent alors plus significatifs (132). Sur le plan épidémiologique, les disparités géographiques de la prévalence de l'asthme au sein d'une population génétiquement proche renforcent le lien entre la génétique d'un individu et ses expositions environnementales dans la pathogénèse de l'asthme (10).

Cette variabilité dans la distribution géographique pourrait être en partie expliquée par les interactions entre l'hôte et son environnement microbien (133). En effet, les enfants originaires de pays où la prévalence des maladies allergiques est faible et qui émigrent dans un pays où celle-ci est élevée ont un risque moins élevé de développer une maladie

allergique que les enfants natifs. Néanmoins, cet effet « protecteur » diminue rapidement chez les enfants demeurant dans cet environnement (134).

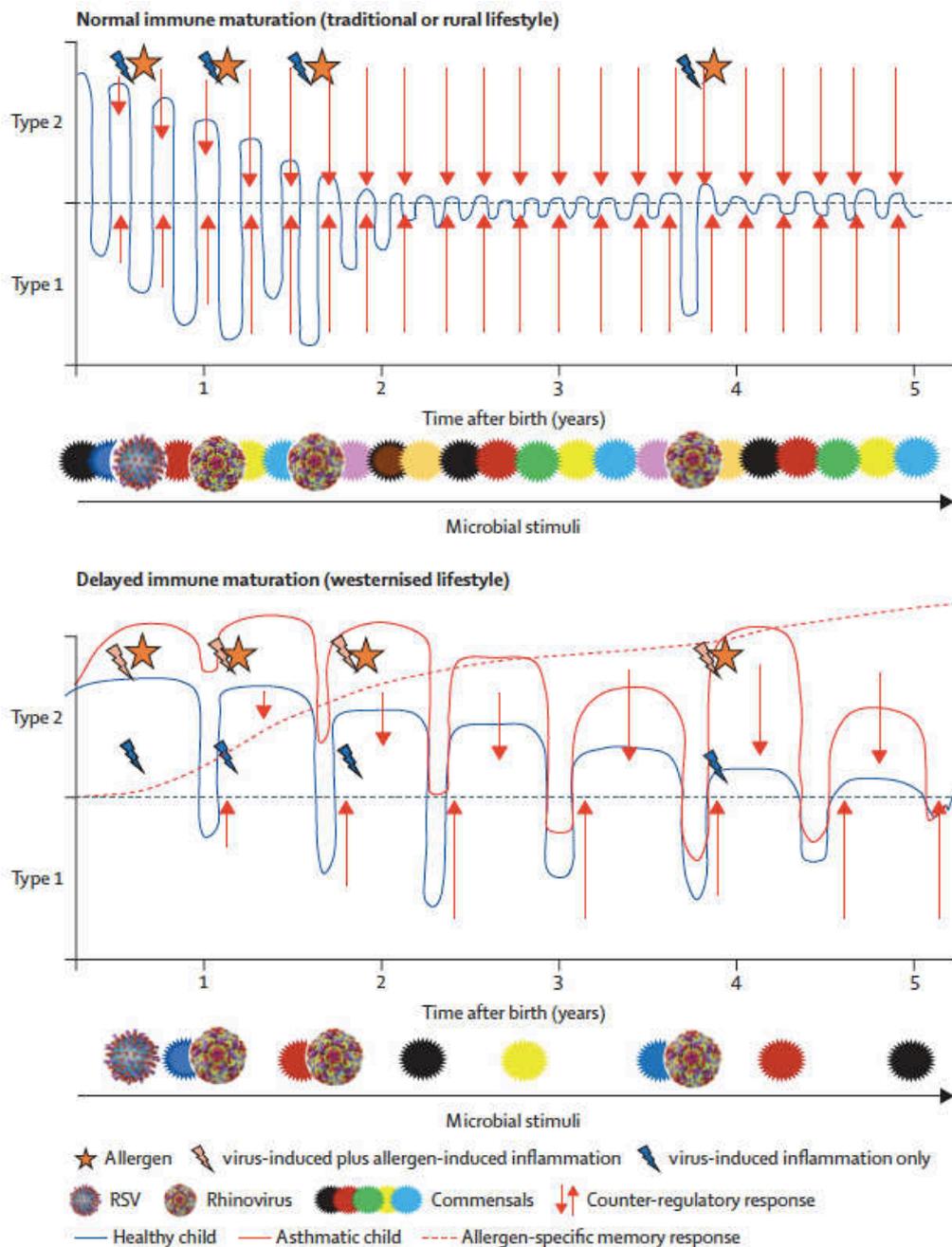


Figure 9 : Maturation et homéostasie du système immunitaire d'enfants asthmatiques ou sains selon leurs expositions environnementales

Le système immunitaire du nouveau-né est immature. La réponse immunitaire dans les premières années de vie repose principalement sur l'immunité innée avec une polarisation de l'immunité adaptative de type Th2 au cours de la première année de vie. La maturation du système immunitaire a pour objectif d'améliorer l'efficacité de la défense contre les pathogènes mais également de ne pas réagir à des stimuli non nocifs comme les allergènes ou les bactéries commensales. Une des hypothèses développées pour expliquer le caractère protecteur d'un environnement rural dans la pathogénèse de l'asthme est que les stimulations répétées du système immunitaire par l'environnement vont permettre une maturation plus rapide du système immunitaire.

Les stimulations sont effectuées par l'environnement microbien endogène, le microbiote ou l'environnement microbien exogène. (Von Mutius et al., 2020)

Le reste de ce chapitre sera consacré aux interactions avec l'environnement microbien endogène ou exogène et la pathogénèse asthmatique (Figure 10).

b. Rôle de l'environnement microbien exogène dans l'asthme

L'une des expositions environnementales les plus fréquemment associées à une protection contre la survenue d'épisodes de sifflements respiratoires chez les enfants d'âge préscolaire ou de la survenue d'un asthme à l'âge scolaire est un environnement rural fermier traditionnel (135). Ce mode de vie expose à de fortes concentrations d'allergènes, d'endotoxines et de micro-organismes. Chez les enfants vivant dans une ferme, la prévalence de l'asthme et l'atopie sont diminuées par rapport aux enfants non exposés. Ces derniers étant exposés à une plus grande variété de micro-organismes (136). Les enfants présentant des épisodes de sifflements respiratoires et étant porteurs d'allèles de susceptibilité sur le chromosome 17q21 sont à haut risque de développer un asthme dans l'enfance. Au sein de cette population, une réduction de 80% du risque de survenue d'un asthme a été mise en évidence si ces enfants étaient exposés de façon prolongée à des bâtiments abritant des animaux de la ferme (137).

Cet effet protecteur de l'environnement rural fermier est possiblement lié à une exposition continue et soutenue à un environnement microbien riche et également à la consommation de produits alimentaires spécifiques comme le lait non pasteurisé (138). De nombreuses études suggèrent également que l'exposition maternelle au cours de la grossesse à ce type d'environnement pourrait avoir un effet protecteur vis à vis de l'apparition de pathologies allergiques (139,140). Cette relation a été initialement mise en évidence dans les pays ayant un PIB par habitant élevé puis elle a été confirmée dans des pays ayant un revenu par habitant bas ou moyen (128).

Le rôle de l'environnement microbien sur la survenue d'un asthme a été particulièrement bien démontré dans l'étude comparant la prévalence de cette pathologie entre les enfants Amish et les enfants Huttérites. Ces deux populations sont génétiquement extrêmement proches mais leurs environnements quotidiens diffèrent drastiquement. Les Amish pratiquent l'agriculture rurale classique alors que les Huttérites vivent de l'agriculture moderne mécanisée. Ces modes de vie influencent l'environnement microbien présent au domicile des familles. Chez les Amish, la diversité microbienne et le niveau d'endotoxine dans les poussières domestiques sont supérieurs à ceux des Huttérites. L'exposition à cet environnement microbien pourrait expliquer la prévalence plus faible de l'asthme parmi les enfants Amish par rapport aux enfants Huttérites. Cette hypothèse a été renforcée par la reproduction de ces résultats après l'exposition de souris à la poussière de chacun des environnements (141).

Ces données ont été confirmées *in vivo* sur un modèle d'asthme induit à l'ovalbumine. L'administration intra-nasale d'une bactérie provenant d'une étable, *Acinetobacter lwoffii* F78, en cours de gestation protège la progéniture contre l'induction d'un asthme allergique induit à l'ovalbumine. Cet effet protecteur était dépendant des TLRs (142).

L'environnement domestique est donc un réservoir majeur d'exposition aux allergènes et aux microbes. Cependant, les bactéries dérivant des animaux de la ferme et assurant probablement l'effet protecteur vis à vis de l'asthme sont absentes des environnements urbains (143).

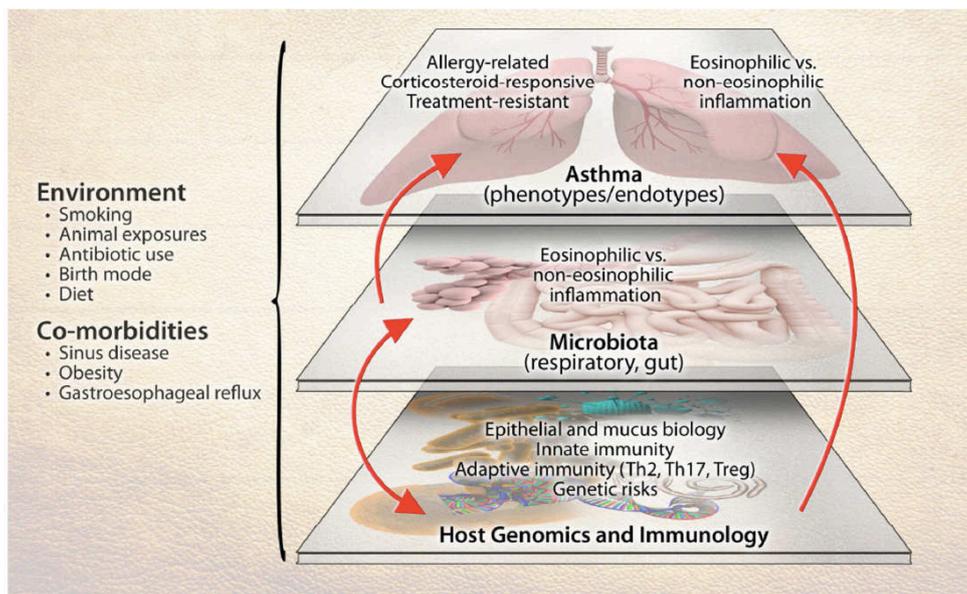


Figure 10: Le microbiote digestif et respiratoire est une interface entre la génétique de l'hôte, ses expositions environnementales et la pathologie asthmatique.
(Adapté d'après Huang et al. 2015)

Dans ces conditions, la combinaison d'allergènes et de composés dérivant de bactéries peut avoir un effet délétère sur l'asthme. Par exemple, les pollens de graminées contiennent des bactéries gram positives qui participent à la maturation des cellules dendritiques et à l'induction de lymphocyte T participant à l'inflammation allergique (144). Dans une étude réalisée aux Etats-Unis, la concentration de bactéries gram négatives dans le domicile de patients asthmatiques adultes était associée à la sévérité de l'asthme et à une augmentation du nombre de passages aux urgences médicales pour crise d'asthme (145). Cet effet protecteur de l'environnement fermier s'inscrit dans le concept d' « hypothèse microbienne » selon laquelle les expositions microbiennes façonneraient la réponse immunitaire (146). De façon intéressante, les conditions de vie associées à une prévalence plus faible de l'asthme pédiatrique comme l'exposition à un milieu rural fermier traditionnel sont généralement liées à une diversité plus importante du microbiote digestif (147). Dans le

prochain paragraphe, nous aborderons le lien entre l'environnement microbien endogène, le microbiote, et l'asthme.

c. Rôle de l'environnement microbien endogène dans la pathogénèse de l'asthme

i. Microbiote des voies aériennes

Le microbiote des voies aériennes saines est caractérisé par une faible abondance. Son implication dans l'homéostasie et dans les pathologies respiratoires chroniques est de plus en plus étudiée (128). Le microbiote des voies aériennes se met en place au cours des deux premières semaines de vie et sa composition se stabilise au cours de la deuxième année de vie avec une colonisation du nasopharynx par *Dolosigranulum* et *Moraxella* (148). L'étude du microbiote des voies aériennes basses est plus complexe compte tenu du caractère invasif des prélèvements et du risque de contamination par le microbiote des voies aériennes supérieures (143).

Une modification de l'homéostasie du microbiote des voies aériennes est également corrélée à la survenue d'un asthme. Dans les trois premiers mois de vie, la diversité de ce dernier et l'abondance relative de *Veillonella* et *Prevotella* sont associées à la survenue d'un asthme à l'âge de 6 ans (149). De plus, les patients asthmatiques présentent une modification qualitative de leur flore pulmonaire se traduisant par une augmentation des protéobactéries et une diminution des *bactéroïdes* (150).

Certains phénotypes asthmatiques ont été associés à une modification du microbiote des voies aériennes. Par exemple, l'abondance des neutrophiles dans les expectorations de patients asthmatiques a été corrélée à la présence de certaines espèces de bactéries dont *Moraxella* (143,151). La composition du microbiote respiratoire est également associée à la réponse aux thérapeutiques. Chez les patients asthmatiques cortico-sensibles ou cortico-résistants, la flore microbienne des voies aériennes respiratoires ne varie pas en diversité ou en richesse. En revanche, la présence d'*Haemophilus parainfluenza* n'est retrouvée que chez les patients asthmatiques cortico-résistants (152).

Ainsi, les caractéristiques du microbiote des voies aériennes semblent être en lien avec la survenue d'un asthme et avec ces caractéristiques. Cette association est d'autant plus pertinente compte tenu de la proximité de ces espèces bactériennes avec les cellules impliquées dans la physiopathologie asthmatique (cellules épithéliales bronchiques, cellules dendritiques, etc.). Néanmoins, de nombreux travaux ont souligné le lien étroit entre le

microbiote digestif et l'asthme. Cette interaction est appelée «axe intestin-poumon» que nous détaillerons dans la prochaine partie (153).

ii. Microbiote digestif

Le microbiote digestif est mis en place dès les premiers jours de la vie. Son homéostasie résulte des interactions entre la génétique de l'hôte et son environnement nutritionnel, hygiénique et médicamenteux (154,155). Une instabilité du microbiote digestif, appelée dysbiose, est liée à la pathogenèse de multiples maladies dont l'asthme chez l'homme et dans des modèles expérimentaux (143).

La constitution initiale du microbiote digestif de l'enfant s'effectue dès la naissance à partir de la flore maternelle. Une méta-analyse a estimé qu'une naissance par césarienne était associée à une augmentation du risque de 20% de survenue d'un asthme chez l'enfant (156). Cette augmentation du risque de survenue d'un asthme est liée au type de flore qui primo-colonise le tube digestif. Le type d'accouchement, voie vaginale ou par césarienne, détermine la constitution du microbiote digestif chez l'enfant. Ainsi, la naissance par voie vaginale est associée à un microbiote digestif plus riche avec notamment la présence de *Lactobacillus*, *Prevotella*, et de *Bacteroides* que lors d'une naissance par césarienne (157,158). La composition du microbiote digestif se complexifie progressivement à partir de la naissance et atteint sa configuration définitive à partir de l'âge de 6 ans (159).

Une perturbation de l'établissement du microbiote digestif chez l'enfant est associée à la survenue de pathologies ultérieures dont la survenue d'un asthme. Dans une cohorte pédiatrique Canadienne, les enfants à risque de développer un asthme présentaient une dysbiose transitoire au centième jour de vie avec une réduction de la diversité du microbiome fécal (160). De nombreux autres travaux ont mis en exergue que la composition de la flore digestive des enfants asthmatiques et non asthmatiques est différente (143,157).

La perturbation précoce de l'établissement du microbiote suite à une exposition aux antibiotiques pendant la vie prénatale et néonatale augmente le risque de survenue d'un asthme allergique (161). Une diversité bactérienne digestive réduite, avec une faible abondance de *Lactobacilli*, *Bactéroides* et *Bifidobactéria*, est associée au développement d'une allergie (162,163)

Ces constatations ont été confirmées expérimentalement. Les modèles animaux dépourvus de flore digestive ou « germ free », ont une polarisation systémique de type Th2 (164). L'induction d'un asthme allergique à l'ovalbumine, chez des animaux axéniques ou traités par une antibiothérapie à large spectre, est associée à un phénotype Th2 exacerbé. Le recrutement éosinophilique dans le lavage broncho-alvéolaire est plus important, l'hyper-réactivité des voies aériennes plus marquée et le taux d'IgE totales est plus élevé chez les

nouveau-nés et chez les adultes (165). L'induction d'un asthme allergique chez des animaux axéniques ou après une dysbiose antibio-induite conduit à une exacerbation des caractéristiques de l'asthme chez les nouveau-nés (166,167) et chez les adultes (165).

La perturbation du microbiote digestif induite par une antibiothérapie semble jouer un rôle dans la survenue des allergies et de l'asthme notamment via une polarisation M2 des macrophages (168).

d. Rôle de l'environnement allergénique : l'acarien un pneumallergène majeur de l'asthme allergique

i. Généralité sur les acariens

Les acariens constituent un taxon d'arachnides appartenant à l'embranchement des arthropodes. Ils ont la particularité de posséder un fort pouvoir allergénique. On estime que 50 à 80% des sujets asthmatiques sont sensibilisés aux acariens (169,170). Une sensibilisation et une exposition aux acariens sont associées à une augmentation du risque de développer un asthme (171). Une exposition à ces allergènes est associée à la sévérité de l'asthme (172).

Les acariens ont été identifiés comme étant allergéniques dans les années 1960 (173). Leur principale source d'allergènes est les déjections (174). Les acariens mesurent 250 à 350 µm de longueur et vivent dans les milieux obscurs et humides (175). Il existe plusieurs espèces d'acariens dont *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) et *Dermatophagoides farinae* (Der f) sont les plus fréquentes. Contrairement à leurs dénominations initiales respectives, d'acariens « Européen » et « Américain », ces espèces sont retrouvées dans la majorité des pays et peuvent cohabiter dans un même logement (176). Ces arachnides se nourrissent de squames de peaux et de phanères d'animaux à sang chaud (175).

Géographiquement, les acariens sont présent sur l'ensemble du globe terrestre, à l'exception des régions polaires avec une prédilection pour les milieux humides et chauds (177). La quantité d'acariens est maximale dans les maisons personnelles. Une exposition aux acariens accrue est corrélée à un haut niveau socio-économique et une faible densité d'habitant par maison. À l'inverse, une densité de sujets plus élevée par habitation, un niveau socio-économique bas sont associés à une prédominance d'allergènes domestiques de type cafard (178). Au sein des habitations personnelles, la quantité d'acariens et d'allergènes est maximale dans la literie (179,180). Certaines conditions environnementales, comme l'altitude, sont moins propices aux sensibilisations allergéniques. Par exemple, la

sensibilisation aux acariens est moindre chez les enfants vivant en altitude dans les Alpes que chez les enfants vivant au niveau de la mer (181).

Chez l'Homme, la sensibilisation allergénique peut être réalisée par contact direct de l'allergène avec les différents épithéliums de l'organisme comme la peau, les voies aériennes et le tractus digestif. Dans le contexte d'une exposition par inhalation, le sujet inspire des particules contenant les allergènes (182). Dans l'allergie aux acariens, les principales particules inhalées sont les fèces mesurant entre 20-25µm. Cette taille est équivalente à celle des pollens et favorise ainsi une inhalation dans le poumon profond et le maintient en suspension dans les particules de l'air (183). Une fois en contact avec l'épithélium des voies aériennes et les cellules du système immunitaire, les différents composants des acariens déclenchent de multiples réponses inflammatoires chez l'hôte.

ii. Interactions entre les composants des acariens et la pathogénèse de l'asthme.

1. Interactions liées aux allergènes majeurs

Selon la nomenclature allergénique internationale, *D. farinae* et *D. pteronyssinus* sont respectivement composé de 39 et 38 allergènes (Figure 11) (184).

La participation directe des acariens à la physiopathologie de l'asthme a notamment été mise en évidence en exposant des cellules épithéliales et musculaires lisses de patients asthmatiques ou de sujets sains à des extraits acariens. Cette stimulation a conduit à une prolifération des cellules musculaires lisses chez les patients asthmatiques, mais pas chez les sujets sains via la production de leukotriène C4 dépendante du récepteur CysLT2 et une surexpression du récepteur au leukotriène CysLT1 (185)

L'une des caractéristiques liées à l'asthme est le dysfonctionnement de la cellule épithéliale conduisant à une altération de l'intégrité de l'épithélium respiratoire notamment via une diminution des jonctions serrées de type claudine-18 (186). La composition allergénique des acariens comporte des nombreuses protéases dont des cystéines protéases (Der f 1 ou Der p 1), des sérines protéases dont Der p 3, p 6 , p9 et Der f 9 (175,187). Certaines protéases, comme Der p 1 ou Der f 1, ont la capacité de dégrader les jonctions serrées de type occludine et claudine (175). Les autres sérines protéases, comme Der p 3, Der p 6, Der p 9 présentent dans les extraits d'acariens participent également à l'altération du fonctionnement des jonctions serrées (188).

Cette dégradation des jonctions serrées amoindrit le rôle barrière de l'épithélium respiratoire et facilite ainsi l'exposition de l'allergène aux cellules présentatrices de l'antigène (189). Certaines jonctions serrées, comme les desmosomes, ne sont pas dégradées par les

protéases des acariens. L'altération de la perméabilité de l'épithélium en réponse à une exposition aux acariens ne se limite pas à la dégradation des jonctions serrées par les protéases. L'expression de certaines jonctions serrées, comme la claudin-1, est diminuée par l'exposition à Der p 1 ou à l'IL-13 (189,190).

La capacité des acariens à perturber le fonctionnement de la barrière épithéliale est grandement dépendante de la composition des extraits d'acariens. En pratique, la comparaison de la composition des extraits d'acariens provenant de trois fournisseurs indépendants a mis en évidence une variabilité majeure de leurs constituants. Par exemple la quantité d'allergène majeur Der p 1 et Der p 2 peut varier respectivement d'un facteur 12 et 428. Cette fluctuation de la composition affecte aussi la quantité de protéase et d'endotoxines bactériennes (LPS) (191).

Le rôle des protéases contenues dans les acariens ne se limite pas à une dégradation de la barrière épithéliale. Dans l'asthme allergique, ces enzymes activent directement les récepteurs de protéase au niveau de l'épithélium bronchique. Cette activation conduit à une augmentation de la masse musculaire lisse induite par les cystéines leucotriènes (185). Une corrélation a été mise en évidence entre la sévérité de l'asthme, le développement de la masse musculaire lisse bronchique et l'expression du récepteur aux protéases PAR-2 et de ces ligands (192).

Gene	Locus tag*	Biochemical function	No. of exons	Deduced no. of amino acids	FPKM	Homologue† (% similarity)
Der f 1	DEFA_073880	Cysteine protease	6	321	840.51	BAC53948 (100%)
Der f 2	DEFA_057430	Lipid binding	2	146	97.27	Q00855 (100%)
Der f 3	DEFA_036500	Trypsin	2	259	36.79	P49275 (99%)
Der f 4	DEFA_092370	α-Amylase	3	526	12.99	AAD38942 (88%)‡
Der f 5	DEFA_009370	Structural protein	2	132	410.29	ABO84970 (100%)
Der f 6	DEFA_160240	Chymotrypsin	3	279	24.83	ABG23667 (100%)
Der f 7	DEFA_012670	Unknown	2	213	481.87	ACK76298 (99%)
Der f 8	DEFA_112610	Glutathione transferase	2	221	353.39	AAP35080 (96%)‡
Der f 9	DEFA_108510	Serine protease	4	272	4.37	AAP57077 (92%)
Der f 10	DEFA_012620	Tropomyosin	5	284	1532.23	Q23939 (99%)
Der f 11	DEFA_029610	Paramyosin	11	876	321.77	AAO73464 (98%)
Der f 13	DEFA_016640	Fatty acid binding	2	131	1772.53	2A0A_A (100%)
Der f 14	DEFA_023480	Vitellogenin: egg yolk storage	6	1666	130.84	AAM21322 (88%)‡
Der f 15	DEFA_127470	Chitinase	4	556	40.83	AAD52672 (96%)
Der f 16	DEFA_053360	Gelsolin: actin binding	7	480	147.91	AAM64112 (99%)
Der f 18	DEFA_042810	Chitinase	3	462	88.28	AAM19082 (100%)
Der f 20	DEFA_122350	Arginine kinase	5	356	342.86	AAP57094 (99%)
Der f 21	DEFA_009360	Structural protein	2	136	943.53	AAX34048 (100%)
Der f 22	DEFA_072800	MD-2-related lipid recognition	2	155	820.98	ABG35122 (100%)
Der f 23	DEFA_123860	Chitin-binding domain type 2	3	91	31.67	ACB46292.1 (84%)

FPKM, Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads.

*Locus tags are included in our assembled *D. farinae* genome.

†Analyzed relative to the NCBI database (by BLAST algorithm); GenBank accession numbers are listed.

‡Partial.

Figure 11: Identification par séquençage haut débit* de la structure des allergènes canoniques de *D. Farinae*

*méthode de Sanger (Chang et al. 2015)

Si la participation des protéases des acariens dans la réponse allergique asthmatique est établie, la capacité des acariens à induire une réponse allergique asthmatique est maintenue même après inactivation de ces dernières par la chaleur dans un modèle d'asthme allergique aux acariens avec sensibilisation par voie intra-nasale (191).

La contribution des allergènes majeurs des acariens dans la réponse allergique asthmatique ne se limite donc pas à l'activité protéasique de certains composants. Certains allergènes majeurs ont la capacité d'activer des récepteurs de l'immunité innée. Der p 2 (67) et Der f 2 (193) ont des analogies de séquence avec la protéine MD-2 nécessaire à la reconnaissance du LPS par le TLR-4 (194). Cette analogie permet l'activation du TLR-4 en présence de LPS permettant une activation équivalente à celle d'un auto-adjuvant.

Le pouvoir allergénique des acariens ne se réduit pas à l'effet des allergènes majeurs. Cet aéro-allergène comporte de nombreuses autres substances susceptibles d'activer des récepteurs de l'immunité innés et contribuer à la réponse immune.

2. Interactions liées aux autres composants des acariens

Les acariens et leur fèces contiennent de nombreux motifs moléculaires associées aux dégâts susceptible d'activer les récepteurs de l'immunité inné épithéliaux et des cellules dendritiques (171,175). Ces principaux composants sont l'ADN des acariens, la chitine et les endotoxines bactériennes. La chitine est une substance organique azotée présente dans l'exosquelette des acariens. Elle est reconnue par le TLR-2 et le récepteur aux lectines de type C (195). L'ADN dérivant des bactéries et des acariens est reconnu et active le récepteur TLR-9 (196). Le TLR-4 est activé par la présence de LPS dans les fèces des acariens aidé par l'homologie de Der p 2/ Der f 2 pour la protéine de co-activation MDP-2. L'activation de ce récepteur induit la synthèse d'alarmines épithéliales dont l'IL-33, TSLP, IL-25 favorisant une réponse immune T2 (197).

En plus de la présence d'endotoxines bactériennes, la mise en évidence d'un microbiome bactérien symbiotique chez les acariens a été révélée par plusieurs études (187,198,199). Cette flore bactérienne endogène varie quantitativement et qualitativement en fonction de l'espèce considérée. De façon reproductible, l'espèce d'acarien Der f semble présenter un inoculum bactérien, évalué par le nombre de copies ARN bactériens 16S, 11 à 24 fois supérieurs par rapport à l'espèce d'acarien Der p (Figure 12) (198,199). Sur le plan qualitatif, le microbiome endogène de Der f est principalement composé par des bactéries gram négatives, mais la composition des espèces symbiotiques varie selon les études. Deux travaux ont mis en évidence une prédominance de l'espèce *Bartonella* qui composait jusqu'à 97.9% des espèces retrouvées (Figure 12) (198,199).

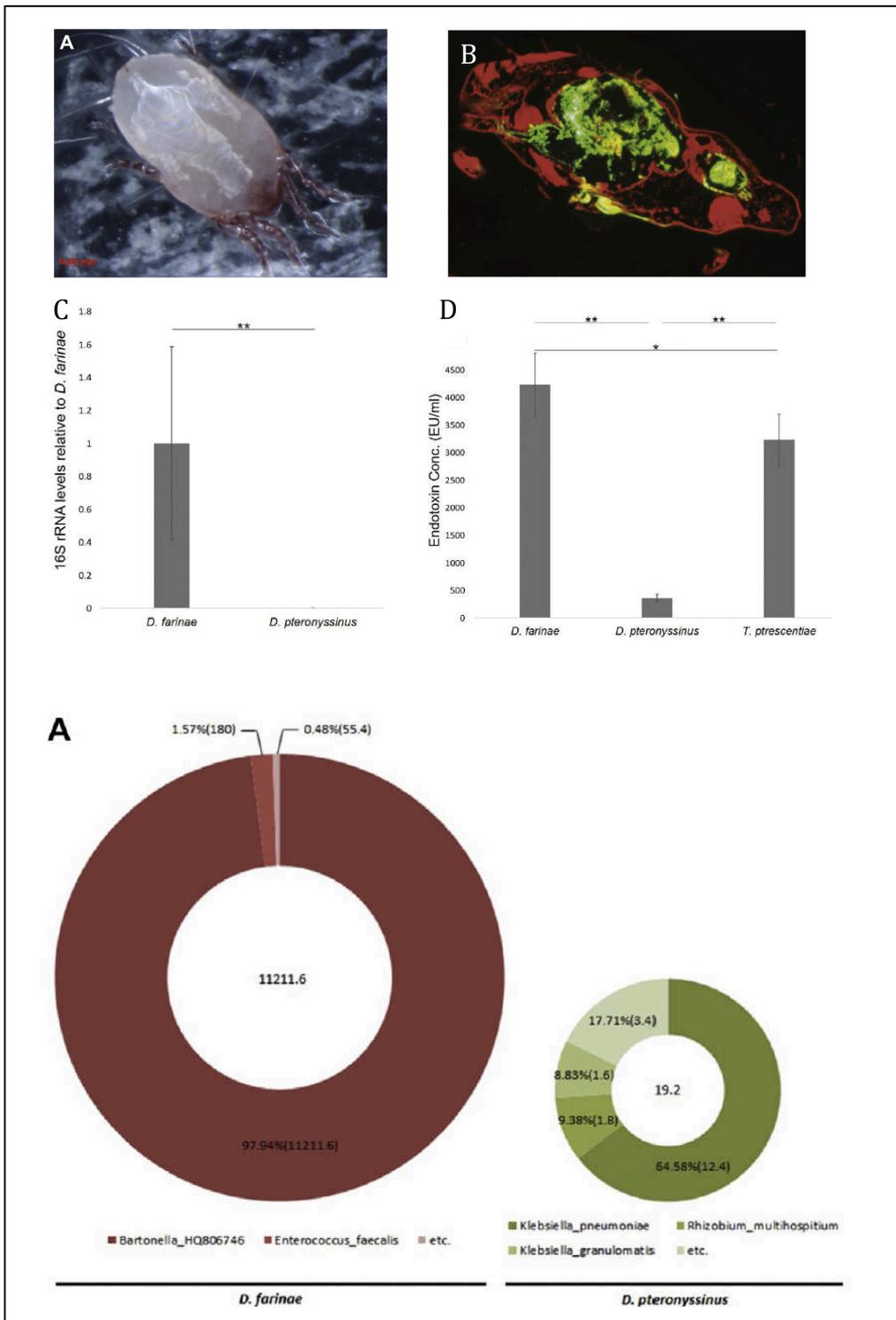


Figure 12: Composition du microbiome digestif de *Dermatophagoïdes farinae*

- Photographie en microscopie optique d'une femelle d'acarien appartenant à l'espèce *Der f*.
- Localisation de l'espèce *Enterobacter Cloacae* dans le tube digestif de l'acarien en immunohistochimie (marquage vert).
- Expression relative de l'ARN bactérien 16S dans des extraits d'acariens de *Der f* comparativement à *Der p* (n=5 lots différents par groupe) (**p<0.01).
- Comparaison de la concentration d'endotoxines bactériennes retrouvées dans trois extraits d'acariens d'espèces différentes [Concentration 1mg/mL d'extrait protéique].
- Répartition des différentes espèces bactériennes présentes dans les extraits d'acariens (*Der f* et *Der p*). La taille du diagramme est représentative du nombre de lectures (Nombre exact au centre du diagramme).

§ (Adapté d'après Chang et al. 2015) ; §§ (Adapté d'après Lee et al. 2019)

Une autre analyse a identifié une prédominance d'enterobacter dans les extraits d'acariens de Der f (187). La présence de ces espèces bactériennes semble être localisée au niveau du tube digestif des acariens (187). Le rôle du microbiote commensal des acariens sur les pathologies allergiques n'a pas été étudié.

III. Rôle de l'immunité innée et du récepteur NOD1 dans l'asthme allergique

Le système immunitaire assure l'homéostasie et la défense de l'organisme contre les agressions microbiennes pathogènes ou le contrôle des processus néoplasiques. De façon schématique, le système immunitaire se compose de trois niveaux de protection. La première ligne de défense est constituée par les barrières anatomiques et physiologiques comme l'épithélium des voies aériennes et du système digestif. Secondairement, le système immunitaire inné permet une reconnaissance rapide des pathogènes et induit une réaction inflammatoire rapide. Finalement, l'immunité adaptative reposant principalement sur les cellules lymphocytaires B et T produit une réponse antigène spécifique cellulaire et humorale assurant une protection sur le long terme (200).

L'ensemble de ces mécanismes de défense est intriqué et leur action est synergique. Ainsi, l'immunité innée participe au renforcement de l'efficacité des barrières épithéliales en permettant une réponse inflammatoire protectrice locale rapide (201). Cependant, l'immunité innée est également nécessaire à l'initiation de la réponse immune adaptative (202).

L'inflammation est impliquée dans la réponse protectrice de l'organisme en réaction à un stimuli délétère comme une infection mais également comme dans le processus de réparation des tissus lésés (203). Le système immunitaire inné est un acteur majeur de l'inflammation en réponse à une infection ou à des dégâts tissulaires (204). La suite de ce travail se concentrera sur l'implication du système inné dans l'asthme allergique.

a. Présentation générale de l'immunité innée

L'immunité innée repose sur la détection de molécules spécifiques non présentes constitutivement chez l'hôte via des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance aux pathogènes, ou pattern recognition receptors (PRRs). Ces récepteurs reconnaissent des éléments microbiens conservés, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes, ou pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (204), mais également des motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires, ou damage-associated molecular patterns (DAMPs) (205). L'une des particularité de la réponse immunitaire innée est d'être assurée à la fois par des cellules immunes professionnelles,

comme les cellules dendritiques (CDs) ou les macrophages, mais également par des cellules de structure non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales et les fibroblastes (201). La famille des récepteurs de reconnaissance aux pathogènes comporte quatre classes de récepteurs. Certaines sont transmembranaires comme les Toll-like receptor (TLRs) ou les récepteurs de type C lectine (CLRs), d'autres sont intra-cytoplasmiques comme les Retinoic acid inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs) et les nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD) receptors.

Les mutations affectant ces récepteurs de l'immunité innée sont responsables d'un large spectre de pathologies chez l'Homme. Par exemple, un dysfonctionnement du récepteur TLR7 et 9 est associé à la survenue d'un lupus érythémateux systémique (206) et des polymorphismes du récepteur NOD2 ont été associés à la maladie de Crohn (207). De façon similaire, l'implication de certains récepteurs de l'immunité innée dans l'asthme a également été mise en évidence.

b. Les Nod-Like récepteurs (NLRs) : une famille de récepteur intracellulaire de l'immunité innée

Les récepteurs NLRs sont des récepteurs intracellulaires reconnaissant de nombreux ligands comme des composants des parois bactériennes, des toxines mais aussi des ligands bactériens dérivant de l'hôte comme l'ATP. La structure de cette famille de PRR est remarquablement préservée à travers les différents embranchements des espèces de vertébrés. Elle est constituée d'un domaine central NOD ou NBP (Nucleotide binding domain), d'un domaine d'interaction protéine-protéine au niveau de leur extrémité effectrice NH₂ terminale et un domaine riche en leucine, leucine-rich repeats domain (LRR) en COOH terminal (208). Le domaine NOD est également appelé domaine NACHT d'après les initiales des premières protéines identifiées le possédant : NAIP, CIIA, HET-E et TP1. Il est composé de 7 motifs distincts dont un site de liaison au Mg²⁺ via une boucle spécifique ATP/GTPase (209).

La famille des récepteurs NLR comprend 22 récepteurs distincts chez l'homme (Figure 13). Une nomenclature fondée sur leur structure a permis d'identifier 4 sous familles, NLRA, NLRB, NLRC et NRLP, classées selon la nature de leur extrémités NH₂ terminale (210).

Les sous familles de récepteur NLRA et NLRB sont représentées chacune par un récepteur reconnaissant respectivement l'IFN γ et la Flagelline (211,212).

Les sous familles NRLP et NLRC représentent la majorité des récepteurs de la famille NLR avec 20 récepteurs chez l'humain et 26 chez la souris.

La sous-famille des récepteurs NLRP est caractérisée par la présence d'une pyrine à sa partie NH2 terminale. Les récepteurs NLRP1, NLRP3 et NLRP6 participent à l'activation de l'inflammasome via le recrutement de la protéine ASC par leur domaine pyrine et activent la caspase-1. Cette activation aboutit à la formation et à la libération de l'IL-1 β et de l'IL-18 (213). Inversement, NLRP10 est un régulateur négatif de ce processus (214).

Subfamily	Protein Structure	Gene	Function	Activator	Human Disease
NLRA		CIITA	MHC-II expression	IFN- γ	Bare lymphocyte syndrome
NLRB		Naip	Control of <i>legionella pneumophila</i> infection	Flagelin	Spinal muscular atrophy
NLRC		NOD1	NF- κ B	DAP	Asthma; IBD
		NOD2	NK- κ B, autophagy, type 1 Interferon production	MDP	Crohn's Disease, Blau syndrome
NLRP		NLRP3	Negative regulator of T cell activation and response to LPS	Unknown	
		NLRP5	Inflammatory response and MHC-I upregulation	IFN- γ , IFN- β	
		NLRP4	Caspase 1 activation, cell death, phagosome maturation,	Rod proteins, flagellin	
		NLRX1	ROS production and antiviral response	Unknown	
		NLRP1	Response to anthrax bacteria	Lethal Toxin, MDP	Vitiligo, Type 1 diabetes
NLRP		NLRP10	Dendritic cell migration	Unknown	Beckwith-Wiedemann Syndrome
		NLRPs 2-9;11-14			
		NLRP2	Embryonic development, Caspase 1 activation	Unknown	Mude-Wells, Familial Cold autoinflammatory syndrome
		NLRP3	Caspase 1 activation	ATP, Alum, Asbestos, Silica, ROS	
		NLRP4	Embryogenesis, type 1 interferon, autophagy	Unknown	
		NLRP5	Embryogenesis	Unknown	
		NLRP6	NF- κ B inhibition and caspase 1 activation	Unknown	
		NLRP7	Embryonic development, caspase 1 activation	Lipopeptides	Hydatiform mole
	NLRP12	Inhibition of noncanonical NF- κ B, ERK and AKT pathway, activation caspase 1	Yersinia	Hereditary periodic fever	
	NLRP14	Spermatogenesis		Spermatogenic failure	

Figure 13 : Tableau résumant les caractéristiques de la famille des Nod Like récepteurs.

La classification de la famille des récepteurs NLRs est établie selon la nature de la partie NH2 terminale. Les récepteurs NLRC3, NLRC5 et NLRX1 sont les seuls à ne pas avoir de domaine terminal défini à l'heure actuelle. La structure des récepteurs est résumée dans la seconde colonne : CARD pour caspase recruitment and activation domain, BIR pour baculovirus IAP repeat, PYD pour domaine pyrine, TA pour acidic transactivation domain, NACHT pour NAIP, CIIA, HET-E et TP1, LRR pour leucine rich repeat.

Les fonctions connues du récepteur, son/ses ligand(s) et son implication en pathologie humaine sont résumés respectivement dans les quatrième, cinquième et sixième colonnes. (Motta et al. 2015)

Les récepteurs appartenant à la sous famille NLRP sont les récepteurs NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC3 (NOD3), NLRC5 et NLRX. Cette sous famille de récepteur NLR présente un ou deux domaines CARD à leur extrémité NH2 terminale (210). Le domaine CARD, pour *caspase recruitment domain*, est impliqué dans le recrutement de la caspase-1 ou de kinase pour transmettre le signal d'activation. La structure et le fonctionnement des récepteurs NOD1 et NOD2 seront détaillés plus loin dans ce document.

Ainsi, l'activation des récepteurs NLR est associée à de multiples voies de signalisation aboutissant à une réponse inflammatoire, l'assemblage de l'inflammasome ou l'activation de la voie NF- κ B (208).

c. Caractéristiques et fonctionnement de deux récepteurs NLRC : NOD1 et NOD2

i. Structure et activation des récepteurs NOD1 et NOD2

Les récepteurs NOD1 et NOD2 appartiennent à la sous famille des récepteur NLRC. Leur structure est représentée dans la figure 14. Chaque domaine spécifique des récepteurs NOD assure des fonctions distinctes. A sa partie carboxy-terminale, le domaine riche en Leucine (LRR) assure la détection des ligands spécifiques du récepteur NOD1 et NOD2 (215,216). Le récepteur NOD1 reconnaît un fragment de motif de peptidoglycane bactérien présent dans la plupart des bactéries gram négatives et dans quelques bactéries gram positives comme *Bacillus subtilis* ou *Listeria monocytogenes* (217,218). La plus petite fraction de peptidoglycane reconnue par Nod1 est le γ -D-Glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) provenant d'une structure contenant le N-acetyl glucosamine-N-acetyl muramic acid (GlcNAc-MurNAc (217,218). Le récepteur NOD2 détecte le Muramyl dipeptide (MDP) provenant à la fois de bactéries gram négatives et positives (219,220). La structure respective des ligands de NOD1 et NOD2 est représentée dans la figure 15.

Suite à la reconnaissance de son ligand par le domaine LRR, la protéine NOD change de conformation ce qui provoque une oligomérisation du récepteur via son domaine central NOD/NACHT. Cette auto-oligomérisation induit, via les domaines CARD, le recrutement et l'activation d'une protéine adaptatrice serine/threonine kinase, la protéine adaptatrice receptor-interacting protein 2 (RIP2K). Le recrutement de cette protéine adaptatrice va permettre l'assemblage d'une plateforme permettant le recrutement d'effecteur nécessaire à la voie de signalisation (221). Le recrutement de molécules régulatrices et l'assemblage du nodosome permettent d'aboutir in fine à l'activation de la réponse inflammatoire via NF- κ B (222). Cette protéine adaptatrice est spécifique de la transduction du signal de NOD1 et de NOD2 mais pas de la transduction du signal des autres récepteurs de l'immunité innée et notamment les TLRs (223). L'activation des récepteurs NOD conduit à l'activation des voies de signalisation de NF- κ B (222,224) et des Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (225,226). *In fine* l'activation de ces voies aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et de chimiokines de type CC-chemokine ligand 2 et la chimiokine de neutrophiles CXC-chemokine ligand 8 (CXCL8 ou IL-8) (227).

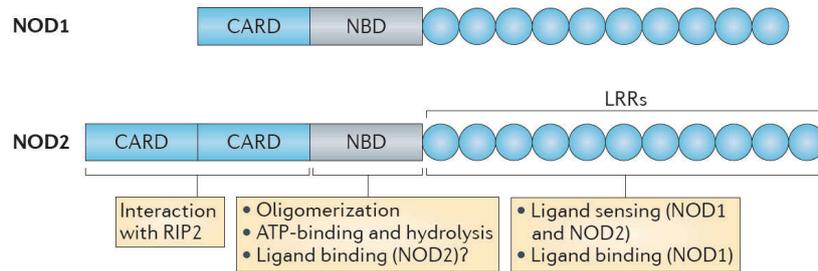


Figure 14: Structure et fonction des différents domaines composant les récepteurs NOD1 et NOD2

La structure du récepteur NOD1 et NOD2 est identique à l'exception de la répétition de deux domaines CARD pour le récepteur NOD2 contre un pour le récepteur NOD1. Ce domaine permet le recrutement de la protéine RIP2K. Le domaine central (NBD/NACHT) permet la liaison de l'ATP et l'oligomérisation du récepteur après reconnaissance de leur ligand respectif via le domaine riche en leucine (LRR). (Philpott et al. 2013)

Le récepteur NOD1 est exprimé de façon ubiquitaire dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires appartenant au système immunitaire professionnel ou des cellules de structure comme les cellules épithéliales (228) ou mésothéliales (229). Les cellules du système immunitaire exprimant NOD1 sont les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages (230), les lymphocytes (231) et les polynucléaires éosinophiles (232). L'expression du récepteur NOD1 peut aussi être régulée à la hausse dans les cellules hématopoïétiques macrophagiques en réponse à une stimulation par du LPS, de l'interféron de type I ou du $TNF\alpha$ (233,234).

Comme l'ensemble de la famille NLR, NOD1 et NOD2 sont des récepteurs intra cytoplasmiques. Leur activation requiert donc une internalisation de leurs ligands au sein du cytoplasme. Les mécanismes d'entrée des fragments de peptidoglycane bactérien sont multiples. Schématiquement, on distinguera les mécanismes dépendants d'un processus bactérien pathogène invasif et de ceux indépendants.

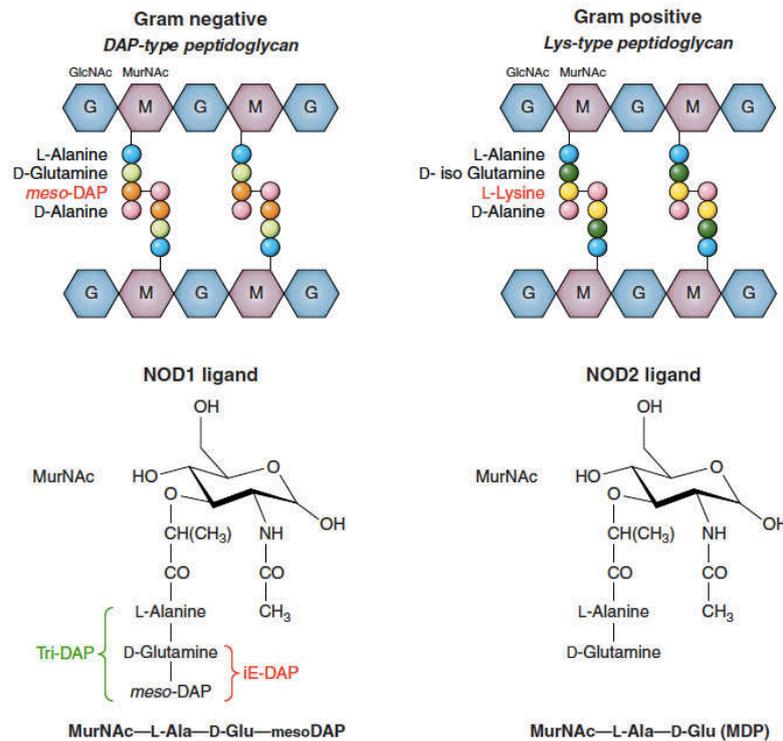


Figure 15 : Structure des ligands de NOD1 et NOD2 dérivant respectivement des peptidoglycanes de bactéries gram négatives et gram positives

- A. Structure des peptidoglycanes de bactéries gram négatives et gram positives
 B. Identification des structures minimales reconnues par les récepteurs NOD1 (iE-DAP) et NOD2 (MDP)

Tri-DAP : L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelic acid; iE-DAP : D-Glu-mesodiaminopimelic acid; MDP, muramyl dipeptide; GlcNAc : N-acetyl-D-glucosamine; MurNAc, N-acetylmuramic acid. (Motta et al. 2015)

ii. Voies d'internalisations des ligands spécifiques de NOD1 et de NOD2 dans le cytoplasme

Le récepteur NOD1 peut être activé au cours d'une infection bactérienne via une intrusion de l'agent pathogène dans le cytoplasme de la cellule hôte ou via l'utilisation de système de sécrétion bactérien permettant l'injection de matériel au sein de la cellule hôte (235). *Chlamydomphila pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* sont des bactéries pathogènes pour l'humain capables de s'introduire dans le cytoplasme des cellules hôtes et d'induire une production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 de façon NOD1 dépendante (236,237). Cette voie d'activation de NOD1 a également été mise en évidence au cours d'infections avec *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* et *Moraxella catarrhalis* (238–240).

Néanmoins, ce mécanisme de défense innée peut-être contourné par les bactéries pathogènes invasives via une modification de la composition de leur peptidoglycanes. Par exemple, la dé-acétylation des résidus N-acetylglucosamine des peptidoglycanes par une enzyme codée par le génome de *Listeria monocytogenes* permet de contourner l'activation du récepteur NOD1 suite à l'invasion cytoplasmique (238). Au cours d'infections respiratoires

chroniques à *Pseudomonas aeruginosa*, une modification de la composition des peptidoglycanes et du LPS au cours du temps a été mise en évidence. Cette modification de la composition de la bactérie aboutit à une diminution de la réponse inflammatoire induite par le pathogène et à une diminution de la reconnaissance des récepteurs TLR4 et NOD1 pour leurs ligands respectifs (241).

Cependant, en absence d'invasion du cytoplasme par l'agent pathogène, les récepteurs NOD peuvent être activés notamment via le système de sécrétion de type IV. Ce complexe protéique exprimé par certaines bactéries comme *Helicobacter pylori* permet l'injection à travers la membrane plasmique d'un certain nombre de molécules biologiques dont des peptidoglycanes capables d'activer NOD1 (242).

De façon intéressante, NOD1 peut également être activé indépendamment d'un processus infectieux pathogène. En effet, comme évoqué précédemment, l'organisme humain est colonisé par des millions de bactéries commensales. La paroi extérieure bactérienne, contenant entre autre des peptidoglycanes, est continuellement renouvelée dans les bactéries à gram négatif et à gram positif. A titre d'exemple, *E.Coli* renouvellerait la moitié du contenu en peptidoglycane de sa paroi entre chaque division cellulaire (243). Ce renouvellement continu de la paroi bactérienne par nombreuses enzymes auto-lytiques libère dans l'environnement direct des bactéries des fragments de paroi bactérienne (244,245). Ces produits de dégradation contiennent des peptidoglycanes pouvant être internalisés par les cellules de l'hôte via différents mécanismes (Figure 16). Premièrement, dans les cellules épithéliales ces peptidoglycanes peuvent être internalisés dans le cytosol des cellules par endocytose principalement médiée par des vésicules de clathrine. Cette voie est dépendante d'un pH acide compris entre 5 et 6 et implique des endosomes précoces et le transporteur SLC15A4 (246). Deuxièmement, dans les cellules capables de phagocytose, les fragments de paroi bactérienne sont dégradés par le système phago-lysosomal. Les produits de dégradation de la phagocytose peuvent ensuite activer NOD1 si son ligand est présent (247). Troisièmement, un transporteur transmembranaire proton-dépendant, nommé PEPT 2, assure le transport spécifique du ligand de NOD1 dans des cellules épithéliales des voies aériennes hautes humaines (248), dans les cellules alvéolaires humaines (249) et dans les macrophages murins (250). Un transporteur spécifique de ligand de NOD2, le transporteur PEPT 1, est particulièrement exprimé dans les cellules épithéliales digestives (251,252). Le renouvellement et la croissance des bactéries sont également associés à la production *in vivo* et *in vitro* de vésicules de membranes extérieures. Ces vésicules peuvent provenir de bactéries gram négatives mais également de bactéries gram positives (253). Ces vésicules contiennent des protéines de l'enveloppe externe, de l'ADN, du LPS et des peptidoglycanes (253). Plusieurs équipes ont mis en évidence que les vésicules bactériennes de la membrane externe (ou *Bacterial* outer membrane vesicles : OMVs)

provenant de différentes bactéries telles que *H. Pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *E. Coli* pouvaient activer une réponse pro-inflammatoire médiée par NOD1 dans des cellules épithéliales (228,254). L'internalisation des OMVs dans le cytoplasme des cellules hôtes est rendue possible via le détournement des radeaux lipidiques des cellules hôtes pour faciliter l'entrée (254).

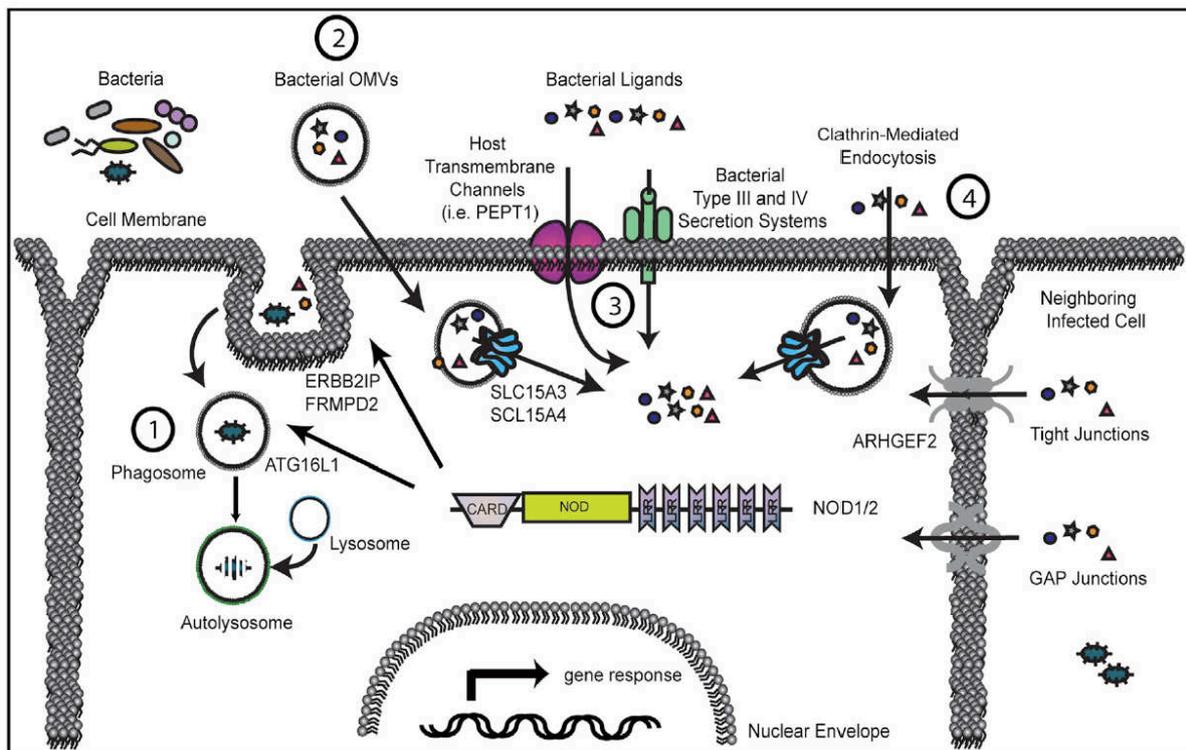


Figure 16 : Mécanismes d'internalisation des ligands de NOD1 et de NOD2 dans le compartiment cytoplasmique

L'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 nécessite une internalisation de leur ligands dans le cytoplasme de la cellule cible pour interagir. Les portes d'entrée des peptidoglycanes dans les cellules sont nombreuses : 1/ Par phagocytose complète de la bactérie ou des débris de paroi bactérienne, 2/ Captation de vésicules membranaires externe dérivant de bactéries, 3/ Passage de la membrane cytoplasmique via un transporteur spécifique (PEPT1, PEPT2), via des systèmes de secretion bactériens (TSST IV), 4/ Endocytose. L'arrivé du ligand dans le cytoplasme induit une relocalisation du récepteur NOD au sein de la cellule. (Caruso et al. 2014)

L'ensemble de ces travaux met en évidence les multiples possibilités d'activation du récepteur NOD1 en réponse à un processus infectieux pathogène mais également dans la détection des produits bactériens liée au renouvellement physiologique de la flore commensale digestive.

Le récepteur NOD1 est un récepteur de l'immunité innée. Ce dernier participe donc à la réponse immune innée de l'hôte contre certains types d'agents pathogènes. Cependant, son rôle ne se limite pas à la réponse immune innée. Il contribue également à l'initiation de la

réponse immunitaire adaptative ainsi qu'au maintien de l'homéostasie du microbiote digestif. Ces différents rôles seront abordés dans le prochain paragraphe.

iii. Rôle de NOD1 et NOD2 dans la réponse aux infections

NOD1 et NOD2 sont des récepteurs de l'immunité innée et participent à la défense de l'organisme contre les infections (Figure 17). Ce rôle a été confirmé *in vitro* en étudiant la réponse inflammatoire induite par des agents infectieux sur différents types cellulaires déficients en NOD1 ou NOD2. Cette approche a permis d'identifier que NOD1 est impliqué dans la reconnaissance de *Pseudomonas aeruginosa* (255), *Campylobacter jejuni* (256), *Acinetobacter baumannii* (257), *Helicobacter Pylori* (258), *Shigella flexneri* (259) et *Listeria monocytogenes* (237) par les cellules épithéliales.

In vivo, l'utilisation de souris déficiente pour Nod1^{-/-} ou Nod2^{-/-} ou déficiente pour les deux récepteurs a permis de confirmer le rôle respectif de ces récepteurs dans la défense contre l'infection. Les souris Nod1^{-/-} étaient plus sensibles aux infections par *H.pylori* (242), *Clostridium difficile* (260), *Trypanosoma cruzi* (261), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (239) avec notamment une augmentation de la charge bactérienne lors de l'infection. De façon non exhaustive, la perte de fonction de NOD2 était associée à une susceptibilité accrue aux infections cutanées à *Staphylococcus aureus* (262), aux infections digestives à *Listeria monocytogenes* (263) ou à *Toxoplasma gondii* (264). Ces études démontrent le rôle spécifique de chacun de ces récepteurs en réponse à des pathogènes particuliers. De façon intéressante, la susceptibilité à certaines infections, comme l'infection à *Bacillus anthracis* (265) et *Salmonella spp* (266) ne sont mises en évidence que chez les souris déficientes pour NOD1 et NOD2. Certaines bactéries comme *S. flexneri* sont à la fois reconnues par NOD1 et NOD2 et cette double reconnaissance aboutie à l'initiation de l'autophagosome et l'initiation d'un processus d'autophagie permettant l'élimination de la bactérie (267). Nod2 est également un récepteur intra-cytoplasmique de reconnaissance des virus à simple brin d'ARN. Il participe à la défense antivirale via la production de IFN-β. Suite à une infection par le virus respiratoire syncytial, les souris Nod2^{-/-} présentent une mortalité accrue et un défaut de production d'IFN-β par rapport aux souris sauvages (268). Cette reconnaissance des virus à ARN simple brin est spécifique de Nod2 (268).

L'activation de NOD1 et de NOD2 conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines via les voies de signalisation NF-κB et MAPK dans différents types cellulaires (218,224). Ainsi, la stimulation de cellules épithéliales et de macrophages humains par des ligands de Nod1 déclenche la production d'IL-6, IL-8, et de TNF-α (224,269–271). La stimulation du récepteur Nod1 de cellules épithéliales murines provoque

la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et CXCL-8/IL-8 de façon similaire (242,272,273).

En plus d'induire une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, les récepteurs Nod renforcent l'efficacité de la défense contre l'infection en favorisant le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de l'inflammation. Ils participent au recrutement de polynucléaires neutrophiles via la sécrétion de chimiokines telles que CXCL8/IL8, CXCL1/KC et CXCL2/MIP-2 chez l'Homme et la souris (218,227,271–273). D'autres chimiokines sont également produites suite à l'activation de ces récepteurs, tel que CCL5/RANTES et CCL2/MCP1 (229,271,273,274) suggérant que d'autres cellules immunes, comme les éosinophiles ou les monocytes pourraient également être recrutés sur le site de l'inflammation via NOD1. De façon cohérente avec la voie d'activation des récepteurs NOD, chez les souris déficientes pour la protéine adaptatrice RIP2K, la production de CCL2, TARC, KC et MIP-1 β est altérée après stimulation par des acariens (275).

La réponse immune innée médiée par les récepteurs Nod implique également la synthèse et la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que la β défensine (271,276,277) et la synthèse d'oxyde nitrique (229).

Nous avons dans le paragraphe précédent détaillé les effets de l'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 dans le cadre de la réponse immune innée.

Cependant, ce mécanisme de défense est complexe et repose sur l'action combinée et intégrée de l'ensemble des récepteurs de reconnaissance des pathogènes présents sur les cellules cibles. Ainsi, les récepteurs NOD1 et NOD2 sont co-exprimés avec certains TLRs dans plusieurs types cellulaires dont les cellules dendritiques (278), les cellules épithéliales (279,280) et les macrophages (280). La co-localisation de ces récepteurs de l'immunité innée permet une synergie de leur action et une potentialisation de la réponse (281)

In vitro, la stimulation de cellules mononucléées périphériques sanguines par des agonistes de NOD1, le M-triDAP ou de NOD2, le MDP, en association avec un agoniste du TLR4, du TLR1/2, ou le LPS induit une réponse synergique sur la production de cytokines IL-8, IL-6, IL1- β et TNF- α (230,282). Une synergie similaire a été mise en évidence après stimulation de cellules monocytaires humaines par un agoniste de NOD1, C12-iE-DAP et de TLR5 avec une production accrue d'IL1- β , IL -8 MIP1 α MIP1 β *in vivo* et *in vitro* (283). La même équipe a mis en évidence qu'une co-stimulation du TLR4 et de NOD2 augmentait la réponse inflammatoire et humorale (284).

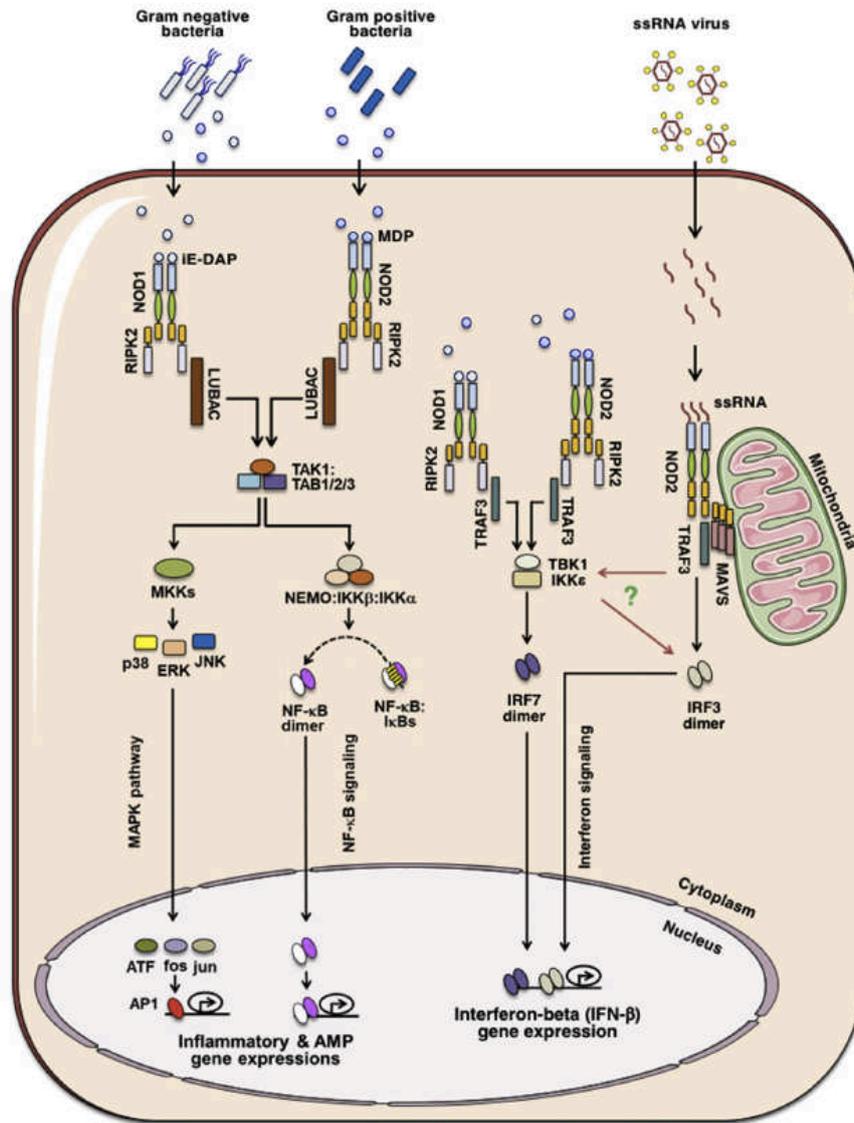


Figure 17 : Voies d'activation et de signalisation de NOD1 et de NOD2

Les ligands respectifs de NOD1, l'iE-DAP et de NOD2, le MDP, sont reconnus par le domaine riche en leucine de chacun des récepteurs. Cette reconnaissance favorise l'oligomérisation du récepteur NOD et le recrutement la protéine sérine thréonine kinase RIPK2. Ce recrutement va permettre l'assemblage des protéines LUBAC et TAK1-YAB kinase. La structure formée est appelée le complexe nodosomal. Il assure l'activation des voies de signalisation NF-κB et MAPK. Ces deux voies de signalisation aboutissent *in fine* à la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de peptides antimicrobiens. (Mukherjee et al. 2018)

Les interactions synergiques entre les récepteurs NOD et les TLRs ne se limiteraient pas à la production de cytokines et pourrait participer à la maturation des cellules dendritiques. Ainsi, la stimulation de cellules dendritiques humaines par un agoniste de NOD2 et de TLR2 induit une activation synergique de CD80, CD83 et du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) (285). Cependant les résultats d'autres études viennent pondérer ces résultats. En effet, la stimulation de cellules dendritiques murines par un agoniste de TLR4 et de MDP induit une augmentation de CD80, CD86 et de CMH de classe II additionnelle plutôt que synergique (284). Ces différences pourraient être expliquées par les espèces étudiées ou par la méthodologie propre des expériences.

Les travaux démontrant l'action synergique des NLRs et des TLRs a été démontrée de façon probante de multiples fois. Les hypothèses mécanistiques pouvant expliquer cette synergie sont au nombre de trois. Premièrement, si les voies de signalisations de NOD et de TLRs son indépendantes initialement, notamment via leurs protéines adaptatrices respectives RIP2K et MyD88, ces dernières convergent vers les facteurs de transcription NF- κ B et notamment la phosphorylation de IKK- β par TAK1 (Figure 17) (286). Les autres hypothèses sont celles d'interactions de TLR/NOD au niveau post transcriptionnel ou une régulation par les TLRs de l'expression de composés des voies de NOD. Ces hypothèses sont regroupées dans une revue récente (281).

Comme nous venons de l'évoquer plus haut, les récepteurs de reconnaissance aux pathogènes, dont les TLRs, sont impliqués dans la maturation des cellules dendritiques via la reconnaissance de leur ligands à la surface de ces cellules (287). Les récepteurs NOD1 et NOD2 possèdent également cette caractéristique et participent ainsi à l'initiation de la réponse adaptative immune.

iv. Implication des récepteurs NOD1 et NOD2 dans l'immunité adaptative

La reconnaissance de leur ligand spécifique par les récepteurs NOD1 et NOD2 permet un amorçage de l'immunité adaptative. Ainsi, la reconnaissance de composants bactériens, dérivant de la flore bactérienne commensale digestive par NOD2 joue le rôle d'agent adjuvant pour augmenter la synthèse d'IgG antigènes spécifiques. Dans ce travail, les souris étaient sensibilisées puis provoquées avec de l'albumine humaine avec ou sans MDP. La présence de MDP potentialisait la production d'anticorps (288). *In vivo*, la stimulation par du MDP favorise une réponse de type Th2 caractérisée par un profil cytokinique IL-5 et IL-4 (289). Des résultats similaires ont été mis en évidence avec le récepteur NOD1. Chez la souris, l'administration d'un agoniste spécifique de NOD1 murin, le FK156, induit l'initiation d'une réponse immune antigène spécifique B et T de type Th2 (227). Fritz et collègues ont confirmé qu'une stimulation par le FK156 induisait une production de la chimiokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), également connue sous le nom de chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) de façon Nod1 dépendante. Cette chimiokine est connue pour promouvoir le recrutement de monocytes et de cellules dendritiques au niveau des tissus inflammés (290) et participer à la promotion de l'immunité de type Th2 dans des modèles infectieux ou allergiques (291). Cette réponse immune antigène spécifique de type Th2 en réponse aux peptidoglycanes médiée par Nod1 est générée par les cellules non hématopoïétiques (227). Une des particularités du récepteur NOD1 dans l'initiation de la

réponse immunitaire adaptative est sa versatilité. Ainsi, la reconnaissance de son ligand par Nod1 en coopération avec l'activation simultanée de TLR, tel que le TLR2, potentialise l'activation de NF- κ B et la production de cytokines IL-12, IL-1 β , IL-6 et IL-23 connues pour promouvoir l'initiation d'une réponse immunitaire Th1 et Th17 (227,292). Ces travaux soulignent l'implication des récepteurs NOD dans l'initiation, le fonctionnement et la polarisation de la réponse immunitaire adaptative.

v. Implication du récepteur NOD1 & NOD2 dans l'homéostasie du microbiote digestif

Le tractus digestif de l'homme est colonisé par une flore commensale bactérienne jouant un rôle important dans le développement du système immunitaire digestif (293) et dans la modulation du système immunitaire systémique (294). Les interactions entre le microbiote et le système immunitaire sont complexes et pourraient impliquer les récepteurs de l'immunité innée.

L'implication des récepteurs NOD dans la régulation du microbiote digestif et dans les interactions avec le système immunitaire a été suggérée initialement par l'association entre des polymorphismes du récepteur NOD2 et la maladie de Crohn, une pathologie inflammatoire de l'intestin associée à une dysbiose digestive (295,296). Des travaux ont révélé l'implication des récepteurs NOD dans le développement des tissus lymphoïdes secondaires digestifs, le maintien de l'homéostasie du microbiote digestif.

In vivo, la colonisation du tube digestif par des bactéries Gram négatives participe à la formation des tissus lymphoïdes secondaires, les follicules lymphoïdes isolés (FLI). Les souris déficientes pour les récepteurs de l'immunité innée TLR2/4 Myd88, TRIF, NOD2 présentent une maturation incomplète des FLI au niveau de l'iléon et du colon sans altération de leur formation. En revanche, l'expression de NOD1 au niveau des cellules stromales, dont les cellules épithéliales, sont nécessaires à la génération de FLI au niveau de l'iléon (297). Ainsi, la maturation des FLI est dépendante de plusieurs PRRs. La reconnaissance des bactéries commensales Gram négatives par NOD1 induit l'expression de β -defensin 3 (mBD3) et de CCL20 qui se lient toutes les deux au récepteur de chimiokine CCR6 conduisant à la formation des FLI immatures (297).

Chez des patients atteints de la maladie de Crohn, l'expression de alpha defensin au niveau de la muqueuse digestive est réduite particulièrement chez les sujets ayant une mutation de NOD2 (298). La régulation de peptides antimicrobiens via le récepteur NOD2 a également été mise en évidence chez la souris (263). Néanmoins, des résultats contradictoires chez des patients atteints de la maladie de Crohn et chez la souris ont également été publiés (299,300).

Le rôle des récepteurs NOD sur la composition du microbiote digestif présente également des données discordantes. Bouskra et al. ont mis en évidence que les souris NOD1^{-/-}, présentaient une altération qualitative et quantitative du microbiote digestif. Ces dernières présentaient une augmentation de leur flore digestive totale d'un facteur 100 ainsi qu'une modification de sa composition. Ces modifications qualitatives affectant particulièrement les genres *Clostridiales*, *Bacteroides*. A titre d'exemple, les *enterobacteriaceae* étaient augmentés également d'un facteur 100 (297). La dysbiose digestive des souris NOD1^{-/-} et NOD2^{-/-} a été remise en question par Robertson et collègues. Après un contrôle des facteurs de confusion spécifique à l'étude du microbiote, comme l'élevage d'animaux, cette équipe a confirmé que l'expression iléale de Nod2, Muc2, α - and β -defensins and keratinocyte-derived chemokine (KC) était altérée chez les souris NOD1^{-/-}. Ce travail n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative dans l'abondance relative des différentes espèces commensales bactériennes chez les souris NOD1 déficientes et WT littermate. Chez les souris NOD2 déficientes aucune différence d'expression des marqueurs immuns ni de la composition bactérienne n'était retrouvée (301). Chez des sujets atteints de la maladie de Crohn et chez leur entourage, aucun effet de NOD2 sur la composition du microbiote n'a été observé (302). Ces résultats contradictoires mettent en évidence la complexité de l'étude et des interactions entre le microbiote et le système immunitaire.

Au delà du maintien potentiel de l'homéostasie du microbiote digestif, la détection de composés bactériens dérivant de la flore digestive permet une amélioration de la réponse immunitaire innée. La reconnaissance des peptidoglycanes dérivant du microbiote digestif améliore la clearance bactérienne de *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* par les PNN issus de la moelle osseuse de façon dépendante de NOD1. Ainsi, l'élimination de ces pathogènes par des PNN provenant de souris NOD1^{-/-} ou de souris axéniques est altérée par rapport aux souris sauvages. Cet amorçage des PNN est dépendant de l'activation de NOD1 par son ligand. Ainsi, l'administration intra-péritonéale d'un agoniste de Nod1 à des souris sauvages 7 jours après une déplétion complète du microbiote digestif par antibiothérapie à large spectre restaure la fonctionnalité des PNN comparativement aux souris ayant reçu du MDP ou un placebo. Ce travail suggère que les éléments bactériens dérivant du microbiote digestif améliorent la réponse immune systémique via l'activation de NOD1 au niveau de PNN dans la moelle osseuse (303).

Dans le paragraphe précédent, nous avons établi le rôle et le fonctionnement du récepteur NOD1 dans la réponse immune innée et son implication probable dans les interactions avec le microbiote digestif. La capacité de ce dernier à induire une polarisation Th2, et son implication dans les interactions entre l'environnement microbien exogène ou endogène, en

fait un candidat potentiellement impliqué dans les pathologies immuno-allergologiques chez l'homme.

d. Rôle putatif des récepteurs NOD1 et NOD2 dans la physiopathologie de l'asthme

i. Arguments en faveur d'une implication du récepteur NOD1 et NOD2 dans l'asthme chez l'Homme

L'hypothèse d'une participation du récepteur NOD1 à la physiopathologie de l'asthme allergique est soutenue initialement par plusieurs études d'association pangénomiques. Des polymorphismes du récepteur Nod1 ont été associés à l'asthme (304) ainsi qu'à des pathologies allergiques fréquemment associées comme l'eczéma (305) ou la rhinite allergique (306).

Ainsi, le polymorphisme (ND₁+32656) de type insertion délétion situé de l'intron IX de NOD1 est fortement associé à l'asthme dans une population d'asthmatiques et de sujets sains avec un Odds Ratio (OR) a 6.3 [95% confidence intervalle (CI) 1.4–28.3, dominant model]. Ce polymorphisme rend également compte de 7% de la variabilité des IgE totales dans deux panels de famille AUS1 et UK1 (304). Ces associations ont été confirmées sur trois autres panels de population différents.

L'eczéma atopique est une affection cutanée appartenant à la famille des pathologies dites « atopiques » dont fait partie l'asthme allergique et la rhinite allergique (307). Cette pathologie a également été associée à des polymorphismes du récepteur NOD1. En Allemagne, dans une cohorte transversale de type cas-contrôle, une association entre trois SNP de Nod1, rs2907748, rs2907749 et rs2075822, et le taux d'IgE ont été mis en évidence sur les 11 SNPs analysés. De plus, deux SNPs, rs2736726 et rs2075817, étaient faiblement associés à l'eczéma de type atopique. A partir des SNPs analysés, les auteurs ont ensuite identifié deux haplotypes associés respectivement au niveau d'IgE et à la dermatite atopique (305). Cette analyse haplotypique est plus discriminante pour mettre en évidence les associations entre les SNPs et le phénotype clinique (308). Des polymorphismes de ce PRR ont également été associés à la rhinite allergique (306).

Les pathologies allergiques semblent être le résultat des interactions entre un génotype particulier et un environnement comme exposé précédemment.

Ces résultats indiquent que les polymorphismes du récepteur NOD1 pourraient altérer les interactions entre l'hôte et les stimuli bactériens. Ces modifications pourraient façonner de façon inappropriée la réponse immune et favoriser l'émergence de pathologies allergiques.

De façon intéressante, Eder et collègues ont évalué si l'association entre la prévalence de pathologies allergiques dans l'enfance et l'exposition à des produits microbiens étaient modifiés par des polymorphismes du récepteur CARD4/NOD1. Les auteurs ont mis en évidence que la corrélation inverse entre une exposition à un environnement rural et la survenue d'un asthme ou de pathologies allergiques dans l'enfance était modifiée par un polymorphisme du récepteur CARD4/-21596. Ainsi, la fréquence du rhume des foins, des symptômes d'asthme atopique et du niveau d'IgE spécifique anti-pollens et chat était accrue chez les enfants porteurs de deux allèles sauvages CARD4/-21596T comparativement aux patients porteurs de l'allèle C. Le génotype homozygote T était fortement protecteur contre les pathologies allergiques chez les enfants vivant en milieu rural. Cette étude confirme que les interactions entre l'environnement bactérien et le génotype impacte la fréquence de survenue de pathologie allergique et que NOD1 pourrait participer à ces interactions (306).

Les études évaluant l'expression de NOD1 chez les sujets atteints de pathologies allergiques sont peu nombreux. Dans une étude de cas-témoin d'enfants asthmatiques, le génotype homozygote AA pour le polymorphisme rs2075820 était associé à un risque accru d'asthme avec un OR à 2.39, IC 95% (1.04–5.49), $p < 0.05$) chez les enfants âgés de 6 à 18 ans. L'expression protéique et en ARNm de NOD1 était plus élevée dans des cellules mononucléées de sang de patients asthmatiques par rapport à un groupe de sujets sains. Cette caractéristique n'était pas retrouvée pour NOD2 (309). Au niveau de la muqueuse nasale de sujets atteints de rhinite allergique aux pollens, l'expression de NOD1 fluctuait au cours de la période de pollinisation (310).

De façon intéressante, les infections virales dans l'enfance précèdent souvent la survenue d'allergie et d'asthme chez les enfants (311) et sont impliquées dans 40 à 85% des exacerbations d'asthme. Les principaux virus impliqués dans les infections virales chez les jeunes enfants sont les rhinovirus et le virus respiratoire syncytial. Ces deux virus sont des virus à ARN simple brin. La capacité du récepteur *Nod2* à reconnaître les virus à ARN simple brin fait de ce récepteur un candidat potentiel dans les exacerbations virales d'asthmatiques. Par ailleurs, des polymorphismes du récepteur NOD2 ont été associés à l'asthme (312).

L'ensemble de ces travaux est en faveur de l'hypothèse d'une implication du récepteur NOD1 et/ou NOD2 dans certains endotypes d'asthme chez l'homme. Cette hypothèse est étayée par des travaux expérimentaux *in vitro* et *in vivo*.

ii. Arguments expérimentaux en faveur d'une implication du récepteur NOD1 et NOD2 dans l'asthme

Notre équipe a mis en évidence que l'amorçage de cellules dendritiques par un agoniste de NOD1, le FK565, induit une augmentation des marqueurs de surface CD80 et CD86 plus prononcée chez les DCs provenant de donneurs allergiques aux acariens de type *Dermatophagoides pteronyssinus* que de CD provenant de sujets sains. De plus, la sécrétion d'IL-10 par les CD est abolie chez les donneurs allergiques par rapport aux contrôles non allergiques. La stimulation des CD par le FK565 augmente la production d'IL-8, d'IL-6 et des chimiokines pro-Th2 CCL17 et CCL22 quelque soit le statut allergique. En revanche, l'expression de CCL22 est significativement augmentée chez des donneurs allergiques. La co-culture de cellules dendritiques stimulées par du FK565 avec des CD4+ naïfs induit la synthèse de cytokines de type Th1, Th2 et Th17 quelque soit le statut allergique du donneur. La polarisation Th2 par les CD sous l'action des chimiokines varie selon le statut allergique. La polarisation Th2 était dépendante de CCL17 et de CCL22 chez les CD provenant de donneurs non allergiques alors que CCL17 était nécessaire et suffisante chez les patients allergiques. Ce travail est le premier à montrer que les cellules dendritiques amorcées par un agoniste de NOD1 sont capables de promouvoir la différenciation de lymphocytes T CD4+ naïf en lymphocytes de type Th2 (313). *In vivo*, dans un modèle murin d'asthme allergique induit à l'ovalbumine avec sensibilisation par voie intrapéritonéale puis challenge par voie intra nasale, l'administration concomitante d'un agoniste de NOD1 exacerbe le recrutement de cellules inflammatoires au niveau du LBA ainsi que la réponse humorale. Cette exacerbation de la réponse Th2 est cohérente avec la synthèse accrue de chimiokines pro-Th2 comme CCL17 et CCL22. Cette recrudescence de l'inflammation de type 2 n'est pas mise en évidence chez les souris NOD1^{-/-} déficientes. Cet effet adjuvant de l'agoniste de NOD1 persiste même en absence d'endotoxines bactériennes, le LPS, dans l'ovalbumine. Néanmoins, la présence de LPS dans l'ovalbumine a un effet synergique sur la réponse Th2. Enfin, le transfert adoptif de cellules dendritiques conditionnées par amorçage avec un agoniste de NOD1 et stimulées avec de l'ovalbumine exacerbe la réponse Th2 induite pulmonaire de façon dépendante de CCL17 (313). Ces résultats confortent les travaux publiés par Wong et collègues qui ont mis en évidence que l'administration intra veineuse d'un agoniste de NOD1 dans un modèle d'asthme allergique à l'ovalbumine était associée à une augmentation du nombre de cellules à mucus dans les poumons, une majoration de la fibrose sous épithéliale et une augmentation des IgE totales (232). Ces études révèlent le rôle pro-inflammatoire Th2 *in vivo* et *in vitro* d'un agoniste de NOD1 dans la réponse allergique asthmatique induite à l'ovalbumine.

Dans un modèle similaire, le rôle d'un agoniste de Nod2 a été évalué. L'administration intra nasale concomitante d'un agoniste de Nod2 et d'ovalbumine bloque l'induction de tolérance observée chez les souris n'ayant reçu que de l'ovalbumine. L'exposition concomitante au MDP et à l'ovalbumine induit une augmentation de la production de cytokines TSLP et IL-25. Cette expression cytokinique favorise l'expression d'une molécule de co-stimulation OX40L aboutissant au blocage de la genèse de lymphocyte T régulateurs. Cette étude révèle l'implication potentielle des agonistes de Nod2 dans l'inflammation allergique et asthmatique (314).

Quelques années plus tard, ce rôle pro-inflammatoire Th2 des récepteurs NODs dans l'asthme allergique a été confirmé par Miller et collègues. En utilisant un modèle d'asthme allergique aux acariens (*Dermatophagoides farinae*), ces derniers ont démontré que la perte de la protéine adaptatrice RIP2K était associée à une réduction majeure des caractéristiques cardinales de l'asthme. Chez les souris RIP2K^{-/-}, la production de mucus dans les voies aériennes, le recrutement alvéolaire de PNN et de PNE, la production de cytokines Th2 (IL-5, IL-4, IL-13) et Th17 et la production humorale étaient réduites par rapport aux souris sauvages (275). De façon intéressante, cette réduction de la réponse Th2 n'était pas secondaire à un défaut d'expansion des ILC2s qui contribuent de façon importante à l'immunité de type Th2 (61). En revanche, l'exposition de cellules épithéliales humaines aux acariens induit la phosphorylation de la protéine RIP2K, témoin de son activation (275,315). La perte de fonction de RIPK2 au niveau de l'épithélium pulmonaire et des fibroblastes est associée à défaut de synthèse de CCL2. Ce travail suggère que NOD1 ou NOD2 est impliqué dans la réponse asthmatique allergique aux acariens et que la cellule épithéliale pourrait jouer un rôle dans la réponse NLRs médiée par les acariens.

In vitro, la stimulation de cellules bronchiques humaines BEAS2B, mais pas les PNE, par un agoniste de NOD1, l'iE-DAP, augmente la sécrétion d'IL-8 et de CCL2. La stimulation de ces cellules par du MDP ne modifie pas l'expression de ces médiateurs inflammatoires. La co-culture de cellules BEAS2B et de PNE sans stimulation permet une augmentation de la synthèse d'IL-8 et de CCL2 qui est potentialisée après une stimulation par MDP ou iE-DAP suggérant que les interactions entre les PNE et les cellules épithéliales potentialisent l'inflammation médiée par un agoniste de NOD1, et que la cellule épithéliale des voies aériennes joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire de type Th2 médiée par NOD1.

Première partie : La détection par NOD1 du microbiote dérivant des acariens favorise l'asthme allergique expérimental

Objectif de travail

L'asthme est une pathologie fréquente et complexe résultant des interactions entre le patrimoine génétique d'un individu et son environnement. De nombreux facteurs environnementaux ont été impliqués dans la pathogenèse asthmatique dont l'exposition aux agents microbiens. Les interactions entre l'hôte et les organismes microbiens résultent de leur présence dans notre environnement exogène ainsi que de leur contribution à notre homéostasie en participant à notre microbiote. De nombreuses études, présentées précédemment, ont mis en évidence le rôle des bactéries, et de leurs composés, dans l'environnement dans le risque de survenue d'un asthme. De façon similaire, une altération de la flore bactérienne endogène, le microbiote, est associée à la survenue d'un asthme.

L'un des phénotypes asthmatiques les plus fréquents est l'asthme allergique. Les acariens constituent un des pneumallergènes le plus fréquent. La composition des acariens est complexe et une exposition à cet allergène déclenche une réponse inflammatoire et immune complexe sur les sujets sensibilisés. Des travaux récents ont révélé la présence de bactéries gram négatif dans le tube digestif des acariens. Au-delà du pouvoir allergénique des protéines composant les acariens, l'implication du microbiote endogène de l'acarien dans la réponse allergique n'a pas été spécifiquement étudiée.

Les interactions entre notre système immunitaire et les bactéries, ou leurs composés, sont en grande partie orchestrées par le système immunitaire inné. Des polymorphismes de plusieurs récepteurs de l'immunité innée ont été associés à un risque accru d'asthme. Notre laboratoire a précédemment démontré que l'activation du récepteur NOD1 jouait un rôle adjuvant dans la réponse allergique asthmatique dans un modèle murin d'asthme allergique induit à l'ovalbumine. Ce récepteur de reconnaissance de pathogènes présente plusieurs caractéristiques pouvant participer à la physiopathologie asthmatique. Premièrement, NOD1 est impliqué dans le développement du système immunitaire digestif et participe à l'homéostasie du microbiote (297) et les souris déficientes en NOD1 présentent une modification de leur flore digestive (297). Secondairement, la présence de bacille gram négatif dans les extraits d'acariens pourrait (198,199), via la présence de fragment de peptidoglycane, activer le récepteur NOD1.

Les hypothèses développées dans ce travail sont que l'implication du récepteur NOD1 dans l'asthme allergique aux acariens pourrait être liée soit à une modification de la réponse immune des souris NOD1 déficiente secondaire à leur dysbiose intestinale soit à une

activation directe du récepteur NOD1 par des fragments peptidoglycanes dérivant du microbiote digestif de l'acarien.

Matériels et méthodes

Souris et cadre éthique

Les souris femelles sauvages (Wild Type ou WT) C57B6 (âgées de 6 semaines) ont été fournies par le laboratoire de Charles River (Wilmington, Mass). Les souris Nod1^{-/-}, Nod2^{-/-} et RIP2K^{-/-} ont été croisées sur un fond génétique de souris C57BL/6 au moins 8 fois. L'ensemble des animaux a été élevé dans un environnement exempt de pathogènes dans des cages adaptées, ventilées avec une litière absorbante et un accès à l'eau et à la nourriture illimité. Un cycle jour nuit de 12 heures était respecté. Les souris axéniques étaient élevées dans des isolateurs flexibles. L'ensemble des expériences réalisées chez les animaux étaient en accord avec le comité d'éthique régional et autorisé par le ministère de la recherche et de l'innovation (autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques no. 7874-2016070417344442 v3). Les transplantations fécales ont été réalisées à partir de fèces fraîches de souris femelles sauvages ou Nod1^{-/-}. Après mise en suspension dans 1mL de PBS stérile, la reconstitution de la flore des souris axéniques étaient réalisées par administration de 200µL de cette suspension par gavage. Le reste de l'homogénat était conservée au congélateur pour des analyses ultérieures.

Protocole d'induction d'un asthme allergique aux acariens et traitement des extraits d'acariens

Les souris sensibilisées aux acariens (Dermatophagoides Farinae, Stallergenes/Greer, lot 9702026) recevaient par voie intra-nasale une dose équivalente à 5 index de réactivité (5 IR : Dose élevée) soit 15 mg protéine/40 mL de PBS ou une dose équivalente à 1 index de réactivité (1 IR : Dose faible) correspondant à 3 mg de protéine/40 mL. Un extrait allergénique est à un titre de 100 IR/ml si un test cutané (prick test) provoque une papule d'un diamètre de 7 mm chez au moins 30 sujets sensibilisés à cet allergène. Les souris contrôles recevaient 40µL de PBS par voie intra-nasale. Une semaine après la sensibilisation, les souris étaient exposées par voie intra-nasale à 40µL d'extraits d'acariens (EA) (selon la dose initiale de sensibilisation haute ou basse) ou 40µL de PBS pendant 5 jours consécutifs. 48 heures après la dernière exposition, les souris étaient anesthésiées avant la réalisation d'une mesure de l'hyper-réactivité des voies aériennes et un sacrifice. Les extraits de Der f contenaient 116 unités d'endotoxine pour 5IR d'extrait d'acariens, soit environ 10 ng de LPS. L'évaluation a été réalisée par un kit de quantification pierce LAL Chromogenic Endotoxin (ThermoFischer scientific).

Pour la réalisation de certaines expériences, des EA natifs ont été purifiés en LPS et en peptidoglycanes. La quantité d'endotoxines a été réduite grâce à l'utilisation de colonnes de résine (Pierce High Capacity Endotoxin Removal Resin, Thermofischer). Après utilisation, les EA contenaient 95 % de leurs protéines initiales et le niveau d'endotoxine était diminué de 99%, soit 0.0625 EU pour 5IR d'acariens. La purification des extraits d'acariens en peptidoglycane a débuté par une digestion à 37°C, dans 12.5mM dans un tampon de phosphate de sodium à pH= 5.6, en présence de 100 UI de mutanolysine de *Streptomyces globisporus* (ATCC 21553 ; Sigma; 10 mg/mL). La déplétion en protéine a été réalisée en ajoutant 3 volumes de solvant : l'acétone, l'acétonitrile et le méthanol. Les surnageants étaient ensuite centrifugés et concentrés avec un speedvac. La pureté en protéine et en allergène a été testée en mesurant le contenu en protéine (Pierce BCA Protein assay Kit, Thermofischer) et en allergène majeur Der f 1 (Der f 1 ELISA kit, Indoor Biotechnologies) dans les surnageants. Aucune trace de ces composés n'a été mise en évidence dans les surnageants. Une méthodologie similaire a révélé que les culots protéiques contenaient entre un tiers à la moitié du contenu initial en protéine et en allergène. Pour les expériences in vivo, les doses administrées étaient normalisées par rapport au contenu initial en protéines et en allergènes soit une normalisation d'un facteur deux ou trois, par rapport à la dose initiale. 10µL ont été injectés pour la spectrométrie de masse LC/MS.

Mesure de l'hyper-réactivité des voies aériennes

Les souris étaient anesthésiées avec 0.5mg/kg de medetomidine (Domitor; Pfizer, Brooklyn, NY) et de kétamine (Imalgene 1000; Merial, Duluth, Ga) et intubées avec un cathéter de 18 gauge suivi par une ventilation mécanique de type FlexiVent (SCIREQ, Montréal, Quebec, Canada). Les souris étaient exposées à un aérosol de PBS puis à des aérosols de doses croissantes de métacholine allant de 0 à 100mg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) en utilisant un nébuliseur ultrasonique (Aeroneb; Aerogen, Mountain View, Calif). La moyenne des valeurs des résistances mesurées était calculée pour chaque dose.

Analyse du lavage broncho-alvéolaire

Le lavage broncho-alvéolaire était réalisé en injectant 1 mL de PBS frais dans les poumons des souris après sacrifice. Les cellules issues du lavage broncho-alvéolaire étaient récupérées par centrifugation pendant 5 minutes à 135 g et à +4 °C. Les cellules étaient mises en suspension dans du PBS puis une numération cellulaire était réalisée. Les échantillons étaient ensuite déposés sur des lamelles (Shandon Cytospin 4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass) et colorées avec du May-Grunwald-Giemsa (DiaPath, Martinengo, Italy) pour effectuer une numération cellulaire.

Prélèvement sanguin et analyses

Le sang était prélevé à partir de la veine abdominale. Après une centrifugation (5000 g pendant 5 minutes), le sérum était collecté et congelé à -20 °C. Le niveau IgE totales et d'IgE spécifiques de Der f était mesuré dans le sérum par ELISA.

Le dosage des IgE totales était réalisé dans une plaque 96 puits (Corning Incorporated) recouverte d'anticorps de rat dirigés contre les IgE murines à la concentration de 2µg/ml (clone R35-72; BD Biosciences Pharmingen). Après une étape de saturation et d'incubation des prélèvements, un anticorps biotinylé anti-IgE de souris (clone R35-118; BD Biosciences Pharmingen) à 2µg/mL était utilisé comme réactif de détection des IgE totales. La liaison des anticorps spécifiques était révélée par addition de streptavidine-peroxydase de Raifort (Zymed, Invitrogen) suivi par l'addition du substrat TMB (Interchim).

La concentration en IgE était exprimée en µg/ml après une comparaison avec une gamme standard d'IgE de souris (0.5mg/mL, BD Biosciences Pharmingen).

La mesure des anticorps IgG1 spécifique de Der f était réalisée via des microplaques coatées avec 10 IR/mL de Der f. Après blocage et incubation avec des dilutions de sérum, la liaison des anticorps spécifiques était détectée par l'addition de streptavidine-peroxydase de Raifort marqué avec un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG1 de souris (Southern Biotechnology, Birmingham).

Histologie pulmonaire

Le lobe droit du poumon de chaque souris était fixé dans l'Antigenfix (DiaPath) et fixé dans de la paraffine (Histowax; HistoLab, Askim, Sweden) selon les recommandations du fabricant. Les sections pulmonaires étaient colorées avec de l'hématoxyline standard, à l'éosine et à l'acide périodique. Ces colorations ont permis l'évaluation respective de l'inflammation péri-bronchique et des mucopolysaccharides présent dans le mucus.

Extraction des protéines pulmonaires

Un lobe pulmonaire était homogénéisé dans 1 mL de réactif pour l'extraction protéique de type T-PER (Thermo Fisher Scientific) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Après dix minutes sur la glace, les lysats cellulaires étaient centrifugés à 13,000 g pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant était collecté pour des mesures et des analyses ultérieures. La concentration totale de protéines des extraits pulmonaires était mesurée en utilisant le kit de mesure de protéines BCA (Protein assay kit ; Thermo Fisher Scientific).

Culture de cellules de lignées humaines et culture de cellules primaires de cellules épithéliales

Lignées cellulaires

Les *cellules* embryonnaires humaines du rein 293 (Human embryonic kidney HEK293) était mise en culture dans le milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) avec du milieu GlutaMAX™ (ThermoFisher Scientific) supplémenté par 10 % de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur (Eurobio Scientific) avec 1 % de pénicilline et 100UI de streptomycine.

Les cellules épithéliales humaines bronchiques BEAS-2B étaient cultivées dans des flasques recouvertes de collagène G (Biochrom) avec un milieu adapté pour les cellules épithéliales respiratoires (Promocell) en accord avec les recommandations de l'American Type Culture Collection (ATCC).

Les cellules alvéolaires épithéliales A549 étaient cultivées dans du Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) avec du glucose et du GlutaMAX™ medium (ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10 % de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur (Eurobio Scientific) et 1 % pénicilline et 100 UI de streptomycine.

L'ensemble des lignées cellulaires était maintenu à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. Un contrôle régulier d'une contamination par mycoplasme était réalisé par PCR.

Les cellules primaires bronchiques

Les cellules bronchiques normales humaines (NHBE) (Lonza) étaient mises en culture dans des plaques PureCoat collagen couvertes par du collagène avec un milieu de culture Pneumacult Ex medium (StemCell) supplémenté avec 96 ng/mL d'hydrocortisone. Les cellules NHBE étaient cultivées pendant 2 passages au maximum à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂. L'ensemble des lignées cellulaires était maintenu à 37 °C dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂. Un contrôle régulier d'une contamination par mycoplasme était réalisé par PCR.

Cellules HEK-293, rapporteuses luciférase de l'activation du récepteur NOD/Nod 1 et 2

L'étude de l'activation de NF-κB par le récepteur d'intérêt dans les cellules rapporteuses luciférase était réalisée en ensemençant chaque puits d'une plaque 96 puits avec 5 x10⁴ cellules par puits. Les cellules étaient transfectées en utilisant de la Lipofectamine LTX avec du « Reagent PLUS » (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Les éléments transfectés étaient des plasmides exprimant le récepteur Nod1 humain (h) NOD1 ou murin (m) Nod1 ou Nod2 (0.5ng/puits) en association avec le plasmide rapporteur pBxIVluc (1 ng/puit) and pEF-BOS-b-gal (25 ng/puit). Le pMXpuro-FLAG-mNOD1

a été créé à partir de l'ADN complémentaire du gène Nod1 d'une souris (Clone EST 944836). Les cellules étaient stimulées en ajoutant 100µL de milieu contenant une quantité d'extrait d'acariens correspondant de 0.2 à 4IR soit une concentration de 3 à 60µg de protéines/mL, soit les ligands spécifiques des récepteurs NLRs (FK565 500ng/puits, FK156 260ng/puit, MDP 500ng/puit) ou seulement du milieu (contrôle). Après un lavage avec 100µL de PBS (Gibco), les cellules étaient lysées avec une solution de lyse passive à la concentration de 1X contenant des inhibiteurs de protéases (cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche).

L'activité luciférase (Luciferase assay substrate, Promega) et de la β-Galactosidase (Mammalian Beta-Galactosidase Assay Kit, ThermoFischer Scientific) était évaluées selon les recommandations des fournisseurs.

Les résultats ont été normalisés en fonction de l'expression de la β-Galactosidase pour refléter l'efficacité de la transfection et exprimés en fonction de l'expression des plasmides seuls.

Stimulation des cellules épithéliales et transfection avec les ARNs interférant (siRNA)

Les lignées cellulaires épithéliales humaines (BEAS-2B et A549) étaientensemencées dans une plaque 96 puits à fond plat avec 1×10^4 cellules par puits. 24 heures après, les cellules étaient traitées pendant 4 heures avec de l'IFN-β (20 ng/mL ; PeproTech, Rocky Hill, NJ). Les cellules étaient ensuite lavées au PBS puis stimulées par des extraits d'acariens à la dose finale de 0.2 IR (correspondant à 6 µg protéines/mL), sauf si une autre indication est mentionnée sur les figures, ou par l'agoniste synthétique de NOD1, le FK565 (50 mg/mL; Fujisawa Pharmaceutical Company, Osaka, Japon) ou du MDP (10 mg/mL; InvivoGen, San Diego, Californie) pendant 24 heures.

Le surnageant de culture et les culots cellulaires étaient collectés pour une mesure des cytokines et de l'expression d'ARN. Pour le besoin de certaines expériences, la stimulation précédemment décrite était associée à l'ajout d'un inhibiteur de RIPK2 (AGV discovery) à la concentration finale de 5 mmol/L. Ces cellules ont aussi été stimulées avec du LPS (InvivoGen) en combinaison avec un inhibiteur de la RIPK2 pour évaluer la spécificité de cet inhibiteur. Les stimulations avec les extraits d'acariens, le FK565, le MDP étaient réalisées en présence de lipofectamine LTX pour faciliter l'internalisation du ligand dans le cytoplasme.

Pour les expériences d'inhibition de l'expression de NOD1 et NOD2 par siRNA, les cellules BEAS-2B étaient transfectées par les ARN interférants duplex-pools siGENOME SMARTpool NOD1 humain (Dharmacon) ou l'ARN interférant siGENOME SMARTpool NOD2 humain (Dharmacon) en utilisant le RNAiMAX (Invitrogen) dans un milieu Opti-MEM (Gibco) selon les recommandations du fabricant. Les cellules BEAS-2B étaient

ensemencées dans une plaque 24 puits avec 1×10^5 cellules par puits puis prétraitées avec de l'interféron pendant 4 heures et transfectées selon les indications ci-dessus pendant 48 heures. Avant la stimulation, les cellules étaient lavées avec du PBS et ensuite exposées pendant 24 heures avec des extraits d'acariens, du FK565 ou du MDP.

L'ARN interférant siRNA1 (Dharmacon) était utilisé comme un control. L'indicateur siGLO red (Dharmacon) était utilisé comme un contrôle de l'efficacité de la transfection. La viabilité cellulaire était évaluée en utilisant le kit Tali dead cell red viability kit (Invitrogen). L'inhibition de l'expression du gene d'intérêt était confirmée par RT-qPCR. L'efficacité du knockdown était de $75 \pm 2.2\%$ pour NOD1 et de $80 \pm 6.7\%$ pour NOD2.

Les cellules NHBE (Lonza) se sont divisées dans le milieu Pneumacult Ex medium (StemCell) avant d'être sous divisées selon les recommandations du fabricant. Elles étaient ensuite ensemencées dans une plaque de 48 puits avec 5×10^4 cellules par puits dans une plaque pré-recouverte avec du collagène de type IV (Sigma) avec du milieu de culture de type "Airway epithelial cell" (Promocell). Les cellules NHBE étaient stimulées pendant 48 heures avec les extraits d'acariens à la dose finale de 1 IR (correspondant à $15 \mu\text{g}$ de protéine/mL) ou l'agoniste de NOD1 FK565 (Fujisawa Inc) ($100 \mu\text{g/mL}$) seul ou en combinaison avec un inhibiteur de RIPK2 (AGV discovery) à la concentration finale de $5 \mu\text{M}$.

Création de souris chimériques par transplantation de moelle osseuse

Les cellules de la moelle osseuses étaient isolées en rinçant les fémurs et les tibias des souris donneuses avec du milieu de culture (minimum essential medium, Life Technologies, Grand Island, NY) et passage des cellules récoltées au travers d'un tamis à cellules stérile de $100 \mu\text{m}$ pour obtenir une suspension de cellules seules.

Les souris receveuses étaient conditionnées par une administration unique d'une irradiation corporelle totale d'une dose de 9 grays. 24 heures après l'irradiation, les souris receveuses bénéficiaient d'une seule injection intraveineuse de 3×10^6 cellules de la moelle osseuse dépletée en cellules T. La déplétion en cellules T de la moelle osseuse des souris donneuses était effectuée à l'aide de microbilles CD4 et CD8 selon le protocole du fournisseur. Les souris chimériques été conservées sous un régime d'eau acidifiée pendant toute la durée du protocole.

PCR quantitative en temps réel

Les lobes pulmonaires étaient homogénéisés avec des billes de céramique (Omni international) et du tampon de lyse RLT RNeasy (Qiagen) en utilisant un tampon de lyse MagNA (Roche). L'isolation d'ARN était réalisée avec le kit RNeasy mini kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. L'ARN extrait du poumon a été rétro-transcrit à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Affinity Script QPCR (Agilent) conformément aux instructions du fabricant.

L'ADNc résultant a été amplifié à l'aide du kit de PCR en temps réel Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent) et détecté sur un Stratagène Mx3005P (Agilent). Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau E2. A l'issue de l'amplification PCR, une analyse de la courbe de fusion de l'ADN a été réalisée afin de confirmer la présence d'un seul amplicon. La gène de la beta-actine humaine (Actb) a été utilisé comme gène de référence interne afin de normaliser les niveaux de transcrits. L'ARN des cellules BEAS-2B a été isolé à l'aide du mini kit RNeasy (Qiagen) et rétro-transcrit à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Affinity Script QPCR (Agilent) combinant Oligo (dT) et des amorces aléatoires. Le gène de la GAPDH a été utilisé comme gène de référence interne afin de normaliser les niveaux de transcrits, à l'exception de hPGLYRP2, de PEPT1 murin et humain, PEPT2 qui ont été normalisés à l'aide de HPRT1 après amplification à l'aide de Primetime gene expression Master Mix (IDT) sur un QuantStudio 12K biosystèmes).

Choix des cytokines et de chimiokines

La mesure du taux de cytokines épithéliales murines pro-Th2 (TSLP, IL-33) et des chimiokines (CCL17, CCL22) a été réalisée par ELISA dans les extraits protéiques de poumon selon les instructions fournies par les fabricants (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota ; et e-Biosciences, Thermo Fisher Scientific). La quantification de la concentration d'IL-6 et d'IL-8 (CXCL8) humaine dans les surnageants de cultures cellulaires BEAS-2B, A549 et NHBE a également été faite par ELISA à l'aide des kits ELISA Duoset (R&D Systems). Les cytokines évaluées dans le contexte d'inflammation allergique des voies respiratoires étaient les cytokines Th2 (IL13 et IL-5), la cytokine Th1 (IFN- γ) et les cytokines Th17 (IL-17 et IL-22). Une mesure des cytokines pro Th2 IL-33 et TSLP a également été réalisée, compte tenu de leur implication dans l'établissement de la réponse Th2. De plus, leurs évaluations étaient justifiées par l'intense expression de NOD1 dans les épithéliums et par son implication dans l'expression de l'IL-33 (316). L'IL-25, une autre cytokine pro-Th2 épithéliale, n'a pas été détectée dans notre modèle. Concernant les chimiokines, nous avons évalué CCL17 et CCL2 car elles sont produites dans les cellules myéloïdes et les cellules épithéliales via la voie de signalisation NOD1 (275,313).

Analyse de l'ARN 16S

Des bibliothèques d'amplicons, ciblant la région hypervariable V3-V4 16S des bactéries, ont été préparées à l'aide du protocole Metabio® optimisé, standardisées et séquencées sur des lectures appariées Illumina MiSeq. Il en résultait 39237 lectures de séquences. Brièvement, la PCR du gène de l'ARNr 16S a été réalisée à l'aide de 5 ng d'ADN génomique, selon le protocole du fabricant, en utilisant 192 amorces à des concentrations finales de 0,2 μ M et une température d'hybridation de 50°C pendant 30 cycles (Metabio®, Genoscreen).

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide d'un système de purification Agencourt AMPure XP-PCR (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), quantifiés selon le protocole du fabricant et multiplexés à des concentrations égales. Le séquençage a été réalisé à l'aide d'un protocole de séquençage à extrémités appariées de 300 pb sur une plateforme Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) à GenoScreen, Lille, France. Le tri par index d'échantillons et le réassemblage des deux lectures « appariées » ont été effectués pour obtenir des séquences de gènes d'ARNr 16S complètes. Les amplicons résultants ont été regroupés en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) avec le logiciel CASAVA v1.0. Les données ont été analysées selon le protocole suivant. Le pipeline interne Metabiote Online v2.0 est partiellement fondé sur le logiciel QIIME v 1.9.1E1. Après les étapes de pré-traitement, les séquences chimères ont été détectées puis éliminées des séquences d'ARNr 16S complètes (sur la base de l'utilisation de Usearch 6.1). Ensuite, une étape d'assemblage a été réalisée pour regrouper des séquences similaires avec un seuil d'identité nucléique (97 % d'identité pour une affiliation au niveau du genre sur les régions V3-V4 du gène de l'ARNr 16S) avec Uclust v1.2.22qE2. La séquence la plus abondante de chaque OTU a donc été considérée comme la séquence de référence de son OTU et taxonomiquement comparée à une base de données de référence (base de données Greengenes, version 13_8 ; www.greengenes.gov) par la méthode de classificateur RDP v2.2E3.

Méthode de spectrométrie de masse LC-MS/MS

L'UHPLC/HRMS a été réalisée sur un système UHPLC Ultimate 3000 couplé à un spectromètre de masse quadripôle-Orbitrap (Q-Exactive Focus, Thermo Fisher Scientific). Les mucopeptides ont été séparés sur une colonne analytique Hypersil Gold aQ (1,9 µm, 2,1 x 150 mm ; Thermo Fisher) à 200 µL/min, avec une température de colonne à 50 °C. Puis pendant 25 minutes, un gradient linéaire de 0,1% (v/v) d'acide formique à 12,5% d'acétonitrile + 0,1% (v/v) d'acide formique a été appliqué, suivi d'une augmentation progressive de l'acétonitrile jusqu'à 20% + 0,1% (v/v) d'acide formique sur 5 minutes et maintenu pendant 5 min. Le rééquilibrage de la colonne a été effectué avec 0,1 % (v/v) d'acide formique pendant 10 minutes supplémentaires.

Le focus Q-Exactive a été opéré sous ionisation électrospray en mode positif et en mode d'acquisition dépendant des données (ddMS2) par Xcalibur 4.0. Le balayage complet (m/z 200 à 3000) a utilisé une résolution de 70 000 FWHM à 200 m/z avec une cible de contrôle automatique de gain (AGC) de 1×10^6 ions et un temps d'injection maximum (IT) en mode automatique. Les paramètres pour MS/MS dépendant des données étaient : résolution 17 500 ; AGC 1×10^5 ions ; IT maximum 60 ms et les 3 ions les plus abondants à charges multiples ont été soumis à une fragmentation des cellules HCD (fenêtre d'isolement 3 m/z,

énergie de collision normalisée (NCE= 25 %)). Les données ont ensuite été traitées avec le logiciel Thermo Xcalibur 3.1 (Thermo Fisher Scientific) pour l'identification des muopeptides.

Analyses statistiques

Pour l'analyse de la taxonomie bactérienne, un logiciel d'analyse du microbiome a été utilisé pour déterminer les propriétés des communautés. Des tracés PCoA utilisant des distances UniFrac non pondérées ont été utilisés pour analyser la ségrégation entre le microbiote fécal (FM) WT(FM)→GF et Nod1^{-/-}FM→GF dans les souris axénique (GF) en utilisant l'analyse des similitudes de groupe statistique. La diversité alpha, calculée comme l'indice de Channon, a été analysée en utilisant le test de U-Mann-Whitney. Les valeurs de P <.05 ont été considérées comme statistiquement significative. Pour les analyses *in vivo* et *in vitro*, les données ont été analysées à l'aide de Prism 8.0 (Logiciel GraphPad, San Diego, Californie). Pour les données normalement distribuées, les différences entre les groupes ont été évaluées par ANOVA avec test post hoc de Bonferroni pour les comparaisons multiples. Pour la comparaison de deux groupes, un test t de Student bilatéral a été utilisé. L'étude de la résistance des voies respiratoires a été réalisée par un test d'analyse de variance double. Les données ne répondant pas à une distribution normale ont été comparées à l'aide du test post hoc de Kruskal-Wallis H avec une correction de Dunn pour les comparaisons multiples. Pour les expériences cellulaires *in vitro*, ces dernières ont été réalisées en 3 ou 4 réplicats et l'expérience a été répétée 2 à 3 fois. Pour les expériences *in vivo*, le nombre de souris par groupe est indiqué dans les légendes des figures. Les valeurs de P <.05 ont été considérées être statistiquement significatives.

Résultats

NOD1 sensing of house dust mite–derived microbiota promotes allergic experimental asthma

Saliha Ait Yahia, PhD,^{a*} Camille Audouset, MD,^{a*} Daniel Alvarez-Simon, PhD,^{a*} Han Vorng, BS^{c,a}, Dieudonné Togbe, PhD,^b Philippe Marquillies, BSc,^a Myriam Delacre, BSc,^a Stephanie Rose, BS^{c,b}, H el ene Bouscayrol, MD,^b Aline Rifflet, PhD,^{c,d,e} Val erie Quesniaux, PhD,^b Ivo Gomperts Boneca, PhD,^{c,d,e} Mathias Chamaillard, PhD,^a and Anne Tsicopoulos, MD^a

*These authors equally contributed to the work.

^athe University of Lille, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019–Unité Mixte de Recherche (UMR) 9017–Centre d’Infection et d’Immunité de Lille,

^bthe Laboratory of Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS—Universitaire of Orléans, France;

^cInstitut Pasteur, Unité Biologie et Génétique de la Paroi Bactérienne;

^dthe CNRS, UMR 2001;

^ethe Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Equipe Avenir, Paris

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021 Aug;148(2):394-406. doi: 10.1016/j.jaci.2020.12.649

La détection par le récepteur NOD1 du microbiote provenant des acariens exacerbe l'asthme allergique expérimental

La voie de signalisation de NOD1 aggrave l'asthme allergique induit aux acariens via la protéine Ripk2

L'impact, *in vivo*, de la voie de signalisation Nod1 a été évaluée dans un modèle d'asthme induit aux acariens par l'instillation intra nasale de 5IR (équivalent à 15 mg de protéine/mL) (Fig 18, A) à des souris C57BL6/J déficientes ou non pour le gène de Nod1 (317).

Les souris sauvages sensibilisées et provoquées par les extraits d'acariens présentaient toutes les caractéristiques de l'inflammation allergique asthmatique des voies respiratoires.

Ces paramètres comprenaient une augmentation :

- du nombre de cellules totales, du nombre d'éosinophiles, de neutrophiles et de macrophages dans le lavage broncho-alvéolaire (Fig 18, B),
- des IgE totales et les anticorps IgG1 spécifiques dirigés contre les acariens (Fig 18, C)
- du niveau d'expression des cytokines pulmonaires TH2/TH17 et de certaines chimiokines pro-TH2 (Fig 18, D; voir Fig E1).

L'ensemble des paramètres cardinaux asthmatiques étaient fortement diminués chez les souris Nod1^{-/-}, à l'exception de la réponse humorale et du taux de cytokines de type TH17 (Figs 18, B-D, et E1, A).

Les coupes histologiques de poumons de souris ayant reçu des extraits d'acariens révélaient une accumulation de mucus dans les voies respiratoires, coloré par l'acide périodique de Schiff, et de l'infiltration cellulaire inflammatoire, mis en évidence par l'hématoxyline et l'éosine chez les souris sauvages. Ces deux caractéristiques étaient réduites chez les souris déficientes en Nod1 (Figs 18, E et E1, B, respectivement).

Sur le plan fonctionnel respiratoire, l'augmentation de la résistance des voies aériennes, en réponse à une provocation à la métacholine, était totalement inhibée chez les souris Nod1^{-/-} stimulées exposées aux acariens comparativement aux souris sauvages ayant reçu le même traitement (Fig 18, F).

De façon similaire, le déficit en Nod2 était associé à une diminution du recrutement cellulaire inflammatoire dans le lavage broncho-alvéolaire après une provocation par les extraits d'acariens (Fig 18, G). La réponse humorale n'était pas modifiée (Fig 18, H). En revanche, contrairement aux souris Nod1^{-/-}, aucune diminution significative du niveau de cytokines et des chimiokines pulmonaires TH2 ou pro-TH2 n'était mise en évidence, à l'exception des chimiokines CCL2 et de la chimiokine dérivée des kératinocytes (KC) (Figs 18, I et E1, C).

Après une exposition aux acariens, l'hyper-réactivité des voies aériennes des souris $Nod2^{-/-}$ n'était pas modifiée par rapport aux souris sauvages (Fig 18, J).

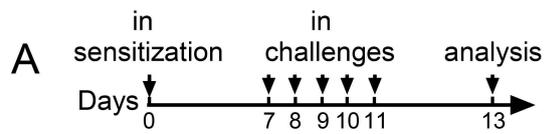
Comme nous l'avons spécifié précédemment (Figure 17), la transduction du signal Nod1 et Nod2 est effectuée via l'adaptateur d'aval Ripk2. Compte tenu de cette organisation, nous avons évalué l'inflammation allergique des voies aériennes chez les souris déficientes en Ripk2.

Miller et collègues (275) ont rapporté que l'inflammation allergique des voies aériennes induites par les acariens était réduite chez les souris $Ripk2^{-/-}$ dans un modèle équivalent à notre modèle à 5IR. Pour ces raisons, nous avons évalué les caractéristiques d'un modèle d'asthme allergique induit aux acariens à 1IR (3 mg de protéine/mL) chez des souris $Ripk2^{-/-}$. Chez les animaux déficients pour Ripk2, une inhibition totale du recrutement cellulaire inflammatoire dans le LBA, en particulier des éosinophiles, était observée (Fig 19, A) sans modification significative de la réponse humorale (Fig 19, B). Une diminution du niveau de cytokines et des chimiokines de type TH2 (Fig 19, C), de la production de mucus (Fig 19, D) et des résistances des voies aériennes était également mise en évidence chez les souris $Ripk2^{-/-}$ comparativement aux souris sauvages dans notre modèle (Fig 19, E).

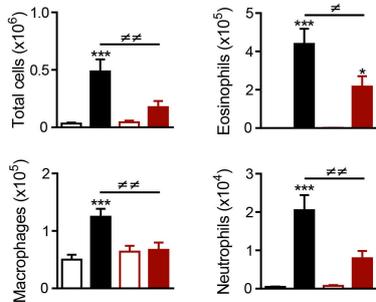
Contrairement aux résultats précédemment publiés par Miller et son équipe (275), nous n'avons pas mis en évidence de modification de la réponse humorale chez les souris $Ripk2^{-/-}$.

Cependant, ce travail est le premier à évaluer l'impact fonctionnel d'une perte de Ripk2 dans la réponse allergique asthmatique en démontrant qu'une déficience en Ripk2 ou en Nod1 était associée à une inhibition de l'hyper-réactivité des voies aériennes dans un modèle d'asthme allergique aux acariens. Cette caractéristique n'était pas retrouvée chez les souris $Nod2$ déficientes.

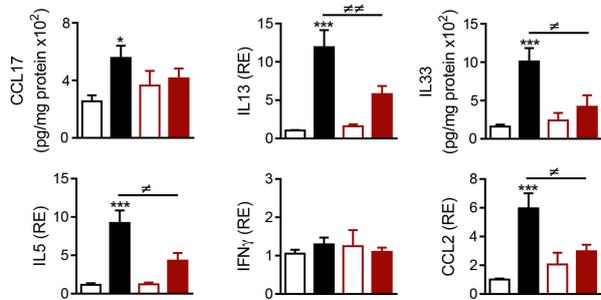
L'ensemble de ces résultats révèle que la voie de signalisation Nod1, mais pas Nod2, est impliqué dans la sévérité de l'inflammation allergique asthmatique induite par les acariens de façon dépendante de l'activation de la protéine Ripk2.



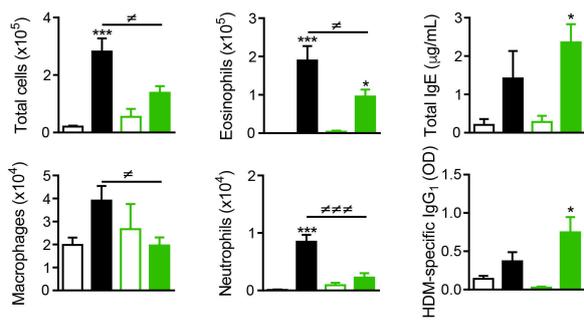
B WT PBS
 WT HDM
Nod1^{-/-} PBS
Nod1^{-/-} HDM



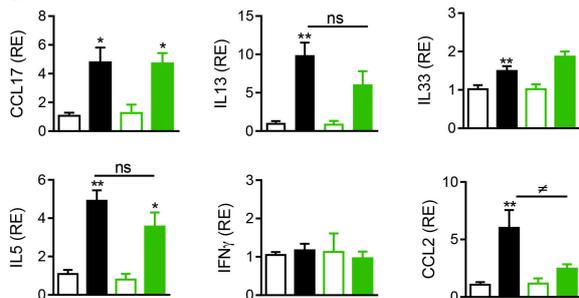
D



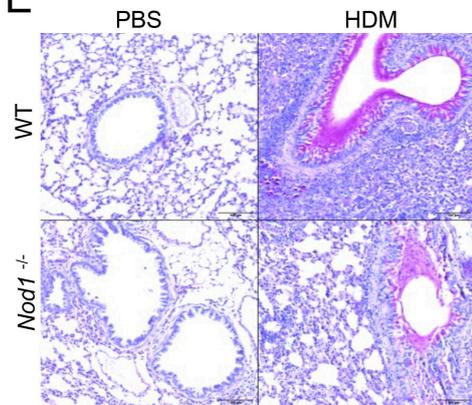
G WT PBS
 WT HDM
Nod2^{-/-} PBS
Nod2^{-/-} HDM



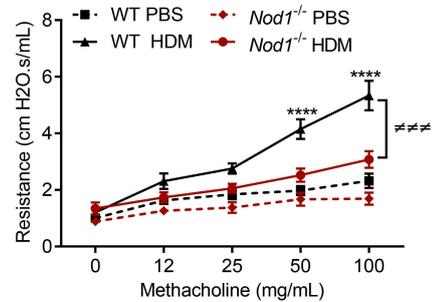
I



E



F



J

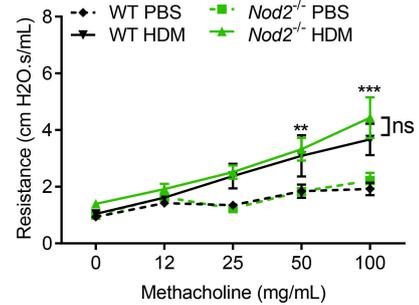


Figure 18 : La signalisation par Nod1 aggrave la réponse allergique des voies respiratoires induite par les acariens

(A) Protocole d'asthme expérimental induit aux acariens

(B) Numération cellulaire dans le LBA chez les souris sauvages et Nod1^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

(C) Evaluation en ELISA de la réponse humorale Th2 chez les souris sauvages et Nod1^{-/-} provoquées par PBS ou des acariens

(D) Expression relative (RE) des protéines et de l'ARNm des cytokines et des chimiokines évaluée par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT et Nod1^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

(E) Microphotographies représentatives de sections pulmonaires colorées au PAS chez les souris WT et Nod1^{-/-}. Echelle: 100 µm

(F) Résistance des voies respiratoires des souris WT et Nod1^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

(G) Nombre de cellules du LBA chez les souris WT et Nod2^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

(H) Evaluation de la réponse humorale Th2 chez les souris WT et Nod2^{-/-} provoquées par du PBS ou par des acariens par ELISA

(I) Expression relative (RE) de protéines et d'ARNm de cytokines et de chimiokines évaluée par ELISA et RT Q-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT et Nod2^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

(J) Résistance des voies respiratoires des souris WT et Nod2^{-/-} provoquées avec du PBS ou des acariens

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de n=12-22 animaux par groupe pour Nod1 et n=5-9 animaux par groupe pour les expériences Nod2.

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 versus PBS, p<0,05 ≠p<0,01, ANOVA unidirectionnelle pour tous sauf la résistance des voies aériennes : ANOVA bidirectionnelle. ns : non significatif, HDM pour House Dust Mite

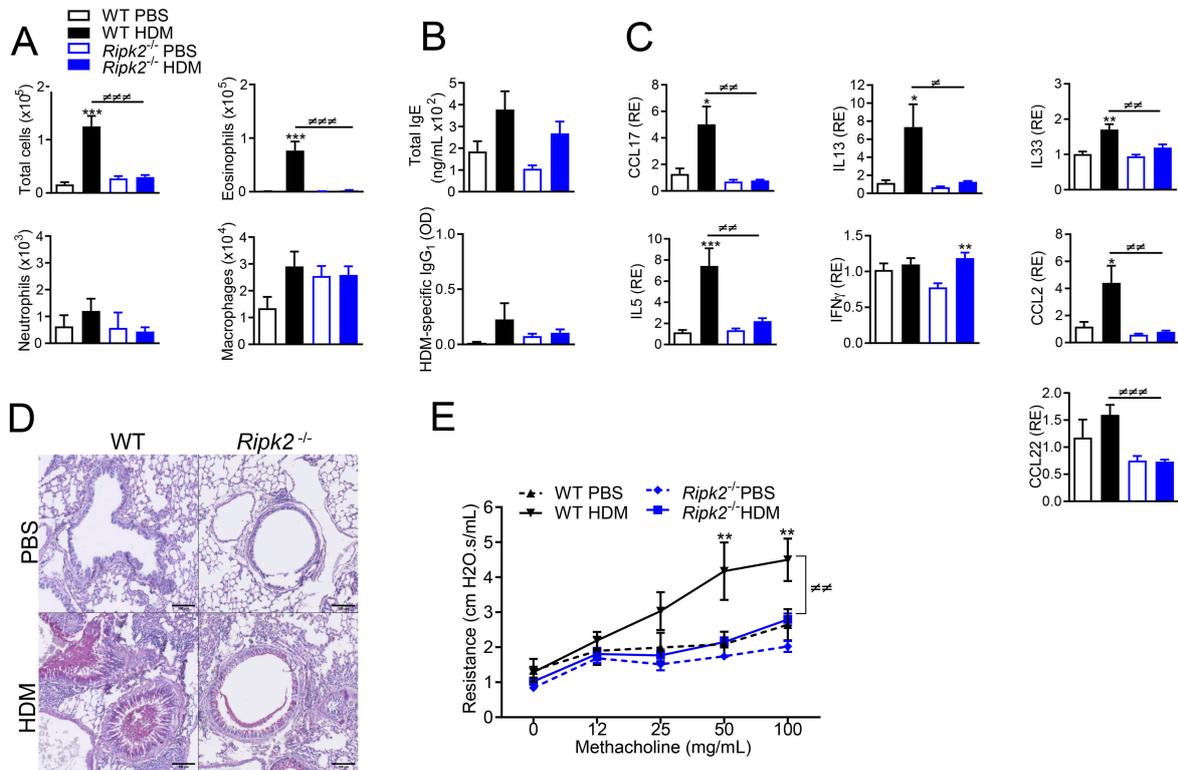


Figure 19 : La signalisation Nod1 exacerbe la réponse allergique des voies respiratoires induite par les acariens via Ripk2

(A) Numération cellulaire dans le LBA de souris sauvages et Ripk2^{-/-} provoquées par du PBS ou par une faible dose d'acarien

(B) Mesure par ELISA des IgE totales et des anticorps IgG1 spécifiques des acariens chez des souris WT et Ripk2^{-/-} provoquées par du PBS ou par une faible dose d'acariens

(C) Expression relative (RE) des protéines et de l'ARNm des cytokines et des chimiokines évaluée par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT et Ripk2^{-/-} provoquées par du PBS ou par une faible dose d'acariens

(D) Microphotographies représentatives de sections pulmonaires colorées au PAS chez les souris WT et Ripk2^{-/-}. Barre d'échelle : 100 μ m

(E) Résistances des voies respiratoires des souris WT et Ripk2^{-/-} provoquées par du PBS ou par une faible dose d'acariens

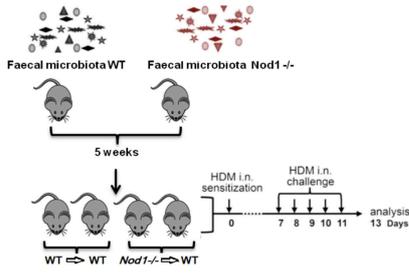
Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de n = 6-12 pour Ripk2. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 versus PBS, p<0,05, \neq p<0,01, p<0,001 ANOVA unidirectionnelle pour tous sauf résistance des voies aériennes : ANOVA bidirectionnelle.

La dysbiose du microbiote digestif causée par la déficience en Nod1 n'a pas d'impact sur la survenue d'un asthme allergique induit aux acariens

Les souris Nod1^{-/-} présentent une flore intestinale dysbiotique (297). Nous avons ensuite voulu évaluer si une telle dysbiose pouvait influencer l'induction d'un asthme allergique expérimental. La transplantation d'une préparation d'homogénats fécaux frais provenant de souris donneuses sauvage (WT) ou Nod1^{-/-} a été réalisée chez des souris receveuses axéniques témoins (appelés respectivement WT ou Nod1^{-/-} FM→GF). Cinq semaines après le transfert, les souris recolonisées ont été soumises à notre protocole d'induction d'asthme aux acariens (Fig 20, A). Les deux groupes de souris exposés aux acariens, ont présenté une augmentation similaire du recrutement de cellules inflammatoires dans le LBA (Fig 20, B), de la réponse humorale (Fig 20, C), de la réponse de type TH2 (Fig 20, D) et de la résistance des voies respiratoires par rapport aux groupes PBS (Fig 20, E). Une évaluation du microbiote bactérien intestinal des souris recolonisées a été réalisée en collectant les fèces à la fin des expériences et en les analysant par profilage phylogénétique de l'ARNr 16S.

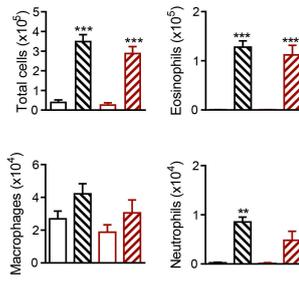
Les graphiques d'analyse des coordonnées principales utilisant des distances métriques de fractions uniques non pondérées ont mis en évidence la ségrégation entre les souris initialement axéniques ($P < .001$, analyse des similitudes de groupe, analyse statistique) (Fig 20, F). La diversité alpha, calculée avec l'indice de Shannon, ont mis en évidence des différences significatives entre les groupes de souris ex-GF ($P < .01$, test Mann-Whitney U) (Fig 20, G). Une heatmap illustre les différences de composition de la flore digestive des deux groupes de souris et leurs similitudes avec la composition du microbiote contenue dans les fèces des souris donneuses (Fig 20, H). Aucune différence significative n'a été observée entre le microbiote des souris traitées par du PBS ou par les acariens quel que soit le génotype des souris donneuses. Au total, ces données confirmaient la présence d'une dysbiose digestive chez les souris déficiente pour Nod1. Néanmoins, cette modification de la composition du microbiote intestinal des souris Nod1^{-/-} n'étaient pas responsables de leur protection contre l'asthme induit aux acariens.

A

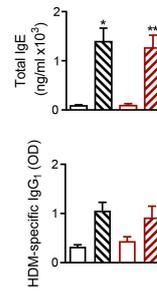


B

□ WT FM → GF PBS
 ▨ WT FM → GF HDM
 □ *Nod1*^{-/-} FM → GF PBS
 ▨ *Nod1*^{-/-} FM → GF HDM

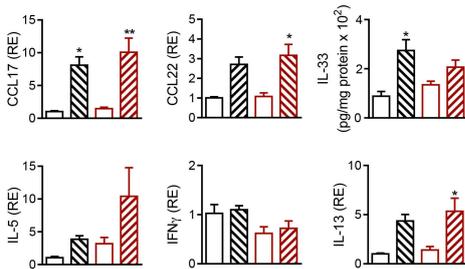


C



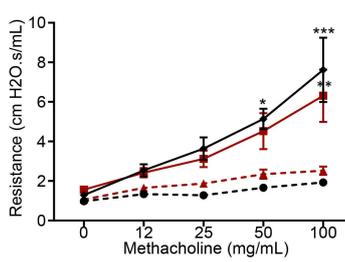
D

□ WT FM → GF PBS
 ▨ WT FM → GF HDM
 □ *Nod1*^{-/-} FM → GF PBS
 ▨ *Nod1*^{-/-} FM → GF HDM

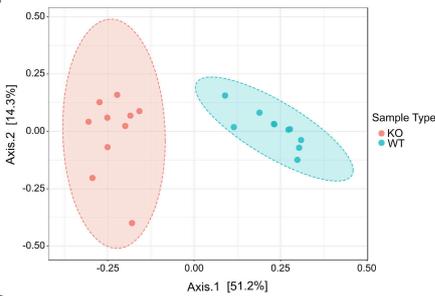


E

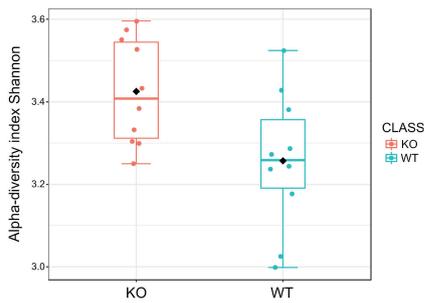
—■— *Nod1*^{-/-} FM → GF HDM —●— WT FM → GF HDM
 - - - ■ - - - *Nod1*^{-/-} FM → GF PBS - - - ● - - - WT FM → GF PBS



F



G



H

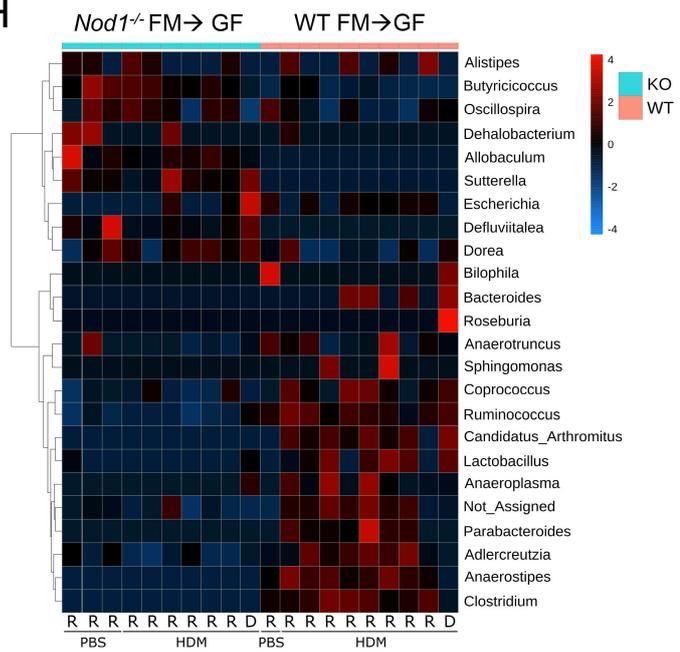


Figure 20. Le microbiote intestinal dysbiotique causé par une déficience en Nod1 n'a pas d'impact sur la réponse allergique des voies respiratoires induite par les acariens

(A) Protocole de transplantation fécale

(B) Numération cellulaire du LBA chez les souris sauvages et Nod1^{-/-} FM → GF provoquées avec du PBS ou des acariens

(C) Détection de la réponse humorale Th2 ELISA chez les souris WT et Nod1^{-/-} FM → GF provoquées avec du PBS ou des acariens

(D) Expression relative (RE) des protéines et de l'ARNm des cytokines et des chimiokines évaluée par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT et Nod1^{-/-} FM → GF provoquées avec du PBS ou des acariens

(E) Résistance des voies respiratoires des souris WT et Nod1^{-/-} FM → GF provoquées avec du PBS ou des acariens.

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de n = 4 à 7 animaux par groupe. Les données sont représentatives de 2 expériences indépendantes. *p<0,05 **p<0,01 versus PBS. ANOVA unidirectionnelle pour tous sauf la résistance des voies respiratoires : ANOVA bidirectionnelle

(F) Tracés je ne sais pas d'où tu sors cette traduction ?? PCoA utilisant les distances UniFrac non pondérées des matières fécales des souris WT FM GF (WT) et Nod1^{-/-} FM GF (KO). p≤0,001 entre les deux groupes, analyse ANOSIM

(G) Diversité alpha évaluée par l'indice de Shannon des matières fécales des souris WT FM →GF (WT) et Nod1^{-/-} FM →GF (KO). p≤0,01 entre les deux groupes, test de Mann Whitney

(H) Heatmap des genres les plus abondants dans les fèces provenant de récepteurs (R) de souris WT FM →GF (WT), Nod1^{-/-} FM →GF (KO) provoquées avec PBS ou d'acariens, et de donneurs initiaux (D)

Les muropeptides présents dans les acariens sont détectés par NOD1 dans les cellules épithéliales via RIPK2

La quantification de la diversité bactérienne présente dans les extraits d'acariens par le séquençage de l'ARNr 16S a révélé que 87,7% des lectures assemblées provenaient de bactérie gram négatif appartenant à la famille des *Bartonellaceae* (Fig 21, A). Pour identifier des fragments de PG spécifiques, des extraits d'acariens ont été analysés par spectrométrie de masse à travers une approche ciblée s'intéressant spécifiquement à des muropeptides bien caractérisés. Le tripeptide muramyl DAP et le MDP, reconnu respectivement par NOD1 et NOD2, ont été détectés. Leur présence a été confirmée par fragmentation (Fig 21, B et C). Ensuite, l'effet des acariens sur les récepteurs NOD1 et NOD2 a été évalué sur des cellules rénales embryonnaires humaines 293 (HEK293) transfectées avec un rapporteur de NF-κB-luciférase et exprimant hNOD1, mNod1 ou mNod2. Les résultats étaient normalisés à l'aide d'un vecteur de contrôle contenant le gène de la β-galactosidase pour évaluer l'efficacité de la transfection. Tous les contrôles positifs ont induit l'activation de NF-κB (Fig 21, D). Les extraits natifs d'acariens ont provoqué une augmentation dose-dépendante de l'activité luciférase médiée par l'activation de hNOD1 et de mNod1. L'activation médiée par NOD2 n'était retrouvée qu'avec la dose la plus élevée d'acariens de 4IR (c.-à-d. 60 mg de protéine/mL) (Fig 21, D). Puisque chez l'Homme, la première cellule rencontrée par l'allergène est la cellule épithéliale bronchique, nous avons stimulé les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B avec des extraits d'acariens. Ces cellules ont été amorcées avec de l'IFN-β (318) pour augmenter l'expression de base du récepteur NOD1. Le rôle de la voie de signalisation Nod1 a ensuite été évalué en quantifiant la production de cytokines

suite à une exposition aux acariens. La stimulation par les acariens déclenche une augmentation dose-dépendante de la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules BEAS-2B avec un effet débutant à 0,2IR (6 mg de protéine/ mL) et un réponse maximale à 4IR (120 mg de protéine/mL) (Fig E2, A). La stimulation des cellules BEAS-2B par les acariens a induit une nette augmentation de l'ARNm de NOD1 et de NOD2 (figure 21, E). L'amorçage par l'IFN- β augmente l'expression de NOD1/2 et augmente la production de cytokines induites par une stimulation par FK565 (Fig E2, B). Cependant, cette exposition n'induit aucune augmentation de la production de cytokine après une stimulation par les acariens (Fig E2, C). Comme suspecté, l'ajout d'un inhibiteur spécifique de RIPK2, appartenant aux 4-amino-quinoléines, a inhibé l'augmentation de la production d'IL-6 et d'IL-8 en réponse au contrôle positif FK565 spécifique de Nod1 (Fig 21, F), sans affecter la réponse au LPS (Fig E2, D). Une stimulation par les acariens induit une production plus élevée d'IL-6 et d'IL-8 (Fig 4, F) et l'ajout d'un antagoniste RIPK2 a un effet inhibiteur partiel (Fig 21, F) non cytotoxique (Fig E2, E). Les mêmes résultats ont été observés sur une lignée cellulaire épithéliale alvéolaire humaine A549 (Fig E2, F). Les rôles respectifs de NOD1 et NOD2 ont ensuite été évalués en transfectant des cellules BEAS-2B avec des siRNA spécifiques.

Par rapport aux siRNA témoins et siRNA NOD2, les siRNA NOD1 inhibent fortement la production d'IL-6 et d'IL-8 induite par FK565 et par les acariens (figures 21, G et E2, G). Une observation similaire a été mise en évidence sur l'expression de l'ARNm de l'IL-33 induite par les acariens (figure E2, H). Ces résultats ont été confirmés en utilisant des cellules bronchiques humaines (NHBE). La stimulation avec des acariens a provoqué une augmentation dose-dépendante de la production d'IL-8 ainsi que de l'expression de l'ARNm NOD1/2 dans les cellules épithéliales primaires (Fig 21, H). Le traitement avec l'antagoniste de RIPK2 a fortement inhibé la production d'IL-8 induite par les acariens (Fig 21, H). L'absence d'effet de NOD2 nous a conduit à évaluer l'expression de l'ARNm de PGLYRP2, une enzyme qui présente une activité amidase, connue pour dégrader certains muopeptides activateurs de NOD2. La stimulation par les acariens a induit l'expression de cette enzyme à la fois *in vitro* dans la lignée cellulaire BEAS-2B ainsi qu'*in vivo* dans les poumons de souris ayant reçu des acariens (Fig 21, I). En revanche, nous n'avons pas détecté de changement dans l'expression de PGLYRP1, un autre membre de la famille des protéines de reconnaissance des peptidoglycanes qui a été impliqué dans la réponse allergique des voies respiratoires induites par les acariens chez des souris BALB/c, plus susceptibles aux allergies (231,319,320) (Fig E2, JE). De plus, le transporteur de peptide (PEPT) 2, permettant le transport des ligands NOD1, était fortement exprimé dans les cellules BEAS-2B et dans les poumons des souris exposées aux acariens par rapport au transporteur PEPT1, spécialisé dans le transport du ligand NOD2 MDP (Fig 21, J). Ces données montrent

que les extraits d'acariens déclenche la production de cytokines par les cellules épithéliales via une voie de signalisation dépendante de NOD1 et impliquant RIPK2.

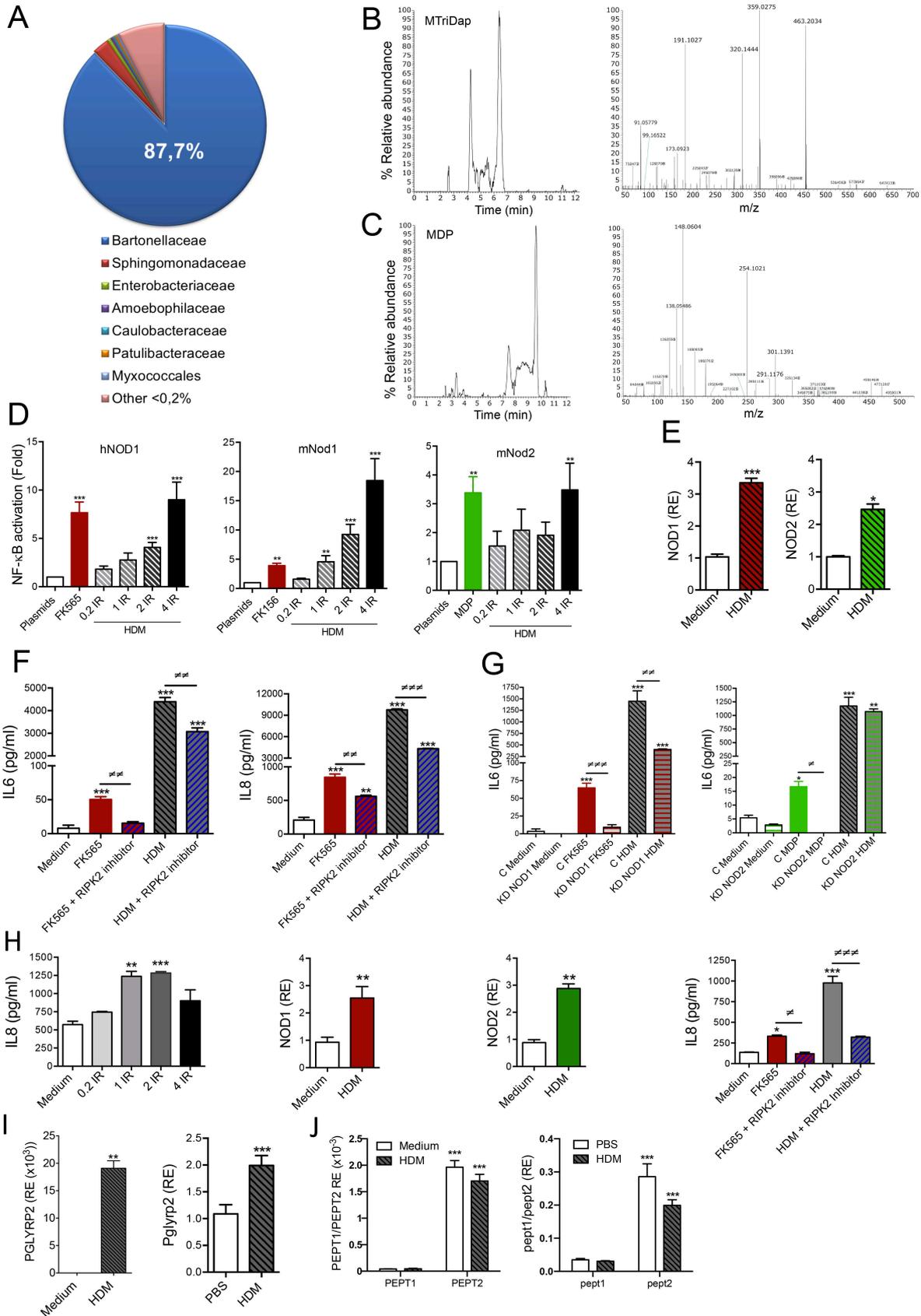


Figure 21 : Les muropéptides associés aux acariens sont détectés par NOD1 dans les cellules épithéliales via RIPK2.

(A) Analyse de séquençage à haut débit des extraits d'acariens

(B) Extrait des chromatogrammes ioniques (XIC) de l'acarien correspondant au MTriDap protoné (m/z 666.2843) et sa fragmentation MS/MS avec une énergie de collision normalisée (NCE) égale à 25 % dans la cellule de dissociation de collision à haute énergie (HCD) de QExactive Focus. Les fragments spécifiques sont précisés dans le tableau E3

(C) XICs d'acariens correspondant au MDP protoné (m/z 494.1990) et sa fragmentation MS/MS comme décrit ci-dessus. Les fragments spécifiques sont précisés dans le tableau E3

(D) Effet dépendant de la dose d'acariens sur l'activité du rapporteur de hNOD1, mNod1 et mNod2 transfectés dans les cellules HEK-293 après normalisation par la β -galactosidase. Contrôles positifs : FK565 pour hNOD1, FK156 pour mNod1, MDP pour mNod2. IR : indice de réactivité

(E) Expression relative (RE) de l'ARNm de hNOD1 et hNOD2 dans les cellules BEAS-2B stimulées par les acariens

(F) Effet inhibiteur de l'antagoniste de RIPK2 sur la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules BEAS-2B stimulées par les extraits d'acariens et le FK565

(G) Effet du contrôle (C) hNOD1 et hNOD2 siRNA (KD) sur la production d'IL-6 induite par les acariens, le FK565 et le MDP dans les cellules BEAS-2B

(H) Les cellules NHBE stimulées par les acariens ont été évalués par leurs réponses cytokiniques dose-dépendantes, l'expression relative de NOD1 et NOD2 (RE) et leur production d'IL-8 en présence d'inhibiteur de RIPK2.

(I) Expression relative (RE) de l'ARNm de PGLYRP2 dans les cellules BEAS-2B stimulées par les acariens et dans les poumons de souris WT exposées aux acariens

(J) Expression relative (RE) de l'ARNm PEPT1 et PEPT2 dans les cellules BEAS-2B stimulées par les acariens et dans les poumons de souris sauvages provoquées par les acariens

Les données sont présentées en moyenne \pm SEM et sont représentatives de 2 à 3 expériences *in vitro* indépendantes et de 10 à 12 souris par groupe. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ versus plasmides ou milieu, $p < 0,05$ $\neq p < 0,01$ $p < 0,001$, ANOVA unidirectionnelle sauf pour la figure 4D : Kruskal-Wallis, et Tests t pour les figures 4E, 4H (NOD1/NOD2) 4I et 4J.

L'expression de Nod1 dans les cellules radio-résistantes régule l'inflammation allergique des voies respiratoires induite par les acariens.

Afin d'évaluer la contribution spécifique des cellules non-hématopoïétiques de structure (dont les cellules épithéliales), par rapport aux cellules hématopoïétiques sur l'inflammation des voies respiratoires induite par des acariens dépendante de Nod1, des souris chimériques ont été générées. Ces dernières exprimaient soit des cellules hématopoïétiques Nod1^{-/-} et des cellules structurales natives (Nod1^{-/-}→WT) ou cellules structurales Nod1^{-/-} avec cellules hématopoïétiques sauvages (WT→Nod1^{-/-}). Les groupes WT→WT et Nod1^{-/-}→Nod1^{-/-} ont servi de témoins. L'analyse du lavage broncho-alvéolaire a mis en évidence que le nombre total de cellules, le nombre d'éosinophiles et de neutrophiles, étaient augmentés après provocation par les acariens chez les souris Nod1^{-/-}→WT et WT→WT. Ces paramètres étaient diminués chez les souris WT→Nod1^{-/-} et les souris Nod1^{-/-}→Nod1^{-/-} (Fig 22, A). La réponse humorale n'était pas significativement modifiée après une exposition aux acariens quel que soit le groupe (Fig 22, B). La plupart des cytokines testées étaient augmentées après une provocation par les acariens chez les souris WT→WT et Nod1^{-/-}→WT. De façon intéressante elles étaient soit diminuées soit abolies chez les souris WT→Nod1^{-/-} et Nod1^{-/-}→Nod1^{-/-} (Fig 22, C). En accord avec nos données *in vitro*, les expériences de chimères ont

démonstré que l'expression de Nod1 par les cellules structurales régule l'inflammation des voies respiratoires induite par les acariens. Cependant, CCL2, IL-13 et IL-33 étaient significativement diminués après une provocation par les acariens dans le groupe $Nod1^{-/-}$ → WT par rapport aux souris WT → WT (Fig 22, C). Cela suggère que l'induction de CCL2, d'IL-13 et d'IL-33 par les acariens chez des souris WT reconstituées avec des cellules hématopoïétiques exprimant Nod1 n'est pas suffisante pour exacerber l'inflammation des voies respiratoires induite par les acariens.

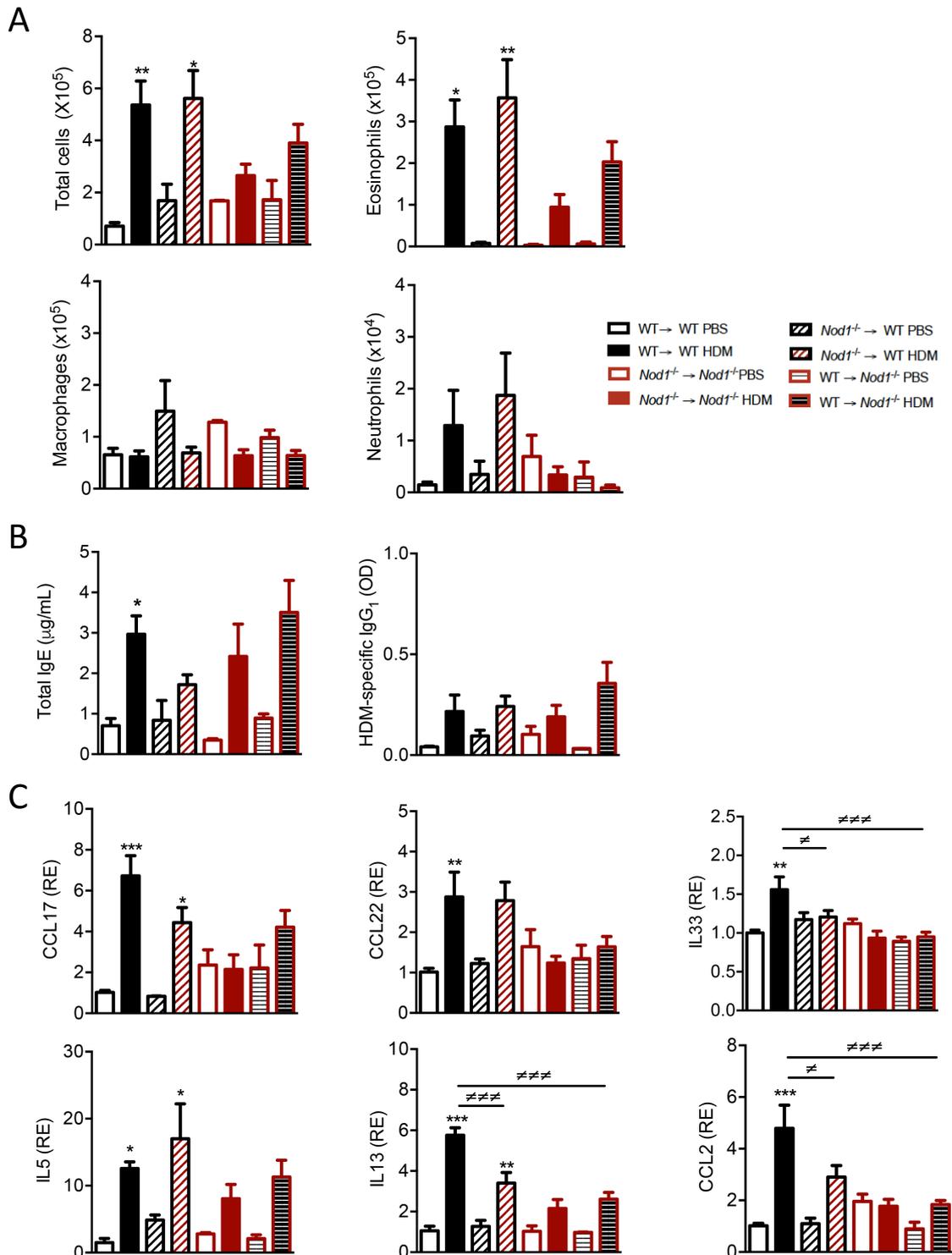


Figure 22 : Nod1 exprimé par les cellules de structure régule l'inflammation allergique des voies respiratoires induite par les acariens chez des souris chimériques générées par transplantation de moelle osseuse

(A) Nombre de cellules dans le LBA chez les souris WT→WT, Nod1^{-/-}→WT (cellules hématopoïétiques déficientes en Nod1), Nod1^{-/-}→Nod1^{-/-}, et WT→Nod1^{-/-} (cellules de structure déficientes en Nod1) après une exposition à du PBS ou une dose élevée d'acariens

(B) Détection par ELISA de la réponse humorale Th2 chez des souris chimériques provoquées avec du PBS ou une dose élevée d'acariens

(C) Expression relative de l'ARNm (RE) des cytokines et des chimiokines évaluée par Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris chimériques provoquées par du PBS ou une dose élevée d'acariens. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de n = 3 à 6 animaux par groupe. *p<0,05 **p<0,01 versus PBS, p<0,01. ANOVA unidirectionnelle.

L'intensité de la réponse allergique des voies respiratoires est diminuée suite à une exposition à des extraits d'acariens appauvris en PG mais pas en LPS.

Parmi les fragments dérivant des bactéries, le LPS ont été décrits comme favorisant ou inhibant l'asthme expérimental induit par l'ovalbumine en fonction de leur abondance (321).

Pour évaluer si le LPS présent dans les extraits d'acariens jouait un rôle dans les résultats observés dans notre modèle d'asthme, nous avons appauvri ces derniers en LPS par purification sur colonne de résine. *In vitro*, dans notre modèle cellulaire rapporteur de l'activation NF-κB-luciférase, les extraits d'acariens à faible teneur en LPS était toujours capable d'activer le récepteur Nod1 de manière dose-dépendante (Fig E3, A). Comme la concentration de LPS contenue dans 1IR (2 ng/IR) n'était pas biologiquement pertinente pour exacerber les paramètres allergiques asthmatiques, nous n'avons utilisé que le protocole avec une dose de 5IR d'extraits d'acariens. *In vivo*, les provocations avec des extraits d'acariens pauvres en LPS ont conduit à une augmentation de la plupart des paramètres de l'asthme expérimental, y compris le recrutement cellulaire total dans le LBA, l'expression des cytokines de type TH2 et l'hyperréactivité des voies respiratoires (Fig. E3, B, D et E). Ces résultats étaient similaires à ceux observés avec une exposition aux acariens natifs. Le seul paramètre qui n'a pas été induit par les acariens appauvris en LPS était la réponse humorale, qui est restée à un niveau basal (Fig E3, C).

Pour évaluer le rôle des peptidoglycanes (PG) dans l'effet dépendant de NOD1, des extraits d'acariens ont été digérés avec de la mutanolysine et les protéines précipitées par des solvants organiques. Les culots protéiques et les surnageants correspondants ont été évalués sur leur capacité à activer le récepteur mNod1. La présence ou l'absence de PG a été confirmée par MS dans les surnageants et les culots, respectivement (Fig 23, A).

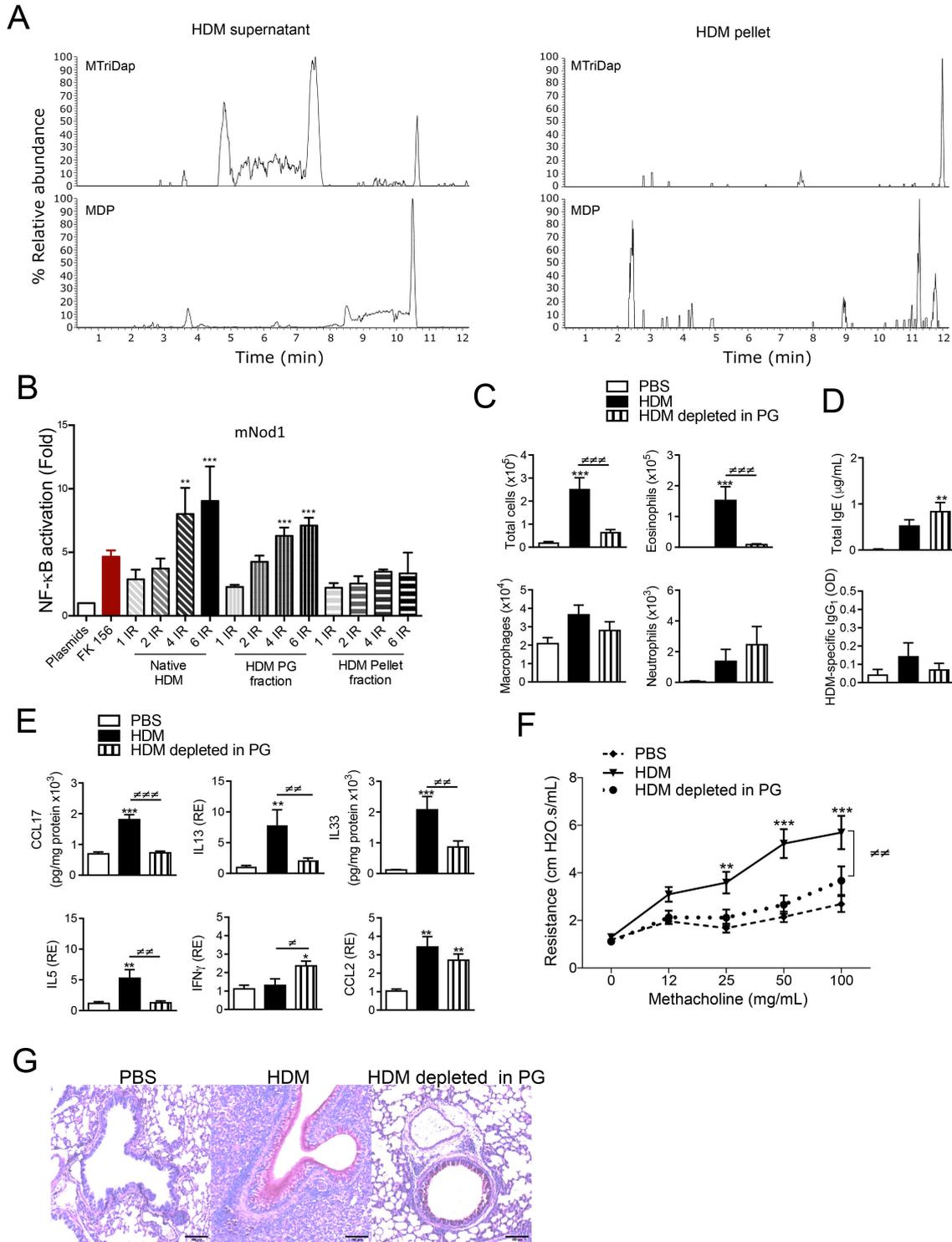


Figure 23 : L'intensité de la réponse allergique des voies respiratoires est diminuée suite à une exposition à des acariens appauvris en PG

(A) Extraits des chromatogrammes ioniques (XIC) des surnageants contenant du peptidoglycane (PG) et des culots sans PG des extraits de HDM après digestion avec la mutanolysine et précipitation des protéines par des solvants organiques, correspondant au MTriDap protoné (m/z 666.2843) et au MDP protoné (m/z 494,1990)

(B) Des extraits d'acariens ont été digérés avec de la mutanolysine puis les protéines précipitées par des solvants organiques. La capacité des culots protéiques dépourvus de peptidoglycane (PG) et des surnageants contenant du PG à activer le récepteur Nod1 a été évaluée sur le modèle cellulaire rapporteur de l'activation de mNod1. Contrôle positif : FK156. IR : indice de réactivité

(C) Cellularité du LBA chez les souris WT provoquées avec du PBS ou une dose élevée d'acariens appauvri ou non en peptidoglycane (PG)

(D) Détection par ELISA de la réponse humorale Th2 chez les souris sauvages provoquées avec du PBS ou une dose élevée d'acariens appauvris ou non en peptidoglycane (PG)

(E) Expression de protéines et des ARNm de cytokines et de chimiokines évaluée par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris sauvages provoquées avec du PBS ou une dose élevée de HDM appauvrie ou non en peptidoglycane (PG)

(F) Résistance des voies respiratoires des souris WT provoquées avec du PBS ou une dose élevée de d'acariens appauvris ou non en peptidoglycane (PG)

(G) Microphotographies représentatives de sections pulmonaires colorées au PAS chez des souris sauvages provoquées par du PBS ou une dose élevée d'acariens appauvris ou non en peptidoglycane (PG). Barre d'échelle : 100 μ m

Les données sont présentées en moyenne \pm SEM d'au moins 2 expériences in vitro indépendantes, **p<0,01 ***p<0,001 par rapport aux plasmides, et en moyenne \pm SEM de n=5-10 animaux par groupe *p<0,05** p<0,01 ***p<0,001 versus PBS, p<0,05 p<0,01, p<0,001. ANOVA unidirectionnelle pour tous sauf pour la résistance des voies aériennes : ANOVA bidirectionnelle

Les culots protéiques sans PG n'ont pas déclenché une activation dose dépendante du reporteur d'activation de mNOD1 alors que les surnageants, contenant les PG, ont induit une activité luciférase traduisant une activation du mNod1. Une activation significative pour les doses de 4 à 6 IR (c'est-à-dire 60 μ g à 90 g de protéine/mL) d'extraits d'acariens natifs initiaux a été visualisée (Fig. 23B).

Ensuite, l'effet de la déplétion des acariens en peptidoglycane, après normalisation sur la quantité finale d'allergène récupérée, a été évalué dans nos deux modèles d'asthme allergique induit aux acariens.

Dans le modèle avec administration de 5IR d'acariens, l'exposition aux acariens appauvris en PG a conduit à (comparativement à une exposition à des extraits d'acariens natifs):

- une réduction du recrutement total des cellules dans le LBA dont principalement les éosinophiles (Fig. 23C)
- aucune modification de la réponse humorale (Fig. 23D)
- une diminution forte du niveau de cytokines de type Th2 et une augmentation de l'IFN- γ (Fig. 6E)
- une baisse des résistances des voies aériennes (Fig. 23F)
- un amoindrissement de la production de mucus (Fig. 23G).

Dans un modèle à 1IR, les acariens appauvris en PG ont conduit à une diminution du recrutement du nombre de cellules totales dans le LBA sans atteindre une significativité statistique (Fig. E3F). En revanche, la réponse humorale IgE médiée était toujours induite (Fig. E3G). Les cytokines de type Th2 étaient réduites (Fig. E3H), tout comme la production de mucus (Fig. E3I). Dans ce modèle, l'exposition aux extraits d'acariens appauvris en PG n'augmentait pas de façon significative les résistances des voies aériennes par rapport aux acariens natifs (Fig. E3J).

Collectivement, ces données démontrent que la réponse allergique des voies aériennes induite par les acariens dépend en grande partie de la détection par Nod1 de mucopeptides dérivés du microbiote endogène de l'allergène.

Figures supplémentaires

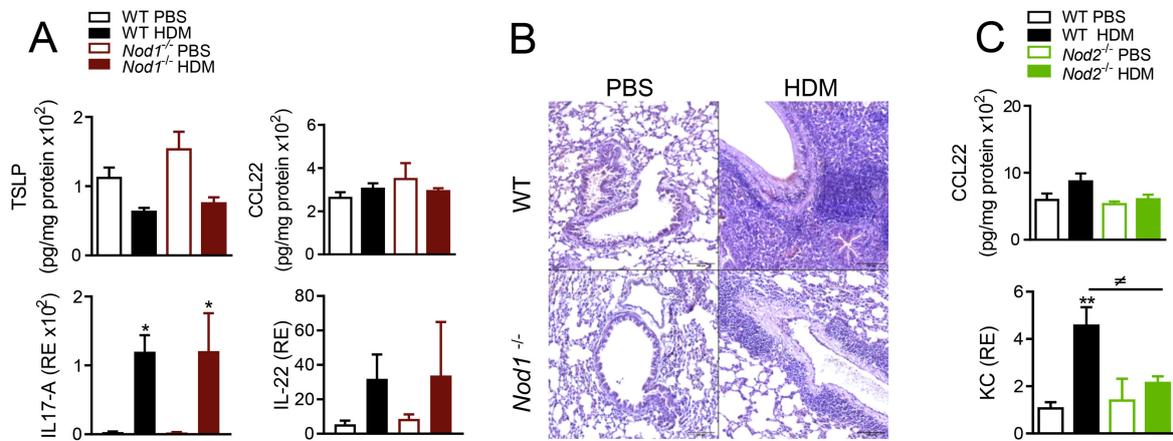


Figure E1 ; La voie de signalisation de Nod1 aggrave la réponse allergique des voies respiratoires induite par HDM

(A) Expression relative (RE) des protéines et de l'ARNm des cytokines et des chimiokines évaluées par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT et Nod1^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

(B) Microphotographies représentatives de sections pulmonaires colorées à l'hématoxyline et à l'éosine chez les souris WT et Nod1^{-/-}. Barre d'échelle : 100 µm

(C) Expression relative (RE) des protéines et de l'ARNm des cytokines et des chimiokines évaluée par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT et Nod2^{-/-} provoquées par du PBS ou des acariens

Les données sont présentées sous forme de SEM moyen de n=12-22 animaux par groupe pour Nod1, n=5-9 pour Nod2 **p<0,01 versus PBS, #p<0,05 ANOVA unidirectionnelle pour tous.

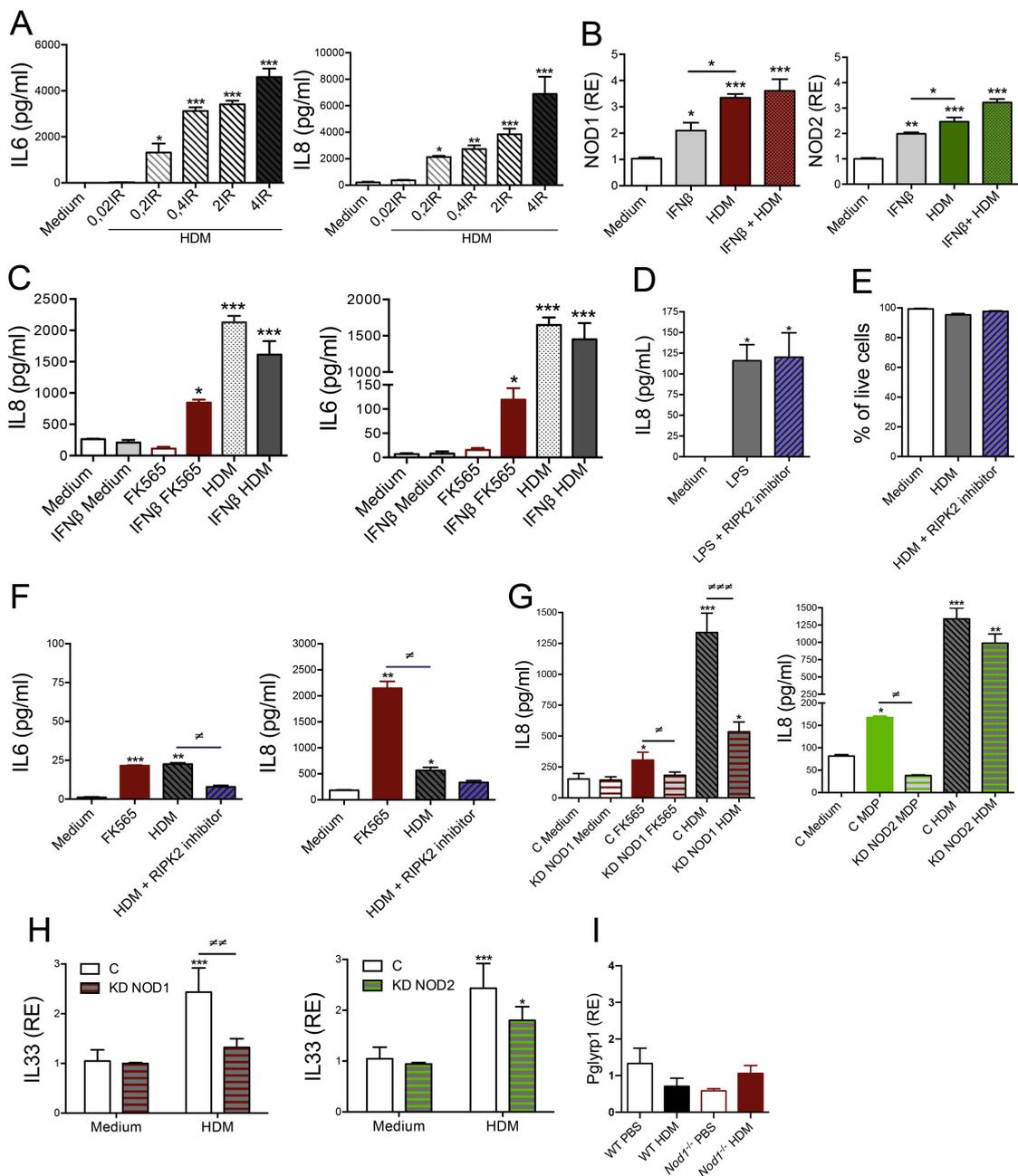


Figure E2 : Les muropéptides associés aux acariens sont détectés par NOD1 dans les cellules épithéliales via RIPK2

(A) Effet dose-dépendant des acariens sur la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules BEAS-2B. (IR : indice de réactivité)

(B) Effet de la pré-stimulation de l'IFN-β on sur l'expression relative (RE) de l'ARNm hNOD1 et hNOD2 par les cellules BEAS-2B

(C) Effet de la pré-stimulation IFN-β sur la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules BEAS-2B. Contrôle positif : FK565 pour hNOD1

(D) L'induction de l'IL-6 par le LPS dans les cellules BEAS-2B n'est pas réduite par l'inhibiteur RIPK2

(E) L'inhibiteur de RIPK2 n'affecte pas la viabilité cellulaire

(G) Effets des siRNA (KD) contrôle (C), hNOD1 et hNOD2 sur la production d'IL-8 induite par les acariens par les cellules BEAS-2B. Contrôles positifs : FK565 pour hNOD1, MDP pour hNOD2.

(H) Effets des siRNA (KD) contrôle (C), hNOD1 et hNOD2 sur l'expression relative de l'ARNm de l'IL-33 induite par HDM (RE).

(I) Expression relative (RE) de l'ARNm de Pglyrp1 dans les poumons de souris déficientes en Nod1 ou sauvages après provocation par du PBS ou des acariens

Pour les expériences in vitro, les données sont présentées sous forme d'écart type SEM à la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, versus milieu, p<0,05 p<0,01, p<0,001, ANOVA unidirectionnelle. Pour les expériences in vivo, n = 5 souris par groupe.

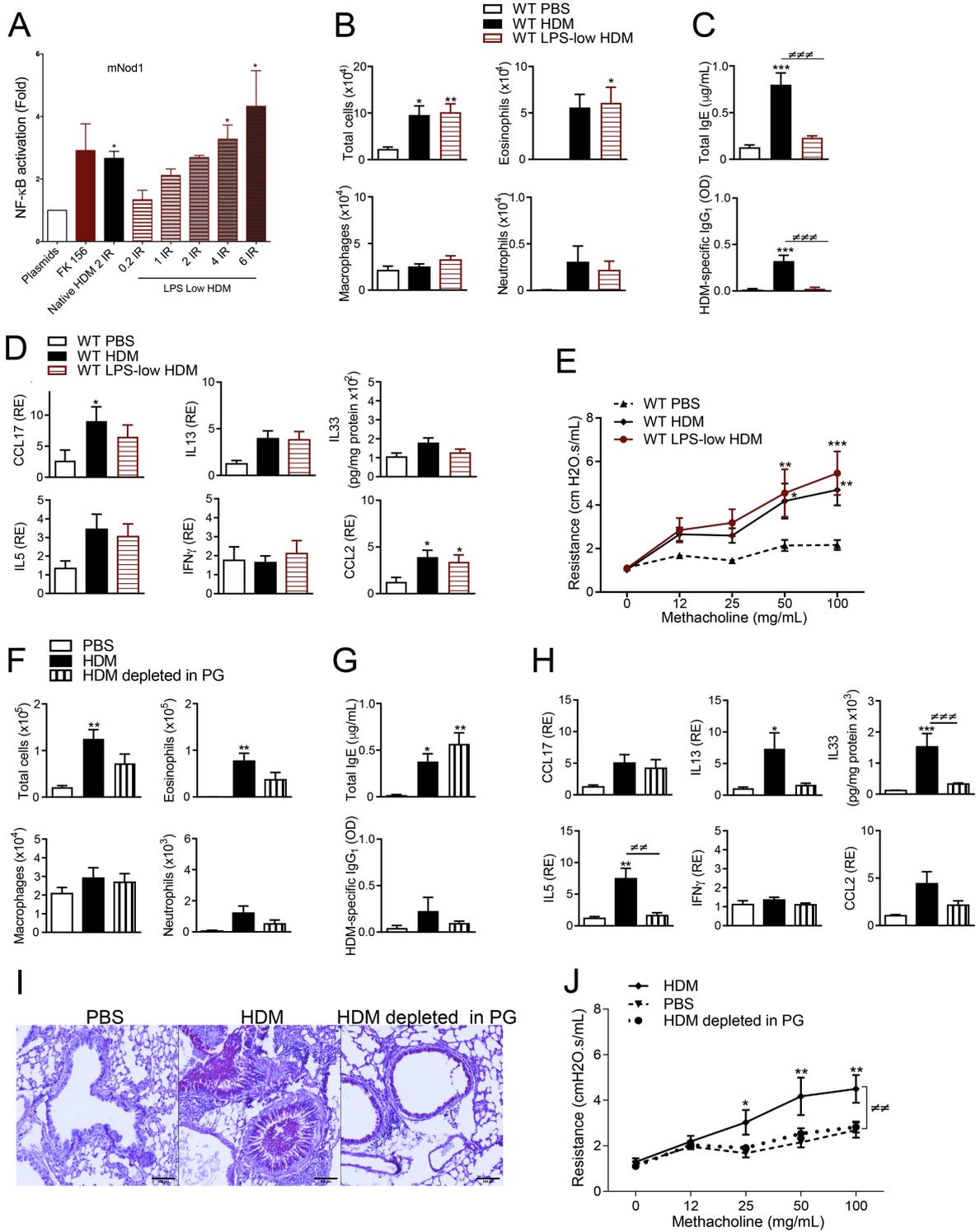


Figure E3 : L'intensité de l'inflammation allergique asthmatique des voies respiratoires est diminuée après provocation avec des acariens appauvris en PG dans le protocole sous-optimal mais pas à avec des acariens pauvres en LPS dans le protocole optimal

A) Effet dépendant de la dose d'acariens appauvris en LPS sur l'activité de rapporteur mNod1 des cellules HEK-293 normalisées avec la β -galactosidase. Contrôle positif : FK156

(B) Cellularité du LBA chez les souris sauvages provoquées par du PBS, des acariens ou des acariens appauvris en LPS

(C) Détection par ELISA de la réponse humorale Th2 chez les souris sauvages provoquées par PBS, des acariens ou des acariens appauvris en LPS

(D) Expression relative (RE) des protéines et de l'ARNm des cytokines et des chimiokines évaluée par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT provoquées par du PBS, des acariens ou des acariens appauvris en LPS

(E) Résistance des voies respiratoires des souris sauvages provoquées par du PBS, des acariens ou des acariens appauvri en LPS

(F) Nombre de cellules du LBA chez les souris WT provoquées avec du PBS ou des acariens appauvris ou non en peptidoglycane (PG) dans le protocole sous-optimal

(G) Détection ELISA des IgE totales et des anticorps IgG1 spécifiques des acariens chez des souris sauvages provoquées par du PBS ou des acariens appauvris ou non en peptidoglycane (PG) dans le protocole sous-optimal

(H) Expression relative (RE) des protéines et des ARNm des cytokines et des chimiokines évaluées par ELISA et Q-RT-PCR dans des extraits pulmonaires de souris WT provoquées avec du PBS ou du HDM appauvri ou non en peptidoglycane (PG) dans le protocole sous-optimal

(I) Microphotographies représentatives de sections pulmonaires colorées au PAS chez des souris WT provoquées avec du PBS, ou du HDM appauvri ou non en peptidoglycane (PG) dans le protocole sous-optimal. Barre d'échelle : 100 μ m

(J) Résistance des voies respiratoires des souris WT provoquées avec du PBS ou du HDM appauvri ou non en peptidoglycane (PG) dans le protocole sous-optimal en réponse au test de provocation à la méthacholine

Les données sont présentées sous forme de SEM moyen de n=7-10 animaux par groupe *p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001 versus PBS, p<0,05 p<0,01, p<0,001 ANOVA unidirectionnelle pour tous sauf pour la figure E3A et CCL17 RE : Kruskal-Wallis et résistance des voies aériennes : ANOVA bidirectionnelle

Partie 2 : Impact fonctionnel des bouchons de mucus dans les voies aériennes chez patients asthmatique en fonction de leur statut tabagique

Hypothèses de travail

L'asthme est une pathologie inflammatoire chronique des voies aériennes conductrices résultant de nombreux processus biologiques. L'ensemble de ces mécanismes aboutit à un phénotype clinique. L'un des paramètres cardinaux de l'asthme est l'augmentation de la production de mucus au niveau des voies aériennes. Cette hyper-production de mucus est multifactorielle. Elle est secondaire à une métaplasie de l'épithélium des voies respiratoires, à une augmentation de la production de mucines et à une modification des propriétés qualitatives du mucus. De plus, des modifications post-traductionnelles sont aussi impliquées dans les changements des propriétés physico-chimiques du mucus.

L'évaluation spécifique de l'impact de cette production accrue de mucus dans la physiopathologie de l'asthme est difficile à apprécier. L'une des conséquences de cette hyperproduction de mucus est la formation et la persistance d'occlusion des voies aériennes par une accumulation endoluminale de mucus. Pour permettre l'évaluation de ces bouchons, un score semi-quantitatif a été développé (99). Cette approche a permis de mettre en évidence que le nombre de segments pulmonaires avec au moins un bouchon de mucus était associé à une altération plus marquée de l'obstruction bronchique en spirométrie et à une inflammation de type T2. Ces corrélations ont été confirmées par plusieurs études (99,122).

Ces travaux ont également révélé que les voies aériennes étant le siège d'une occlusion par un bouchon de mucus présentaient toujours une occlusion plusieurs années après dans la grande majorité des cas (99). Cette persistance d'une occlusion de la lumière des bronches pourrait être liée à une augmentation locale de l'inflammation de type 2 qui entretiendrait la persistance du bouchon. Suite à cette observation, nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation locale de l'inflammation de type 2 pourrait être secondaire à la présence de cristaux de Charcot Leyden au niveau de ces segments bronchiques. Ces cristaux sont formés à partir de dimères de la protéine Galectine 10 (322). Cette protéine est présente en abondance dans le cytoplasme des éosinophiles (323), des basophiles, de des lymphocytes régulateur Th2 CD4⁺CD25⁺ (324) et des cellules CD4⁺ productrices d'IL-22 (325). L'une des principales caractéristiques de cette protéine est sa capacité à exister sous forme soluble ou cristalline (326). La formation des cristaux est un mécanisme contrôlé, dépendant de la NADPH pouvant débiter dans le cytoplasme (327) ou dans le milieu extracellulaire (326). La formation de ces derniers débute après initiation d'un processus de mort cellulaire spécifique

appelé « eosinophil extracellular trap cell death » (328). Les facteurs susceptibles de provoquer ce processus sont nombreux : l'IL-5, GM-CSF, platelet activating factor (PAF) dépendant de la voie de signalisation NADPH par la NADPH-oxidase (326,327). Depuis de nombreuses années, la Galectin 10 a été considérée comme un marqueur de l'inflammation de type 2 (326,329,330). Sa concentration dans les expectorations des patients asthmatiques est corrélée à la présence d'éosinophiles (330). Des travaux récents suggèrent que les cristaux de Galectin 10 sont des acteurs actifs de l'inflammation innée et adaptative (326,331). Dans un modèle murin d'asthme, l'injection intra-trachéale de cristaux de Galectin 10 exacerbe les paramètres de l'asthme allergique expérimental, dont la production de mucus, dans un modèle d'asthme allergique aux acariens et induit à l'ovalbumine (326). De façon prometteuse, la dissolution des cristaux de Galectin 10 par des anticorps permettait une réduction de l'inflammation allergique des voies aériennes (326).

La persistance d'une occlusion par des bouchons de mucus de bronche pourrait être favorisée par leurs caractéristiques architecturales telles que la surface de la lumière bronchique, la longueur des segments ou l'épaisseur de la paroi. Ces modifications de la morphologie des voies aériennes, en association avec les modifications de la rhéologie du mucus chez les asthmatiques, pourraient favoriser la formation de bouchons de mucus.

L'implication de l'architecture bronchique dans le risque de survenue d'une maladie des voies aériennes et sur ces caractéristiques a déjà été mise en évidence. Par exemple, les variations proximales les plus fréquentes de la segmentation bronchique chez les patients tabagiques ont été associées à une augmentation du risque de survenue d'une BPCO et une modification de la symptomatologie clinique (332).

De plus, récemment, l'impact fonctionnel des bouchons de mucus présent dans les voies aériennes des patients tabagiques a été confirmé en utilisant une méthodologie similaire. Dans cette population, le score de bouchons de mucus était un facteur associé à une altération du VEMS. De façon intéressante dans cette pathologie respiratoire, la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes n'est pas corrélée à la présence d'éosinophiles mais à la présence de neutrophiles dans les expectorations. Ces résultats suggèrent que la physiopathologie de la formation des bouchons de mucus dans les voies aériennes est complexe et implique probablement des physiopathologies différentes (121). L'impact du tabagisme sur la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques n'a pas été étudié à l'heure actuelle. Cette exposition pourrait modifier la réponse inflammatoire bronchique ou de l'architecture bronchique et avoir un impact sur la formation des bouchons de mucus et de leur impact fonctionnel dans l'asthme.

Les hypothèses de ce travail sont :

1. Confirmer le lien entre le score de bouchons de mucus, l'altération de la fonction respiratoire et l'inflammation de type 2 chez patients asthmatiques
2. Evaluer l'impact du tabagisme sur la formation des bouchons de mucus dans les voies aériennes asthmatiques.
3. Déterminer si la Galectin 10 ou l'architecture bronchique sont associés à la présence de bouchons de mucus chez les patients asthmatiques en fonction de leur statut tabagique

Matériel et méthode

Cette étude a été réalisée à partir des scanners thoraciques de patients inclus dans deux cohortes de suivi de patients asthmatiques au Centre Universitaire de santé de McGill à l'institut thoracique de Montréal. La première cohorte dérive d'une étude sur l'asthme difficile. Cette cohorte a déjà fait l'objet de publications et la méthode de recrutement a été précédemment décrite (333,334). La deuxième cohorte est une cohorte prospective ayant pour but d'évaluer l'impact du tabagisme sur le phénotype asthmatique. Les recrutements sont toujours en cours. Les protocoles de deux études ont été examinés et approuvés par les comités d'examen institutionnel des deux institutions, et un consentement éclairé a été obtenu. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de recherche du Centre universitaire de santé McGill.

Recrutements des sujets

Dans la cohorte d'asthme difficile, les patients étaient inclus avec un diagnostic d'asthme modéré ou sévère posé par un pneumologue et confirmé :

- soit par une amélioration du VEMS de 12 % ou plus et d'une augmentation absolue d'au moins 200 ml après administration d'un agoniste β -adrénergique de courte durée d'action
- soit d'une variabilité du VEMS au cours du temps.

Un critère d'observance thérapeutique était également requis pour l'inclusion initiale dans l'étude avec la nécessité d'une prise d'au moins 70 % des doses d'inhalations quotidiennes de 4 bouffées de fluticasone (soit 1000 μ g) et de salmétérol (soit 200 μ g) par jour pendant un mois période d'observation. L'observance était évaluée à l'aide d'un dispositif électronique, le MDILog (Medtrac technologies, Lakewood, Colo) permettant de quantifier le nombre de prises (335).

Le diagnostic d'asthme sévère était retenu selon les critères de l'American Thoracic Society (ATS) pour l'asthme sévère (336) et nécessitait la présence d'au moins un critère majeur soit :

- un traitement par une corticothérapie systémique quotidienne pendant plus de la moitié de l'année précédente ou
- un traitement par cortico-stéroïde inhalé (CSI) ou à forte dose (≥ 1000 μ g de fluticasone ou équivalent par jour)

- et au moins un autre traitement d'appoint (bêta agoniste à longue durée d'action (BALA), antagoniste des récepteurs des leucotriènes, ou théophylline) en continu au cours des 12 derniers mois.

De plus, au moins 2 critères mineurs ou plus devaient être présent :

- utilisation quotidienne d'un bêta-agoniste à courte durée d'action;
- un trouble ventilatoire obstructif persistant défini par un rapport VEMS/CVF pré-bronchodilatateur inférieur à 70 % et un rapport VEMS/CVF inférieur à 80 % de la valeur prédite ;
- 1 ou plusieurs consultations en urgence au cours des 12 derniers mois ;
- nécessité de recours à 3 ou plus cures de corticostéroïde au cours des 12 derniers mois ;
- détérioration rapide après une réduction de moins de 25 % de la corticothérapie systémique ;
- un asthme aigu grave au cours des 3 dernières années.

Les critères requis pour l'asthme modéré étaient :

- un asthme bien contrôlé avec au moins 200 µg/j de fluticasone ou équivalent par jour mais n'excédant pas 1000 µg/j, avec ou sans l'utilisation d'un agoniste à longue durée d'action
- 2 ou moins cures de corticothérapie systémique au cours des 12 derniers mois et aucune au cours des 3 derniers mois avant l'inclusion (le nombre total de jours de prise orale les stéroïdes ne pouvaient pas dépasser 30 jours au cours des 12 derniers mois);
- VEMS supérieur à 70 % de la valeur prédite et supérieur à 90 % du record personnel des 2 années précédentes ;
- pas plus d'une visite non-programmée aux urgences ou visite au cabinet en urgence au cours des 12 derniers mois.

Dans la cohorte ACO (asthma COPD overlap syndrome), l'ensemble des patients asthmatique inclus étaient des patients asthmatiques sévères. Les critères d'inclusion et d'exclusion étaient :

Les critères d'inclusion pour les asthmatiques sévères non-fumeurs

- un diagnostic d'asthme sévère posé par un pneumologue
- des preuves fonctionnelles respiratoires antérieures évocatrices d'un d'asthme (variation post-bronchodilatateur du VEMS > ou = à 12 % et 200 ml) ou modifications

supérieures à 400 ml entre deux mesures indépendantes (intervalle minimal d'un jour).

- Le contrôle des symptômes nécessitant l'utilisation combinée de bronchodilatateurs de longue durée et de corticostéroïdes inhalés
- exacerbations fréquentes malgré un traitement adéquat (1 ou plusieurs exacerbations par an nécessitant un traitement par corticothérapie systémique).
- Une persistance du VEMS < 80 % de la valeur prédite

Critère d'exclusion :

- Toute autre maladie pulmonaire connue, y compris un diagnostic antérieur de BPCO
- Présence d'autres comorbidités majeures pouvant affecter l'activité de l'asthme (VIH, le cancer métastatique et l'insuffisance cardiaque congestive).
- Infection des voies respiratoires dans les 6 semaines suivant l'inclusion
- une exacerbation asthmatique nécessitant une augmentation de la dose quotidienne de Prednisone ou équivalent d'au moins 10 mg par jour dans les 6 semaines précédant l'inclusion
- une thermoplastie bronchique

Le statut tabagique était défini comme par une consommation actuelle d'au moins 10 cigarettes par jour et une consommation cumulée supérieure à 10 paquets/années. Chez les patients tabagiques actifs ou sevrés, le diagnostic initial d'asthme devait avoir été posé par un médecin avant l'âge de 40 ans.

Les critères d'inclusion pour les asthmatiques sévères tabagiques

- Le tabagisme actif était défini par une consommation actuelle d'au moins 10 cigarettes par jour et une consommation cumulée supérieure à 10 paquets/années.
- un diagnostic d'asthme devait avoir été posé par un médecin avant l'âge de 40 ans
- des antécédents de critères spirométriques d'asthme (variation post-bronchodilatateur du VEMS > ou = à 12 % et 200 ml) ou modifications supérieures à 400 ml entre deux mesures indépendantes (Intervalle minimal de 24 heures).
- Le contrôle des symptômes nécessitant l'utilisation combinée de BALA/CSI à forte dose.
- Exacerbations fréquentes malgré un traitement optimal (1 ou plusieurs exacerbations par an nécessitant un traitement systémique par corticothérapie systémique).
- Une persistance du VEMS < 80 % de la valeur prédite.

Les critères d'inclusion pour les témoins sains étaient l'absence de diagnostic médical d'asthme et l'absence d'un antécédent de tabagisme.

L'ensemble des sujets inclus dans les cohortes précédemment décrites était éligible pour cette étude. Le critère d'inclusion principal dans l'étude actuelle était la disponibilité d'un scanner thoracique avec une résolution des coupes transversale minimale de 2,5 mm. Le délai maximal entre la réalisation du scanner thoracique, l'évaluation de la fonction respiratoire (spirométrie), le prélèvement sanguin, l'expectoration induite et la mesure de FeNO était de 3 mois.

Quantification des bouchons muqueux sur le scanner

La quantification de l'occlusion des voies aériennes par des bouchons de mucus était réalisée à partir des scanners thoraciques. Cette évaluation était réalisée à l'aide d'un score visuel semi-quantitatif fondé sur l'anatomie broncho-pulmonaire. La méthodologie détaillée de ce score est précisée dans la référence suivante (99). Brièvement, l'ensemble des segments pulmonaire est inspecté visuellement à la recherche de bouchon de mucus. Un bouchon muqueux est défini comme une obstruction complète des voies respiratoires indépendamment de la génération bronchique. Ces obstructions muqueuses apparaissent comme une densité tubulaire lors de leur visualisation dans un plan parallèle et comme une opacité arrondie dans le plan perpendiculaire. La présence d'un bouchon muqueux dans un segment pulmonaire compte pour un point et son absence pour 0. Chaque poumon est constitué de 10 segments pulmonaires. Le score final varie de 0 à 20 et est généré par l'addition du score de chaque segment pulmonaire. La zone pulmonaire périphérique situé à 2 cm de la plèvre costale à la plèvre diaphragmatique a été exclue de l'analyse compte tenu du calibre des voies aériennes (99) (Figure 24). L'ensemble des scanners ont été évalués par deux évaluateurs indépendants et en aveugle des données cliniques.

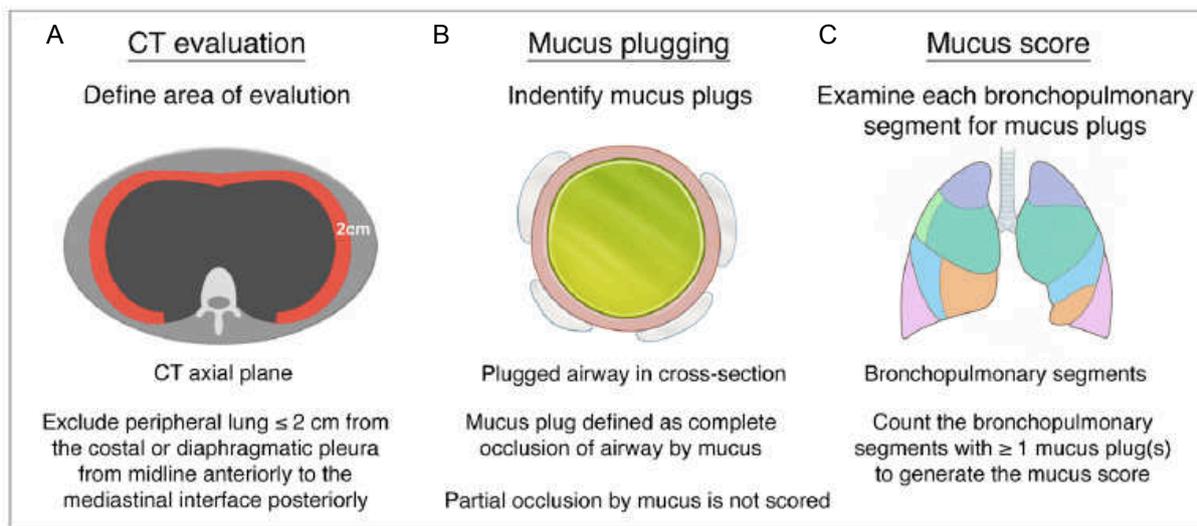


Figure 24 : Description de la méthodologie pour l'utilisation du mucus score à partir d'un scanner thoracique.

Les bouchons de mucus étaient définis comme étant une occlusion complète d'une voie aérienne indépendamment de la génération bronchique. Les occlusions incomplètes n'étaient pas comptées.

1. Une zone d'exclusion de l'analyse des voies aériennes était comprise dans les 2 cm à partir de la paroi thoracique (zone en rouge). Les éventuels bouchons de mucus dans cette zone sont exclus de l'analyse.

2. Représentation des bouchons de mucus en section transversale sur un scanner thoracique

3. Représentation schématisée des différents segments pulmonaires. Chaque segment pulmonaire, représenté par une couleur différente, est examiné. La présence d'un bouchon dans chaque segment compte pour un point. Le score final est établi par la somme de l'ensemble des segments.

D'après Dunican et coll., 2018

Analyse de la morphologie quantitative pulmonaire et des voies aériennes

La morphologie quantitative des voies respiratoires a été évaluée à partir d'analyses des scanners thoraciques à l'aide d'un logiciel automatisé et quantitatif conçu pour identifier et segmenter de manière fiable les cinq à six premières générations de voies respiratoires. Il permet la mesure précise des parois des voies aériennes, du diamètre de la lumière des bronches perpendiculairement à leurs grands axes (Apollo 1.2 ; VIDA Diagnostics ; Iowa City, IA) (Figure 24). L'accès à ce logiciel a été possible grâce à une collaboration avec le Dr. M. Kirby, de l'université Ryerson, Toronto, Canada. Les mesures des voies aériennes des scanners thoraciques comprenaient l'épaisseur de la paroi des voies aériennes (Wall thickness; WT), le pourcentage de WT (WT %), la longueur des voies aériennes (Center Line Length, mm), le diamètre interne moyen de la lumière des voies aériennes (Avg Minor Inner Diameter), la lumière bronchique (LA). L'ensemble des scanners a été analysé par un évaluateur puis une relecture indépendante a été effectuée par un second évaluateur.

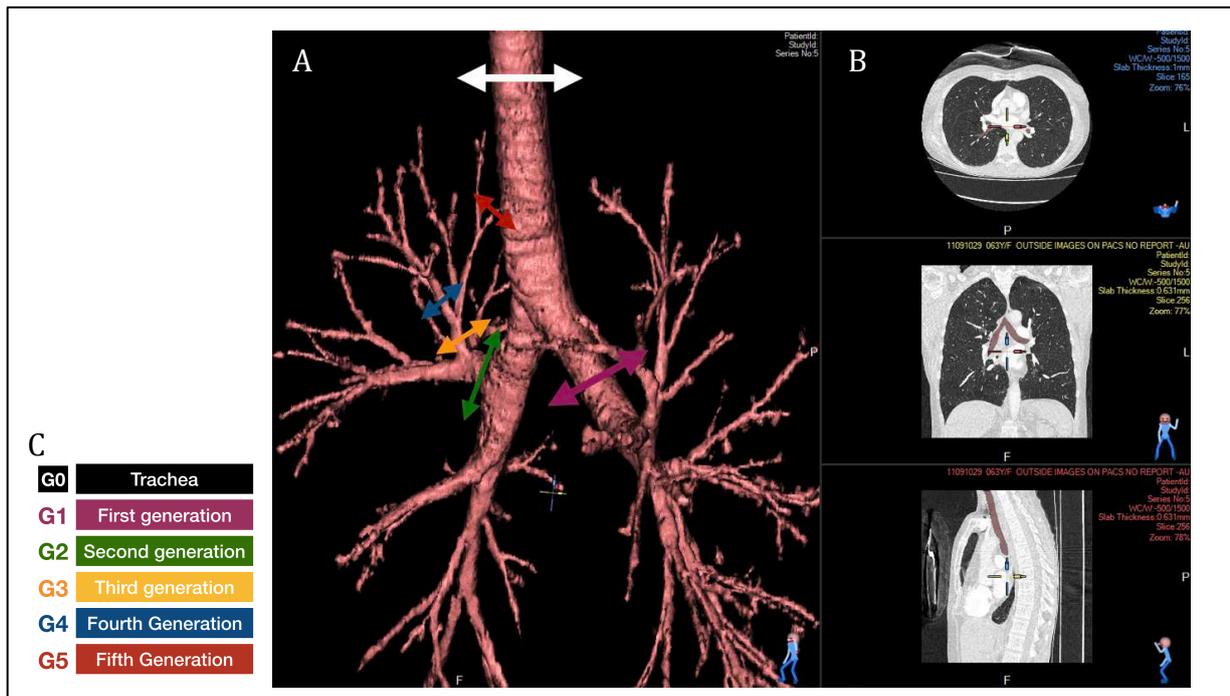


Figure 25 : Analyse quantitative des voies aériennes à partir du logiciel d'analyse VIDA Software

L'analyse quantitative des voies aériennes est réalisée à partir du scanner thoracique du patient (B.). L'arbre bronchique est ensuite modélisé (A.) et les différentes sections des voies aériennes sont identifiées (C.). Une mesure quantitative de chaque segment des voies aériennes est effectuée (Longueur, diamètre interne de la lumière, épaisseur de la paroi, longueur du segment).

L'ensemble des participants était réparti en trois groupes selon leur score de mucus respectif. Les patients n'ayant aucune occlusion des voies aériennes par un bouchon de mucus étaient assignés dans le groupe « zero mucus score », les sujets ayant un score égal ou supérieur à 4 étaient affectés au groupe « high mucus score » et les sujets ayant un score intermédiaire appartenaient au groupe « low mucus score ». Cette catégorisation était identique à celle précédemment publiée (99).

Induction des expectorations

Les expectorations induites ont été réalisées après une nébulisation d'une solution saline hypertonique de 3,4 % et 5 % suite à une inhalation de salbutamol (200µg). Le traitement des expectorations a été effectué selon le protocole décrit précédemment (337). Après leur collecte, les expectorations étaient traitées avec du dithiothréitol (DTT) (Sputalysin 10 %, Calbiochem Corp., San Diego, CA) pour rompre les liaisons muqueuses. Une numération cellulaire totale a été effectuée. Le surnageant d'expectoration a été stocké dans des tubes Eppendorf à -80°C.

Mesures de la protéine Galectin 10 dans les expectorations

Le surnageant des expectorations a été dilué au demi. Le dosage de la protéine Galectin-10 a été réalisé par ELISA (Kit Galectin10, Invitrogene Ref# EH204RB) selon les recommandations du fabricant.

Mesure de la fraction d'azote exhalé

La mesure du monoxyde d'azote exhalé (FeNO) a été effectuée sur un analyseur Niox Mino (Aerocrine, Solna, Sweden). Les mesures ont été réalisées selon les recommandations de l'American Thoracic Society/ERS Standardization à un débit fixe de 50ml/s (338).

Prélèvements sanguins

La procédure de réalisation et d'analyse des IgE totales et de la numération formule sanguine ont précédemment été décrite (333,334). L'éosinophilie sanguine et le taux d'immunoglobulines était mesurée dans l'année de réalisation du scanner thoracique.

Evaluation de la fonction respiratoire par spirométrie

L'évaluation de la fonction respiratoire a été réalisé par spirométrie selon les recommandations de l'ATS (28).

Analyses statistiques

La normalité des données a été évaluée par le test de normalité de Shapiro-Wilk. Pour les données ne répondant pas une distribution normale, des tests non-paramétriques ont été appliqués et les résultats ont été exprimés en médiane [intervalle interquartile]. Pour les données respectant une distribution normale, les résultats ont été exprimés en moyenne +/- écart-type (SD) et des tests paramétriques ont été appliqués. La corrélation entre les variables a été évaluée à l'aide de la corrélation de Spearman. Les diagrammes en boîte à moustache représentent la médiane, 25 % et 75 % des quartiles des données étudiées pour les variables continues. La concordance inter-évaluateurs pour l'établissement des scores a été estimée en utilisant le coefficient de corrélation de rang de Kendall. Les analyses statistiques ont été réalisées avec Graph Pad Prism Version 8.4.3 et R (Core Team (2020), R : A language and environment for statistics computing). R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. URL <https://www.R-project.org/> avec Wickham et al., (2019). Bienvenue dans le tidyverse. Journal des logiciels libres, 4(43), 1686, <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Résultats

Diagramme de flux et quantification du score de mucus

L'ensemble des patients (n=22) participant à l'étude « ACO » a été inclus dans cette étude dont 18 patients asthmatiques sévères et 4 sujets sains. Les détails des examens réalisés sont résumés dans la figure 26. Dans la cohorte de patients suivie pour un asthme difficile, 62 scanners thoraciques étaient disponibles dont 29 n'ont pas été inclus dans ce travail. Les justifications de ces exclusions étaient : la qualité du scanner reflétée par une épaisseur de coupe transversale >2.5mm (n=19), la présence de dilatation de bronches diffuses faisant suspecter un autre diagnostic associé à l'asthme comme une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (n=5) ou un problème technique empêchant l'analyse du scanner (problème d'importation ou de lecture de l'examen).

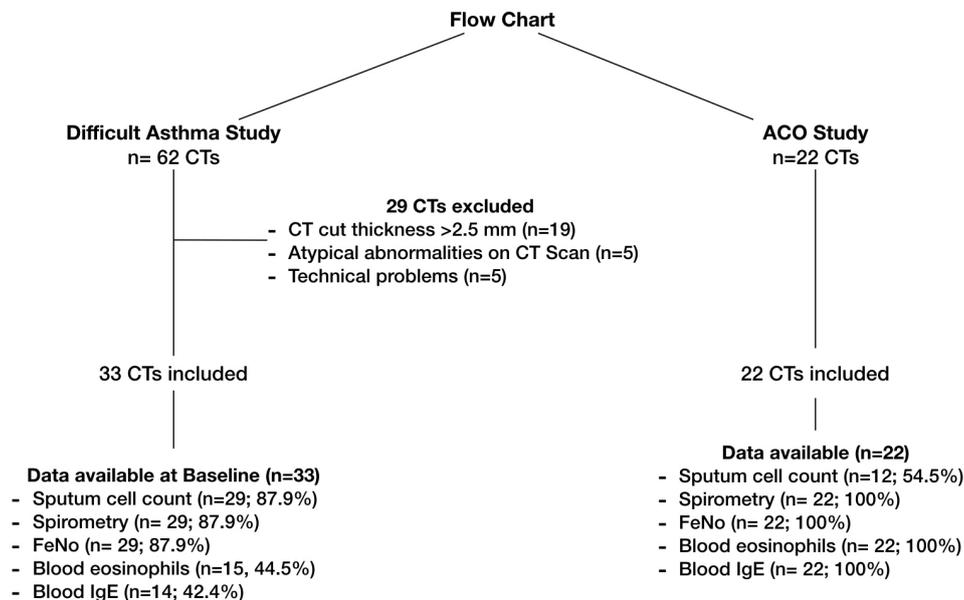


Figure 26 : Diagramme de flux de la sélection des scanners inclus dans l'étude à partir des cohortes de patients asthmatiques « Difficult Asthma » et « ACO ».

La quantification du score de mucus a été réalisée selon la méthodologie précédemment publiée (99,122). L'ensemble des scanners a été scoré indépendamment par un pneumologue et un radiologue thoracique du Centre Universitaire de santé de McGill à l'institut thoracique de Montréal. Un premier ensemble de 10 scanners a été analysé et quantifié. Les résultats ont été comparés et discutés entre les deux évaluateurs puis l'ensemble des scanners a été évalué par chacun des évaluateurs. La comparaison des scores retrouvait un τ de corrélation de Kendall de 0.66 $p < 0.0001$. L'ensemble des scanners dont la différence de score était >4 ont été discutés (n=5) jusqu'à l'obtention d'un consensus

sur le score. La comparaison des score finaux retrouvait un τ de corrélation de Kendall de 0.84, $p < 0.0001$.

L'occlusion des voies aériennes par des bouchons de mucus est fréquente chez les sujets asthmatiques quel que soit le statut tabagique

Les caractéristiques cliniques et fonctionnelles des patients asthmatiques et des sujets sains sont respectivement représentées dans le tableau 1 et T1 selon les catégories de score de mucus.

Tableau 1 : Caractéristiques globales des patients asthmatiques selon les catégories de score de mucus (n=51)

Characteristic	All (n=51)	Mucus score		
		Zero (n=13)	Low (n=17)	High (n=21)
Age, years	54.9 ± 12.3	50.7 ± 13.7	51.3 ± 11.7	59.9 ± 10.6
Femal sex, %	23 (45.1)	4 (30.8)	9 (52.9)	10 (47.6)
BMI, kg/m ² ^a	28.1 ± 5.0	27.7 ± 4.0	30.0 ± 5.4	26.7 ± 4.8
Atopic ^b	32 (68)	8 (61.5)	11 (64.7)	15 (71.4)
Mucus score	3 [0.25; 6.25]	0	1.5 [0.5; 3]	7 [5; 9]
Smoking Status^b				
Non smoker	28 (59.6)	8 (72.7)	7 (43.7)	13 (65)
Former Smoker	10 (21.3)	2 (18.2)	4 (25)	4 (20)
Active smoker	9 (19.1)	1 (9.1)	5 (31.3)	3 (15)
Spirometry				
FEV ₁ pre-BD, % _{pred} ^a	64.5 [50.2; 87.5]	67 [55; 89.2]	79.5 [63; 89.5]	56 [40.5; 67.7]
FVC pre-BD, % _{pred} ^a	81.7 [66.7; 95.2]	85.5 [71.5; 89.5]	96 [71.5; 104.5]	72.5 [65.7; 93.5]
FEV ₁ /FVC % ^a	63.5 [57.2; 73.7]	70 [61.6; 80.6]	68.4 [60.9; 75.1]	57.1 [46.2; 67.3]
FeNO, ppb ^c	19 [9; 27]	12.5 [10.5; 22.1]	14 [6.7; 19.2]	22 [19; 39]
Sputum eosinophils, % ^d	1.6 [0.2; 4.7]	0.5 [0; 1.71]	1.2 [0.6; 3.6]	4.7 [0.9; 14]
Sputum neutrophils, % ^d	61.5 [50.5; 77.6]	51.2 [31.5; 60.1]	52.1 [50.7; 66.1]	77.6 [59.2; 87.8]
Galectin 10, ng/ml ^e	16.5 [0; 45.5]	7.5 [1.1; 18.0]	17.1 [3.1; 27.3]	19 [0; 65.6]

Data are presented as mean ± SD, n (%), median [IQR]; BMI= body mass index; FeNO: Fractional Exhaled Nitric Oxide; ICS= inhaled corticosteroids. Missing data: ^an= 3; ^bn=4; ^cn=33; ^dn=26; ^en=23

Le nombre d'asthmatiques présentant au moins une occlusion des voies aériennes par un bouchon de mucus était de 38 (74 %). Le score de mucus médian était respectivement de 3 [0,25 ; 6,25] et de 0,5 [0,37 ; 0,5] chez les asthmatiques et chez les sujets sains. La sévérité de l'asthme semblait être associée à une augmentation du score (Fig. 27A et 27B). De façon cohérente, le groupe de sujets présentant un score de mucus élevé présentait un syndrome obstructif plus sévère par rapport aux groupes de sujets ayant un score de mucus « low » ou « zero » ($p=0,03$ et $p=0,02$) (Tableau 1). Sur le plan thérapeutique, 94 % des asthmatiques ($n=39/41$) bénéficiaient d'un traitement par corticostéroïde inhalé à forte dose, soit une dose équivalente à 500 µg ou plus de fluticasone propionate selon le tableau d'équivalence du GINA (30). Un traitement par anticorps monoclonal était retrouvé respectivement chez 23.5 % ($n=4/17$), 14.8 % (2/14) et 10 % (1/10) des patients présentant un score de mucus

« high », « low » ou « zero ». Les anticorps monoclonaux utilisés étaient l'anti-IgE (OMALIZUMAB ; n=4), l'anti IL-5 (MEPOLIZUMAB; n=2) et l'anti IL-5 récepteur (BENRALIZUMAB ; n = 1). Le score de mucus des patients sous immunothérapie avait tendance à être plus élevé que celui des autres patients (Fig 27.B). La population des asthmatiques ayant un score de mucus « high » était significativement plus âgée (p=0,02).

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des patients asthmatiques selon leur statut tabagique (n=47)

	Non Smokers (n=28)	Smoker (n=9)	Former Smoker (n=10)
Age	55.4 ± 12.6	46.5 ± 11.4	62 ± 8.9
Female sex, %	10 (35.7)	4 (44.4)	7 (70)
Height (m)^a	1.69 ± 0.1	1.72 ± 0.07	1.64 ± 0.1
BMI, kg/m^{2a}	27.9 ± 4.8	27.7 ± 5.2	28.4 ± 5.8
Atopic	22 (78.6)	5 (55.4)	5 (50)
Mucus score	3.25 [0; 6.5]	1.5[1; 5]	2 [0.75; 6.5]
Spirometry			
FEV1(%pred) ^a	64 [42; 87]	67 [45; 85]	63 [59.7; 87.5]
FVC (% pred) ^a	79[61; 93]	88[72; 103]	82.5 [72.2; 101]
FEV1/FVC (%) ^a	66.2 [57; 75]	60 [47; 73]	66.5 [61.7; 70.9]
FeNO, ppb^b	21 [12; 33]	7[6-9]	16[13.5; 25]
Sputum eosinophils, %^c	2.5 [0.2; 10.4]	0.7 [0.1; 1.5]	1.5 [1.0; 2.9]
Sputum neutrophils %^c	53.7 [44.2; 86.6]	63 [53.5; 74.4]	66.2 [50.5; 68.8]
Galectin 10, ng/ml^d	16.9[3.4; 64.1]	0[0; 22.2]	23.9[22.2; 25.6]

Data are presented as mean ± SD, n (%), median [IQR]; BMI= body mass index; FeNO: Fractional Exhaled Nitric Oxide; ICS= inhaled corticosteroids.
Missing data ^a n=2 ^b n=14 ^c n=22 ^d n=19

L'occlusion des voies aériennes asthmatiques par des bouchons de mucus était très fréquente quel que soit le statut tabagique (Tableau 2). La prévalence était respectivement de 71 % (n=20), 80 % (n=8) et 88.9 % (n=8) chez les non-fumeurs asthmatiques, fumeurs sevrés ou fumeurs actifs. Le mucus score ne différait pas significativement entre ces populations (Fig 27.C). La proportion d'asthmatiques non-fumeurs et de fumeurs/ex-fumeurs appartenant à la catégorie de score de mucus « high » est respectivement de 41 % et 37 % (p = 0,4, Fig 27.D).

L'analyse complète des scanners thoraciques incluait 1100 segments pulmonaires dont 214 (19.4 %) présentaient au moins un bouchon de mucus. La distribution était homogène dans l'ensemble des segments quel que soit le statut tabagique (Fig 27.E).

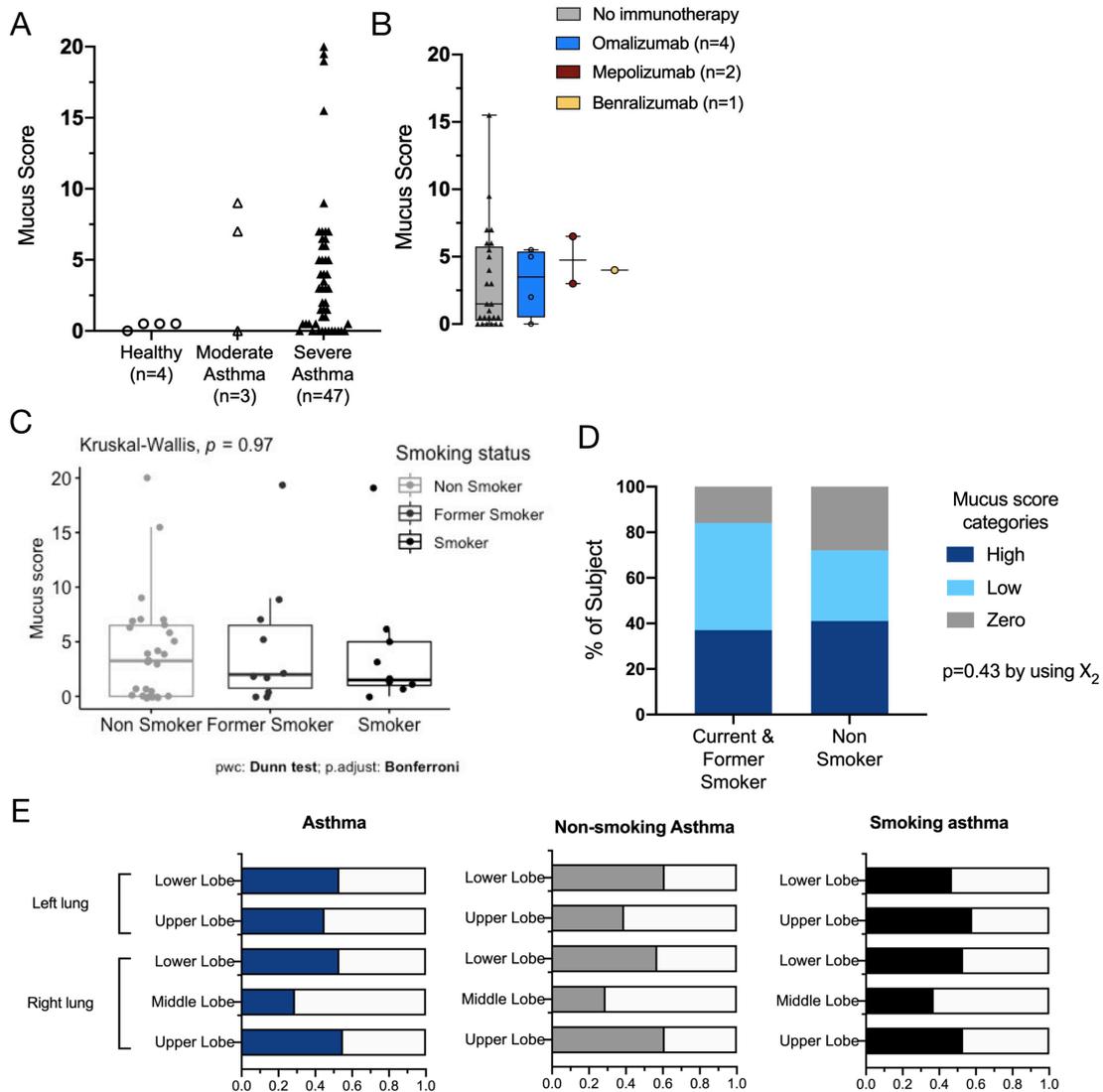


Figure 27: Les bouchons de mucus sont fréquents et distribués de façon homogène dans les segments pulmonaires chez les asthmatiques quel que soit le statut tabagique

- A. Le mucus score apparait comme plus élevé chez les asthmatiques que chez les sujets sains
- B. Les asthmatiques sous immunothérapie ont tendance à avoir un score de mucus médian plus élevée que les patients sous traitement par CSI seuls (n=32).
- C. La valeur du score de mucus ne varie pas significativement selon le statut tabagique des asthmatiques (n=47).
- D. La répartition des asthmatiques dans les différentes catégories de score de mucus ne varie pas selon leur statut tabagique (n=47).
- E. La distribution des bouchons de mucus dans les différents lobes pulmonaires, reflétée par le pourcentage des lobes avec au moins un bouchon de mucus dans les segments pulmonaire qui le compose est homogène et ne varie pas selon le statut tabagique (n=275 lobes)

Le score de mucus est associé à un syndrome obstructif plus sévère

Secondairement, nous avons cherché à confirmer les corrélations entre le score de mucus et les paramètres fonctionnels respiratoires évalués en spirométrie. Le groupe de sujets présentant un score de mucus «high» présentait un syndrome obstructif plus sévère que les groupes des autres catégories de mucus score (Tableau 1, Fig 28.A).

Dans cette cohorte, des corrélations inverses entre l'obstruction bronchique, évaluée par le ratio VEMS/CVF et le VEMS ont été confirmées avec respectivement un coefficient ρ de Spearman de -0,32 ($p=0,02$) et -0,43 ($p=0,003$) et confirmé en analyse univarié (Fig 28.B).

Dans les sous-groupes de non-fumeurs asthmatiques ou fumeurs actifs ou sevrés asthmatiques, ces corrélations n'ont pas été retrouvées (données non présentées).

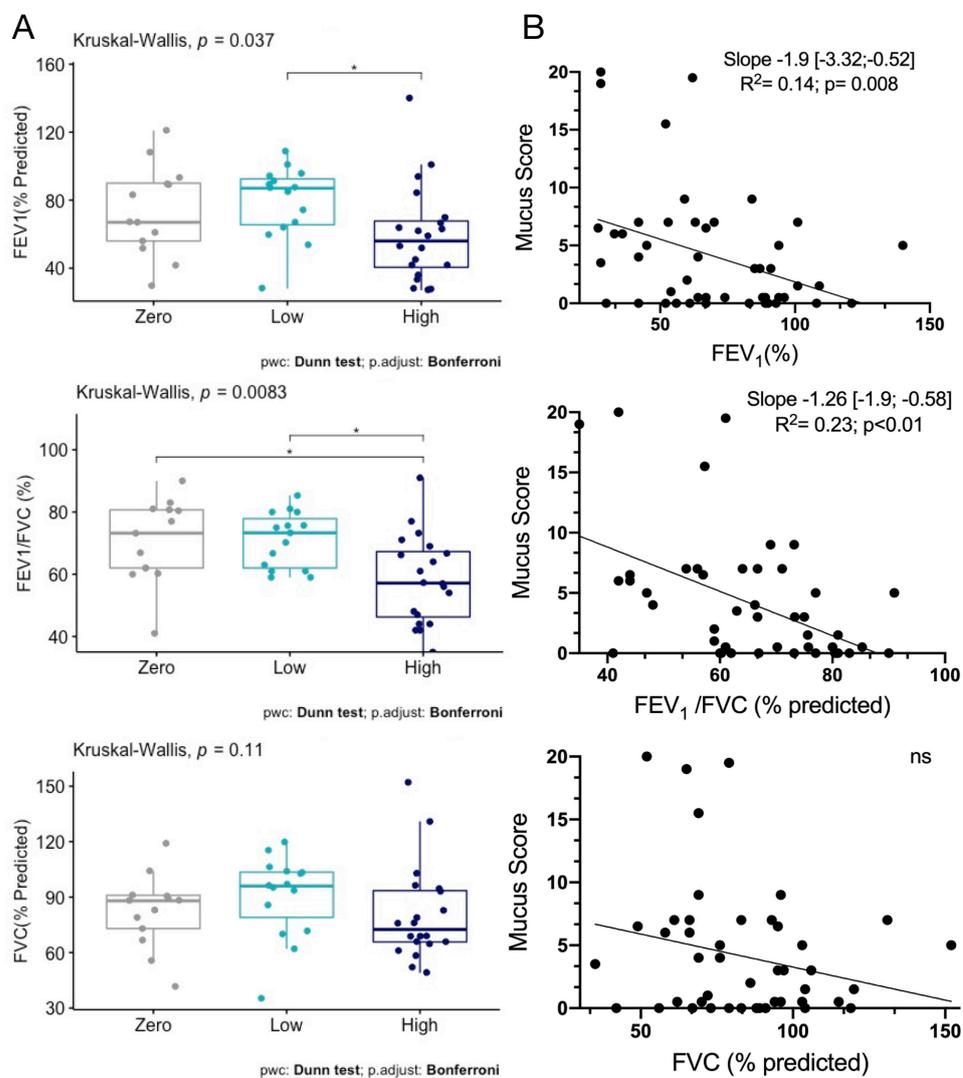


Figure 28: Les bouchons de mucus sont associés à un syndrome obstructif bronchique plus sévère

- L'obstruction bronchique, reflétée par le ratio FEV₁/FVC, est significativement plus sévère dans le groupe avec un score de mucus « High » comparativement aux autres groupes de catégories de score de mucus
- Une relation linéaire inverse est retrouvée entre le score de mucus et le ratio FEV₁/FVC et le FEV₁.

L'occlusion des voies aériennes est associée à une inflammation de type 2 chez les sujets asthmatiques non-fumeurs et possiblement à l'inflammation neutrophilique chez les fumeurs actifs ou sevrés asthmatiques

Ensuite, l'association entre le score de mucus, l'éosinophilie des expectorations, l'inflammation de type T2 chez les patients asthmatiques a été explorée. Dans la population globale des patients asthmatiques, le score de mucus était corrélé positivement et significativement avec le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations (ρ de Spearman =0,4 ; $p=0,04$, Fig 6.A). Chez les asthmatiques non-tabagiques, cette corrélation tendait à être confirmée (ρ de Spearman à 0.46, $p=0,07$) mais pas chez les asthmatiques fumeurs actifs ou sevrés (ρ de Spearman à 0.26, $p=0.49$). Aucune association entre le score de mucus, l'éosinophilie sanguine ou le taux d'IgE sanguin n'ont été mis en évidence (données non présentées). En revanche, le FeNO était positivement et significativement associé au score de mucus chez les patients asthmatiques non-fumeurs (ρ de Spearman à 0.51 ; $p=0.02$, Fig 6.B). Cette corrélation n'était pas retrouvée dans la population générale asthmatique ni chez les asthmatiques sevrés ou fumeurs actifs (avec respectivement $p=0.17$ et 0,17, Fig 6.B). En revanche, chez les fumeurs actifs ou sevrés asthmatiques, le pourcentage de neutrophiles dans les expectorations était positivement et significativement associé aux scores de mucus (ρ de Spearman=0,69, $p=0,04$; Fig 6.C). Cette association n'était pas mise en évidence dans la population asthmatique générale ou non-tabagique (données non présentées). Enfin, dans la population générale de l'étude, le score de mucus était faiblement associé à l'âge des sujets (ρ de Spearman à 0.29 ; $p=0.03$). La recherche de corrélation entre le score de mucus et d'autres variables cliniques susceptibles d'influencer le phénotype asthmatique, tel que le BMI ou le genre, n'ont pas permis d'établir d'associations.

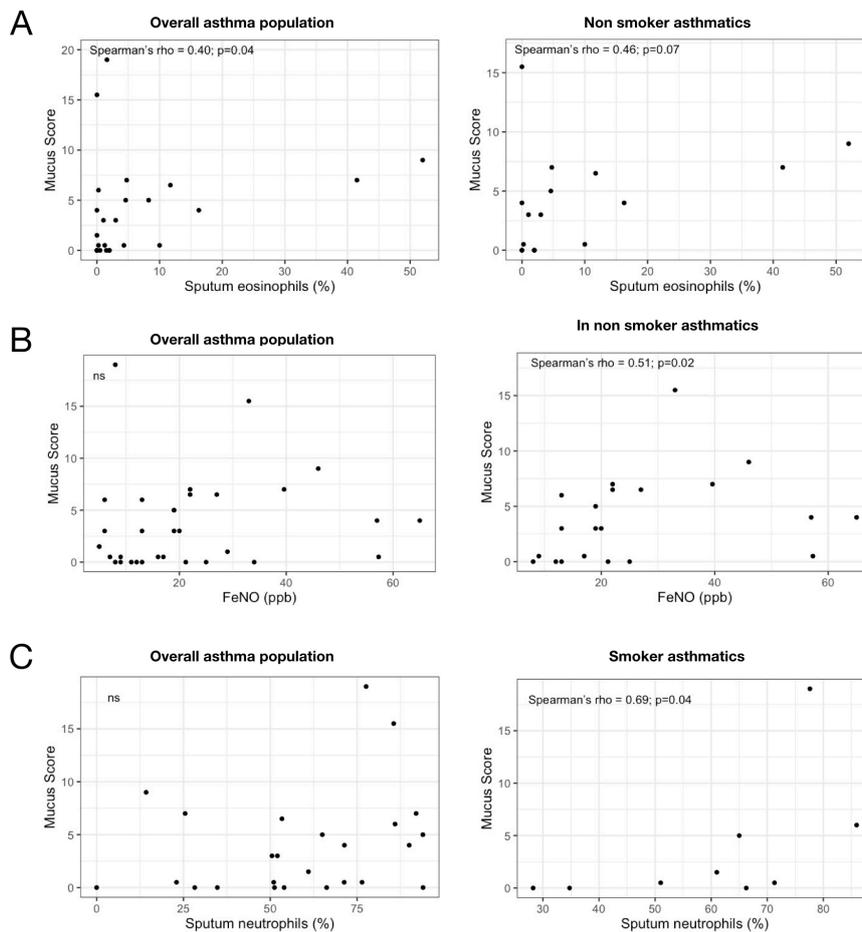


Figure 29: Le score de mucus est associé au pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations et au FeNO chez les asthmatiques non-fumeurs

- A. Le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations est corrélé au score de mucus chez les asthmatiques (n=37). Une tendance similaire est retrouvée chez les asthmatiques non-fumeurs (n=25).
- B. Le FeNO est associée au score de mucus dans la population non tabagique asthmatique (n=16) mais pas dans la population générale (n=37)
- C. Le pourcentage de polynucléaires neutrophiles, chez les fumeurs actifs ou ex fumeurs est corrélé avec le score de mucus (n=9) mais pas dans la population asthmatique globale (n=37)

La concentration de Galectin 10 dans les expectorations des sujets asthmatiques est un marqueur de l'inflammation de type 2 mais pas de l'occlusion des voies aériennes par des bouchons de mucus

La confirmation d'une association entre l'éosinophilie des expectorations, l'inflammation de type T2 et la présence de bouchons muqueux dans les voies respiratoires des patients asthmatiques nous a incité à étudier l'implication potentielle de la protéine Galectin 10 dans ce processus. Cette protéine a été mesurée par ELISA dans le surnageant des expectorations de 40 sujets asthmatiques et de 3 sujets sains. Chez les asthmatiques, la concentration médiane de Gal 10 était de 27,3 ng [2.3; 84.4]. De façon surprenante, la concentration médiane chez les sujets non asthmatiques était de 122 ng/ml en raison d'une élévation marquée de la Gal10 chez deux sujets respectivement à 122ng/mL et 172 ng/ml.

La première patiente était une femme de 31 ans ayant des antécédents d'atopie avec des IgE totales à 442 UI/mL mais sans éosinophiles dans le sang ou les expectorations avec un FeNO à 11 ppb. Le deuxième sujet était un homme de 58 ans avec une éosinophilie modérée à 300/mm³ dans le sang et 0,3 % d'éosinophiles dans les expectorations sans augmentation des IgE ni antécédents d'atopie.

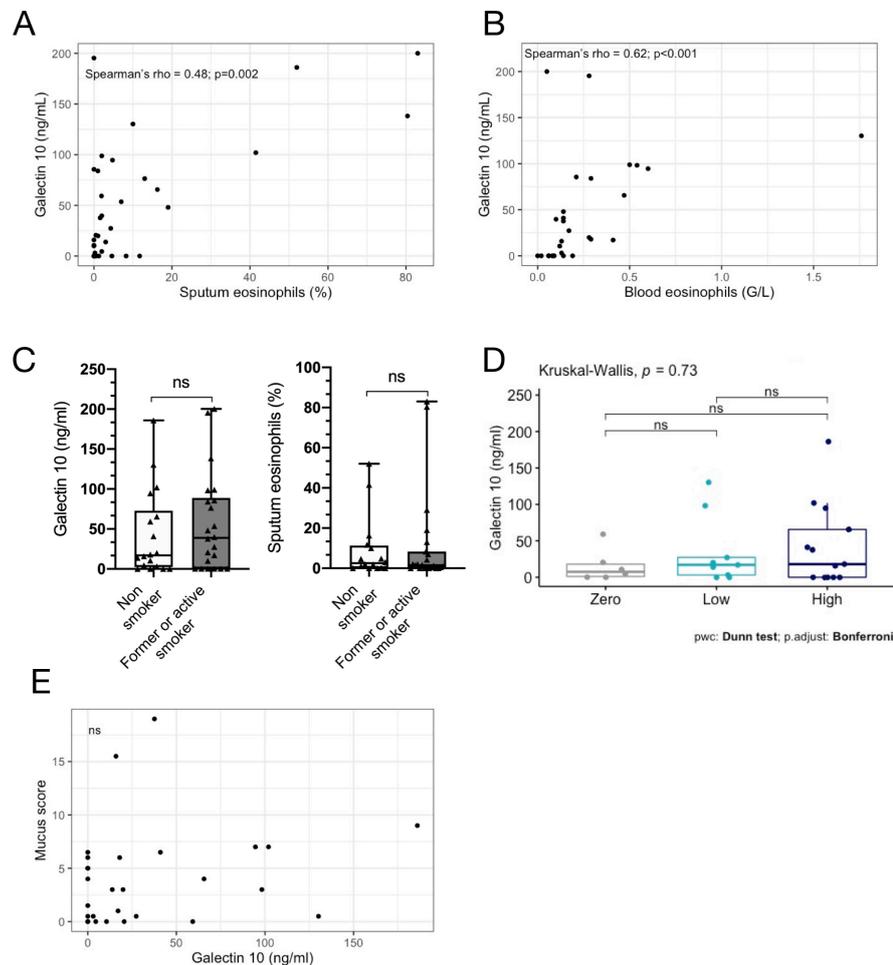


Figure 30: La galectine 10 est un marqueur de substitution de l'inflammation éosinophilique chez les patients asthmatiques mais n'est pas liée à la formation des bouchons de mucus dans les voies aériennes

A.B. La Galectine 10 est corrélée au pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations et dans le sang chez les asthmatiques (respectivement n= 31)

C. Comparaison de la concentration de Galectin 10 et du pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations de patients ex/fumeurs actifs (n=22 et n= 13) et non fumeurs asthmatiques (n=18 et n=16).

D. Comparaison de la concentration de Galectin 10 dans les expectorations de patients asthmatiques selon les groupes de score de mucus (n=31)

E. La concentration de Galectin 10 n'est pas corrélée au score de mucus chez les sujets asthmatiques (n=31)

La concentration de Gal10 dans les expectorations des asthmatiques était corrélée au pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations (ρ de Spearman = 0,48, $p=0,002$, Fig 30.A) et également à l'éosinophilie sanguine (ρ de Spearman à 0,62, $p<0,001$ Fig 30.B). Ces

associations étaient encore plus marquées chez les asthmatiques non-fumeurs avec respectivement un ρ de Spearman à 0,58 ($p = 0,01$) et 0,95 ($p < 0,001$). Aucune autre association entre la concentration de Gal 10 et les paramètres de l'inflammation de type 2 n'a été mise en évidence. Chez les fumeurs actifs ou sevrés asthmatiques, la concentration de Gal10 dans les expectorations tendait à être plus élevée sans modification apparente de la concentration d'éosinophiles entre ces deux groupes (Fig 30.C). Le pourcentage de neutrophiles dans les expectorations était négativement corrélé avec la concentration de Gal10 (ρ de Spearman = -0,36, $p = 0,02$). Concernant, un potentiel lien entre la concentration de Gal10 dans les expectorations et la présence de bouchon de mucus dans les bronches, aucune différence significative de concentration n'a été mise en évidence entre les différents groupes de catégories de score de mucus (Fig 30.D). Aucune corrélation n'a été trouvée avec le score de mucus et la quantité de Gal10 dans les expectorations (ρ de Spearman = 0,11, $p = 0,53$, Fig 30.E) ou d'autres paramètres fonctionnels respiratoires (données non présentées). Ces données suggèrent que la Galectine 10 est un marqueur de l'inflammation éosinophilique chez les asthmatiques mais n'est pas associé à la formation des bouchons de mucus. Compte tenu d'une association entre l'éosinophilie des expectorations et la formation de bouchons de mucus, cette constatation suggère que la Galectine 10 présente dans les voies respiratoires pourrait provenir d'autres types cellulaires ou ne pas représenter la forme cristal pathogénique.

Figures supplémentaires

Table R1 : Caractéristiques des sujets sains

Characteristic	Healthy subjects (n=4)
Age, years	44.5 ± 11,4
Femal sex	1 (25%)
BMI, kg/m²	29 ± 9.9
Atopic	2 (50%)
Smoking Status	
Non smoker	4 (100%)
Former Smoker	-
Active smoker	-
Spirometry	
FEV ₁ preBD, % _{pred}	99,8 ± 14,8
FVC pre-BD, % _{pred}	103 ± 11,3
FEV ₁ /FVC %	79,1 ± 2,3
FeNO, ppb	15 [13-18]
Sputum eosinophils, %^a	0,1 [0.1-0.2]
Sputum neutrophils, %^a	248 [198-297]
Sputum macrophages, %^a	146 [99-194]

Data are presented as mean ± SD, n (%), median [IQR]; BMI= body mass index; FeNO: Fractional Exhaled Nitric Oxide; ICS= inhaled corticosteroids.

Missing data: ^a n= 2

Discussion

L'asthme est une pathologie complexe et fréquente responsable d'une morbi-mortalité significative pour la société. Une amélioration de la prise en charge de l'asthme permettrait une réduction de la morbidité et du coût financier. Cet objectif est atteignable par des mesures de santé publique et le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Cette seconde démarche requiert une meilleure compréhension de la physiopathologie asthmatique afin de découvrir et de mettre au point de nouveaux traitements. Néanmoins, l'hétérogénéité des phénotypes asthmatiques et la multiplicité des mécanismes cellulaires impliqués dans sa physiopathologie rendent compliquée l'étude de cette maladie. Pour surmonter ces difficultés, une approche globale doit être utilisée en confirmant les hypothèses mécanistiques fondées sur des observations chez l'Homme sur des modèles expérimentaux et inversement. Dans ce travail, deux approches intégratives ont été faites. Dans une première partie, en se fondant sur des études pangénomiques, l'hypothèse de l'implication du récepteur NOD1 dans l'asthme chez l'Homme a été évaluée sur un modèle murin d'asthme allergique aux acariens. Puis dans une deuxième partie, à partir de données cliniques recueillies chez des patients asthmatiques, des hypothèses expérimentales ont été évaluées sur des échantillons humains. Dans la présente partie, les résultats de chacun de ces deux axes expérimentaux seront discutés.

Partie 1 : Rôle du récepteur Nod1 dans l'asthme allergique aux acariens

La première partie de ce travail a permis de révéler que l'asthme allergique expérimental induit aux acariens était significativement amoindri chez les souris Nod1 déficientes mais pas chez les souris Nod2 déficientes. Cette réduction incluait la cellularité du LBA, la résistance des voies aériennes et l'expression des cytokines de type TH2. Chez les souris Nod2^{-/-} le seul paramètre significativement réduit par rapport aux souris sauvages était le recrutement cellulaire inflammatoire du LBA.

Cette diminution du recrutement cellulaire pourrait être une conséquence d'une baisse du niveau de CCL2. En effet, la neutralisation de cette chimiokine atténue l'accumulation de macrophages et d'éosinophiles dans le LBA de singes asthmatiques (339). Les souris Nod2^{-/-} exposées aux acariens avaient toujours la capacité d'induire de l'IL-33 au niveau pulmonaire contrairement aux souris Nod1^{-/-}. Cette constatation est en accord avec l'induction d'une réponse muqueuse IL-33 par l'activation directe de Nod1 au niveau de l'épithélium (316). De façon similaire, des résultats équivalents ont été observés dans les cellules BEAS-2B. Une explication pourrait être que les ligands de Nod2 soient dégradés par une activité amidase qui pourrait être présente soit dans les extraits d'acariens, soit induits

par ceux-ci. En effet, la présence d'une g-D-glutamyl-L-diamino endopeptidase acide a été décrite dans ce type d'extraits (340). De plus, la PGLYRP2, une N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase, est induite *in vitro* au niveau de cellules BEAS-2B après une stimulation avec des extraits d'acariens et *in vivo* dans les poumons de souris après l'induction du modèle d'asthme allergique.

Parallèlement, PEPT2, un transporteur permettant l'absorption des ligands de Nod1, mais pas du MDP (248), est exprimé par les cellules épithéliales des voies respiratoires (341) contrairement à PEPT1, un transporteur du MDP, principalement exprimé par le tractus gastro-intestinal (252). En effet, l'ARNm de PEPT2 était fortement exprimé par les cellules BEAS-2B ainsi que dans les poumons de souris exposées aux acariens par rapport à PEPT1. Ceci explique probablement également l'activation différentielle des récepteurs Nod1/2 dans les poumons par les acariens.

Lors de la reconnaissance du peptidoglycane par les récepteurs NOD1 et NOD2, ces derniers subissent une auto-oligomérisation conduisant au recrutement de la protéine RIPK2 et à l'ensemble d'un complexe aboutissant in fine à l'activation NF- κ B et à la transcription de plusieurs gènes inflammatoires.

En accord avec un travail récent (275) et nos résultats obtenus sur les souris Nod1^{-/-}, les souris Ripk2^{-/-} présentaient une diminution des caractéristiques asthmatiques en réponse aux acariens dont une diminution de la résistance des voies aériennes. Des études antérieures ont rapporté des données contradictoires sur le rôle de la Ripk2 dans l'inflammation allergique des voies respiratoires. Une retrouvait un effet promoteur (275) et d'autres n'en trouvaient pas (342,343). À la lumière de nos données, ces résultats peuvent être conciliés par la présence (ou non) de muropeptides dans les extraits allergéniques utilisés pour induire l'inflammation des voies respiratoires. De manière cohérente, nous avons déjà montré que les souris Nod1^{-/-} présentaient un asthme allergique induit à l'ovalbumine similaire à celui des souris sauvages. De plus, l'utilisation d'un agoniste NOD1 comme adjuvant systémique exacerbait les caractéristiques expérimentales de l'asthme (313). Il est désormais bien établi que des altérations du microbiote intestinal sont impliquées dans la susceptibilité à l'asthme (344). Dans le même ordre d'idées, la déficience de Nod1 a été impliquée dans la dysbiose intestinale (297) et inhibe l'amorçage des neutrophiles par les PG dérivé de l'intestin, ce qui entraîne une susceptibilité accrue à l'infection pulmonaire à pneumocoque (303). Même si la transplantation fécale exclut la possibilité d'un rôle pro allergénique du microbiote intestinal, il est toujours possible, en théorie, que le microbiote des voies respiratoires des souris Nod1^{-/-} contribue à la réponse allergique en plus du microbiote dérivant des acariens.

L'analyse des extraits d'acariens en spectrométrie de masse a révélé la présence du ligand spécifique de NOD1, le muramyl tripeptide, et du ligand de NOD2, le MDP.

Cependant, à l'inverse de l'activation du rapporteur mNod1 induite par les acariens, l'activation du rapporteur de l'activation de mNod2 n'a été observée qu'en réponse à une concentration 4 fois supérieure d'acariens, suggérant à nouveau une dégradation putative du ligand de Nod2. Bien que l'analyse LC-MS ait confirmé la déplétion complète des PG dans la fraction de surnageant, une activité résiduelle du rapporteur de mNod1 a été observée *in vitro* suggérant une endocytose potentielle de traces de PG contenus dans le sérum fœtal animal utilisé pour la culture cellulaire (345).

Les cellules BEAS-2B ont présenté une production de cytokines induite par les acariens qui n'était que partiellement inhibée par l'antagoniste RIPK2 et par le knock-down de NOD1 par ARN interférant. Cette inhibition partielle est peut être le témoin d'autres mécanismes capables d'induire la production de cytokines par les cellules épithéliales bronchiques en réponse à d'autres composants des acariens (346), comme par exemple les protéases via l'activation du récepteur activé par les protéases 2 ou le LPS par la stimulation du TLR4 (197,347).

Les souris chimériques de la moelle osseuse ont montré que les cellules structurelles exprimant Nod1 étaient les principales cellules impliquées dans l'aggravation des caractéristiques de l'inflammation des voies respiratoires induite par les acariens. Ces résultats sont cohérents avec l'effet *in vitro* observé sur les cellules épithéliales. Cependant, l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires dépendait également de cellules hématopoïétiques et probablement de cellules dendritiques qui expriment également NOD1.

Il a été proposé que de faibles doses d'endotoxine favoriseraient une réponse TH2, alors que des fortes doses d'endotoxine favoriseraient une réponse TH1. Cependant, le degré de contamination dans nos extraits d'acariens par les endotoxines était 10 fois plus faible (10 ng) que la dose utilisée pour promouvoir une réponse immunitaire TH2 induite par l'OVA (par exemple, 100 ng) (321). En outre, les extraits d'acariens appauvris en LPS étaient encore capables de déclencher tous les paramètres de l'inflammation allergique des voies aériennes, à l'exception de la réponse humorale. Ceci suggère que le LPS, étant un stimulus majeur des cellules B (348), est essentiel pour l'induction d'une réponse humorale dirigée contre les acariens. Cette observation pourrait être liée à la prédominance du genre *Bartonella* dans les extraits d'acariens, puisque son LPS a des interactions fortement réduites avec le TLR4. (349) La déplétion des acariens en PG a entraîné une inhibition similaire à celle observée chez les souris Nod1^{-/-}, confirmant ainsi son rôle dans l'exacerbation de l'inflammation allergique des voies respiratoires induite par les acariens.

Il est intéressant de noter que des anticorps neutralisants ciblant le muropeptide MDP ont été récemment développés et qu'ils ont démontré leur capacité à inhiber l'arthrite auto-immune dépendante des PG. (350). Le développement de futurs anticorps neutralisant les

PG fournirait de plus amples informations sur le rôle spécifique de NOD1 dans l'inflammation allergique des voies respiratoires induite par les acariens.

Cette étude a mis en évidence une interaction sans précédent entre NOD1 et l'un des allergènes les plus courants, les acariens. Elle dévoile un nouveau mécanisme selon lequel le microbiote dérivant des acariens est détecté par Nod1 et potentialise la sévérité de la maladie. Cette découverte ouvre la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la voie NOD1 et potentiellement d'autres implications du récepteur Nod1 dans la physiopathologie asthmatique. Ces perspectives seront abordées dans la prochaine section de ce manuscrit.

Parties 2 : Impact fonctionnel des bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques

Dans cette cohorte de patients principalement composée de patients asthmatiques sévères (n=44, 86 %), la présence d'au moins un segment bronchique obstrué par un bouchon de mucus est retrouvée chez 74 % des asthmatiques. Cette prévalence est en accord avec les études précédemment publiées (99,122). Dans une cohorte d'asthmatiques sévères, tous les patients ayant une inflammation bronchique éosinophilique avait au moins un bouchon de mucus dans les bronches ainsi que 36 % des asthmatiques sévères ayant une inflammation bronchique éosinophilique contrôlée. Le contrôle de l'éosinophilie bronchique était défini par un pourcentage d'éosinophiles ≤ 3 % dans les expectorations (122). Dans l'étude princeps (99), la prévalence des bouchons de mucus dans les voies aériennes des asthmatiques était évaluée à 58 %. Cette discordance pourrait être liée aux profils des patients asthmatiques inclus dans ces études. En effet, la proportion d'asthmatiques sévères était de 65.8 % dans l'étude princeps (99) contre 74 % et 100 % pour les deux autres. Ces résultats tendent à souligner que la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques serait un marqueur de sévérité de la maladie. De façon cohérente avec cette hypothèse, dans notre étude, le groupe de sujet ayant un score de mucus élevé était plus âgé, avait un syndrome obstructif plus sévère et semblait être soumis à une pression thérapeutique plus importante que les autres catégories de score de mucus (Tableau 1). Des tendances équivalentes étaient retrouvées dans les précédentes études (99,122).

L'une des forces de ce travail est l'étude de l'impact du tabagisme sur la fréquence des bouchons de mucus dans les voies aériennes asthmatiques. L'occlusion des bronches par des bouchons muqueux est mise en évidence dans de nombreuses pathologies respiratoires chroniques dont la BPCO (351). Le tabagisme est le facteur environnemental causal le plus fréquent dans la survenue de cette pathologie (352). Récemment, dans une cohorte de 400 sujets comprenant 300 patients atteints de BPCO et 100 sujets tabagiques sans obstruction bronchique, la prévalence des bouchons de mucus était estimée à 57 % chez l'ensemble des participants. Dans notre cohorte, la prévalence de la présence d'au moins une occlusion bronchique par du mucus était estimée à 84 % chez les asthmatiques tabagiques actifs ou sevrés contre 71.4 % chez les asthmatiques non-tabagiques. Ces données suggèrent que le tabagisme n'affecte pas la prévalence des bouchons de mucus chez les asthmatiques.

La distribution de ces occlusions au sein des voies aériennes dans les pathologies inflammatoires chroniques des voies aériennes a été décrite de façon contradictoire. Dans l'asthme, leur présence est décrite de façon homogène et diffuse (99) alors qu'elle pourrait prédominer dans les lobes inférieurs dans la BPCO (353). Dans cette étude, l'occlusion des

voies aériennes est répartie de façon diffuse dans l'ensemble des segments pulmonaires quel que soit le statut tabagique (Fig. 27).

En utilisant une méthodologie similaire aux études précédemment publiées sur le sujet, une association négative et significative a été mise en évidence entre le score de mucus et une altération du VEMS et de l'obstruction bronchique. Ces corrélations sont relativement modestes et proches de celles observées chez les patients asthmatiques sévères (122). Comparativement à l'étude princeps, les associations entre la fonction respiratoire et le score de mucus sont moins fortes (Tableau 3). Les éléments pouvant expliquer cette différence sont multiples. Premièrement, les effectifs inclus dans ces études ne sont pas les mêmes. Secondairement, les caractéristiques de la présente cohorte ne sont pas les mêmes que les cohortes précédemment publiées. En effet, la population de la présente étude est en moyenne plus âgée que la population de l'étude de Dunican (54,9 ans vs 46,8 ans), avec une altération plus marquée de la fonction respiratoire (VEMS moyen à 66.7% de la valeur théorique prédite contre 72.2%). Ces différences ont pu avoir une influence sur l'association entre le score de mucus et la fonction respiratoire. Néanmoins, quelque que soit les études considérées, le coefficient de détermination R^2 entre le score de mucus et la fonction respiratoire reste modeste en analyse univariée. Il est respectivement estimé à 0.24 ($p < 0.001$) et 0.26 ($p < 0.001$) pour le VEMS et le ratio VEMS/CVF dans l'étude princeps (99) contre 0.14 ($p = 0.008$) et 0.23 ($p < 0.01$) dans ce travail. La force de ces associations suggère que d'autres facteurs sont également associés à la persistance d'une obstruction bronchique chez les patients asthmatiques. L'un des déterminants suspecté du syndrome obstructif chez les asthmatiques est l'épaisseur de la paroi des voies aériennes (354,355). L'augmentation de l'épaisseur de la paroi bronchique est secondaire au remodelage et implique de nombreux mécanismes dont une fibrose sous-épithéliale, une métaplasie glandulaire de l'épithélium, et une hypertrophie musculaire lisse bronchique (355). Ainsi, la surface musculaire lisse bronchique est inversement corrélée à la mesure du VEMS sur des biopsies bronchiques de patients asthmatiques sévères (333).

Tableau 3 : Corrélation entre le score de mucus et les différents paramètres spirométriques

Etudes	Rho de Spearman		
	FEV ₁ ^a	FVC ^a	FEV ₁ /FVC ratio ^a
Etude actuelle ^b	-0.38	Ns	-0.41
Dunican and coll. ^c	0.51	-0.32	-0.54
Svenningsen and coll. ^c	ns	ns	-0.42

^a prebronchodilator measure of each parameter, expressed in % of predicted volume; ^b in overall population, ^c in asthma population

Nous avons également confirmé l'association étroite, précédemment publiée (99,122), entre la survenue de bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques et l'inflammation de type 2. Ces travaux ont mis en évidence une corrélation entre le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations, ainsi que d'autre marqueur de l'inflammation de type 2 (comme l'IL-13 et le FeNO) et le score de mucus (99,122). Dans ce travail, nous avons confirmé l'association entre le score de mucus et l'éosinophilie des expectorations (Fig. 29). De façon intéressante, le FeNO n'est pas corrélé avec le score de mucus dans la population générale des asthmatiques mais uniquement chez les asthmatiques non-tabagiques (Fig. 29). Le tabagisme a un impact majeur sur la physiopathologie de l'asthme et sur sa sévérité (356) et notamment sur le niveau de NO exhalé. En effet, le tabagisme réduit la synthèse de NO (357). Cet effet de la fumée de cigarette sur la production de NO pourrait expliquer que l'association entre le score de mucus et ce paramètre ne soit significatif que chez les asthmatiques non-fumeurs (Fig. 29). Les marqueurs sanguins de l'inflammation de type 2, comme le nombre d'éosinophiles ou encore le taux d'IgE totales, ne sont pas corrélés au score de mucus dans ce travail.

Un rôle particulièrement prépondérant a été attribué aux éosinophiles dans la formation des bouchons de mucus dans les voies aériennes asthmatiques. En effet, en plus de la corrélation précédemment décrite, il a été proposé qu'une enzyme spécifique des éosinophiles, l'éosinophile peroxydase (EPO), pourrait participer à la formation des bouchons de mucus (99). La concentration de cette enzyme était plus élevée dans les expectorations de patients ayant un score de mucus élevé par rapport aux autres groupes. De plus, il a été démontré que l'EPO était capable d'oxyder les résidus thiols des groupements cystéines présents au sein des mucines. Cette oxydation aboutirait à une augmentation des propriétés visco-élastiques du mucus (99). Mis bout à bout, l'ensemble de ces arguments suggère un rôle crucial des éosinophiles dans la formation des bouchons de mucus chez les patients asthmatiques. Néanmoins, plusieurs arguments indiquent que les éosinophiles ne sont probablement pas les seuls facteurs impliqués dans la formation des bouchons de mucus.

Ces bouchons sont composés d'un amas de mucines, de cellules inflammatoires et de protéines (121). De nombreux travaux ont permis d'identifier l'inflammation de type 2, notamment via l'IL-13, comme étant un environnement inflammatoire favorisant la formation de bouchons de mucus via une augmentation de la production de mucus et une différenciation de l'épithélium respiratoire en cellules caliciformes (82). De plus, la possibilité de survenue de bouchons de mucus en absence d'inflammation éosinophilique bronchique a été démontrée in vivo sur un modèle murin (358). Ainsi, la production de mucus dépendante de l'activation des cellules Th2 en réponse à une stimulation allergénique est dépendante de la voie IL-4R mais pas des éosinophiles (358). Ces résultats in vivo suggèrent qu'en

absence d'une éosinophilie bronchique, l'inflammation de type 2 peut promouvoir la formation de bouchons de mucus. Cet environnement inflammatoire conduit à une modification quantitative de la production de mucines et à une modification qualitative de la composition du mucus avec une augmentation du ratio MUC5AC/MUC5B (90,95). Une modification qualitative de la composition du mucus, évaluée par une augmentation du ratio MUC5AC/MUC5, a été mise en évidence dans les expectorations du groupe de patients ayant un score de mucus élevé par rapport aux autres catégories de score de mucus (99). De façon intéressante, il a été montré que l'augmentation de ce ratio conduisait à attachement du mucus au collet des glandes sous muqueuses ce qui favoriserait la formation de bouchons de mucus et l'altération de la clearance muco-ciliaire (107). L'ensemble des travaux cités ci-dessus suggère une implication significative de l'inflammation de type 2 et des éosinophiles dans la formation des bouchons de mucus.

L'intérêt récent porté à l'étude de l'impact des bouchons de mucus dans les voies aériennes au cours des pathologies respiratoires chroniques a permis d'enrichir les connaissances relatives à ce phénomène. Ainsi, chez les patients BPCO tabagiques, le nombre de segments pulmonaires ayant au moins un bouchon de mucus, reflété par le score de mucus, n'est pas corrélé au pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations, mais au pourcentage de neutrophiles (121). De plus, chez les asthmatiques sévères, même en absence d'inflammation éosinophilique identifiée, 36 % des sujets présentent au moins un bouchon de mucus dans leurs poumons (122). Dans ce travail, grâce à l'inclusion de sujets asthmatiques tabagiques actifs ou sevrés, nous avons pu identifier une corrélation entre le pourcentage de neutrophiles dans les expectorations et le mucus score chez les asthmatiques tabagiques (Fig 29). Plusieurs arguments rendent plausible l'hypothèse de l'imputabilité d'une exposition à la cigarette dans cette association entre le score de mucus et le pourcentage de neutrophiles. Premièrement, la fumée de cigarette contient de nombreuses substances toxiques susceptibles d'augmenter la production de mucines par l'épithélium respiratoire. Cette exposition induit notamment une augmentation de la production de MUC5B au niveau des voies aériennes distales (106) ainsi qu'une augmentation de la production de MUC5AC, notamment via une exposition à l'acréoline (114). La production de MUC5AC par l'épithélium des voies aériennes respiratoires de sujets tabagiques est augmentée d'un facteur 18 par rapport à celle de l'épithélium de sujets non-fumeurs (359). La fumée de cigarette a également un impact sur de nombreux mécanismes associés au bon fonctionnement de l'escalator mucociliaire. On dénombre notamment une altération de la structure et de la fonction des cils épithéliaux bronchiques (360,361), une altération de la fonction du canal CFTR (362), une activation des récepteurs ErbB (363). L'ensemble de ces mécanismes aboutit à une inflammation locale, à une augmentation de la production de mucines, une déshydratation de la couche de mucus et un dysfonctionnement

de l'escalator muco-ciliaire. Ces processus favorisent la stase de mucus au niveau de l'épithélium respiratoire et probablement la formation de bouchons de mucus. L'exposition à la fumée de cigarette modifie également le recrutement cellulaire inflammatoire au niveau du lavage broncho-alvéolaire avec notamment une augmentation du recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages (364,365). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les mucines MUC5AC et MU5B peuvent subir des modifications post-transcriptionnelles pouvant affecter les propriétés physico-mécaniques du mucus. Les résidus thiols présents dans les groupements cystéines des mucines peuvent former des ponts disulfures. Ces liaisons inter-mucines augmentent le maillage réticulé du mucus aboutissant à une augmentation des propriétés viscoélastiques du mucus.

Dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose, il a été constaté que des niveaux élevés de ROS sont positivement et significativement corrélés avec à une augmentation de la concentration de cystéines oxydées ainsi qu'à un accroissement du module visqueux et élastique du mucus. Ces deux paramètres reflètent l'élasticité et la viscosité du mucus. Chez ces patients, la myéloperoxydase (MPO) a démontré sa capacité à former des liaisons disulfures entre les mucines et à conduire à une modification de la rhéologie du mucus (98). Chez les patients asthmatiques tabagiques ou ayant une inflammation bronchique neutrophilique, un mécanisme similaire est plausible.

De plus, les mucines possèdent des propriétés anti-oxydantes (366). L'asthme étant une pathologie associée à une augmentation du stress oxydatif des voies aériennes conductrices (367), les mucines pourraient participer à la régulation du stress oxydatif local en subissant des oxydations. D'autres facteurs physico-chimiques pourraient également influencer les propriétés rhéologiques d'un gel composé de MUC5AC. L'acidification du milieu et des concentrations plus élevées de sel dans un mucus composé de MUC5AC augmentent les modules élastiques et visqueux (368). L'ensemble de ces modifications pourrait aboutir à une modification des propriétés rhéologiques du mucus et favoriser la formation du bouchon de mucus.

Cette étude confirme l'association précédemment retrouvée entre l'inflammation de type 2 et la présence de bouchon de mucus dans les voies aériennes des asthmatiques non tabagiques. Ce travail est le premier à établir un lien entre le pourcentage de neutrophiles dans les expectorations et le score de mucus chez les patients asthmatiques ayant un antécédent de tabagisme.

Suite à la découverte récente du potentiel pro-inflammatoire des cristaux de Charcot-Leyden (CCL) (326,369), nous avons recherché à connaître leurs potentiels associations à la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes asthmatiques. Dans un premier temps, nous avons confirmé que la concentration de Galectin 10 dans les expectorations était un marqueur de l'inflammation de type 2 avec une association entre la concentration de

Galectin 10 et le % d'éosinophiles dans les expectorations et dans le sang. La corrélation mise en évidence entre le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations et la concentration de Gal10 était plus faible que celle précédemment publiée (ρ de Spearman = 0,58, $p=0.02$ vs 0,74, $p <0,001(330)$). Les raisons possibles pour expliquer cette discordance pourraient être secondaires à la méthodologie utilisée pour le dosage de la Gal10 dans les expectorations (kit ELISA différents) ou liés aux caractéristiques de la population incluse. En effet, notre cohorte incluait des patients asthmatiques tabagiques. L'externalisation de la protéine Gal10 est dépendante d'un processus de mort cellulaire spécifique (370). Hors, l'impact du tabagisme sur l'initiation de processus cellulaire n'est pas actuellement connu.

Concernant l'hypothèse formulée, la concentration de Galectin 10 dans les expectorations des patients asthmatiques n'est pas corrélée au score de mucus quel que soit le statut tabagique. Cette absence de corrélation n'exclue pas la participation des cristaux de Galectin 10 dans la formation des bouchons de mucus. En effet, dans les études *in vivo* et *in vitro*, la forme soluble de la Gal10 ne présentait pas d'effet pro-inflammatoire dans les modèles *in vivo*. Seule la forme cristalline induisait une réponse inflammatoire (326). Dans ce travail, la recherche spécifique de cristaux de Gal10 n'a pas été possible. Néanmoins, la formation de ces cristaux semble dépendante de la concentration de Gal10 libre (370). Ainsi, les patients ayant les concentrations les plus élevées auraient une probabilité plus élevée de présenter des cristaux de Gal10. La confirmation ou l'infirmité de la participation des CCL dans la formation des bouchons de mucus nécessitera des travaux dédiés pour rechercher spécifiquement la présence des cristaux dans les expectorations fraîches de patients, en évitant de traiter les expectorations par des agents réducteur (326). Une autre approche serait de rechercher les cristaux sur des biopsies bronchiques.

La principale force de cette étude est l'évaluation de l'impact du tabagisme sur la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes asthmatiques et son interaction avec les corrélations précédemment décrites. L'utilisation des outils et d'une méthodologie validée par les précédentes études sur le sujet permet une relative reproductibilité et comparabilité de nos résultats. Suivant un protocole d'analyse similaire aux études précédemment publiées, l'accord entre les évaluateurs pour l'établissement des scores de mucus était proche (Tableau 4). Les principales limites de ce travail sont liées à l'hétérogénéité du recueil des données compte tenu de la fusion de deux cohortes ainsi que les données manquantes. La période d'inclusion des patients allait d'avril 2008 à mars 2019 ce qui a pu induire un biais dans le profil des patients inclus.

	Subjects (n)	Initial agreement	Final agreement
Dunican's study	146	0.69	0.80 (95% CI 0.74 to 0.85)
Svenningsen's study	27	0.65	0.97 (95% CI: 0.92 to 0.99)
Current study	55	0.63	0.84

Tableau 4: Comparaison des coefficients de concordance inter-évaluateur de l'établissement des scores de mucus chez les patients asthmatiques.

En résumé, nos résultats confirment que la présence de bouchons de mucus dans les voies aériennes de patients asthmatiques est fréquente et est un marqueur de la sévérité de la pathologie. L'occlusion des voies aériennes par du mucus est associée à un syndrome obstructif plus sévère. Conformément aux études précédemment publiées (99,122), la présence de ces derniers est associée à une éosinophilie des voies aériennes et à l'inflammation de type 2 chez les sujets asthmatiques. La concentration de Galectin 10 dans les expectorations n'est pas corrélée au score de mucus quel que soit le sous-groupe de patients étudié. De façon intéressante, chez les patients asthmatiques tabagiques, le nombre d'occlusions de voies aériennes par un bouchon de mucus est corrélé au pourcentage de neutrophiles dans les expectorations. D'autres travaux prospectifs sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Les occlusions des voies aériennes au cours des maladies respiratoires chroniques doivent être considérées comme de potentielles cibles thérapeutiques ou comme marqueurs d'un phénotype spécifique pouvant guider le clinicien dans sa prise en charge thérapeutique. Ces points seront mis en perspectives dans la prochaine partie.

Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus dans cette thèse, tant dans le domaine fondamental que sur le plan clinique, m'incite à poursuivre les investigations pour approfondir ces résultats. Dans cette dernière partie, les perspectives de développement des résultats de ce travail et les futurs axes de recherche envisagés seront exposés.

Partie 1 : Poursuite des investigations concernant l'implication du récepteur NOD1 dans l'asthme

Ce projet a permis de mettre en évidence une réduction des paramètres allergiques asthmatiques induit par les acariens chez les souris Nod1^{-/-}. Cette atténuation de la réponse allergique asthmatique n'est pas liée à une modification de la flore digestive des souris Nod1^{-/-}. En revanche, les extraits d'acariens contiennent une flore microbienne, principalement composée de bacille gram négatif, susceptible d'activer directement le récepteur Nod1. Cette activation est liée à la reconnaissance par NOD1 de son ligand au niveau de l'épithélium des voies respiratoires. Cette reconnaissance participe à la potentialisation de la réponse allergique inflammatoire induite par les acariens.

Ces résultats incitent à évaluer le potentiel thérapeutique pré-clinique d'une inhibition de la voie de signalisation de NOD1 ainsi que d'éventuelles autres implications de NOD1 dans l'inflammation asthmatique.

Evaluation du potentiel thérapeutique d'un antagoniste de NOD1 sur la réponse allergique asthmatique aux acariens

Les résultats *in vitro* ont mis en évidence que l'inhibition de la protéine RIPK2 par un inhibiteur spécifique réduisait de façon partielle la réponse cytokinique inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques humaines induite par une stimulation avec des extraits d'acariens. La disponibilité d'un antagoniste de la RIPK2, nous a incité à évaluer le potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de RIPK2 dans notre modèle murin d'asthme. Ces expériences ont été conduites par le Dr. Simon Alvarez au sein du laboratoire. Dans un premier temps, sur des lignées cellulaires BEAS-2B et des cellules dendritiques de souris, les doses optimales d'inhibiteurs ont été évaluées. Les doses de 0.1 et 1mg/kg ont été sélectionnées pour leur capacité à réduire la synthèse cytokinique inflammatoire induite par les extraits d'acariens ainsi que leur profil de cytotoxicité (<5%).

Dans un premier temps, l'inhibiteur de RIP2K a été utilisé de façon préventive, par voie intranasale dès la phase de sensibilisation, 30 minutes avant l'exposition aux extraits d'acariens selon le protocole d'induction d'asthme usuel. La pré-exposition à un inhibiteur de la RIPK2

avant la stimulation allergénique réduit de façon significative l'hyper-réactivité des voies aériennes, le recrutement pulmonaire d'éosinophiles et de lymphocytes et la synthèse d'IgG1 spécifiques des acariens (Fig 31 A, B, D). Le traitement préventif local par inhibiteur de RIPK2 est également associé à une réduction de l'inflammation de type 2, de l'IL-33 et de chimiokines pro-inflammatoires (Fig 31.C). Ces résultats suggèrent un potentiel thérapeutique des inhibiteurs de RIPK2 dans la réponse allergique asthmatique. L'administration par voie systémique d'inhibiteur de RIPK2 n'a pas été évaluée. Cette voie d'administration requiert des concentrations de RIPK2 plus élevées qui sont potentiellement cytotoxiques.

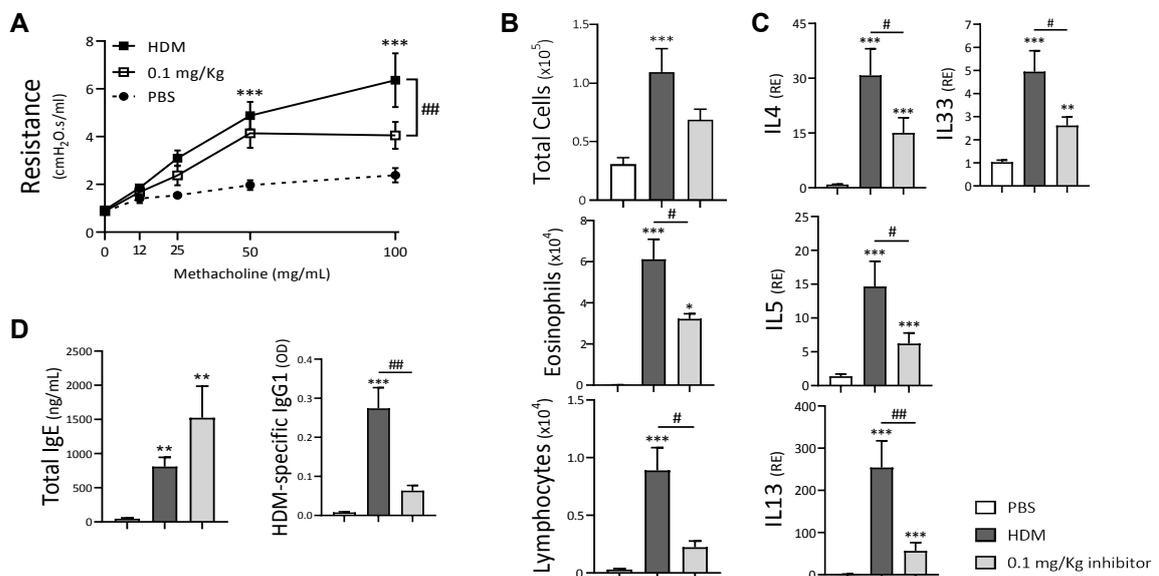


Figure 31: L'administration d'un inhibiteur spécifique de la RIPK2 pendant la phase d'initiation d'un asthme allergique aux acariens réduit l'inflammation pulmonaire, l'inflammation de type 2 et l'hyperréactivité des voies aériennes chez les souris traitées

- Réduction de l'hyper-réactivité des voies aériennes après administration d'un inhibiteur de RIP2K chez les souris exposées aux acariens comparativement aux souris ayant reçu des extraits d'acariens plus du PBS+DMSO
- Réduction significative du recrutement des polynucléaires éosinophiles et des lymphocytes dans le LBA de souris ayant reçu des extraits d'acariens + l'inhibiteur de RIPK2 par rapport aux acariens seuls.
- Réduction significative de l'inflammation de type 2 et de l'alarmine épithéliale IL-33 chez les souris ayant reçu des extraits d'acariens et l'inhibiteur de RIPK2 par rapport aux souris ayant reçu les acariens + le control
- L'association d'un inhibiteur de la RIPK2 à l'exposition aux acariens réduit la synthèse d'anticorps spécifiques anti-HDM

L'ensemble de ces expériences ont été réalisées par le Dr. Álvarez Simón (data non publiées)

Secondairement, une approche thérapeutique, c'est-à-dire l'administration de l'inhibiteur de la RIPK2 après la phase de sensibilisation à la dose de 0.1mg/kg a été réalisée. Cette stratégie réduisait de façon significative la réponse inflammatoire épithéliale (IL-33 et CCL17) et tendait à réduire l'hyper-réactivité des voies aériennes sans autres modifications des paramètres cardinaux asthmatiques (données non présentées). Ces données suggèrent

que, dans notre modèle, une approche inhibition locale de la RIPK2 réduit la réponse inflammatoire épithéliale.

L'analyse des extraits d'acariens utilisés dans notre laboratoire a révélé que le ligand de NOD1 contenu dans ces derniers était le M-TriDAP. Or, l'affinité de ce ligand pour son récepteur varie entre le récepteur Nod1 humain et murin. Pour une même concentration de ligand, l'activation de Nfkb est 3 ou 4 fois supérieure avec le récepteur humain par rapport à celui murin (371). Cette différence de réponse au MTriDAP nous a encouragé à évaluer les protocoles présentés ci-dessus sur un modèle murin de souris Nod1 humanisée *hnod1⁺/card4^{-/-}*. Des expériences préliminaires ont été réalisées sur ce modèle *in vivo*. Comme suspectée, la réponse allergique asthmatique était significativement augmentée chez les souris Nod1 humanisées comparativement aux souris Nod1 sauvages. De plus, après administration du traitement inhibiteur l'amplitude de la réduction du recrutement des cellules inflammatoires, de la réponse inflammatoire T2 était plus marquée chez les souris Nod1 *hnod1⁺/card4^{-/-}* comparativement aux souris NOD1 natives. Ces données cliniques suggèrent que les résultats *in vivo* obtenus dans notre modèle murin sauvage pourraient sous-estimer l'effet attendu chez les sujets asthmatiques humains. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confirmés par d'autres expériences indépendantes. Enfin, ces résultats prometteurs nécessitent la validation de ces observations sur des cellules primaires de patients asthmatiques afin de confirmer la pertinence clinique de ces travaux chez l'Homme.

Des études récentes ont révélé l'implication de NOD1 dans d'autres mécanismes cellulaires impliqués dans la pathologie humaine et potentiellement de façon indépendante de son ligand (372,373).

Implication du récepteur NOD1 dans la réponse au stress protéique dans l'asthme

Récemment, l'implication du récepteur NOD1 dans la réponse au stress protéique a été mise en évidence (372,373). La réponse au stress protéique ou (Unfolded protein response, UPR) est impliquée dans de nombreuses pathologies chez l'Homme comme le diabète de type II, la maladie de Crohn et l'Asthme.

L'UPR est une réponse adaptative permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire en réponse, ou non, à des agressions endogènes ou exogènes. L'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique conduit à un stress au niveau de cette organelle. Cette situation induit une série de mécanismes adaptatifs, la réponse au stress protéique ou UPR, visant à restaurer l'homéostasie cellulaire ou induire l'apoptose. Les trois principales voies de signalisations impliquées dans cette réponse sont des protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique : IRE1, PERK et ATF6. La voie IRE1 est composée de deux isoformes: IRE1a (ubiquitaire) et IRE1b (expression dans les épithéliums

bronchiques et digestifs). IRE1a est une protéine transmembranaire extrêmement conservée dans le monde animal. Son implication dans des pathologies humaines est maintenant démontrée (374). IRE1a possède une activité RNase qui excise l'ARNm de XBP1 et conduit à l'activation entre autre d'une réponse inflammatoire, une up-régulation des protéines chaperonnes et une activité Kinase qui va déclencher également une réponse inflammatoire (IL6) via TRAF2, via RIPK1 (IL6, TNF α) et via la voie Junk-AP1 (374).

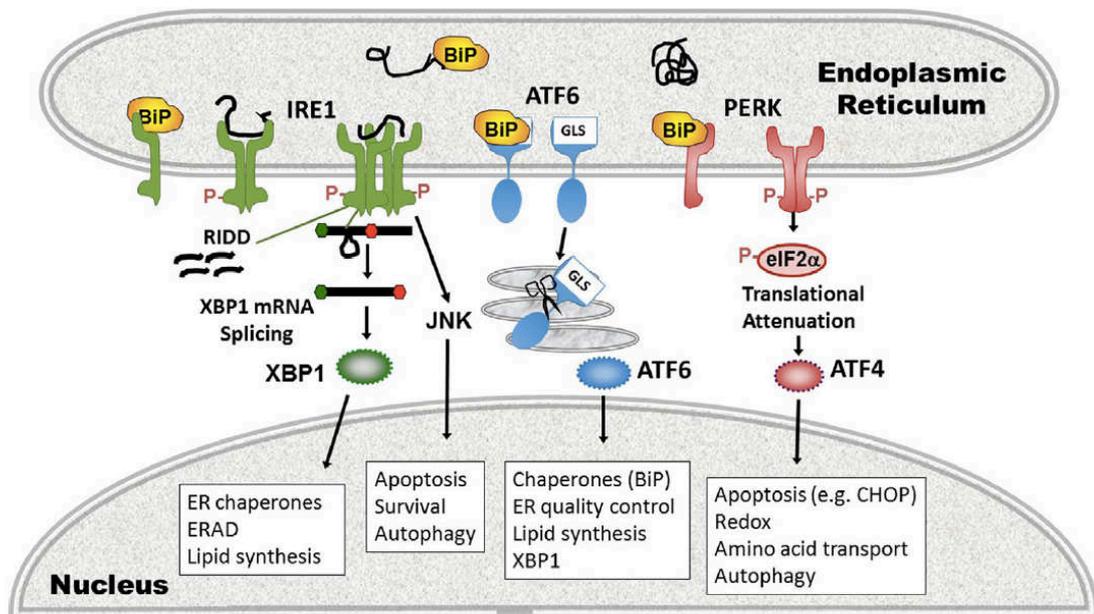


Figure 32 : Schéma représentatif des trois voies de la réponse au stress protéique (UPR).

1. La voie de l'enzyme 1 (IRE1) nécessitant de l'inositol (en vert à gauche), une endonucléase et une kinase double, se lie à la protéine de liaison des chaperons (BiP) à l'état monomère. Lorsqu'elle détecte une protéine dépliée ou mal repliée, IRE1 s'oligomérisse et s'auto-transphosphoryle (point rouge). L'activation de l'endonucléase épisse spécifiquement 26 nucléotides de l'ARNm XBP1, provoquant une mutation de type modification du cadre de lecture qui supprime un codon stop prématuré, permettant ainsi la traduction du facteur de transcription dans sa totalité. En cas d'augmentation du stress, la fonction endonucléase non spécifique clive les ARNm associés au réticulum endoplasmique (RE) dans un processus appelé désintégration régulée IRE1-dépendante (RIDD). Le domaine kinase d'IRE1 s'associe à d'autres partenaires de signalisation qui phosphorylent la Jun N-terminal kinase (JNK) et provoque la dégradation associée à l'ER appelé l'ERAD.
2. Voie du facteur de transcription activateur 6 (ATF6) (au milieu en bleu) : La libération de BiP par ATF6 découvre un signal de localisation du Golgi (GLS) permettant la translocation vers le Golgi. Là, il est clivé par les protéases Site-1 et Site-2 (ciseaux), libérant le facteur de transcription ATF6.
3. Voie de la protéine kinase R like endoplasmic reticulum kinase (PERK) (à droite, en rose) : en présence d'une protéine phosphorylée, PERK s'oligomérisse également et se transphosphoryle, activant ainsi son activité kinase. PERK phosphoryle à son tour la eIF2 α , ce qui entraîne une inhibition translationnelle globale transitoire, à l'exception de quelques ARNm spécifiques comme l'ATF4. L'ATF4 favorise la transcription du facteur de transcription C/EBB induisant l'apoptose. L'inducteur d'apoptose, la protéine homologue C/EBP (CHOP). Les processus cellulaires modifiés par les voies de l'UPR et les cibles génétiques clés qui sont des composants de l'UPR sont présentés dans des encadrés.

(Smith et coll., 2018)

Chez l'Homme, des études génomiques ont permis d'identifier une liaison moléculaire entre un gène codant pour une protéine impliquée dans l'UPR, Orosomucoid like 3 (ORMDL3) et l'asthme débutant dans l'enfance avec un taux d'IgE élevé (375), à l'asthme sévère et à l'exposition au tabagisme passif des enfants dans l'enfance (376). ORMDL3 régule la concentration de Ca²⁺ dans le réticulum endoplasmique via une inhibition de la pompe Ca²⁺ ATPase (SERCA). Cette inhibition conduit à une diminution de la concentration de Ca²⁺ dans le RE puis une diminution de la phosphorylation de eIF2a (Voie PERK) et une activation de l'UPR (377). L'implication de cette protéine dans la physiopathologie asthmatique a été démontrée dans l'asthme induit par l'Ovalbumine chez des souris ORMDL3 Zona Pellucida 3 Cre (hORMDL3zp3-Cre) sur-exprimant ce gène. La surexpression de ORMLD3 aboutit à une augmentation du remodelage des voies aériennes, une augmentation des cellules musculaires lisses des voies aériennes et de l'hyper-réactivité des voies aériennes. Ce phénotype est associé à l'induction de la branche ATF6 de l'UPR via le gène cible SERCA2b (378) sans activation significative de la voie PERK ou IRE1. L'expression de ce gène est inductible : après un challenge allergénique bronchique par *Alternaria*, son expression est augmentée 127 fois dans l'épithélium bronchique des souris challengées (379).

Keestra-Gounder et collègues ont démontré en 2016, que les récepteurs de l'immunité innée NOD1 et NOD2 étaient impliqués dans production de la cytokine pro-inflammatoire IL6 induite par la branche IRE1a de l'UPR. Cette étude a mis en évidence que l'induction d'un stress du RE, par un inducteur chimique de l'UPR : la Thapsigargin induit une production d'IL6 dépendante de la voie de signalisation NOD1-NOD2-RIP2K-TRAF2. La Thapsigargin est un inhibiteur de la SERCA conduisant à une activation globale de l'UPR. La production de la cytokine pro inflammatoire IL6 est réduite en présence d'un inhibiteur global de l'UPR : la TUDCA ou d'un inhibiteur spécifique de la branche l'IRE1a (KIRA6). Cette voie de production de l'IL6 est différente de la voie d'activation canonique du récepteur NOD1/2. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres agents chimiques comme le dithiothreitol (DTT) ou des pathogènes intracellulaires comme *Brucella abortus* and *Chlamydia muridarum* (372). Ainsi, NOD1 participe à la réponse inflammatoire induite par l'UPR indépendamment de la présence de son ligand bactérien en participant à l'initiation de la branche IRE1a de l'UPR (372).

Lors des travaux réalisés sur l'implication du récepteur NOD1 dans l'asthme allergique aux acariens, l'inflammation induite par les extraits d'acariens appauvris en peptidoglycanes était inférieure à celle obtenue par les extraits d'acariens natifs. Néanmoins, sur notre modèle in vitro d'activation du récepteur NOD1, une activation résiduelle, supérieure à celle des cellules contrôles était observée après exposition aux extraits d'acariens appauvris en peptidoglycanes. Cette activation persistante n'était pas liée à la présence du ligand

spécifique de NOD1 car son absence a été confirmée par spectrométrie de masse après déplétion. Cette activation résiduelle pourrait-être en partie liée à l'activation de l'UPR par la voie NOD1/NOD2-TRAF2-RIPK2 suite au stress protéique induit par les extraits d'acariens. L'ensemble des données précédemment présentées et nos résultats suggèrent que NOD1 pourrait être impliqué dans la réponse allergique asthmatique aux acariens de façon dépendante de sa stimulation par des peptidoglycanes contenus dans les extraits d'acariens mais également de façon indépendante en participant possiblement à l'activation de la branche IRE1a-TRAF2 de l'UPR au niveau de l'épithélium bronchique. Cette voie d'activation non canonique de NOD1 pourrait également être impliquée dans la réponse de la cellule bronchique à d'autres stimuli exogènes.

Néanmoins, cette activation de l'UPR dépendante de NOD1, en absence de son ligand, a récemment été remise en question dans une étude parue en 2019 (345). Les auteurs ont confirmé la production de cytokines pro-inflammatoires dépendante de NOD1 en réponse à un stress induit à la thapsigargin. Cette production de cytokines pro-inflammatoires était liée à des perturbations du calcium intra et extra cellulaire. L'activation de NOD1 par la thapsigargin était dépendante de l'endocytose et de l'addition de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture. Les auteurs ont proposé que les perturbations calciques intracellulaires induites par la thapsigargin pourraient conduire à une internalisation inappropriée des peptidoglycanes bactériens présents dans le sérum de veau fœtal contenu dans le milieu cellulaire. Cette internalisation conduirait à une activation de NOD1 par son ligand et à une réponse pro-inflammatoire. Cette proposition est également pertinente in vivo, car chez l'Homme, la présence de peptidoglycanes bactériens dans le sang à l'état basal a déjà été rapportée (380).

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une perturbation de l'homéostasie du calcium intracellulaire au niveau de l'épithélium bronchique, par exemple induite par la fumée de cigarette (CSE), pourrait conduire à une activation de NOD1 en réponse à l'internalisation de peptidoglycane présent dans le sang ou l'environnement et ainsi majorer la réponse inflammatoire et participer à la sévérité de l'asthme. Cette hypothèse pourrait apporter un mécanisme physiopathologique supplémentaire soutenant l'association entre le tabagisme passif au cours de la grossesse ou dans l'enfance et la survenue d'un asthme allergique dans l'enfance (381). Ces hypothèses pourront être évaluées dans notre laboratoire lors de travaux préliminaires en utilisant nos outils de cultures cellulaires. Dans un premier temps, et en accord avec nos résultats, le rôle du récepteur NOD1 dans la cellule épithéliale bronchique sera évalué. Les cellules bronchiques (BEAS-2B et cellules bronchiques primaires) seront stimulées par un agoniste de Nod1, avec et sans CSE. La réponse cytokinique sera évaluée. Une potentialisation de l'activation de Nod1 par les CSE est attendue. Un PPR de surface, comme le TLR-4, sera utilisé comme contrôle.

En résumé, les perspectives de l'implication du récepteur NOD1 dans l'asthme sont doubles. Premièrement, NOD1 pourrait constituer une potentielle nouvelle cible thérapeutique pour certains phénotypes asthmatiques. Deuxièmement, la mise en évidence de NOD1 dans la réponse au stress protéique conforterait notre connaissance de la physiopathologie asthmatique et permettrait de développer d'autres approches thérapeutiques.

Partie 2 : Impact fonctionnel des bouchons de mucus dans les voies aériennes des patients

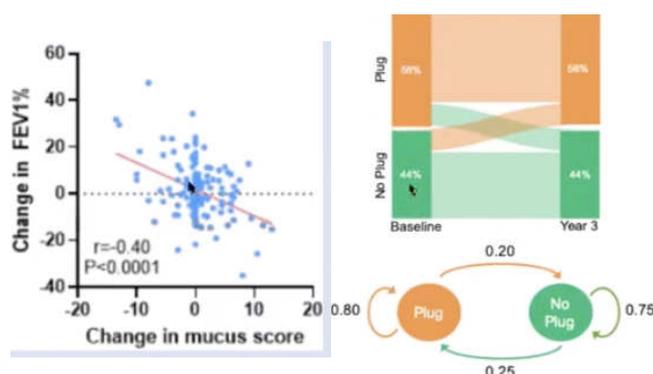
L'occlusion des voies aériennes par des bouchons de mucus est une caractéristique commune aux pathologies respiratoires bronchiques chroniques (382). Le développement du scanner thoracique à haute résolution et d'un score visuel semi-quantitatif a permis d'évaluer l'impact clinique des bouchons de mucus des voies aériennes dans l'asthme et la BPCO (99,121). Cette caractéristique phénotypique des maladies chroniques des voies aériennes représente un potentiel biomarqueur (124). Elle pourrait être utilisée comme une potentielle cible thérapeutique ou comme un marqueur prédictif de la réponse au traitement.

Cette première approche a déjà fait l'objet de réflexions. Dans les articles publiés dans l'asthme et utilisant le score de mucus, les auteurs présentaient les bouchons de mucus comme une potentielle cible thérapeutique accessible à un traitement mucolytique (99,122). Le rationnel mis en avant serait qu'une dissolution des bouchons de mucus permettrait une amélioration de la fonction respiratoire chez les sujets traités. Dans un cours dispensé à l'université de San Francisco, Dr Fahy a présenté des données non publiées relatives à cet axe de recherche. Premièrement, le lien entre le score de mucus et l'altération de la fonction respiratoire a été confirmé en révélant que pour un même patient, l'augmentation des bouchons de mucus était associée à une altération de la fonction respiratoire (Fig 33A). De plus, le pourcentage de patients présentant ou non des bouchons de mucus est stable au cours du temps (Fig 33B). Dans cette présentation, la possibilité de traiter ces bouchons via des mucolytiques a de nouveau été évoquée sans présentation de résultats. En revanche, les modalités pratiques de l'administration des mucolytiques ont été abordées avec notamment la nécessité d'adapter la durée du traitement mucolytique en fonction de la forme et du volume des expectorations. Même si cette approche thérapeutique est séduisante, il est probable qu'elle se heurtera à d'autres problématiques telles que la tolérance de l'inhalation des mucolytiques ou encore la persistance d'une obstruction bronchique secondaire à d'autres mécanismes associés à l'obstruction bronchique comme l'épaississement de la paroi des voies aériennes.

Figure 33: Les bouchons de mucus dans les voies aériennes sont stables au cours du temps et leur évolution est corrélée à la fonction respiratoire

- A. Corrélation entre la variation du score de mucus et une variation du VEMS
- B. Pourcentage d'asthmatiques dont la présence d'au moins un bouchon de mucus dans les voies aériennes change au cours d'une période de trois ans

Figure d'après un cours en ligne du Dr. Fahy pour l'université de Californie



Dans la cadre de la poursuite de ce travail sur l'impact fonctionnel des bouchons présent dans les voies aériennes, j'envisage de considérer la présence de ces occlusions de mucus comme des biomarqueurs spécifiques de la pathologie (124).

Chez les asthmatiques, ces bouchons de mucus sont majoritairement présents dans les phénotypes les plus sévères. Or, dans cette population, des traitements par anticorps monoclonaux sont disponibles. L'arsenal thérapeutique, actuellement disponible, comprend des anticorps anti-IgE (omalizumab), anti-IL5 (mepolizumab), anti-IL-5 récepteur (benralizumab), anti IL-4 (dupilumab) et bientôt l'anti-TSLP (tezepelumab). À l'heure actuelle, l'éligibilité à ces traitements repose sur des critères d'éligibilité biologique et l'expertise des réunions collégiales d'asthme. Néanmoins, la prédiction de l'évaluation de la réponse à ces thérapeutiques est complexe (383).

Le prochain axe de recherche que je souhaite mettre en place dans ce domaine serait d'évaluer la réponse clinique et fonctionnelle respiratoire aux biothérapies disponibles en fonction de la présence et du nombre de bouchons de mucus dans les voies aériennes lors du bilan initial d'asthme sévère. À terme, l'objectif de ce travail serait d'orienter le choix d'une biothérapie chez les patients asthmatiques sévères en s'appuyant sur les éléments clinico-biologiques déjà connus et éventuellement sur la présence d'occlusion des voies aériennes par des bouchons de mucus.

Un projet préliminaire de travail rétrospectif est actuellement en discussion dans le service d'immuno-allergologie du Pre. Chenivresse au Centre Hospitalier Universitaire de Lille. Dans ce centre, l'ensemble des patients asthmatiques sévères ont bénéficié d'un bilan complet comprenant des explorations fonctionnelles respiratoires et un TDM thoracique avant l'initiation d'une biothérapie. Les dossiers sont ensuite présentés en réunion collégiale d'asthme (RCA) avant mise en route d'une biothérapie.

Le projet est de mesurer le mucus score sur les scanners thoraciques initiaux avant la mise en route de la biothérapie. Ce scoring serait réalisé indépendamment du traitement reçu par

un évaluateur indépendant en aveugle. L'objectif serait d'évaluer la réponse clinique et fonctionnelle respiratoire après la mise sous biothérapie en fonction de la présence et/ou du nombre d'occlusions muqueuses des voies aériennes. Si les résultats préliminaires sont encourageants, des travaux prospectifs seront envisagés.

Bibliographie

1. Horak F, Doberer D, Eber E, Horak E, Pohl W, Riedler J, et al. Diagnosis and management of asthma - Statement on the 2015 GINA Guidelines. *Wien Klin Wochenschr.* 2016 Aug;128(15-16):541-54.
2. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017 Sep 16;390(10100):1211-59.
3. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr.* 2019;7:246.
4. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health.* 2012 Mar 19;12:204.
5. Ellwood P, Asher MI, Beasley R, Clayton TO, Stewart AW, ISAAC Steering Committee. The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005 Jan;9(1):10-6.
6. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J.* 1996 Apr;9(4):687-95.
7. Health, United States, 2005. Hyattsville,MD: National Center for Health Statistics, December 8, 2005:63. (Accessed October 30, 2006, at <http://www.cdc.gov/nchs/data/hus/hus05.pdf>.) (page 345.).
8. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet.* 2006 Aug 26;368(9537):733-43.
9. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *The Lancet.* 2018 Feb 24;391(10122):783-800.
10. Wang D, Xiao W, Ma D, Zhang Y, Wang Q, Wang C, et al. Cross-sectional epidemiological survey of asthma in Jinan, China. *Respirology.* 2013 Feb;18(2):313-22.
11. Leynaert B, Sunyer J, Garcia-Esteban R, Svanes C, Jarvis D, Cerveri I, et al. Gender differences in prevalence, diagnosis and incidence of allergic and non-allergic asthma: a population-based cohort. *Thorax.* 2012 Jul;67(7):625-31.
12. Barraclough R, Devereux G, Hendrick DJ, Stenton SC. Apparent but not real increase in asthma prevalence during the 1990s. *Eur Respir J.* 2002 Oct;20(4):826-33.
13. Downs SH, Marks GB, Sporik R, Belosouva EG, Car NG, Peat JK. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Arch Dis Child.* 2001 Jan;84(1):20-3.
14. von Mutius E, Weiland SK, Fritzsche C, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet.* 1998 Mar 21;351(9106):862-6.
15. Lee S-L, Wong W, Lau Y-L. Increasing prevalence of allergic rhinitis but not asthma among children in Hong Kong from 1995 to 2001 (Phase 3 International Study of Asthma and Allergies in Childhood). *Pediatr Allergy Immunol.* 2004 Feb;15(1):72-8.
16. Antonicelli L, Bucca C, Neri M, De Benedetto F, Sabbatani P, Bonifazi F, et al. Asthma severity and medical resource utilisation. *Eur Respir J.* 2004 May;23(5):723-9.
17. Loftus PA, Wise SK. Epidemiology and economic burden of asthma. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015 Sep;5 Suppl 1:S7-10.
18. Nurmagambetov T, Kuwahara R, Garbe P. The Economic Burden of Asthma in the

- United States, 2008-2013. *Ann Am Thorac Soc*. 2018 Mar;15(3):348–56.
19. Moore WC, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Ameredes BT, Bacharier L, et al. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;119(2):405–13.
 20. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014 Feb;43(2):343–73.
 21. Hyland ME, Whalley B, Jones RC, Masoli M. A qualitative study of the impact of severe asthma and its treatment showing that treatment burden is neglected in existing asthma assessment scales. *Qual Life Res*. 2015 Mar;24(3):631–9.
 22. Riviere S, Delmas M-C, Iwatsubo Y. [Asthma and socioeconomic characteristics in France in 2012]. *Rev Mal Respir*. 2018 Mar;35(3):287–94.
 23. Delmas M-C, Guignon N, Leynaert B, Moisy M, Marguet C, Fuhrman C. [Increase in asthma prevalence among young children in France]. *Rev Mal Respir*. 2017 May;34(5):525–34.
 24. Tual S, Godard P, Bousquet J, Annesi-Maesano I. The decrease in asthma-related mortality in France. *Rev Mal Respir*. 2010 Sep;27(7):e1-5.
 25. Gadenne S, Pribil C, Chouaid C, Vergnenegre A, Detournay B. [The costs of asthma in France and the economic implications of its level of control]. *Rev Mal Respir*. 2011 Apr;28(4):419–26.
 26. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 2006 Nov 23;355(21):2226–35.
 27. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005 Nov;26(5):948–68.
 28. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005 Aug;26(2):319–38.
 29. Plantier L, Beydon N, Chambellan A, Degano B, Delclaux C, Dewitte J-D, et al. [Guidelines for methacholine provocation testing]. *Rev Mal Respir*. 2018 Sep;35(7):759–75.
 30. Boulet L-P, Reddel HK, Bateman E, Pedersen S, FitzGerald JM, O'Byrne PM. The Global Initiative for Asthma (GINA): 25 years later. *Eur Respir J*. 2019;54(2).
 31. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000 Dec 23;356(9248):2144–8.
 32. Rackemann FM. A working classification of asthma. *Am J Med*. 1947 Nov;3(5):601–6.
 33. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006 Jan;11(1):54–61.
 34. Kuo C-HS, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, et al. A Transcriptome-driven Analysis of Epithelial Brushings and Bronchial Biopsies to Define Asthma Phenotypes in U-BIOPRED. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Feb 15;195(4):443–55.
 35. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):673–83.
 36. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):57–65.

37. 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*. 2014 Nov 15;190(10):1094–101.
38. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019 Jul 1;144(1):1–12.
39. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008 Sep 20;372(9643):1107–19.
40. Wu W, Bleecker E, Moore W, Busse WW, Castro M, Chung KF, et al. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1280–8.
41. Guida G, Riccio AM. Immune induction of airway remodeling. *Seminars in Immunology*. 2019 Dec 1;46:101346.
42. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):45–56.
43. Brightling CE, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID, Bradding P. Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003 Dec;33(12):1711–6.
44. Park J-A, Sharif AS, Tschumperlin DJ, Lau L, Limbrey R, Howarth P, et al. Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Dec;130(6):1375–83.
45. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The Cytokines of Asthma. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):975–91.
46. Voehringer D, Reese TA, Huang X, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1435–46.
47. Djukanović R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Aug;142(2):434–57.
48. Peebles RS, Aronica MA. Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Asthma. *Clin Chest Med*. 2019 Mar;40(1):29–50.
49. Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012 Jul;67(7):835–46.
50. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Sep 1;180(5):388–95.
51. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130(3):647–654.e10.
52. Pavlidis S, Takahashi K, Kwong FNK, Xie J, Hoda U, Sun K, et al. “T2-high” in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2020 Oct 7];53(1). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/53/1/1800938>
53. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Fibbens NL, Powell H, et al. Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Apr;133(4):997–1007.
54. Sánchez-Ovando S, Baines KJ, Barker D, Wark PA, Simpson JL. Six gene and TH2 signature expression in endobronchial biopsies of participants with asthma. *Immun Inflamm Dis*. 2020 Jan 5;8(1):40–9.
55. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TKA, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010

Apr 29;464(7293):1367–70.

56. Gabryelska A, Kuna P, Antczak A, Białasiewicz P, Panek M. IL-33 Mediated Inflammation in Chronic Respiratory Diseases-Understanding the Role of the Member of IL-1 Superfamily. *Front Immunol*. 2019;10:692.
57. Borish L. The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016 Aug;117(2):108–14.
58. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):1105–16.
59. Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, Drynan LF, Wong SH, Cruickshank JP, et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jan;129(1):191-198.e1-4.
60. Halim TYF, Krauss RH, Sun AC, Takei F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):451–63.
61. Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 2015 Mar;36(3):189–95.
62. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004 Feb 21;363(9409):608–15.
63. Jain VV, Perkins DL, Finn PW. Costimulation and allergic responses: immune and bioinformatic analyses. *Pharmacol Ther*. 2008 Mar;117(3):385–92.
64. Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol*. 2001 Jan;2(1):45–50.
65. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91:59–75.
66. Jacquet A. Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy*. 2013;2013:735031.
67. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):585–8.
68. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):412–24.
69. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2017 Jul;278(1):162–72.
70. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000 Dec;12(6):624–31.
71. Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH, Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 1986 Nov;78(5 Pt 1):825–32.
72. Diamant Z, Gauvreau GM, Cockcroft DW, Boulet L-P, Sterk PJ, de Jongh FHC, et al. Inhaled allergen bronchoprovocation tests. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1045-1055.e6.
73. Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Mar;12(3):254–9.
74. Hogan SP, Koskinen A, Foster PS. Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c

- mice. *Immunol Cell Biol.* 1997 Jun;75(3):284–8.
75. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998 Dec 18;282(5397):2258–61.
 76. Ledford DK, Lockey RF. Asthma and comorbidities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013 Feb;13(1):78–86.
 77. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 1999 Mar;54(3):268–72.
 78. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Dec;112(6 Suppl):S118-127.
 79. Redington AE. Fibrosis and airway remodelling. *Clin Exp Allergy.* 2000 Jun;30 Suppl 1:42–5.
 80. Bergeron C, Boulet L-P. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest.* 2006 Apr;129(4):1068–87.
 81. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Dec;120(6):1233–44; quiz 1245–6.
 82. Fahy JV. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest.* 2002 Dec;122(6 Suppl):320S-326S.
 83. Bourdin A, Neveu D, Vachier I, Paganin F, Godard P, Chanez P. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1367–74.
 84. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990 Nov;3(5):507–11.
 85. Karjalainen EM, Lindqvist A, Laitinen LA, Kava T, Altraja A, Halme M, et al. Airway inflammation and basement membrane tenascin in newly diagnosed atopic and nonatopic asthma. *Respir Med.* 2003 Sep;97(9):1045–51.
 86. Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, Richter A, Lackie P, Lordan J, et al. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J Suppl.* 2003 Sep;44:24s–9s.
 87. Joubert P, Hamid Q. Role of airway smooth muscle in airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Sep;116(3):713–6.
 88. Siddiqui S, Sutcliffe A, Shikotra A, Woodman L, Doe C, McKenna S, et al. Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Oct;120(4):813–9.
 89. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S39-45.
 90. Fahy JV, Dickey BF. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med.* 2010 Dec 2;363(23):2233–47.
 91. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodeling in asthma. *Trends Immunol.* 2004 Sep;25(9):477–82.
 92. Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2007 Jul;85(5):348–56.
 93. Hudey SN, Ledford DK, Cardet JC. Mechanisms of non-type 2 asthma. *Curr Opin Immunol.* 2020 Oct;66:123–8.
 94. O'Reilly R, Ullmann N, Irving S, Bossley CJ, Sonnappa S, Zhu J, et al. Increased airway smooth muscle in preschool wheezers who have asthma at school age. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Apr;131(4):1024–32, 1032.e1-16.
 95. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *CHEST.* 2018 Jul

1;154(1):169–76.

96. Dunican EM, Watchorn DC, Fahy JV. Autopsy and Imaging Studies of Mucus in Asthma. Lessons Learned about Disease Mechanisms and the Role of Mucus in Airflow Obstruction. *Ann Am Thorac Soc*. 2018;15(Suppl 3):S184–91.
97. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res*. 2018 Jul;52(7):751–62.
98. Yuan S, Hollinger M, Lachowicz-Scroggins ME, Kerr SC, Dunican EM, Daniel BM, et al. Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 25;7(276):276ra27.
99. Dunican EM, Elicker BM, Gierada DS, Nagle SK, Schiebler ML, Newell JD, et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J Clin Invest*. 2018 01;128(3):997–1009.
100. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*. 2006 Jan;86(1):245–78.
101. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J*. 2002 Feb 1;361(Pt 3):537–46.
102. Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, et al. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Oct;31(4):382–94.
103. Young HWJ, Williams OW, Chandra D, Bellinghausen LK, Pérez G, Suárez A, et al. Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Sep;37(3):273–90.
104. Zhu Y, Ehre C, Abdullah LH, Sheehan JK, Roy M, Evans CM, et al. Munc13-2/- baseline secretion defect reveals source of oligomeric mucins in mouse airways. *J Physiol*. 2008 Apr 1;586(7):1977–92.
105. Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelium and the genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Nov;25(5):542–53.
106. Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Day AJ, Forteza RM. Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Mar;40(3):277–85.
107. Bonser LR, Zlock L, Finkbeiner W, Erle DJ. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma. *J Clin Invest*. 2016 01;126(6):2367–71.
108. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, Dunican EM, Yu M, Carrington SD, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Nov 15;194(10):1296–9.
109. Zhen G, Park SW, Nguyenvu LT, Rodriguez MW, Barbeau R, Paquet AC, et al. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Feb;36(2):244–53.
110. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):885–9.
111. Curran DR, Cohn L. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Mar;42(3):268–75.
112. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult

- murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Apr;32(4):311–8.
113. Holtzman MJ, Byers DE, Benoit LA, Battaile JT, You Y, Agapov E, et al. Immune pathways for translating viral infection into chronic airway disease. *Adv Immunol*. 2009;102:245–76.
114. Deshmukh HS, Shaver C, Case LM, Dietsch M, Wesselkamper SC, Hardie WD, et al. Acrolein-activated matrix metalloproteinase 9 contributes to persistent mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Apr;38(4):446–54.
115. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Feb 27;61(2):75–85.
116. Innes AL, Carrington SD, Thornton DJ, Kirkham S, Rousseau K, Dougherty RH, et al. Ex vivo sputum analysis reveals impairment of protease-dependent mucus degradation by plasma proteins in acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Aug 1;180(3):203–10.
117. Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol*. 1960 Jan;13:27–33.
118. Kuyper LM, Paré PD, Hogg JC, Lambert RK, Ionescu D, Woods R, et al. Characterization of airway plugging in fatal asthma. *Am J Med*. 2003 Jul;115(1):6–11.
119. Sheehan JK, Richardson PS, Fung DC, Howard M, Thornton DJ. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma: a detailed study from a patient who died in status asthmaticus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Dec;13(6):748–56.
120. Perry SF, Purohit AM, Boser S, Mitchell I, Green FH. Bronchial casts of human lungs using negative pressure injection. *Exp Lung Res*. 2000 Feb;26(1):27–39.
121. Dunican EM, Elicker BM, Henry T, Gierada DS, Schiebler ML, Anderson W, et al. Mucus Plugs and Emphysema in the Pathophysiology of Airflow Obstruction and Hypoxemia in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Nov 12;
122. Svenningsen S, Haider E, Boylan C, Mukherjee M, Eddy RL, Capaldi DPI, et al. CT and Functional MRI to Evaluate Airway Mucus in Severe Asthma. *CHEST*. 2019 Jun 1;155(6):1178–89.
123. Brightling CE, Gupta S, Gonem S, Siddiqui S. Lung damage and airway remodelling in severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2012 May;42(5):638–49.
124. Chassagnon G, Burgel P-R. Mucus Plugs in Medium-sized Airways: A Novel Imaging Biomarker for Phenotyping Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Apr 15;203(8):932–4.
125. Tsafaras GP, Ntontsi P, Xanthou G. Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Front Pediatr*. 2020;8:5.
126. Bachus H, Kaur K, Papillion AM, Marquez-Lago TT, Yu Z, Ballesteros-Tato A, et al. Impaired Tumor-Necrosis-Factor- α -driven Dendritic Cell Activation Limits Lipopolysaccharide-Induced Protection from Allergic Inflammation in Infants. *Immunity*. 2019 Jan 15;50(1):225–240.e4.
127. Thyssen AH, Waage J, Larsen JM, Rasmussen MA, Stokholm J, Chawes B, et al. Distinct immune phenotypes in infants developing asthma during childhood. *Sci Transl Med*. 2020 Feb 5;12(529).
128. von Mutius E, Smits HH. Primary prevention of asthma: from risk and protective factors to targeted strategies for prevention. *Lancet*. 2020 Sep 19;396(10254):854–66.
129. Kurz T, Ober C. The role of environmental tobacco smoke in genetic susceptibility to asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;4(5):335–9.
130. Sbihi H, Boutin RC, Cutler C, Suen M, Finlay BB, Turvey SE. Thinking bigger: How early-life environmental exposures shape the gut microbiome and influence the development of asthma and allergic disease. *Allergy*. 2019 Nov;74(11):2103–15.

131. Shrine N, Portelli MA, John C, Soler Artigas M, Bennett N, Hall R, et al. Moderate-to-severe asthma in individuals of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2019 Jan;7(1):20–34.
132. Smit L a. M, Bouzigon E, Pin I, Siroux V, Monier F, Aschard H, et al. 17q21 variants modify the association between early respiratory infections and asthma. *Eur Respir J*. 2010 Jul;36(1):57–64.
133. Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, Genuneit J, Cookson WOCM, Braun-Fahrländer C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011 Feb 24;364(8):701–9.
134. Garcia-Marcos L, Robertson CF, Ross Anderson H, Ellwood P, Williams HC, Wong GW, et al. Does migration affect asthma, rhinoconjunctivitis and eczema prevalence? Global findings from the international study of asthma and allergies in childhood. *Int J Epidemiol*. 2014 Dec;43(6):1846–54.
135. von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Mar;137(3):680–9.
136. Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, Genuneit J, Cookson WOCM, Braun-Fahrländer C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011 Feb 24;364(8):701–9.
137. Loss GJ, Depner M, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvärinen A, et al. The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Apr 15;193(8):889–97.
138. Illi S, Depner M, Genuneit J, Horak E, Loss G, Strunz-Lehner C, et al. Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments—the GABRIEL Advanced Studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jun;129(6):1470-1477.e6.
139. Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Ublagger E, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;117(4):817–23.
140. Loss G, Bitter S, Wohlgensinger J, Frei R, Roduit C, Genuneit J, et al. Prenatal and early-life exposures alter expression of innate immunity genes: the PASTURE cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Aug;130(2):523-530.e9.
141. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):411–21.
142. Conrad ML, Ferstl R, Teich R, Brand S, Blümer N, Yildirim AO, et al. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):2869–77.
143. Ver Heul A, Planer J, Kau AL. The Human Microbiota and Asthma. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019 Dec;57(3):350–63.
144. Heydenreich B, Bellinghausen I, König B, Becker W-M, Grabbe S, Petersen A, et al. Gram-positive bacteria on grass pollen exhibit adjuvant activity inducing inflammatory T cell responses. *Clin Exp Allergy*. 2012 Jan;42(1):76–84.
145. Ross MA, Curtis L, Scheff PA, Hryhorczuk DO, Ramakrishnan V, Wadden RA, et al. Association of asthma symptoms and severity with indoor bioaerosols. *Allergy*. 2000 Aug;55(8):705–11.
146. Tang HHF, Teo SM, Sly PD, Holt PG, Inouye M. The intersect of genetics, environment, and microbiota in asthma—perspectives and challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021 Mar 1;147(3):781–93.
147. Kirjavainen PV, Karvonen AM, Adams RI, Täubel M, Roponen M, Tuoresmäki P, et al. Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma

- development. *Nat Med*. 2019 Jul;25(7):1089–95.
148. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJF, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Dec 1;190(11):1283–92.
149. Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, Mortensen M, Brejnrod A, Bønnelykke K, et al. Infant airway microbiota and topical immune perturbations in the origins of childhood asthma. *Nat Commun*. 2019 01;10(1):5001.
150. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*. 2010 Jan 5;5(1):e8578.
151. Taylor SL, Leong LEX, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, Upham JW, et al. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jan;141(1):94-103.e15.
152. Goleva E, Jackson LP, Harris JK, Robertson CE, Sutherland ER, Hall CF, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Nov 15;188(10):1193–201.
153. Marsland BJ, Trompette A, Gollwitzer ES. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 Nov;12 Suppl 2:S150-156.
154. Kamada N, Kao JY. The tuning of the gut nervous system by commensal microbiota. *Gastroenterology*. 2013 Dec;145(6):1193–6.
155. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559–63.
156. Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Apr;38(4):629–33.
157. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*. 2007 Nov;62(11):1223–36.
158. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):690–703.
159. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 May 9;486(7402):222–7.
160. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med*. 2015 Sep 30;7(307):307ra152.
161. Murk W, Risnes KR, Bracken MB. Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: a systematic review. *Pediatrics*. 2011 Jun;127(6):1125–38.
162. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001 Apr 7;357(9262):1076–9.
163. Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, Wold AE, Strachan DP, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jan;121(1):129–34.
164. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1578–93.
165. Herbst T, Sichelstiel A, Schär C, Yadava K, Bürki K, Cahenzli J, et al. Dysregulation

of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Jul 15;184(2):198–205.

166. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science.* 2012 Apr 27;336(6080):489–93.

167. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 2012 May;13(5):440–7.

168. Kim Y-G, Udayanga KGS, Totsuka N, Weinberg JB, Núñez G, Shibuya A. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE₂. *Cell Host Microbe.* 2014 Jan 15;15(1):95–102.

169. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, Blay FD, Rojas DHF de, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2015 Jul 1;136(1):38–48.

170. Sánchez-Borges M, Fernandez-Caldas E, Thomas WR, Chapman MD, Lee BW, Caraballo L, et al. International consensus (ICON) on: clinical consequences of mite hypersensitivity, a global problem. *World Allergy Organ J.* 2017;10(1):14.

171. Abu Khweek A, Kim E, Joldrichsen MR, Amer AO, Boyaka PN. Insights Into Mucosal Innate Immune Responses in House Dust Mite-Mediated Allergic Asthma. *Front Immunol.* 2020;11:534501.

172. Kupczyk M, Kupryś I, Górski P, Kuna P. Aspirin intolerance and allergy to house dust mites: important factors associated with development of severe asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004 Apr;92(4):453–8.

173. Miyamoto T, Oshima S, Ishizaki T, Sato SH. Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. *J Allergy.* 1968 Jul;42(1):14–28.

174. Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TA. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature.* 1981 Feb 12;289(5798):592–3.

175. Miller JD. The Role of Dust Mites in Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019 Dec;57(3):312–29.

176. Arlian LG, Morgan MS, Neal JS. Dust mite allergens: ecology and distribution. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002 Sep;2(5):401–11.

177. Murray AB, Ferguson AC, Morrison BJ. Sensitization to house dust mites in different climatic areas. *J Allergy Clin Immunol.* 1985 Jul;76(1):108–12.

178. Leaderer BP, Belanger K, Triche E, Holford T, Gold DR, Kim Y, et al. Dust mite, cockroach, cat, and dog allergen concentrations in homes of asthmatic children in the northeastern United States: impact of socioeconomic factors and population density. *Environ Health Perspect.* 2002 Apr;110(4):419–25.

179. Abbott J, Cameron J, Taylor B. House dust mite counts in different types of mattresses, sheepskins and carpets, and a comparison of brushing and vacuuming collection methods. *Clin Allergy.* 1981 Nov;11(6):589–95.

180. Garrett MH, Hooper BM, Hooper MA. Indoor environmental factors associated with house-dust-mite allergen (Der p 1) levels in south-eastern Australian houses. *Allergy.* 1998 Nov;53(11):1060–5.

181. Charpin D, Birnbaum J, Haddi E, Genard G, Lanteaume A, Toumi M, et al. Altitude and allergy to house-dust mites. A paradigm of the influence of environmental exposure on allergic sensitization. *Am Rev Respir Dis.* 1991 May;143(5 Pt 1):983–6.

182. Woodfolk JA, Commins SP, Schuyler AJ, Erwin EA, Platts-Mills TAE. Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses? *Allergol Int.* 2015

Oct;64(4):295–303.

183. de Blay F, Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TA. Airborne dust mite allergens: comparison of group II allergens with group I mite allergen and cat-allergen Fel d I. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Dec;88(6):919–26.
184. Allergen Search Results [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <http://www.allergen.org/search.php?allergenname=Derf&searchname=Search>
185. Trian T, Allard B, Dupin I, Carvalho G, Ousova O, Maurat E, et al. House dust mites induce proliferation of severe asthmatic smooth muscle cells via an epithelium-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Mar 1;191(5):538–46.
186. Sweerus K, Lachowicz-Scroggins M, Gordon E, LaFemina M, Huang X, Parikh M, et al. Claudin-18 deficiency is associated with airway epithelial barrier dysfunction and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jan;139(1):72-81.e1.
187. Chan T-F, Ji K-M, Yim AK-Y, Liu X-Y, Zhou J-W, Li R-Q, et al. The draft genome, transcriptome, and microbiome of *Dermatophagoides farinae* reveal a broad spectrum of dust mite allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Feb;135(2):539–48.
188. Wan H, Winton HL, Soeller C, Gruenert DC, Thompson PJ, Cannell MB, et al. Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy*. 2000 May;30(5):685–98.
189. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(1):123–33.
190. Henriquez OA, Den Beste K, Hoddeson EK, Parkos CA, Nusrat A, Wise SK. House dust mite allergen Der p 1 effects on sinonasal epithelial tight junctions. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013 Aug;3(8):630–5.
191. Post S, Nawijn MC, Hackett TL, Baranowska M, Gras R, van Oosterhout AJM, et al. The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation. *Thorax*. 2012 Jun;67(6):488–95.
192. Aubier M, Thabut G, Hamidi F, Guillou N, Brard J, Dombret M-C, et al. Airway smooth muscle enlargement is associated with protease-activated receptor 2/ligand overexpression in patients with difficult-to-control severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Sep;138(3):729-739.e11.
193. Ichikawa S, Takai T, Yashiki T, Takahashi S, Okumura K, Ogawa H, et al. Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. *Genes Cells*. 2009 Sep;14(9):1055–65.
194. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1777–82.
195. Lee CG. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. *Yonsei Med J*. 2009 Feb 28;50(1):22–30.
196. El Kebir D, József L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):4386–94.
197. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med*. 2009 Apr;15(4):410–6.
198. Valerio CR, Murray P, Arlian LG, Slater JE. Bacterial 16S ribosomal DNA in house dust mite cultures. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Dec;116(6):1296–300.
199. Lee J, Kim JY, Yi M-H, Hwang Y, Lee I-Y, Nam S-H, et al. Comparative microbiome

- analysis of *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Tyrophagus putrescentiae*. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(4):1620–3.
200. Turvey SE, Broide DH. Chapter 2: Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24–32.
201. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
202. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020 Mar 19;180(6):1044–66.
203. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428–35.
204. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805–20.
205. Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018 Sep 28;18(11):63.
206. Anders HJ. A Toll for lupus. *Lupus*. 2005;14(6):417–22.
207. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599–603.
208. Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels. *Physiol Rev*. 2015 Jan;95(1):149–78.
209. Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci*. 2000 May;25(5):223–4.
210. Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):285–7.
211. Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell*. 1993 Oct 8;75(1):135–46.
212. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):318–25.
213. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229–65.
214. Imamura R, Wang Y, Kinoshita T, Suzuki M, Noda T, Sagara J, et al. Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. *J Immunol*. 2010 May 15;184(10):5874–84.
215. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J*. 2004 Apr 7;23(7):1587–97.
216. Girardin SE, Jéhanno M, Mengin-Lecreux D, Sansonetti PJ, Alzari PM, Philpott DJ. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem*. 2005 Nov 18;280(46):38648–56.
217. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 2003 Jul;4(7):702–7.
218. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LAM, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003 Jun 6;300(5625):1584–7.
219. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is

- a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):8869–72.
220. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278(8):5509–12.
221. Hrdinka M, Schlicher L, Dai B, Pinkas DM, Bufton JC, Picaud S, et al. Small molecule inhibitors reveal an indispensable scaffolding role of RIPK2 in NOD2 signaling. *EMBO J.* 2018 Sep 3;37(17).
222. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):4812–8.
223. Park J-H, Kim Y-G, McDonald C, Kanneganti T-D, Hasegawa M, Body-Malapel M, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol.* 2007 Feb 15;178(4):2380–6.
224. Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun.* 2004 Mar;72(3):1487–95.
225. Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity.* 2014 Dec 18;41(6):898–908.
226. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jan;14(1):9–23.
227. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity.* 2007 Apr;26(4):445–59.
228. Cañas M-A, Fábrega M-J, Giménez R, Badia J, Baldomà L. Outer Membrane Vesicles From Probiotic and Commensal *Escherichia coli* Activate NOD1-Mediated Immune Responses in Intestinal Epithelial Cells. *Front Microbiol.* 2018;9:498.
229. Park J-H, Kim Y-G, Shaw M, Kanneganti T-D, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):514–21.
230. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreux D, Caroff M, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol.* 2005 Aug;35(8):2459–70.
231. Park SY, Jing X, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition protein 1 enhances experimental asthma by promoting Th2 and Th17 and limiting regulatory T cell and plasmacytoid dendritic cell responses. *J Immunol.* 2013 Apr 1;190(7):3480–92.
232. Wong CK, Hu S, Leung KM-L, Dong J, He L, Chu YJ, et al. NOD-like receptors mediated activation of eosinophils interacting with bronchial epithelial cells: a link between innate immunity and allergic asthma. *Cell Mol Immunol.* 2013 Jul;10(4):317–29.
233. Kim Y-G, Park J-H, Reimer T, Baker DP, Kawai T, Kumar H, et al. Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host Microbe.* 2011 Jun 16;9(6):496–507.
234. Takahashi Y, Isuzugawa K, Murase Y, Imai M, Yamamoto S, Iizuka M, et al. Up-regulation of NOD1 and NOD2 through TLR4 and TNF-alpha in LPS-treated murine macrophages. *J Vet Med Sci.* 2006 May;68(5):471–8.
235. Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 2018 Feb;107(4):455–71.

236. Opitz B, Förster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomphila pneumoniae*. *Circ Res*. 2005 Feb 18;96(3):319–26.
237. Opitz B, Püschel A, Beermann W, Hocke AC, Förster S, Schmeck B, et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):484–90.
238. Boneca IG, Dussurget O, Cabanes D, Nahori M-A, Sousa S, Lecuit M, et al. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 16;104(3):997–1002.
239. Le Bourhis L, Magalhaes JG, Selvanantham T, Travassos LH, Geddes K, Fritz JH, et al. Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during *Salmonella* pathogenicity island 1-independent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun*. 2009 Oct;77(10):4480–6.
240. Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonatat C, Dietel S, et al. *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol*. 2007 Mar;9(3):694–707.
241. Cigana C, Curcurù L, Leone MR, Ieranò T, Lorè NI, Bianconi I, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS One*. 2009 Dec 23;4(12):e8439.
242. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1166–74.
243. Mayer C, Kluj RM, Mühleck M, Walter A, Unsleber S, Hottmann I, et al. Bacteria's different ways to recycle their own cell wall. *Int J Med Microbiol*. 2019 Nov;309(7):151326.
244. Park JT, Uehara T. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 Jun;72(2):211–27, table of contents.
245. Irazoki O, Hernandez SB, Cava F. Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 Mar 28 [cited 2020 Nov 2];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6448482/>
246. Lee J, Tattoli I, Wojtal KA, Vavricka SR, Philpott DJ, Girardin SE. pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J Biol Chem*. 2009 Aug 28;284(35):23818–29.
247. Iyer JK, Coggeshall KM. Cutting edge: primary innate immune cells respond efficiently to polymeric peptidoglycan, but not to peptidoglycan monomers. *J Immunol*. 2011 Apr 1;186(7):3841–5.
248. Swaan PW, Bensman T, Bahadduri PM, Hall MW, Sarkar A, Bao S, et al. Bacterial peptide recognition and immune activation facilitated by human peptide transporter PEPT2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Nov;39(5):536–42.
249. Takano M, Takeuchi T, Kuriyama S, Yumoto R. Role of peptide transporter 2 and MAPK signaling pathways in the innate immune response induced by bacterial peptides in alveolar epithelial cells. *Life Sci*. 2019 Jul 15;229:173–9.
250. Hu Y, Song F, Jiang H, Nuñez G, Smith DE. SLC15A2 and SLC15A4 Mediate the Transport of Bacterially Derived Di/Tripeptides To Enhance the Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Dependent Immune Response in Mouse Bone Marrow-Derived

- Macrophages. *J Immunol.* 2018 Jul 15;201(2):652–62.
251. Ismail MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreulx D, Girardin SE. hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Dec;84(12):1313–9.
252. Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, et al. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5):1401–9.
253. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Jan;17(1):13–24.
254. Kaparakis M, Turnbull L, Carneiro L, Firth S, Coleman HA, Parkington HC, et al. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2010 Mar;12(3):372–85.
255. Travassos LH, Carneiro LAM, Girardin SE, Boneca IG, Lemos R, Bozza MT, et al. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2005 Nov 4;280(44):36714–8.
256. Zilbauer M, Dorrell N, Elmi A, Lindley KJ, Schüller S, Jones HE, et al. A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol.* 2007 Oct;9(10):2404–16.
257. Bist P, Dikshit N, Koh TH, Mortellaro A, Tan TT, Sukumaran B. The Nod1, Nod2, and Rip2 axis contributes to host immune defense against intracellular *Acinetobacter baumannii* infection. *Infect Immun.* 2014 Mar;82(3):1112–22.
258. Watanabe T, Asano N, Kitani A, Fuss IJ, Chiba T, Strober W. Activation of type I IFN signaling by NOD1 mediates mucosal host defense against *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes.* 2011;2(1):61–5.
259. Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2001 Aug;2(8):736–42.
260. Hasegawa M, Yamazaki T, Kamada N, Tawaratsumida K, Kim Y-G, Núñez G, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J Immunol.* 2011 Apr 15;186(8):4872–80.
261. Silva GK, Gutierrez FRS, Guedes PMM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TWP, et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1148–52.
262. Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, Botwin GJ, Hugot J-P, Karin M, et al. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12873–8.
263. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):731–4.
264. Shaw MH, Reimer T, Sánchez-Valdepeñas C, Warner N, Kim Y-G, Fresno M, et al. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol.* 2009 Dec;10(12):1267–74.
265. Loving CL, Osorio M, Kim Y-G, Nuñez G, Hughes MA, Merkel TJ. Nod1/Nod2-Mediated Recognition Plays a Critical Role in Induction of Adaptive Immunity to Anthrax

- after Aerosol Exposure. *Infect Immun*. 2009 Oct;77(10):4529–37.
266. Geddes K, Rubino S, Streutker C, Cho JH, Magalhaes JG, Bourhis LL, et al. Nod1 and Nod2 Regulation of Inflammation in the Salmonella Colitis Model. *Infection and Immunity*. 2010 Dec 1;78(12):5107–15.
267. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):55–62.
268. Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol*. 2009 Oct;10(10):1073–80.
269. Philpott DJ, Yamaoka S, Israël A, Sansonetti PJ. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):903–14.
270. Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S, et al. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med*. 2006 Jan 23;203(1):203–13.
271. Uehara A, Fujimoto Y, Kawasaki A, Kusumoto S, Fukase K, Takada H. Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1796–804.
272. Welter-Stahl L, Ojcius DM, Viala J, Girardin S, Liu W, Delarbre C, et al. Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol*. 2006 Jun;8(6):1047–57.
273. Werts C, le Bourhis L, Liu J, Magalhaes JG, Carneiro LA, Fritz JH, et al. Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol*. 2007 Sep;37(9):2499–508.
274. Bérubé J, Bourdon C, Yao Y, Rousseau S. Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal*. 2009 Mar;21(3):mat.
275. Miller MH, Shehat MG, Alcedo KP, Spinel LP, Soulakova J, Tigno-Aranjuez JT. Frontline Science: RIP2 promotes house dust mite-induced allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol*. 2018;104(3):447–59.
276. Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park J-H, Ewings KE, Bowie AG, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):11637–48.
277. Grubman A, Kaparakis M, Viala J, Allison C, Badea L, Karrar A, et al. The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. *Cell Microbiol*. 2010 May 1;12(5):626–39.
278. Tada H, Aiba S, Shibata K-I, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7967–76.
279. Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, Takada H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol*. 2007 May;44(12):3100–11.
280. Pashenkov MV, Popilyuk SF, Alkhazova BI, L'vov VL, Murugin VV, Fedenko ES, et al. Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2010 Aug;10(8):875–82.
281. Pashenkov MV, Murugina NE, Budikhina AS, Pinegin BV. Synergistic interactions

between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J Leukoc Biol.* 2019 Apr;105(4):669–80.

282. Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, et al. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock.* 2001 Sep;16(3):178–82.

283. Tukhvatulin AI, Gitlin II, Shcheblyakov DV, Artemicheva NM, Burdelya LG, Shmarov MM, et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2013 Oct;81(10):3855–64.

284. Tukhvatulin AI, Dzharullaeva AS, Tukhvatulina NM, Shcheblyakov DV, Shmarov MM, Dolzhikova IV, et al. Powerful Complex Immunoadjuvant Based on Synergistic Effect of Combined TLR4 and NOD2 Activation Significantly Enhances Magnitude of Humoral and Cellular Adaptive Immune Responses. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155650.

285. Kim HJ, Yang JS, Woo SS, Kim SK, Yun C-H, Kim KK, et al. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 2007 Apr;81(4):983–9.

286. Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol Cell Biol.* 2007 Sep;27(17):6012–25.

287. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):987–95.

288. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):731–4.

289. Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, Selvanantham T, et al. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol.* 2008 Dec 1;181(11):7925–35.

290. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677–86.

291. Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation.* 2003 Jun;10(3–4):247–57.

292. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008 Jun 19;453(7198):1051–7.

293. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):837–48.

294. Noverr MC, Huffnagle GB. The “microflora hypothesis” of allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 2005 Dec;35(12):1511–20.

295. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn’s disease in German and British populations. *Lancet.* 2001 Jun 16;357(9272):1925–8.

296. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn’s disease. *Lancet.* 2017 Apr 29;389(10080):1741–55.

297. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature.* 2008 Nov 27;456(7221):507–10.

298. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1658–64.
299. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 2008 Jul;57(7):903–10.
300. Shanahan MT, Carroll IM, Grossniklaus E, White A, von Furstenberg RJ, Barner R, et al. Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut*. 2014 Jun;63(6):903–10.
301. Robertson SJ, Zhou JY, Geddes K, Rubino SJ, Cho JH, Girardin SE, et al. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes*. 2013 Jun;4(3):222–31.
302. Turpin W, Espin-Garcia O, Xu W, Silverberg MS, Kevans D, Smith MI, et al. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nat Genet*. 2016 Nov;48(11):1413–7.
303. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):228–31.
304. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr 1;14(7):935–41.
305. Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Novak N, Baurecht H-J, et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jul;116(1):177–84.
306. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy*. 2006 Sep;61(9):1117–24.
307. Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2020 Aug 1;396(10247):345–60.
308. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002 Jun 21;296(5576):2225–9.
309. Belhaj R, Kaabachi W, Khalfallah I, Hamdi B, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Gene Variants, mRNA and NOD1/2 Protein Levels in Tunisian Childhood Asthma. *Lung*. 2019 Jun;197(3):377–85.
310. Bogefors J, Rydberg C, Uddman R, Fransson M, Månsson A, Benson M, et al. Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? *Allergy*. 2010 Oct;65(10):1222–6.
311. Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Dec;128(6):1165–74.
312. Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A, et al. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy*. 2005 Jul;35(7):866–72.
313. Ait Yahia S, Azzaoui I, Everaere L, Vorng H, Chenivesse C, Marquillies P, et al. CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 15;189(8):899–908.
314. Duan W, Mehta AK, Magalhaes JG, Ziegler SF, Dong C, Philpott DJ, et al. Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Dec;126(6):1284–1293.e10.
315. Tigno-Aranjuez JT, Asara JM, Abbott DW. Inhibition of RIP2's tyrosine kinase

- activity limits NOD2-driven cytokine responses. *Genes Dev.* 2010 Dec 1;24(23):2666–77.
316. Tran LS, Tran D, De Paoli A, D’Costa K, Creed SJ, Ng GZ, et al. NOD1 is required for *Helicobacter pylori* induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2018 May;20(5):e12826.
317. Everaere L, Ait-Yahia S, Molendi-Coste O, Vorng H, Quemener S, LeVu P, et al. Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Nov;138(5):1309-1318.e11.
318. Kim Y-G, Park J-H, Reimer T, Baker DP, Kawai T, Kumar H, et al. Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host Microbe.* 2011 Jun 16;9(6):496–507.
319. Yao X, Gao M, Dai C, Meyer KS, Chen J, Keeran KJ, et al. Peptidoglycan recognition protein 1 promotes house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 Dec;49(6):902–11.
320. Banskar S, Detzner AA, Juarez-Rodriguez MD, Hozo I, Gupta D, Dziarski R. The Pglyrp1-Regulated Microbiome Enhances Experimental Allergic Asthma. *J Immunol.* 2019 15;203(12):3113–25.
321. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1645–51.
322. Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, et al. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J Immunol.* 1993 Jan 15;150(2):456–68.
323. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem.* 2014 Jun 20;289(25):17406–15.
324. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood.* 2007 Sep 1;110(5):1550–8.
325. Noh S, Jin S, Park CO, Lee YS, Lee N, Lee J, et al. Elevated Galectin-10 Expression of IL-22-Producing T Cells in Patients with Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2016 Jan;136(1):328–31.
326. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, Gevaert E, Aegerter H, Percier J-M, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science.* 2019 24;364(6442).
327. Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, Saito H, Honda K, Fukuchi M, et al. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood.* 2018 15;132(20):2183–7.
328. Ueki S, Melo RCN, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood.* 2013 Mar 14;121(11):2074–83.
329. Chua JC, Douglass JA, Gillman A, O’Hehir RE, Meeusen EN. Galectin-10, a potential biomarker of eosinophilic airway inflammation. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e42549.
330. Nyenhuis SM, Alumkal P, Du J, Maybruck BT, Vinicky M, Ackerman SJ. Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 is a surrogate biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthma. *Biomark Med.* 2019;13(9):715–24.
331. Rodríguez-Alcázar JF, Ataíde MA, Engels G, Schmitt-Mabmunyo C, Garbi N, Kastenmüller W, et al. Charcot-Leyden Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome and Cause IL-1 β Inflammation in Human Macrophages. *J Immunol.* 2019 15;202(2):550–8.
332. Smith BM, Traboulsi H, Austin JHM, Manichaikul A, Hoffman EA, Blecker ER, et

- al. Human airway branch variation and chronic obstructive pulmonary disease. *PNAS*. 2018 Jan 30;115(5):E974–81.
333. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):544–9.
334. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):45-51.e1-4.
335. Julius SM, Sherman JM, Hendeles L. Accuracy of three electronic monitors for metered-dose inhalers. *Chest*. 2002 Mar;121(3):871–6.
336. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec;162(6):2341–51.
337. Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF, Hendeles L, Boulet LP, Wei LX, et al. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *Eur Respir J*. 1999 Jul;14(1):12–8.
338. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 1;184(5):602–15.
339. Mellado M, Martín de Ana A, Gómez L, Martínez C, Rodríguez-Frade JM. Chemokine receptor 2 blockade prevents asthma in a cynomolgus monkey model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Feb;324(2):769–75.
340. Tang VH, Stewart GA, Chang BJ. House dust mites possess a polymorphic, single domain putative peptidoglycan d,l endopeptidase belonging to the NlpC/P60 Superfamily. *FEBS Open Bio*. 2015;5:813–23.
341. Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Döring F, Daniel H, Fischer A. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol*. 2001 Feb;158(2):707–14.
342. Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, Marsland BJ. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*. 2011 Sep;66(9):755–63.
343. Kim T-H, Park Y-M, Ryu S-W, Kim D-J, Park J-H, Park J-H. Receptor Interacting Protein 2 (RIP2) Is Dispensable for OVA-Induced Airway Inflammation in Mice. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014 Mar;6(2):163–8.
344. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med*. 2015 Sep 30;7(307):307ra152.
345. Molinaro R, Mukherjee T, Flick R, Philpott DJ, Girardin SE. Trace levels of peptidoglycan in serum underlie the NOD-dependent cytokine response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2019 31;294(22):9007–15.
346. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011 Sep;32(9):402–11.
347. Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, Bakker AJ, Eidne KA, Thompson PJ, et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4572–8.
348. Lu M, Munford R. LPS stimulates IgM production in vivo without help from non-B cells. *Innate Immun*. 2016 Jul;22(5):307–15.
349. Zähringer U, Lindner B, Knirel YA, van den Akker WMR, Hiestand R, Heine H, et al.

- Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem*. 2004 May 14;279(20):21046–54.
350. Huang Z, Wang J, Xu X, Wang H, Qiao Y, Chu WC, et al. Antibody neutralization of microbiota-derived circulating peptidoglycan dampens inflammation and ameliorates autoimmunity. *Nat Microbiol*. 2019 May;4(5):766–73.
351. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Dec 3;1:15076.
352. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003 Oct;22(4):672–88.
353. Okajima Y, Come CE, Nardelli P, Sonavane SK, Yen A, Nath HP, et al. Luminal Plugging on Chest CT Scan: Association With Lung Function, Quality of Life, and COPD Clinical Phenotypes. *Chest*. 2020 Feb 1;
354. Cohen L, E X, Tarsi J, Ramkumar T, Horiuchi TK, Cochran R, et al. Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jul 15;176(2):138–45.
355. Aysola RS, Hoffman EA, Gierada D, Wenzel S, Cook-Granroth J, Tarsi J, et al. Airway remodeling measured by multidetector CT is increased in severe asthma and correlates with pathology. *Chest*. 2008 Dec;134(6):1183–91.
356. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J*. 2004 Nov;24(5):822–33.
357. McSharry CP, McKay IC, Chaudhuri R, Livingston E, Fraser I, Thomson NC. Short and long-term effects of cigarette smoking independently influence exhaled nitric oxide concentration in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005 Jul 1;116(1):88–93.
358. Cohn L, Homer RJ, MacLeod H, Mohrs M, Brombacher F, Bottomly K. Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4Ralpha, but not on eosinophils. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):6178–83.
359. Groiss S, Somvilla I, Daxböck C, Fuchs J, Lang-Olip I, Stiegler P, et al. Quantification of increased MUC5AC expression in airway mucus of smoker using an automated image-based approach. *Microsc Res Tech*. 2021 Jul 20;
360. Verra F, Escudier E, Lebargy F, Bernaudin JF, De Crémoux H, Bignon J. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Mar;151(3 Pt 1):630–4.
361. Tamashiro E, Xiong G, Anselmo-Lima WT, Kreindler JL, Palmer JN, Cohen NA. Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis. *Am J Rhinol Allergy*. 2009 Apr;23(2):117–22.
362. Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, Ellis L, Dupuis A, Liao J, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 15;173(10):1139–44.
363. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel PR, Dao-Pick T, Ueki IF, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Jan;280(1):L165-172.
364. Burke WM, Roberts CM, Bryant DH, Cairns D, Yeates M, Morgan GW, et al. Smoking-induced changes in epithelial lining fluid volume, cell density and protein. *Eur Respir J*. 1992 Jul;5(7):780–4.
365. Costabel U, Guzman J. Effect of smoking on bronchoalveolar lavage constituents. *Eur Respir J*. 1992 Jul;5(7):776–9.
366. Lillehoj EP, Kato K, Lu W, Kim KC. Cellular and molecular biology of airway mucins. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;303:139–202.

367. Cienciewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. OXIDANTS AND THE PATHOGENESIS OF LUNG DISEASES. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):456–70.
368. Wagner CE, Turner BS, Rubinstein M, McKinley GH, Ribbeck K. A rheological study of the association and dynamics of MUC5AC gels. *Biomacromolecules*. 2017 Nov 13;18(11):3654–64.
369. Rodríguez-Alcázar JF, Ataíde MA, Engels G, Schmitt-Mabmunyo C, Garbi N, Kastenmüller W, et al. Charcot-Leyden Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome and Cause IL-1 β Inflammation in Human Macrophages. *J Immunol*. 2019 15;202(2):550–8.
370. Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, Saito H, Honda K, Fukuchi M, et al. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood*. 2018 Nov 15;132(20):2183–7.
371. Magalhaes JG, Philpott DJ, Nahori M-A, Jéhanno M, Fritz J, Le Bourhis L, et al. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep*. 2005 Dec;6(12):1201–7.
372. Keestra-Gounder AM, Byndloss MX, Seyffert N, Young BM, Chávez-Arroyo A, Tsai AY, et al. NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature*. 2016 Apr;532(7599):394.
373. Keestra-Gounder AM, Tsolis RM. NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing. *Trends in Immunology*. 2017 Oct;38(10):758–67.
374. Junjappa RP, Patil P, Bhattarai KR, Kim H-R, Chae H-J. IRE1 α Implications in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Development and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 7];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01289/full>
375. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):470–3.
376. Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier M-H, Boland A, Bousquet J, et al. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N Engl J Med*. 2008 Nov 6;359(19):1985–94.
377. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, Valverde MA, Vicente R. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Hum Mol Genet*. 2010 Jan 1;19(1):111–21.
378. Miller M, Rosenthal P, Beppu A, Mueller JL, Hoffman HM, Tam AB, et al. ORMDL3 transgenic mice have increased airway remodeling and airway responsiveness characteristic of asthma. *J Immunol*. 2014 Apr 15;192(8):3475–87.
379. Miller M, Tam AB, Cho JY, Doherty TA, Pham A, Khorram N, et al. ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Oct 9;109(41):16648–53.
380. Xu X-L, Lee RTH, Fang H-M, Wang Y-M, Li R, Zou H, et al. Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. *Cell Host Microbe*. 2008 Jul 17;4(1):28–39.
381. Murrison LB, Brandt EB, Myers JB, Hershey GKK. Environmental exposures and mechanisms in allergy and asthma development. *J Clin Invest*. 2019 Apr 1;129(4):1504–15.
382. Boucher RC. Muco-Obstructive Lung Diseases. *N Engl J Med*. 2019 May 16;380(20):1941–53.
383. Bakakos A, Rovina N, Bakakos P. Treatment Challenges in Severe Eosinophilic Asthma: Differential Response to Anti-IL-5 and Anti-IL-5R Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 12;22(8):3969.

Annexes :

Publications

- Ait Yahia S*, Audousset C*, Alvarez-Simon D*, Vorng H, Marquillies P, Delacre M, Rifflet A, Gomperts Boneca I, Chamaillard M, Tsicopoulos A. House dust mite-derived microbiota promotes allergic airway disease through innate receptor Nod1 sensing. 2019, in preparation. (*co-first authors)
- Everaere, L. Ait Yahia S, Bouté M, Audousset C, Chenivesse C, Tsicopoulos A, Innate lymphoid cells at the interface between obesity and asthma. 2018. Immunology, 153: 21-30.
- Mélodie Bouté, Saliha Ait Yahia, Julie Nanou, Daniel Alvarez Simon, Camille Audousset, Han Vorng, Joanne Balsamelli, Fan Ying, Philippe Marquillies, Elisabeth Werkmeister, Patricia de Nadai, Cécile Chenivesse, and Anne Tsicopoulos. Aryl hydrocarbon receptor regulates airway remodeling and bronchus-associated lymphoid tissue in neutrophilic airway inflammation. July 2020.
- Camille Audousset¹, Toby McGovern¹, James G. Martin ¹. Role of Nrf2 in Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches – Pulmonary Disease/Asthma – Under review-, Août 2021.

Communications

- Audousset C. Time course of pulmonary hyperinflation in adult cystic fibrosis: clinical and lung function correlates. European Cystic Fibrosis Society, Belgrade, June 6-9, 2018. (Poster).
- S. Ait Yahia*, C. Audousset*, D. Alvarez-Simon*, H. Vorng, P. Marquillies, M. Delacre, Aline Rifflet, Ivo Gomperts Boneca, M. Chamaillard and A. Tsicopoulos Implication of NOD-1 receptor in an experimental house dust mite induced asthma model. Allergy Research Today, Paris, April 16, 2019. Oral Communication.* First co-authors, presenter (Poster + présentation orale).
- S. Ait Yahia*, C. Audousset*, D. Alvarez-Simon*, H. Vorng, P. Marquillies, M. Delacre, Aline Rifflet, Ivo Gomperts Boneca, M. Chamaillard and A. Tsicopoulos Implication of NOD-1 receptor in direct activation of reporter epithelial cells by house dust mite. Journée de Recherche en Allergologie (Poster)

NOD1 sensing of house dust mite-derived microbiota promotes allergic experimental asthma



Saliha Ait Yahia, PhD,^{a,*} Camille Audousset, MD,^{a,*} Daniel Alvarez-Simon, PhD,^{a,*} Han Vornig, BSc,^a Dieudonné Togbe, PhD,^b Philippe Marquillies, BSc,^a Myriam Delacre, BSc,^a Stéphanie Rose, BSc,^b Hélène Bouscayrol, MD,^b Aline Rifflet, PhD,^{c,d,e} Valérie Quesniaux, PhD,^b Ivo Gomperts Boneca, PhD,^{c,d,e} Mathias Chamillard, PhD,^a and Anne Tscicopoulos, MD^a *Lille, Orléans, and Paris, France*

Background: Asthma severity has been linked to exposure to gram-negative bacteria from the environment that are recognized by NOD1 receptor and are present in house dust mite (HDM) extracts. NOD1 polymorphism has been associated with asthma. **Objective:** We sought to evaluate whether either host or HDM-derived microbiota may contribute to NOD1-dependent disease severity.

Methods: A model of HDM-induced experimental asthma was used and the effect of NOD1 deficiency was evaluated.

Contribution of host microbiota was evaluated by fecal transplantation. Contribution of HDM-derived microbiota was assessed by 16S ribosomal RNA sequencing, mass spectrometry analysis, and peptidoglycan depletion of the extracts.

Results: In this model, loss of the bacterial sensor NOD1 and its adaptor RIPK2 improved asthma features. Such inhibitory effect was not related to dysbiosis caused by NOD1 deficiency, as shown by fecal transplantation of *Nod1*-deficient microbiota to wild-type germ-free mice. The 16S ribosomal RNA gene sequencing and mass spectrometry analysis of HDM allergen, revealed the presence of some muropeptides from gram-negative bacteria that belong to the Bartonellaceae family. While such HDM-associated

muropeptides were found to activate NOD1 signaling in epithelial cells, peptidoglycan-depleted HDM had a decreased ability to instigate asthma *in vivo*.

Conclusions: These data show that NOD1-dependent sensing of HDM-associated gram-negative bacteria aggravates the severity of experimental asthma, suggesting that inhibiting the NOD1 signaling pathway may be a therapeutic approach to treating asthma. (*J Allergy Clin Immunol* 2021;148:394-406.)

Key words: Asthma, allergy, house dust mite, *T_H2* cells, NOD1, peptidoglycan, epithelial cells, microbiota

An increasing body of evidence from clinical and experimental studies suggests that microbiota encompass a wide range of dynamic microbial communities that play a significant role in host immunity including protecting against asthma. Besides the putative effect of the respiratory microbiota in asthma,¹⁻³ intestinal dysbiosis appears to also play an important role.^{4,5} Accordingly, host immune responses are *T_H2*-biased under germ-free (GF) conditions⁶ and antibiotic-treated or GF animal models of allergen-induced asthma exhibit an exacerbated phenotype in either neonates^{7,8} or adults.⁹ However, much less attention has been paid to the microbiota derived from house dust mite (HDM), which is the most frequent cause of allergic asthma, although analysis of HDM extracts has revealed the presence of gram-negative bacteria that may likely arise from their intestines.^{10,11} Although it is well established that viral infections are involved in 40% to 85% of asthma exacerbations,¹² a link has been established between adult asthma severity and exposure to indoor gram-negative bacteria.¹³ Unique muropeptides from the peptidoglycan (PG) of such bacteria are sensed by the pattern recognition receptors NOD1^{14,15} and NOD2, each receptor recognizing distinct PG structures. While NOD1 recognizes meso-diaminopimelic containing muramyl tripeptide, NOD2 recognizes muramyl dipeptide (MDP).¹⁶ Both receptors signal via the downstream adaptor RIPK2, which then activates mitogen-activated protein kinase and the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. Of note, NOD1-mediated sensing of the gut microbiota participates in the development of lymphoid tissues, while its absence results in dysbiosis.¹⁷ Additionally, genome-wide association studies have revealed a molecular link among polymorphisms of NOD1, asthma, and high levels of IgE.¹⁸ In agreement, we have previously shown that a NOD1 agonist used as a systemic adjuvant exacerbates ovalbumin (OVA)-induced *T_H2*-mediated allergic asthma through dendritic cell activation,¹⁹ and a recent article²⁰ has shown that RIPK2

From ^athe University of Lille, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019–Unité Mixte de Recherche (UMR) 9017–Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, ^bthe Laboratory of Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR 7355 CNRS–Universitaire de Orléans, France; ^cInstitut Pasteur, Unité Biologie et Génétique de la Paroi Bactérienne; ^dthe CNRS, UMR 2001; and ^ethe Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Équipe Avenir, Paris.

*These authors equally contributed to the work.

Supported by grants from Projets Transversaux de Recherche (18-16) from Institut Pasteur (to A.T., M.C., and I.G.B.), by Agence Nationale de Recherche 18-CE14-0020 (to A.T., M.C., and I.G.B.), and by CNRS of Orléans (France) and European funding in Region Centre-Val de Loire (Fonds Européens de Développement Régional no. 2016-00110366 BIO-TARGET and EX005756 BIO-TARGET II). A.R. was supported by Investissement d’Avenir program, Laboratoire d’Excellence “Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases” (ANR-10-LABX-62-IBEID).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication July 1, 2020; revised October 27, 2020; accepted for publication December 28, 2020.

Available online January 25, 2021.

Corresponding author: Anne Tscicopoulos, MD, Center for Infection and Immunity of Lille, U1019 Pulmonary Immunity, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. E-mail: anne.tscicopoulos@pasteur-lille.fr.

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

0091-6749/\$36.00

© 2021 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.12.649>

Abbreviations used

BAL:	Bronchoalveolar lavage
FM:	Fecal microbiota
GF:	Germ-free
h:	Human
HDM:	House dust mite
HEK:	Human embryonic kidney
IR:	Index of reactivity
m:	Mouse
MDP:	Muramyl dipeptide
NF- κ B:	nuclear factor- κ B
NHBE:	Normal human bronchial epithelial
OVA:	ovalbumin
PEPT:	Peptide transporter
PG:	Peptidoglycan
siRNA:	Small, interfering RNA
WT:	Wild type

promotes HDM-induced allergic airway inflammation by favoring type 2 immunity. The aim of this study was to evaluate whether either host or HDM-derived microbiota may contribute to NOD1-dependent disease severity. Here we provide evidence that NOD1-dependent sensing of muropeptides from gram-negative bacteria present in HDM extracts exacerbate the severity of allergic airway inflammation, independently of the control by NOD1 of the composition of the gut microbiota from its host. These data identify a new mechanism of asthma aggravation linking HDM-derived microbiota and NOD1 and suggest that interfering with NOD1 signaling pathway may provide a therapeutic approach in this cumbersome disease, as well as for exacerbations of asthma driven by gram-negative bacteria.

METHODS

Reagents

Key reagents used are listed in [Table E1](#) in this article's Online Repository (available at www.jacionline.org).

Mice

Wild-type (WT) female C57BL/6 mice (6 weeks of age) were purchased from Charles River (Wilmington, Mass). *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-}, and *Ripk2*^{-/-} mice were backcrossed on the C57BL/6 background at least 8 times. All animals were housed under specific pathogen-free conditions, in ventilated cages with absorbent bedding material, maintained on a 12-hour daylight cycle and with free access to commercial pelleted food and water *ad libitum*. GF mice were housed in flexible isolators. All animal experiments were approved by the regional ethical committee and authorized by the ministry of research and innovation (Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques no. 7874-2016070417344442 v3), and the animals' care was in accordance with institutional guidelines. For fecal transplantation, fresh fecal pellets from untreated WT or *Nod1*^{-/-} female mice were resuspended in 1 mL of sterile PBS, and GF mice were reconstituted by oral gavage with 200 μ L of the suspension. The remaining homogenate was kept frozen and analyzed for the status of fecal colonization.

HDM-induced allergic airway inflammation and treatment of extracts

HDM mice were sensitized intranasally with Dermatophagoides farinae extract kindly provided by Stallergenes/Greer (lot 9702026) at a high dose

of 5 index of reactivity (5IR) (ie, 15 μ g protein/40 μ L of PBS) or a lower dose of 1IR (ie, 3 μ g protein/40 μ L) in order to have a strong and a moderate model of allergic inflammation, respectively. Control mice received 40 μ L of PBS. Seven days after sensitization, mice were challenged intranasally with 40 μ L of HDM or PBS daily for 5 consecutive days. Forty-eight hours later, mice were anesthetized, assessed for airway hyperresponsiveness, and sacrificed ([Fig 1, A](#)). For some experiments, HDM extracts were depleted in LPSs or in PG (see this article's Online Repository at www.jacionline.org). For all conditions, airway hyperresponsiveness and lung inflammation were assessed. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluids were recovered. Lung samples were collected for protein extraction, RNA isolation, and histology analysis.

Airway responsiveness measurement

Mice were anesthetized with 0.5 mg/kg medetomidine (Domitor; Pfizer, Brooklyn, NY) and ketamine (Imalgene 1000; Merial, Duluth, Ga) and immediately intubated with an 18-gauge catheter, followed by mechanical ventilation using the FlexiVent (SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada). Mice were exposed to nebulized PBS followed by increasing concentrations of nebulized methacholine (0-100 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) using an ultrasonic nebulizer (Aeroneb; Aerogen, Mountain View, Calif). Return to baseline resistance was ensured prior to the administration of the next doses of methacholine. The mean value of measured resistances was calculated for each dose.

BAL analysis

A total volume of 1 mL of ice-cold PBS was used to gently wash the lungs. Cells from the lavage fluid were recovered by centrifugation at 135g for 5 minutes at 4°C. Cells were then resuspended in PBS and counted. Samples of this resuspended BAL were spun onto slides (Shandon Cytospin 4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass) and stained with May-Grünwald Giemsa (DiaPath, Martinengo, Italy) for differential cell count.

Serum collection and analysis

Blood was drawn from the abdominal vein. Serum was collected by centrifugation (5000g for 5 minutes) and stored at -20°C. Levels of total IgE and D farinae-specific IgG₁ were measured in collected sera by ELISA as indicated in the [Online Repository](#).

Pulmonary histology

The left lobe of the lung from each mouse was fixed in Antigenfix (DiaPath) and embedded in paraffin (Histowax; HistoLab, Askim, Sweden) according to the manufacturer's indications. Lung sections of 5 μ m were stained with a standard hematoxylin and eosin stain and periodic acid-Schiff staining kit (DiaPath) to evaluate the peribronchial inflammation and mucopolysaccharide staining for mucus, respectively.

Lung protein extracts

Lung lobe was homogenized in 1 mL of T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) buffer containing protease inhibitors (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). After 10 minutes on ice, the lysates were centrifuged at 13,000g for 5 minutes at 4°C and supernatants were collected for further cytokine and chemokine measurements. Total protein concentrations of lung extracts were measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Human cell lines and primary human epithelial cells

Human embryonic kidney HEK293, human bronchial epithelium BEAS-2B, and human alveolar epithelial A549 cell lines, as well as normal human bronchial epithelial (NHBE) cells were cultured as indicated in the [Online Repository](#).

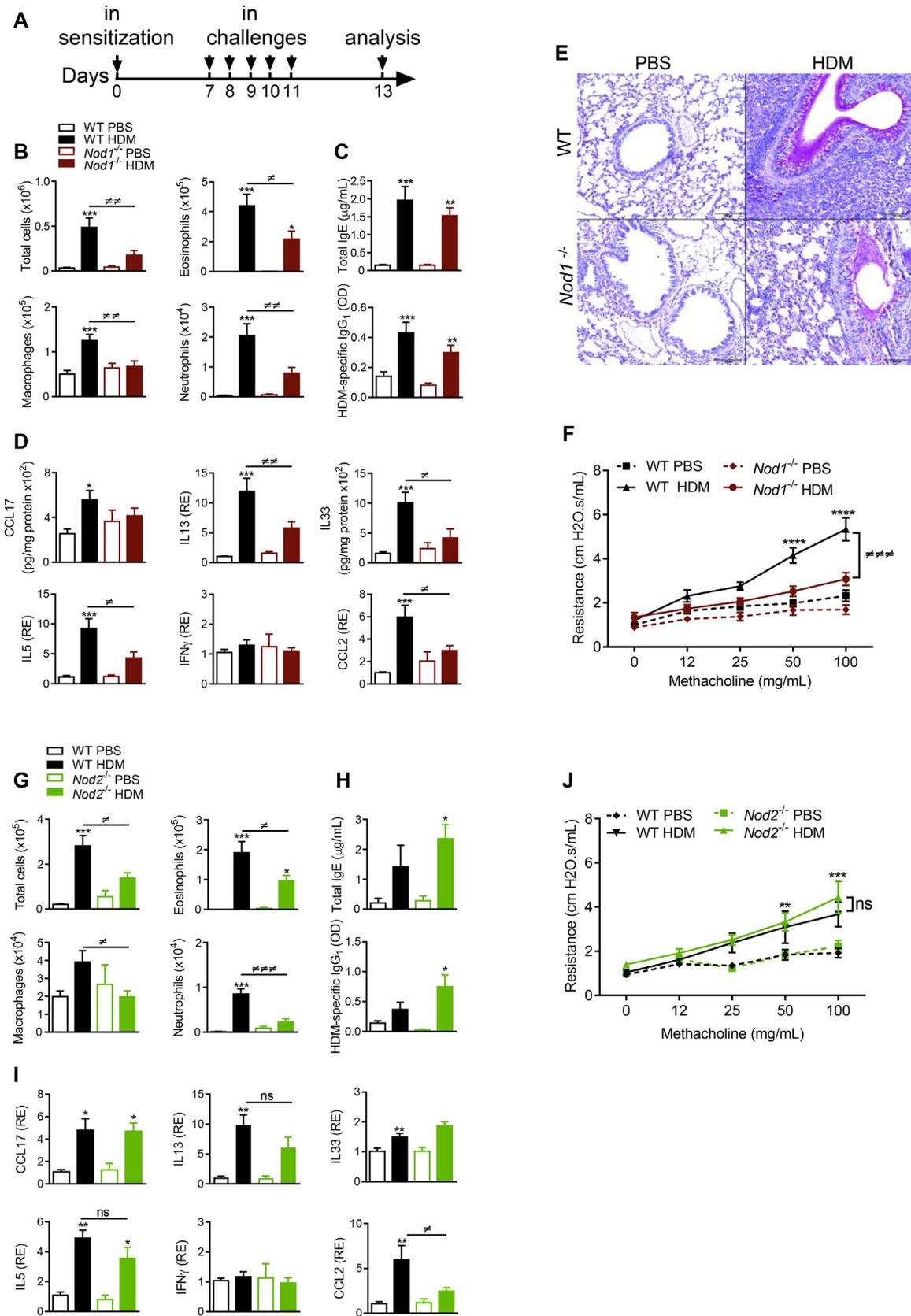


FIG 1. *Nod1* signaling aggravates HDM-induced allergic airway disease. **A**, Protocol of HDM-induced experimental asthma. **B**, BAL cell counts in WT and *Nod1*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. **C**, ELISA detection of T_H2 humoral response in WT and *Nod1*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. **D**, Protein and mRNA relative expression (RE) of cytokines and chemokines assessed by ELISA and quantitative real-time-PCR in

HEK293 luciferase reporter cell assay

The luciferase NF- κ B reporter assays, were performed by seeding HEK293 cells in 96-well plates at 5×10^4 cells per well and transfecting them with expression plasmids producing either human (h) NOD1, mouse (m) Nod1, or mouse Nod2 (0.5 ng/well) in combination with the reporter plasmids pBxIV-luc (1 ng/well) and pEF-BOS- β -gal (25 ng/well) using Lipofectamine LTX with Plus Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's recommendations. The reporter plasmids and the expression plasmids for hNOD1, hNOD2, mNod1, and mNod2 were kindly provided by Gabriel Nuñez and Naohiro Inohara (Ann Arbor, Mich). Details are provided in the [Online Repository](#). The results were normalized by the expression of β -galactosidase to reflect the efficiency of transfection and expressed as fold expression of the plasmid-transfected cells.

Epithelial cell line stimulation and transfection with siRNA

BEAS-2B cells were stimulated with HDM at a final dose of 0.2 IR (ie, 6 μ g protein/mL) unless otherwise stated in the figures, the synthetic NOD1 agonist FK565 (50 μ g/mL; Fujisawa Pharmaceutical Company, Osaka, Japan) or MDP (10 μ g/mL; InvivoGen, San Diego, Calif), after a 4-hour human recombinant IFN- β (20 ng/mL; PeproTech, Rocky Hill, NJ) priming. Culture supernatants and cell pellets were collected for cytokine quantification and RNA isolation. In some experiments, the stimuli were combined with a specific RIPK2 kinase inhibitor (AGV discovery) at a final concentration of 5 μ mol/L. BEAS-2B cells were also stimulated with LPSs (InvivoGen) in combination with the RIPK2 inhibitor as a specificity control of the inhibitor. Except for mRNA analysis, HDM, FK565, and MDP stimulations were performed in presence of Lipofectamine LTX to enhance intracellular transport. Knockdowns of either *NOD1* or *NOD2* in BEAS-2B were obtained by a 48 hours small, interfering RNA (siRNA) transfection after a 4-hour human recombinant IFN- β (20 ng/mL; PeproTech) priming. NHBE cells were cultured as described in the [Online Repository](#).

Generation of chimeric mice by bone marrow transplantation

Total body irradiated WT or *Nod1*^{-/-} mice were transplanted with either WT or *Nod1*^{-/-} bone marrow cells. Two months later, mice were sensitized and challenged with HDM as described above. Details are provided in the [Methods](#) of this article's [Online Repository](#) (available at www.jacionline.org).

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed using standard procedures described in the [Online Repository](#). Primers used are listed in [Table E2](#) in this article's [Online Repository](#) (available at www.jacionline.org).

ELISA measurement of cytokine chemokine

Murine cytokine (TSLP, IL-33) and chemokine (CCL17, CCL22) levels in lung protein extracts were assessed using commercial ELISA according to the instructions provided by the manufacturers (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, Minn; and e-Biosciences, Thermo Fisher Scientific). Human IL-6 and IL-8 (CXCL8) concentrations in BEAS-2B, A549 and NHBE cell

culture supernatants were measured by ELISA using the ELISA Duo sets kits (R&D Systems). The reasons of the choice of the different cytokines and chemokines are indicated in the [Online Repository](#).

16S rRNA analysis

Fresh fecal samples were collected at the end of the experiment and immediately snap frozen in liquid nitrogen. Fecal DNA was isolated and sequenced at Genoscreen (<https://www.genoscreen.fr>). Quantification of bacterial diversity in HDM was assessed by 16S rRNA sequencing on the V3/V4 region. Details are provided in the [Online Repository](#).

LC-MS/MS method

HDM extracts were analyzed by LC-MS/MS method as described in the [Online Repository](#).

Statistical analysis

For bacterial taxonomy analysis, we used the microbiome analyst software to determine community properties. Principal coordinates analysis plots using unweighted unique fraction metric distances were used to analyze the segregation between WT fecal microbiota (FM) \rightarrow GF and *Nod1*^{-/-} FM \rightarrow GF mice using analysis of group similarities statistical analysis. Alpha diversity, calculated as the Channon index, was analyzed using Mann-Whitney *U* test. *P* values $< .05$ were considered to be statistically significant. For animal and cell analyses, data were analyzed using Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, Calif). For normally distributed data, significance of differences between groups was evaluated by 1-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test for multiple comparisons. For pairwise comparisons the 2-tailed Student *t*-test was used. For airway resistance, the 2-way analysis of variance test was used. Nonnormally distributed data were analyzed using the Kruskal-Wallis *H* with Dunn *post hoc* test. For *in vitro* cell experiments, 3 to 4 biological replicates were performed, and the experiment was repeated 2 to 3 times. For *in vivo* experiments, the number of mice per group is indicated in the figure legends. *P* values $< .05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

Nod1 signaling aggravates HDM-induced allergic airway disease through Ripk2

The *in vivo* effect of Nod1 signaling was investigated in a model of 5IR (ie, 15 μ g protein/mL) HDM-induced asthma²¹ (Fig 1, A) in C57BL/6J mice deficient or not in *Nod1*. HDM-challenged WT mice exhibited all the cardinal features of allergic airway inflammation, including increase in total cell, eosinophil, neutrophil, and macrophage numbers in BAL (Fig 1, B), total IgE, and HDM-specific IgG₁ antibodies (Fig 1, C), and levels of lung T_H2/T_H17 cytokines and some pro-T_H2 chemokines (Fig 1, D; see Fig E1, A, in this article's [Online Repository](#) at www.jacionline.org). All these features were strongly diminished in *Nod1*^{-/-} mice, except for the humoral response and T_H17-type cytokine levels (Figs 1, B-D, and E1, A). Lung sections from HDM-challenged mice showed

lung extracts from WT and *Nod1*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. E, Representative microphotographs of periodic acid-Schiff-stained lung sections in WT and *Nod1*^{-/-} mice. Bars = 100 μ m. F, Airway resistance of WT and *Nod1*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. G, BAL cell counts in WT and *Nod2*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. H, ELISA detection of T_H2 humoral response in WT and *Nod2*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. I, Protein and mRNA RE of cytokines and chemokines assessed by ELISA and quantitative real-time PCR in lung extracts from WT and *Nod2*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. J, Airway resistance of WT and *Nod2*^{-/-} mice challenged with PBS or HDM. Data are presented as mean \pm SEM of *n* = 12 to 22 animals per group for Nod1 and *n* = 5 to 9 animals per group for Nod2 experiments. **P* $< .05$, ***P* $< .01$, ****P* $< .001$ versus PBS, *****P* $< .0001$; [#]*P* $< .05$, ^{##}*P* $< .01$, ^{###}*P* $< .001$, 1-way ANOVA for all except airway resistance, which is 2-way ANOVA. NS, Not significant.

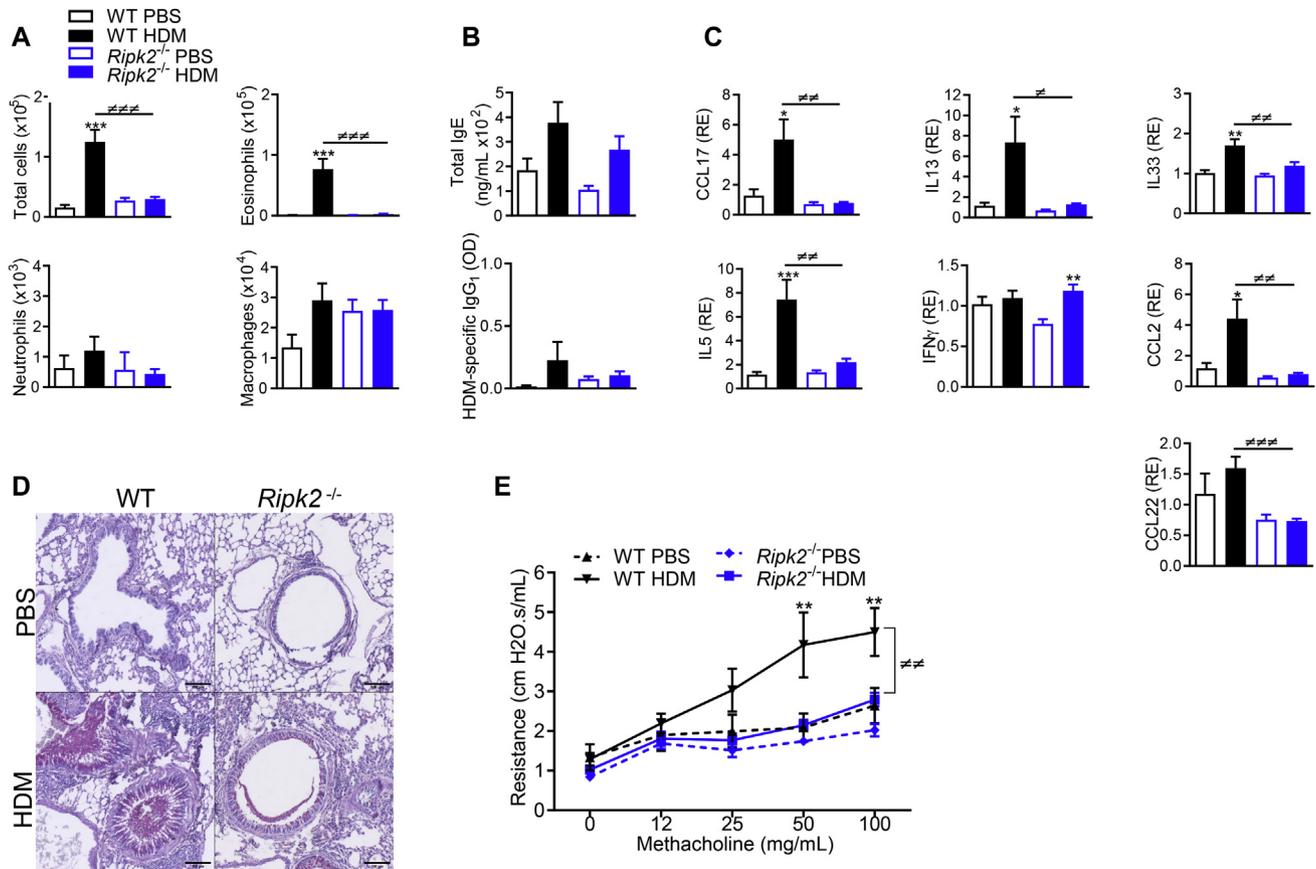


FIG 2. Nod1 signaling aggravates HDM-induced allergic airway disease through Ripk2. **A**, BAL cell counts in WT and *Ripk2*^{-/-} mice challenged with PBS or low dose of HDM. **B**, ELISA detection of total IgE and HDM-specific IgG₁ antibody in WT and *Ripk2*^{-/-} mice challenged with PBS or low dose of HDM. **C**, Protein and mRNA RE of cytokines and chemokines assessed by ELISA and quantitative real-time PCR in lung extracts from WT and *Ripk2*^{-/-} mice challenged with PBS or low dose of HDM. **D**, Representative microphotographs of periodic acid–Schiff–stained lung sections in WT and *Ripk2*^{-/-} mice. Bars = 100 μ m. **E**, Airway resistances of WT and *Ripk2*^{-/-} mice challenged with PBS or low dose of HDM. Data are presented as mean \pm SEM of n = 6 to 12 for *Ripk2*. **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001 versus PBS; #*P* < .05, ##*P* < .01, ###*P* < .001 one-way ANOVA for all except airway resistance, which is 2-way ANOVA.

that the increases in periodic acid–Schiff–stained mucus and in hematoxylin and eosin–stained cellular infiltrates in WT mice were decreased in the absence of Nod1 (Figs 1, E, and E1, B, respectively). Functionally, airway resistance in response to methacholine challenge was totally inhibited in HDM-challenged *Nod1*^{-/-} versus WT mice (Fig 1, F). Likewise, *Nod2* deficiency led to a decrease in BAL cell recruitment after HDM challenge (Fig 1, G) and not in the humoral response (Fig 1, H). By contrast, there was no statistically significant decrease in T_H2 and pro-T_H2 lung cytokines and chemokines except for CCL2 and keratinocyte-derived chemokine (Figs 1, I, and E1, C), and no decrease in airway resistance (Fig 1, J). Given that Nod1 and Nod2 signal via the downstream adaptor Ripk2, we next evaluated whether a similar pattern of response was observed in *Ripk2*^{-/-} mice. Miller *et al*²⁰ have recently reported that HDM-induced allergic airway inflammation is reduced in *Ripk2*^{-/-} mice in a model similar to our 5IR model. Therefore, we assessed *Ripk2*^{-/-} mice in a 1IR (3 μ g protein/mL) model of HDM-induced allergic inflammation. There was a total inhibition of BAL cell recruitment, in particular of eosinophils (Fig 2, A), no changes in the humoral response (Fig 2, B),

a decrease of T_H2-type cytokines and chemokines (Fig 2, C), of mucus production (Fig 2, D) and of airway resistance (Fig 2, E). In contrast to the Miller *et al*²⁰ article, it is of note that we did not observe changes in the humoral response, but we additionally observed abolition of a cardinal feature of asthma, that is, airway resistance in *Ripk2*^{-/-} and *Nod1*^{-/-} but not *Nod2*^{-/-} mice. Taken together, these data demonstrate that Nod1, but not Nod2 signaling, is involved in the severity of HDM-induced airway disease through Ripk2 activation.

Dysbiotic gut microbiota caused by Nod1 deficiency does not impact HDM-induced allergic airway disease risk

Because *Nod1*^{-/-} mice harbor a dysbiotic gut flora, we next assessed whether such dysbiosis may influence the development of experimental asthma. Transplantation of fresh fecal homogenates from WT or *Nod1*^{-/-} donor mice was performed in control GF recipients (referred to as WT or *Nod1*^{-/-} FM \rightarrow GF, respectively). Five weeks later, recolonized mice were subjected

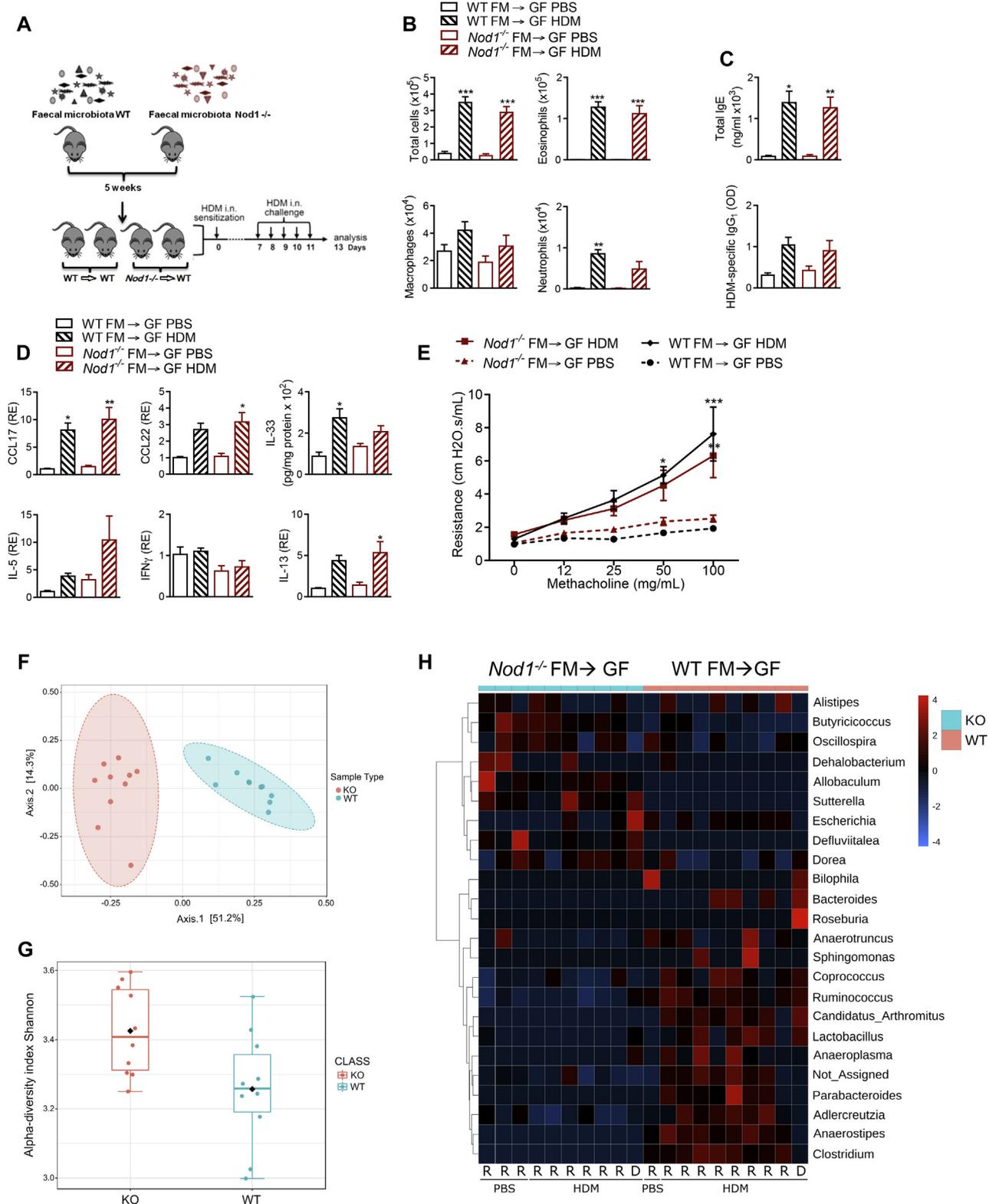


FIG 3. Dysbiotic gut microbiota caused by *Nod1* deficiency does not impact HDM-induced allergic airway disease risk. **A**, Protocol of fecal transplantation. **B**, BAL cell counts in WT and *Nod1*^{-/-} FM → GF mice challenged with PBS or HDM. **C**, ELISA detection of T_H2 humoral response in WT and *Nod1*^{-/-} FM → GF mice challenged with PBS or HDM. **D**, Protein and mRNA RE of cytokines and chemokines assessed by ELISA and quantitative real-time PCR in lung extracts from WT and *Nod1*^{-/-} FM → GF mice challenged with PBS or HDM. **E**, Airway resistance of WT and *Nod1*^{-/-} FM → GF mice challenged with PBS or HDM. Data are presented as mean ± SEM of n = 4 to 7 animals per group. Data are representative of 2 independent experiments. **P* < .05 ***P* < .01 versus PBS. One-way ANOVA for all except airway resistance, which is 2-way ANOVA. **F**, Principal coordinates analysis plots using unweighted unique fraction metric distances of feces from WT FM → GF (WT) and *Nod1*^{-/-} FM → GF mice (KO). *P* < .001 between the 2 groups, analysis of group similarities. **G**, Alpha diversity assessed by the Shannon index of feces from WT and *Nod1*^{-/-} KO mice. *P* < .01 between the 2 groups, Mann-Whitney *U* test. **H**, Heat map of the top most abundant genera of feces from receivers (R) of WT, *Nod1*^{-/-} KO mice challenged with PBS or HDM, and from initial donors (D). in, Intranasal.

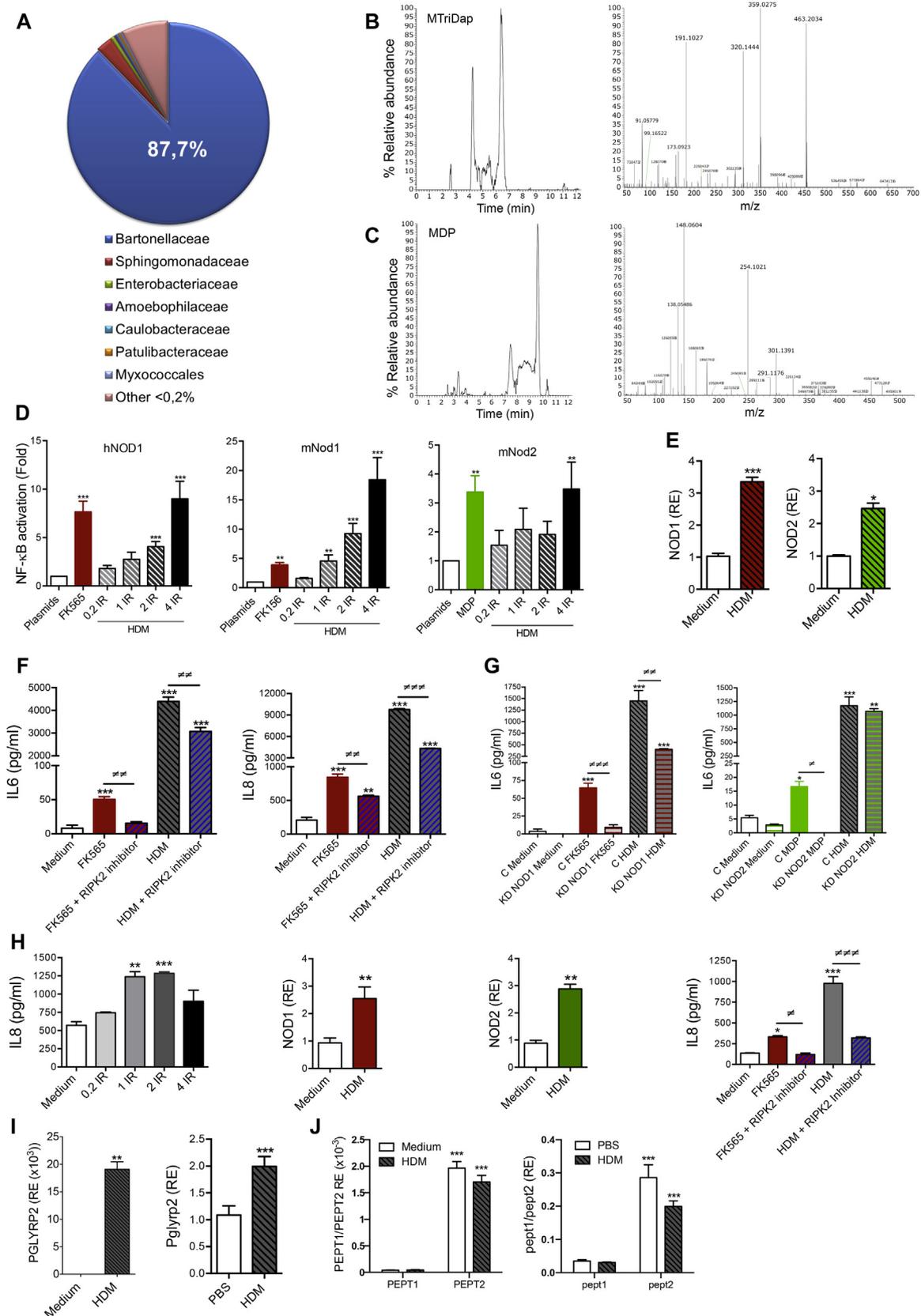


FIG 4. HDM-associated muropeptides are sensed by NOD1 in epithelial cells via RIPK2. **A**, High throughput sequencing analysis of HDM. **B**, Extract ion chromatograms of HDM corresponding to the protonated DAP-containing muramyl tripeptide (MTriDap) (m/z 666.2843) and its MS/MS fragmentation with a normalized collision energy equal to 25% in the high energy collision dissociation cell of QExactive Focus. The specific fragments are recorded in [Table E3](#). **C**, Extract ion chromatograms of HDM corresponding to the protonated

to the HDM protocol (Fig 3, A). Both groups of mice challenged with HDM, compared with the PBS groups, exhibited similar increased BAL cell recruitment (Fig 3, B), humoral response (Fig 3, C), T_H2-type response (Fig 3, D), and airway resistance (Fig 3, E). To evaluate the gut bacterial ecosystem of recolonized mice, fecal pellets were collected at the end of the experiments and analyzed by 16S rRNA phylogenetic profiling. Principal coordinates analysis plots using unweighted unique fraction metric distances highlighted the segregation between ex-GF mice ($P \leq .001$, analysis of group similarities statistical analysis) (Fig 3, F). Alpha diversity, calculated as the Shannon index, showed significant differences between the groups of ex-GF mice ($P \leq .01$, Mann-Whitney U test) (Fig 3, G). Heat map of the top-most abundant genera illustrates the major differences in the composition of both groups of mice and the similarities with the microbiota composition from donors' feces (Fig 3, H). No difference was observed between PBS- and HDM-treated mice whatever the genotype of the donor mice. Altogether these data underline that the compositional changes in the gut microbiota of *Nod1*^{-/-} mice were not responsible for their protection against HDM-induced disease.

HDM-associated muropeptides are sensed by NOD1 in epithelial cells via RIPK2

Quantification of bacterial diversity in HDM extracts by 16S rRNA sequencing revealed that 87.7% of the assembled reads associated with members of the gram-negative Bartonellaceae family (Fig 4, A). To identify specific PG moieties, HDM extracts were analyzed by MS through a targeted approach specifically looking at well-characterized muropeptides. Both DAP-containing muramyl tripeptide and MDP, sensed by NOD1 and NOD2, respectively, were detected and their presence confirmed by fragmentation (Fig 4, B and C, and see Table E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Next, the effect of HDM was evaluated on human embryonic kidney 293 (HEK293) cells harboring a NF- κ B-dependent luciferase reporter and expressing *hNOD1*, *mNod1*, or *mNod2* and normalized for transfection efficiency using a β -galactosidase control vector. All positive controls induced NF- κ B activation (Fig 4, D). HDM extracts elicited a dose-dependent increase in both *hNOD1*- and *mNod1*-dependent luciferase activity, but only an effect at the highest dose of 4IR (ie, 60 μ g protein/mL) for *mNod2* activity (Fig 4, D). As the allergen first encounters epithelial cells, human bronchial epithelial BEAS-2B cells were primed with IFN- β ²² to increase the baseline expression of *NOD1*. The role of *Nod1* signaling pathway was subsequently assessed by quantifying their cytokine production in response to HDM. HDM stimulation elicited a dose-dependent increase in the production of IL-6 and

IL-8 by BEAS-2B cells with an effect starting at 0.2IR (6 μ g protein/mL) and maximal at 4IR (120 μ g protein/mL) (Fig E2, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). BEAS-2B stimulation by HDM induced a clear increase in *NOD1* and *NOD2* mRNA (Fig 4, E). Although IFN- β increased *NOD1/2* expression and FK565-induced cytokine production (Fig E2, B), no effect was noticed on the response to HDM (Fig E2, C). As expected, the addition of a specific RIPK2 inhibitor belonging to the 4-amino-quinolines inhibited both IL-6 and IL-8 increases in response to FK565 positive control (Fig 4, F), but did not modulate the response to LPSs (Fig E2, D). HDM stimulation induced a stronger production of IL-6 and IL-8 (Fig 4, F) with a partial inhibitory noncytotoxic effect (Fig E2, E) of RIPK2 antagonist (Fig 4, F). The same results were observed for the human alveolar epithelial cell A549 (Fig E2, F). The respective roles of *NOD1* and *NOD2* were next assessed by transfecting BEAS-2B cells with specific siRNA. As compared to control and *NOD2* siRNAs, *NOD1* siRNA strongly inhibited FK565- and HDM-induced IL-6 and IL-8 production (Figs 4, G, and E2, G). Similar observation was noticed on HDM-induced IL-33 mRNA expression (Fig E2, H). Results were further confirmed using NHBE cells. Stimulation with HDM elicited a dose-dependent increase in IL-8 production as well as in *NOD1/2* mRNA expression in primary epithelial cells (Fig 4, H). Treatment with the RIPK2 antagonist strongly inhibited HDM-induced IL-8 production (Fig 4, H). The lack of effect of *NOD2* led us to evaluate the mRNA expression of *PGLYRP2*, an enzyme that displays amidase activity known to degrade some *NOD2*-activating muropeptides. HDM stimulation was able to induce this enzyme both *in vitro* in BEAS-2B cells as well as *in vivo* in the lungs of HDM-challenged mice (Fig 4, I). In contrast, we failed to detect any change in the expression of *PGLYRP1*, another member of the peptidoglycan recognition protein family that was shown to be involved in HDM-induced allergic airway inflammation in the allergy-prone BALB/c mice²³⁻²⁵ (Fig E2, I). Furthermore, the transporter peptide transporter (PEPT) 2, allowing uptake of *NOD1* ligands, was highly expressed in both BEAS-2B cells and in the lungs of HDM-challenged mice as compared with PEPT1 transporter, which specialized in the transport of *NOD2* ligand MDP (Fig 4, J). These data show that HDM triggers cytokine production by epithelial cells through a *NOD1*-dependent pathway involving RIPK2 signaling.

Nod1 expressed by radio-resistant cells mediate HDM-induced allergic airway inflammation

To evaluate the specific contribution of nonhematopoietic structural cells, in particular epithelial cells, versus the role of

MDP (m/z 494.1990) and its MS/MS fragmentation as described above. The specific fragments are recorded in Table E3. D, Dose-dependent effect of HDM on *hNOD1*, *mNod1*, and *mNod2* reporter activity of HEK293 cells normalized with β -galactosidase. Positive controls: FK565 for *hNOD1*, FK156 for *mNod1*, MDP for *mNod2*. E, RE of *hNOD1* and *hNOD2* mRNA in BEAS-2B cells stimulated with HDM. F, Inhibitory effect of RIPK2 inhibitor on IL-6 and IL-8 production by HDM- and FK565-stimulated BEAS-2B cells. G, Effect of control (C) *hNOD1* and *hNOD2* siRNA (KD) on HDM-, FK565-, and MDP-induced production of IL-6 by BEAS-2B cells. H, HDM-stimulated NHBE cells were examined in terms of dose-dependent cytokine response, of *NOD1* and *NOD2* RE, and of IL-8 production in the presence of RIPK2 inhibitor. I, *PGLYRP2* mRNA RE in HDM-stimulated BEAS-2B cells and in lungs from HDM-challenged WT mice. J, PEPT1 and PEPT2 mRNA RE in HDM-stimulated BEAS-2B cells and in lungs from HDM-challenged WT mice. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of 2 to 3 independent *in vitro* experiments and of 10 to 12 mice per group. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ versus plasmids or medium; $^{\#}P < .05$, $^{\#\#}P < .01$, $^{\#\#\#}P < .001$, 1-way ANOVA (A-C,F,G), Kruskal-Wallis test (D) and t tests (E, H [[*NOD1/NOD2*], I, and J).

hematopoietic cells on Nod1-dependent HDM-induced airway inflammation, chimeric mice were generated expressing either Nod1^{-/-} hematopoietic cells and structural WT cells (Nod1^{-/-} → WT) or Nod1^{-/-} structural cells together with WT hematopoietic cells (WT → Nod1^{-/-}). WT → WT and Nod1^{-/-} → Nod1^{-/-} groups served as controls. Analysis of BAL showed that the total cell, as well as eosinophil and neutrophil numbers, were increased after HDM challenge in the Nod1^{-/-} → WT and the WT → WT mice, whereas they were diminished in the WT → Nod1^{-/-} and Nod1^{-/-} → Nod1^{-/-} mice (Fig 5, A). The humoral response was not significantly modified after HDM challenge, whatever the group (Fig 5, B). While most tested cytokines were increased after HDM challenge in the WT → WT and Nod1^{-/-} → WT mice, these were either decreased or abolished in WT → Nod1^{-/-} and Nod1^{-/-} → Nod1^{-/-} mice (Fig 5, C). In agreement with our *in vitro* data, chimera experiments demonstrated that Nod1 expressed by structural cells mediates HDM-induced airway inflammation. However, CCL2, IL-13, and IL-33 were significantly decreased after HDM challenge in the Nod1^{-/-} → WT group compared with in the WT → WT mice (Fig 5, C). This suggests that such induction of CCL2, IL-13, and IL-33 by HDM in WT mice reconstituted with Nod1-expressing hematopoietic cells is not sufficient for exacerbating HDM-induced airway inflammation.

Severity of allergic airway disease is decreased in response to PG-depleted but not LPS-depleted HDM

Among bacterial moieties, LPSs have been described to either favor or inhibit OVA-induced experimental asthma, according to their abundance.²⁶ To evaluate whether LPSs present in HDM were playing a role in the observed results, we depleted LPSs by purification on a resin column. *In vitro*, in NF-κB reporter cells, LPS-low HDM was still able to dose-dependently activate Nod1 (Fig E3, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). As the concentration of LPSs was not biologically relevant for exacerbating the immunopathology in response to IIR (2 ng/IR) we only used the 5IR HDM-induced protocol. *In vivo*, LPS-low HDM challenges led to an increase in most of the parameters of experimental asthma including BAL total cell recruitment, T_H2-type cytokine expression and airway hyperreactivity (Fig E3, B, D, and E) similar to that observed with native HDM challenges. The only parameter that was not induced by LPS-low HDM was the humoral response, which remained at basal levels (Fig E3, C). To evaluate the role of PG in NOD1-dependent effect, HDM extracts were digested with mutanolysin and proteins precipitated by organic solvents, and the corresponding pellets and supernatants were assessed on mNod1 activity. Presence or absence of PG was confirmed by MS in the supernatants and pellets, respectively (Fig 6, A). The PG-free pellets did not exhibit dose-dependent activation of mNod1 reporter activity, whereas the PG-containing supernatants activated the luciferase activity with significant effects at 4IR to 6IR (ie, 60 μg to 90 μg protein/mL) of initial HDM input (Fig 6, B). Next, the effect of PG depletion after normalization for final allergen content was evaluated in both HDM models to ascertain the results. In the 5IR HDM model, PG-depleted HDM challenges led to a reduction in BAL total cell recruitment, including mainly eosinophils (Fig 6, C), and no changes

in the humoral response (Fig 6, D), but they did lead to a strong decrease in T_H2-type cytokines and an increase in IFN-γ (Fig 6, E). Airway resistance was also reduced (Fig 6, F), as well as mucus production (Fig 6, G). In the IIR model, PG-depleted HDM led to attenuated recruitment of total cells in the BAL, which did not reach significance (Fig E3, F) whereas the IgE humoral response was still induced (Fig E3, G). T_H2-type cytokines were nonetheless reduced (Fig E3, H), as was mucus production (Fig E3, I). PG-depleted HDM was also not able to increase airway resistance, as compared to native HDM (Fig E3, J). Collectively, these data demonstrate that HDM-induced allergic airway disease depends to a large extent on Nod1 sensing of unique muropeptides derived from the microbiota of the allergen *per se*.

DISCUSSION

In this study, HDM-induced allergic airway disease was strongly decreased in Nod1-deficient but not Nod2-deficient mice, including BAL cell recruitment, airway resistance, and T_H2-type cytokine expression. Only BAL showed reduced cell recruitment in Nod2^{-/-} compared with WT mice. We presume that this is possibly a consequence of lowered CCL2 levels, as neutralization of this chemokine pathway attenuates macrophage and eosinophil accumulation in the BAL of asthmatic monkeys.²⁷ HDM challenged Nod2^{-/-} mice were still able to induce lung IL-33 in contrast to Nod1^{-/-} mice, in agreement with the known direct effect of Nod1 on induction of mucosal IL-33 responses.²⁸ Likewise, similar findings were observed in BEAS-2B cells. One explanation may be that Nod2 ligands are degraded by an amidase activity that is either present in or induced by HDM extracts. Indeed, the presence of a γ-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase has been described in such extracts.²⁹ Furthermore, PGLYRP2, an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, was induced *in vitro* by HDM stimulation in BEAS-2B cells and *in vivo* in the lungs of the HDM model. Alternatively, PEPT2, a transporter mediating the uptake of Nod1 ligands, but not MDP,³⁰ is thoroughly expressed by the epithelial cells from the respiratory tract,³¹ in contrast to PEPT1, a MDP transporter mainly expressed by the gastrointestinal tract.³² Indeed, PEPT2 mRNA was highly expressed in BEAS-2B cells as well as in the lungs of HDM-challenged mice as compared with PEPT1, likely also explaining the differential activation of Nod1/2 receptors in the lung by HDM. On recognition of PG, both NOD1 and NOD2 undergo self-oligomerization, leading to NF-κB activation and transcription of multiple inflammatory genes on the recruitment of the scaffolding kinase protein RIPK2. In agreement with a recent report²⁰ and with our data using Nod1^{-/-} mice, Ripk2^{-/-} mice exhibited decreased asthma features in response to HDM, including a decrease in airway resistance. Previous studies have reported conflicting data about the role of Ripk2 in allergic airway inflammation, some finding a promoting effect²⁰ and others finding none.^{33,34} In light of our own data, these results can be reconciled by the presence (or not) of unique muropeptides in the allergen extracts that are used to induce airway inflammation. Consistently, we have previously shown that Nod1^{-/-} mice exhibited similar OVA-induced T_H2-mediated allergic asthma as WT mice did, although a NOD1 agonist used as a systemic adjuvant exacerbated experimental asthma features.¹⁹ It is now well established that alterations in gut microbiota are involved in the

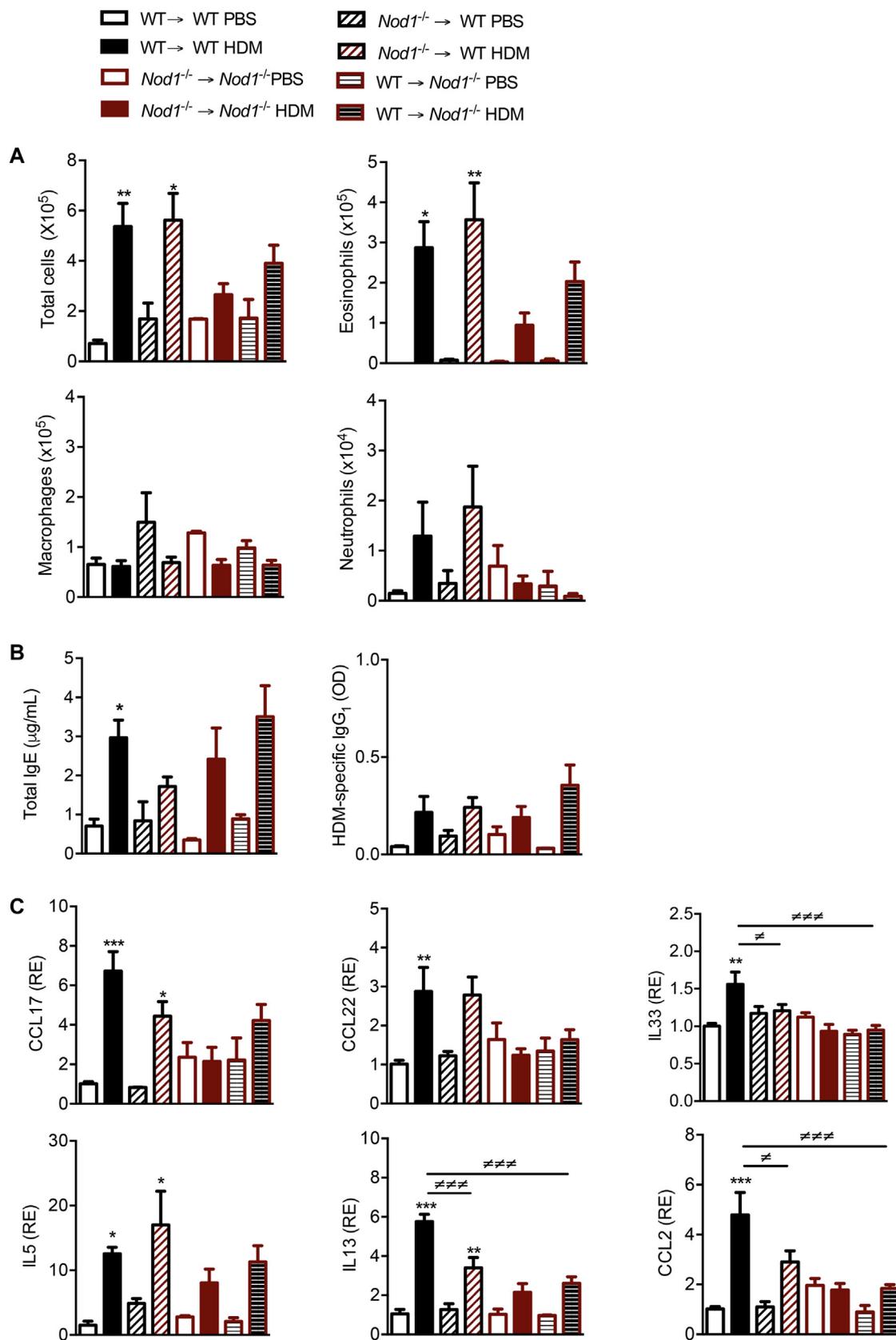


FIG 5. *Nod1* expressed by structural cells mediate HDM-induced allergic airway inflammation. Chimeric mice were generated by bone marrow transplantation. **A**, BAL cell counts in WT → WT, *Nod1*^{-/-} → WT (hematopoietic cells deficient in *Nod1*), *Nod1*^{-/-} → *Nod1*^{-/-}, and *Nod1*^{-/-} → WT (structural cells deficient in *Nod1*) mice challenged with PBS or high dose of HDM. **B**, ELISA detection of T_H2 humoral response in chimeric mice challenged with PBS or high dose of HDM. **C**, mRNA RE of cytokines and chemokines assessed by quantitative real-time PCR in lung extracts from chimeric mice challenged with PBS or high dose of HDM. Data are presented as mean ± SEM of n = 3 to 6 animals per group. * *P* < .05, ** *P* < .01, *** *P* < .001 versus PBS; # *P* < .05, ### *P* < .001. One-way ANOVA.

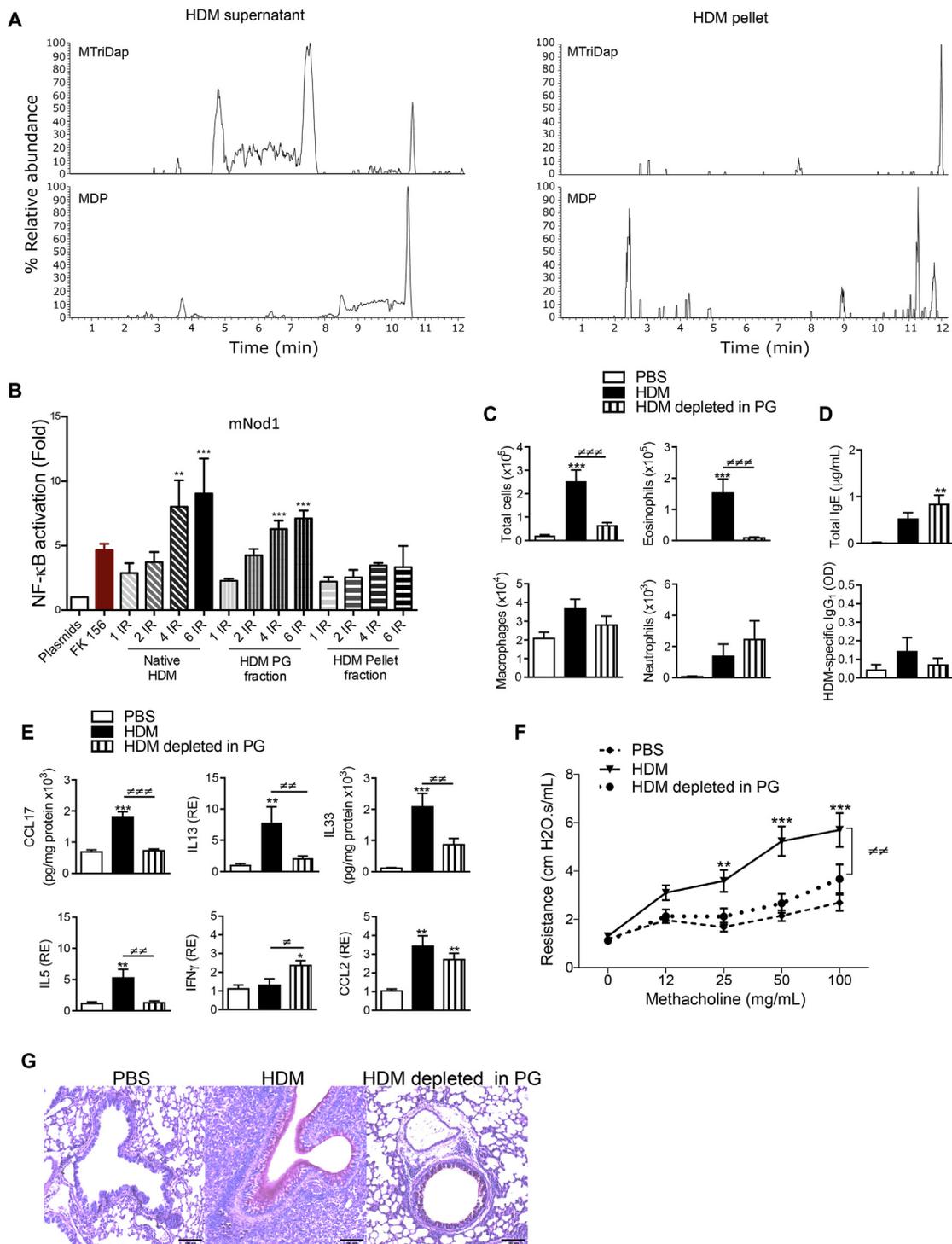


FIG 6. Severity of allergic airway disease is decreased in response to PG-depleted HDM. **A**, Extract ion chromatograms in the PG-containing supernatants and PG-free pellets of HDM extracts after digestion with mutanolysin and precipitation of proteins by organic solvents, corresponding to the protonated MTriDap (m/z 666.2843) and the protonated MDP (m/z 494.1990). **B**, HDM extracts were digested with mutanolysin and proteins precipitated by organic solvents and the activity of the PG-free lysates and the PG-containing supernatants assessed on mNod1 reporter activity. Positive control: FK156. **C**, BAL cell counts in WT mice challenged with PBS or high dose of HDM depleted or not in PG. **D**, ELISA detection of T_H2 humoral response in WT mice challenged with PBS or high dose of HDM depleted or not in PG. **E**, Protein and mRNA expression of cytokines and chemokines assessed by ELISA and quantitative real-time PCR in lung extracts from WT mice challenged with PBS or high dose of HDM depleted or not in PG. **F**, Airway resistance of WT mice challenged with PBS or high dose of HDM depleted or not in PG. **G**, Representative microphotographs of periodic acid-Schiff-stained lung sections in WT mice challenged with PBS or high dose of HDM depleted or not in PG. Bars = 100 μ m. Data are presented as mean \pm SEM of at least 2 independent *in vitro* experiments, ** P < .01, *** P < .001 versus plasmids, and as mean \pm SEM of n = 5 to 10 animals per group, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001 versus PBS; # P < .05, ## P < .01, ### P < .001. One-way ANOVA for all except for airway resistance, which is 2-way ANOVA.

susceptibility to asthma.³⁵ Along this line, Nod1-deficiency has been implicated in intestinal dysbiosis¹⁷ and inhibits the priming of neutrophils by gut-derived PG, resulting in increased susceptibility to pneumococcal lung infection.³⁶ Even if fecal transplantation experiments excluded the possibility of a pro-allergenic role of the gut microbiota, there is still a possibility in theory that airway microbiota from *Nod1*^{-/-} mice might contribute to the allergic response in cooperation with the one derived from HDM.

MS analysis of HDM showed the presence of the specific NOD1 ligand DAP-containing muramyl tripeptide, and of the NOD2 ligand MDP. However, in contrast to HDM-induced mNod1 reporter activity, mNod2 reporter activity was only observed in response to 4 times more HDM, suggesting again a putative Nod2 ligand degradation. Although LC-MS analysis confirmed the complete PG depletion, a residual mNod1 reporter activity was observed *in vitro*. This suggests a potential endocytosis of trace PG contaminants that are contained in the animal serum used in the cultures.³⁷ BEAS-2B cells exhibited a HDM-induced cytokine production that was only partly inhibited by RIPK2 antagonist and by NOD1 siRNA. This partial inhibition may reflect other mechanisms able to induce cytokine production in bronchial epithelial cells in response to other HDM components³⁸ such as proteases through protease-activated receptor 2 activation³⁹ or LPSs through TLR4 stimulation.⁴⁰ Bone marrow chimeric mice showed that *Nod1*-expressing structural cells were the major cells involved in the aggravated features of HDM-induced airway inflammation which is consistent with the *in vitro* effect observed in epithelial cells. However, the expression of some proinflammatory cytokines was also dependent on hematopoietic cells and probably on dendritic cells that also express NOD1.

It has been proposed that low-dose endotoxin promotes T_H2 responses, whereas high-dose endotoxin promotes T_H1 responses. However, the degree of endotoxin contamination in our extracts was 10 times lower (eg, 10 ng) than the dose used to promote T_H2 immune responses to OVA (eg, 100 ng).²⁶ Furthermore, LPS-depleted HDM extracts were still able to elicit all the parameters of allergic airway inflammation except for humoral responses, suggesting that LPS, as a major direct stimulus for B cells,⁴¹ is essential in the induction of antibody responses to HDM. This may relate to the predominance of *Bartonella* in HDM extracts, as its LPS has sharply reduced interactions with TLR4.⁴² PG depletion from HDM resulted in a similar inhibition than that observed in *Nod1*^{-/-} mice, confirming its role in the exacerbation of HDM-induced allergic airway inflammation. It is of interest that neutralizing antibodies targeting the muropeptide MDP have been recently developed and shown to inhibit PG-dependent autoimmune arthritis.⁴³ Future development of such PG-neutralizing antibodies would provide further information on the specific role of NOD1 in HDM-induced allergic airway inflammation.

Collectively, this study highlights an unprecedented interaction between NOD1 and HDM, one of the most common allergens, and unveils a new mechanism whereby HDM-derived microbiota is sensed by Nod1 and potentiates disease severity. It paves the way toward novel therapeutic strategies targeting the NOD1 pathway for fighting against the epidemic of asthma.

We thank Stallergenes/Greer for providing *D. farinae* extract, and Gabriel Nuñez and Naohiro Inohara (Ann Arbor, Mich) for providing the reporter and expression plasmids for hNOD1, mNod1, and mNod2.

Key messages

- NOD1-dependent sensing of HDM-associated gram-negative bacteria aggravates experimental asthma.
- Inhibition of NOD1 signaling pathway may provide a new therapeutic approach in asthma.

REFERENCES

1. Goleva E, Jackson LP, Harris JK, Robertson CE, Sutherland ER, Hall CF, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1193-201.
2. Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, Mortensen M, Breyndro A, Bonnelykke K, et al. Infant airway microbiota and topical immune perturbations in the origins of childhood asthma. *Nat Commun* 2019;10:5001.
3. Zhou Y, Jackson D, Bacharier LB, Mauger D, Boushey H, Castro M, et al. The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children. *Nat Commun* 2019;10:5714.
4. Kim YG, Udayanga KG, Totsuka N, Weinberg JB, Nunez G, Shibuya A. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE(2). *Cell Host Microbe* 2014;15:95-102.
5. Li X, Leonardi I, Semon A, Doron I, Gao IH, Putzel GG, et al. Response to fungal dysbiosis by gut-resident CX3CR1(+) mononuclear phagocytes aggravates allergic airway disease. *Cell Host Microbe* 2018;24:847-56.e4.
6. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 2012;149:1578-93.
7. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012;336:489-93.
8. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep* 2012;13:440-7.
9. Herbst T, Sichelstiel A, Schar C, Yadava K, Burki K, Cahenzli J, et al. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:198-205.
10. Valerio CR, Murray P, Arlian LG, Slater JE. Bacterial 16S ribosomal DNA in house dust mite cultures. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1296-300.
11. Lee J, Kim JY, Yi MH, Hwang Y, Lee IY, Nam SH, et al. Comparative microbiome analysis of *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteromyssinus*, and *Tyrophagus putrescentiae*. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1620-3.
12. Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST, et al. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2002;359:831-4.
13. Ross MA, Curtis L, Scheff PA, Hryhorczuk DO, Ramakrishnan V, Wadden RA, et al. Association of asthma symptoms and severity with indoor bioaerosols. *Allergy* 2000;55:705-11.
14. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003;4:702-7.
15. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003;300:1584-7.
16. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
17. Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 2008;456:507-10.
18. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet* 2005;14:935-41.
19. Ait Yahia S, Azaoui I, Everaere L, Vorng H, Chenivresse C, Marquillies P, et al. CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:899-908.
20. Miller MH, Shehat MG, Alcedo KP, Spinel LP, Soulakova J, Tigno-Aranjuez JT. Frontline science: RIP2 promotes house dust mite-induced allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 2018;104:447-59.
21. Everaere L, Ait-Yahia S, Molendi-Coste O, Vorng H, Quemener S, LeVu P, et al. Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1309-18.e11.

22. Kim YG, Park JH, Reimer T, Baker DP, Kawai T, Kumar H, et al. Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host Microbe* 2011;9:496-507.
23. Banskar S, Detzner AA, Juarez-Rodriguez MD, Hozo I, Gupta D, Dziarski R. The Pglyrp1-regulated microbiome enhances experimental allergic asthma. *J Immunol* 2019;203:3113-25.
24. Park SY, Jing X, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition protein 1 enhances experimental asthma by promoting Th2 and Th17 and limiting regulatory T cell and plasmacytoid dendritic cell responses. *J Immunol* 2013;190:3480-92.
25. Yao X, Gao M, Dai C, Meyer KS, Chen J, Keeran KJ, et al. Peptidoglycan recognition protein 1 promotes house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:902-11.
26. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002;196:1645-51.
27. Mellado M, Martin de Ana A, Gomez L, Martinez C, Rodriguez-Frade JM. Chemokine receptor 2 blockade prevents asthma in a cynomolgus monkey model. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:769-75.
28. Tran LS, Tran D, De Paoli A, D'Costa K, Creed SJ, Ng GZ, et al. NOD1 is required for *Helicobacter pylori* induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol* 2018;20:e12826.
29. Tang VH, Stewart GA, Chang BJ. House dust mites possess a polymorphic, single domain putative peptidoglycan d,l endopeptidase belonging to the NlpC/P60 Superfamily. *FEBS Open Bio* 2015;5:813-23.
30. Swaan PW, Bensman T, Bahadduri PM, Hall MW, Sarkar A, Bao S, et al. Bacterial peptide recognition and immune activation facilitated by human peptide transporter PEPT2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:536-42.
31. Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Doring F, Daniel H, Fischer A. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol* 2001;158:707-14.
32. Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, et al. hPepTI transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 2004;127:1401-9.
33. Kim TH, Park YM, Ryu SW, Kim DJ, Park JH, Park JH. Receptor interacting protein 2 (RIP2) is dispensable for OVA-induced airway inflammation in mice. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014;6:163-8.
34. Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, Marsland BJ. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax* 2011;66:755-63.
35. Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med* 2015;7:307ra152.
36. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 2010;16:228-31.
37. Molinaro R, Mukherjee T, Flick R, Philpott DJ, Girardin SE. Trace levels of peptidoglycan in serum underlie the NOD-dependent cytokine response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2019;294:9007-15.
38. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* 2011;32:402-11.
39. Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, Bakker AJ, Eidne KA, Thompson PJ, et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol* 2002;169:4572-8.
40. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009;15:410-6.
41. Lu M, Munford R. LPS stimulates IgM production in vivo without help from non-B cells. *Innate Immun* 2016;22:307-15.
42. Zahringer U, Lindner B, Knirel YA, van den Akker WM, Hiestand R, Heine H, et al. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem* 2004;279:21046-54.
43. Huang Z, Wang J, Xu X, Wang H, Qiao Y, Chu WC, et al. Antibody neutralization of microbiota-derived circulating peptidoglycan dampens inflammation and ameliorates autoimmunity. *Nat Microbiol* 2019;4:766-73.

Innate lymphoid cells at the interface between obesity and asthma

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

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

doi:10.1111/imm.12832

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

Correspondance: Dr Anne Tsicopoulos,
Institut Pasteur de Lille, CIIL, Team
Pulmonary Immunity, 1 avenue du Pr
Calmette, 59019 Lille cedex, France.
Email: anne.tsicopoulos@pasteur-lille.fr
Senior author: Dr Anne Tsicopoulos

Obesity and asthma

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

Summary

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

Keywords: asthma; innate lymphoid cells; obesity.

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

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

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

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

Innate lymphoid cells

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

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

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

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

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

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

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

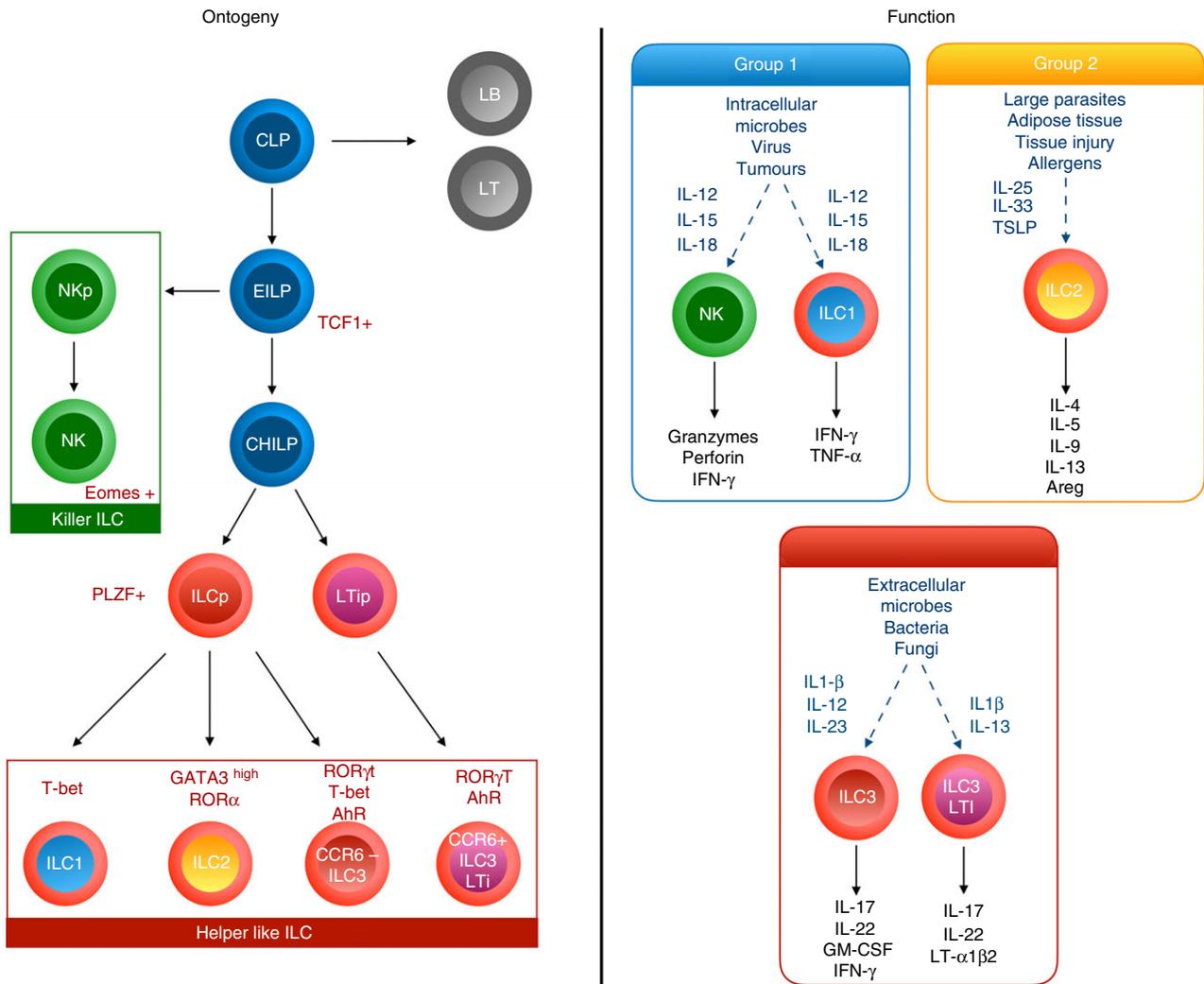


Figure 1. Ontogeny and function of lymphoid lineages. Downstream of the common lymphoid progenitor (CLP), the early innate lymphoid cell (ILC) Progenitor (EILP) initiates TCF1 expression and can differentiate into either natural killer (NK) cells or into an Id2^{high} common helper-like ILC progenitor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

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

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

Lymphoid cells in obesity

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

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

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

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

Lymphoid cells in asthma

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

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

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

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

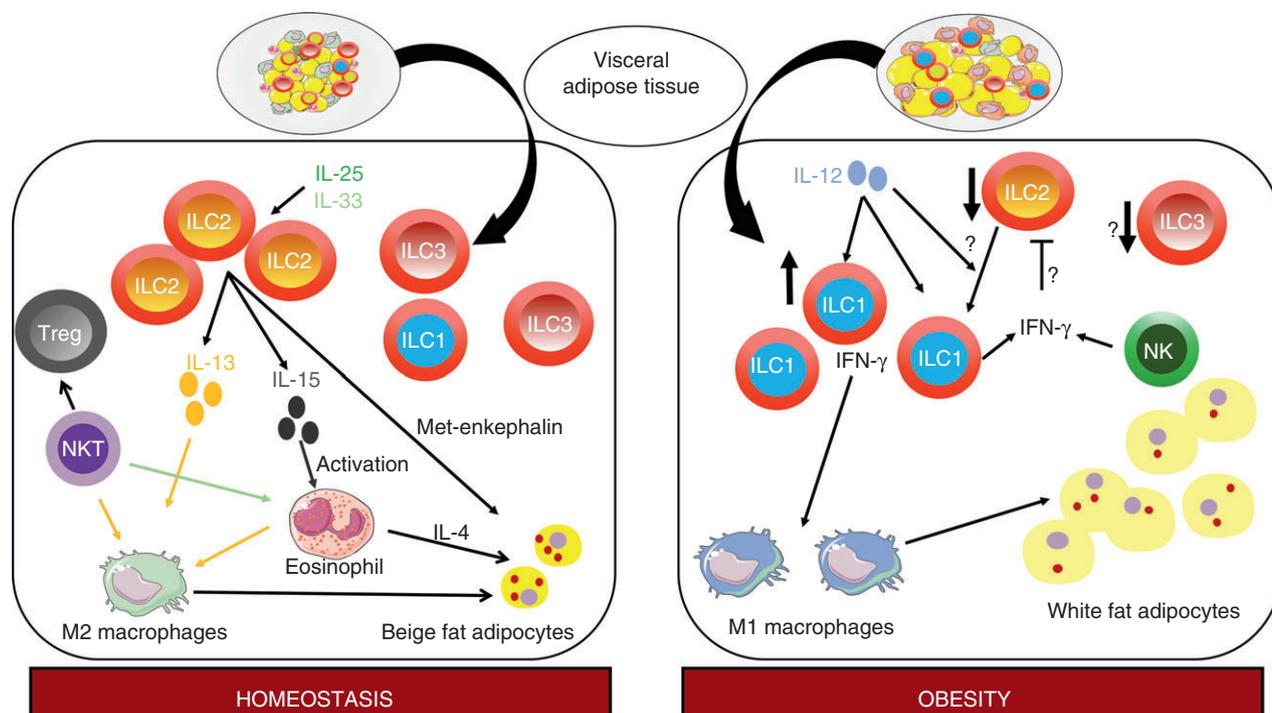


Figure 2. Innate lymphoid cells (ILCs) in the visceral adipose tissue. In homeostasis conditions, the visceral adipose tissue is infiltrated by ILC2 in response to locally produced interleukin-33 (IL-33) and IL-25. Through their production of IL-5 and IL-13, they activate on the one hand eosinophils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

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

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

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

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

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

Lymphoid cell: a link between obesity and asthma?

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

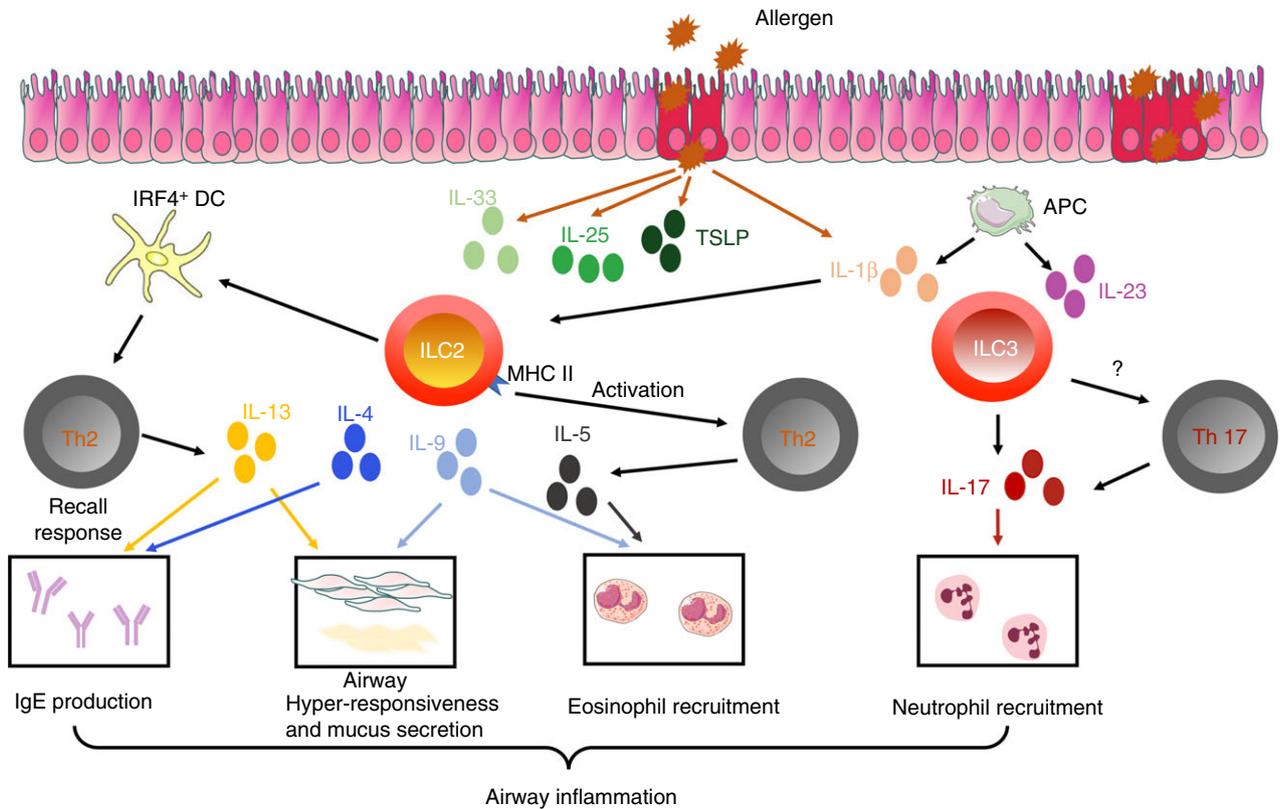


Figure 3. Innate lymphoid cells (ILCs) in allergic airway inflammation. In response to protease-type allergens, airway epithelial cells release cytokines such as interleukin-25 (IL-25), IL33, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and IL-1 β , which all activate ILC2. Activated ILC2 produce type 2 cytokines,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

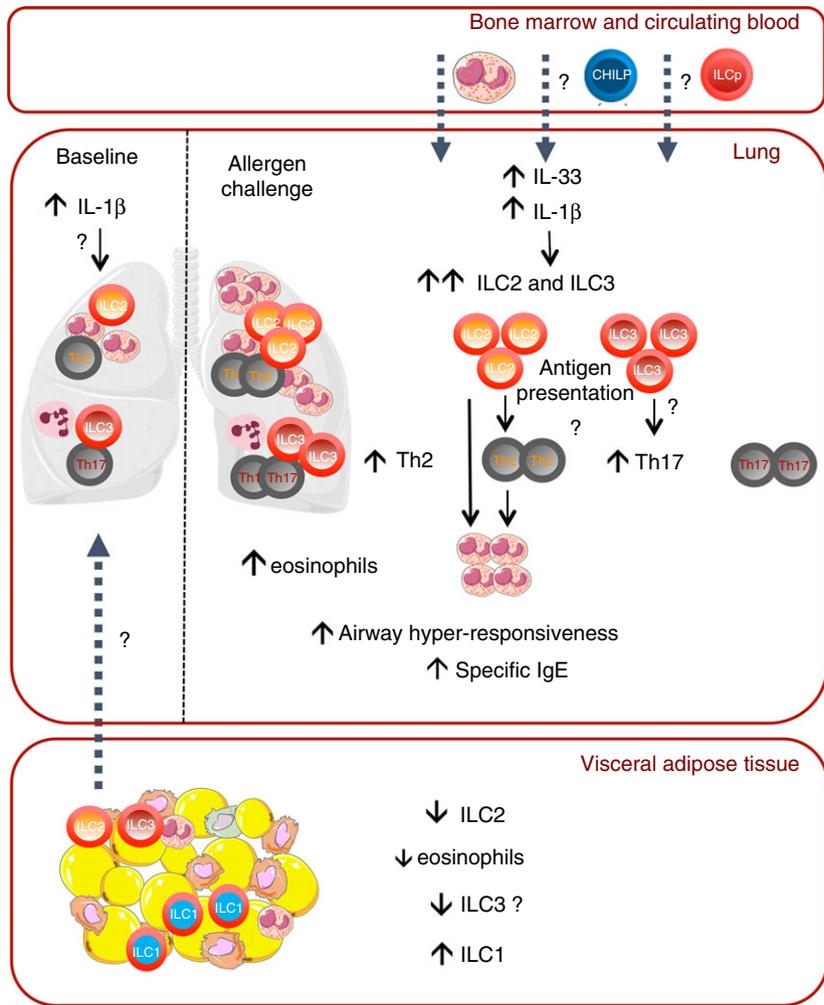
rag^{-/-} mice depleted in ILCs, and restored by ILC3 transfer. Interleukin-17 production by ILC3 was dependent upon the Nlrp3 inflammasome stimulated by macrophage-derived IL-1 β .¹¹⁵ Ozone exposure has also been shown to result in increased AHR in obese mice compared with lean mice. This effect was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

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

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

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

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



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

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

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

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

Disclosures

The authors declare having no competing interests.

References

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

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

- 58 Seillet C, Rankin LC, Groom JR, Mielke LA, Tellier J, Chopin M *et al.* Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. *J Exp Med* 2014; **211**:1733–40.
- 59 Serafini N, Klein Wolterink RG, Satoh-Takayama N, Xu W, Vosshenrich CA, Hendriks RW *et al.* Gata3 drives development of ROR γ t+ group 3 innate lymphoid cells. *J Exp Med* 2014; **211**:199–208.
- 60 Yang Q, Monticelli LA, Saenz SA, Chi AW, Sonnenberg GF, Tang J *et al.* T cell factor 1 is required for group 2 innate lymphoid cell generation. *Immunity* 2013; **38**:694–704.
- 61 Constantinides MG, McDonald BD, Verhoef PA, Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 2014; **508**:397–401.
- 62 Lim AI, Li Y, Lopez-Lastra S, Stadhouders R, Paul F, Casrouge A *et al.* Systemic human ILC precursors provide a substrate for tissue ILC differentiation. *Cell* 2017; **168**:e10.
- 63 Bjorklund AK, Forkel M, Picelli S, Konya V, Theorell J, Friberg D *et al.* The heterogeneity of human CD127⁺ innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol* 2016; **17**:451–60.
- 64 Koues OI, Collins PL, Cella M, Robinette ML, Porter SI, Pyfrom SC *et al.* Distinct gene regulatory pathways for human innate versus adaptive lymphoid cells. *Cell* 2016; **165**:1134–46.
- 65 Robinette ML, Fuchs A, Cortez VS, Lee JS, Wang Y, Durum SK *et al.* Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol* 2015; **16**:306–17.
- 66 Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, de Jong E, Gronke K, Kofoed-Nielsen M *et al.* Interleukin-12 and -23 control plasticity of CD127⁺ group 1 and group 3 innate lymphoid cells in the intestinal lamina propria. *Immunity* 2015; **43**:146–60.
- 67 Lim AI, Menegatti S, Bustamante J, Le Bourhis L, Allez M, Rogge L *et al.* IL-12 drives functional plasticity of human group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med* 2016; **213**:569–83.
- 68 Ohne Y, Silver JS, Thompson-Snipes L, Collet MA, Blanck JP, Cantarel BL *et al.* IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nat Immunol* 2016; **17**:646–55.
- 69 Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, Sanden C, Mori M, Yu L *et al.* Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol* 2016; **17**:626–35.
- 70 Bal SM, Bernink JH, Nagasawa M, Groot J, Shikhaigae MM, Golebski K *et al.* IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol* 2016; **17**:636–45.
- 71 Huang Y, Guo L, Qiu J, Chen X, Hu-Li J, Siebenlist U *et al.* IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1^{hi} cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2015; **16**:161–9.
- 72 Duerr CU, McCarthy CD, Mindt BC, Rubio M, Meli AP, Pothlichet J *et al.* Type 1 interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2016; **17**:65–75.
- 73 Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M *et al.* Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol* 2016; **17**:76–86.
- 74 Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H *et al.* Innate production of T_H2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺ Sca-1⁺ lymphoid cells. *Nature* 2010; **463**:540–4.
- 75 Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; **150**:366–76.
- 76 Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, Stine RR, Monticelli LA, Sonnenberg GF *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote being of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 2015; **519**:242–6.
- 77 Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A *et al.* Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* 2013; **210**:535–49.
- 78 Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB *et al.* Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 2013; **502**:245–8.
- 79 Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN *et al.* Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res* 2010; **107**:650–8.
- 80 Van Gool F, Molofsky AB, Morar MM, Rosenzweig M, Liang HE, Klatzmann D *et al.* Interleukin-5-producing group 2 innate lymphoid cells control eosinophilia induced by interleukin-2 therapy. *Blood* 2014; **124**:3572–6.
- 81 Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC *et al.* Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 2015; **160**:74–87.
- 82 Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V *et al.* Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 2012; **37**:574–87.
- 83 Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM *et al.* Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* 2014; **157**:1292–308.
- 84 Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 2011; **332**:243–7.
- 85 Hu ZQ, Zhao WH. The IL-33/ST2 axis is specifically required for development of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2015; **12**:521–4.
- 86 Lynch L, Michelet X, Zhang S, Brennan PJ, Moseman A, Lester C *et al.* Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol* 2015; **16**:85–95.
- 87 Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S *et al.* The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol* 2015; **16**:276–85.
- 88 Wensveen FM, Jelencic V, Valentic S, Sestan M, Wensveen TT, Theurich S *et al.* NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* 2015; **16**:376–85.
- 89 Molofsky AB, Van Gool F, Liang HE, Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J *et al.* Interleukin-33 and interferon- γ counter-regulate group 2 innate lymphoid cell activation during immune perturbation. *Immunity* 2015; **43**:161–74.
- 90 O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, Weizman OE, Bhardwaj P, Adams NM *et al.* Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity* 2016; **45**:428–41.
- 91 Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010; **464**:1367–70.
- 92 Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisle CJ, Erle DJ *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:11489–94.
- 93 Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, Drynan LF, Wong SH, Cruickshank JP *et al.* Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**:191–8.
- 94 Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25⁺ CD44^{hi} lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol* 2012; **188**:1503–13.
- 95 Halim TY, Krauss RH, Sun AC, Takei F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 2012; **36**:451–63.
- 96 Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y *et al.* Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 2012; **42**:1106–16.
- 97 Christianson CA, Goplen NP, Zafar I, Irvin C, Good JT Jr, Rollins DR *et al.* Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**:59–68.
- 98 Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K *et al.* Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun* 2013; **4**:2675.
- 99 Bartemes KR, Kephart GM, Fox SJ, Kita H. Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**:671–8.
- 100 Liu T, Wu J, Zhao J, Wang J, Zhang Y, Liu L *et al.* Type 2 innate lymphoid cells: a novel biomarker of eosinophilic airway inflammation in patients with mild to moderate asthma. *Respir Med* 2015; **109**:1391–6.
- 101 Lombardi V, Beuraud C, Neukirch C, Moussu H, Morizur L, Horiot S *et al.* Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **138**:305–8.
- 102 Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria JP, O'Byrne PM *et al.* Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**:75–86.
- 103 Nagakumar P, Denney L, Fleming L, Bush A, Lloyd CM, Saglani S. Type 2 innate lymphoid cells in induced sputum from children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**:624–6.
- 104 Halim TY, Steer CA, Matha L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM *et al.* Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity* 2014; **40**:425–35.
- 105 Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, Scott C, Bain CC, Cerovic V *et al.* Type 2 innate lymphoid cells drive CD4⁺ Th2 cell responses. *J Immunol* 2014; **192**:2442–8.
- 106 Oliphant CJ, Hwang YY, Walker JA, Salimi M, Wong SH, Brewer JM *et al.* MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4⁺ T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* 2014; **41**:283–95.
- 107 Gold MJ, Antignano F, Halim TY, Hirota JA, Blanchet MR, Zaph C *et al.* Group 2 innate lymphoid cells facilitate sensitization to local, but not systemic, TH2-inducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**:1142–8.

- 108 Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4⁺ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy* 2014; **69**:1300–7.
- 109 Halim TY, Hwang YY, Scanlon ST, Zaghouni H, Garbi N, Fallon PG *et al.* Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat Immunol* 2016; **17**:57–64.
- 110 Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA *et al.* Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity* 2014; **40**:758–71.
- 111 Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A *et al.* An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity* 2015; **43**:175–86.
- 112 Barnig C, Cernadas M, Dutile S, Liu X, Perrella MA, Kazani S *et al.* Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med* 2013; **5**:174ra26.
- 113 Doherty TA, Khorram N, Lund S, Mehta AK, Croft M, Broide DH. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **132**:205–13.
- 114 Xue L, Salimi M, Panse I, Mjosberg JM, McKenzie AN, Spits H *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**:1184–94.
- 115 Kim HY, Lee HJ, Chang YJ, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA *et al.* Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med* 2014; **20**:54–61.
- 116 Mathews JA, Krishnamoorthy N, Kasahara DJ, Cho Y, Wurmbrand AP, Ribeiro L *et al.* IL-33 drives augmented responses to ozone in obese mice. *Environ Health Perspect* 2017; **125**:246–53.
- 117 Kim SH, Sutherland ER, Gelfand EW. Is there a link between obesity and asthma? *Allergy Asthma Immunol Res* 2014; **6**:189–95.
- 118 Lloyd CM, Saglani S. Eosinophils in the spotlight: finding the link between obesity and asthma. *Nat Med* 2013; **19**:976–7.
- 119 Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; **2013**:139239.
- 120 Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F *et al.* IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4⁺ Th17 cells. *J Exp Med* 2012; **209**:1595–609.
- 121 Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 2013; **498**:113–7.
- 122 von Burg N, Chappaz S, Baerenwaldt A, Horvath E, Bose Dasgupta S, Ashok D *et al.* Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**:12835–40.
- 123 Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J *et al.* Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* 2015; **348**:1031–5.
- 124 Tumanov AV, Koroleva EP, Guo X, Wang Y, Kruglov A, Nedospasov S *et al.* Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe* 2011; **10**:44–53.
- 125 Lintomen L, Calixto MC, Schenka A, Antunes E. Allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis and airways eosinophilic inflammation in leptin-deficient ob/ob mice. *Obesity (Silver Spring)* 2012; **20**:1959–65.

LETTER TO THE EDITOR

Direct activation of the aryl hydrocarbon receptor by dog allergen participates in airway neutrophilic inflammation

To the Editor,

Asthma is a chronic disorder, characterized by airway hyperresponsiveness (AHR), variable bronchial remodelling and an inflammatory process leading to fluctuating recruitment of eosinophils and neutrophils. Among asthma patients, up to 10% exhibit severe asthma and display type 2 (T2)-low and type 2 (T2)-high phenotypes. Besides T2 cytokines, Th17-type cytokines are also a driver of severe asthma pathophysiology, through induction of airway neutrophil infiltration, AHR, bronchial remodelling and corticosteroid resistance. One determinant of Th17-type cytokine production is the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr). This receptor is activated by small molecules provided by the diet, microorganisms, metabolism and pollutants. In T cells, Ahr controls IL-17 and IL-22 transcription, but can also induce CD4 T cells with a regulatory phenotype. Depending on the Ahr ligand used, opposite results have been published in allergic airway inflammation (AAI) reporting anti- and pro-inflammatory effects.¹ The aim of this study was to develop a model of neutrophilic AAI exhibiting Th17-type features to evaluate the effect of Ahr blockade.

A mouse model of dog allergen-induced AAI was developed (Figure S1A), an allergen associated with more severe asthma in humans.² Dog allergen-challenged mice exhibited all the cardinal features of AAI, including increases in broncho alveolar lavage (BAL) total cell numbers, in relation to a high number of neutrophils and to a lesser extent with eosinophil and lymphocyte elevations (Figure 1A and Figure S1B), raised total and dog allergen-specific serum IgE (Figure 1B), and elevated AHR (Figure 1C). The cytokine profile of lung extracts showed that although BAL eosinophil counts were low in this model, Th2-type cytokines and chemokines *IL-4*, *IL-13*, *IL-33* and *CCL17* were upregulated in the lungs of dog allergen-challenged mice, as were *IL-17*, *IL-22* and neutrophil attracting *CXCL1* and *CXCL2*, but not *IFN- γ* (Figure 1D and Figure S1C). Cells known to produce *IL-17* and *IL-22* were analysed by flow cytometry (Figure S2). In dog allergen-stimulated groups, CD4⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells and lymphoid tissue inducer cells (LTi), a subset of ILC3, appeared to be the major cell subsets expressing both *IL-17* and *IL-22* (Figure 1E). Other analysed cells did not significantly contribute to this cytokine production after allergen challenge (Figure S1D). These data are in agreement with other studies in lung infection models.³ These pro-Th17 effects may relate to dog allergen composition, which includes lipocalin Can f 1, able to bind the mannose

and DC-SIGN receptors that promote Th17 responses to fungal infections. Histological analysis of lung sections from dog allergen-challenged mice compared with PBS-challenged mice showed an increase in haematoxylin and eosin-stained cell infiltrates, in periodic acid-Schiff-stained mucus and in peri-bronchial collagen depots as assessed by Masson's trichrome staining, Picrosirius red staining and two-photon microscopy, as well as thicker bronchial smooth muscle cell (SMC) layer assessed by anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) staining, and the presence of ectopic follicles resembling inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) (Figure 1F and Figure S1E). iBALTs are tertiary lymphoid organs composed of B and T cells, and germinal centres with follicular dendritic cells (FDC). CD21⁺FDC, B220⁺B cells and CD3⁺T cells were assessed by immunohistochemistry and found in the peri-bronchial ectopic follicles (Figure 1G). Total IgA and dog allergen-specific IgG1 were strongly increased in BAL from the dog allergen-challenged but not from the control group (Figure 1G). Although the presence of BALT has been observed in bronchial biopsies from asthmatic patients, their relationship with the severity of asthma and their cause remain unclear. Pathogen-derived LPS is able to favour the induction of iBALT; however, much higher doses (1–10 μ g)³ than those present in our extracts (50 ng cumulative dose) are necessary. In lung infection models, *IL-17* deficiency may³ or may not⁴ alter iBALT development depending on the infectious agent used. Finally, *IL-22* has been described to favour formation of tertiary lymphoid organs in virus-infected salivary glands in mice.⁵ Whether *IL-17* and/or *IL-22* initiate iBALT formation in our AAI model will need further investigations.

As Ahr controls the expression of *IL-17* and *IL-22*, we wondered whether dog allergen may contain an Ahr ligand. In reporter cell lines for the human and murine Ahr, dog allergen and in particular Can f 2, but neither house dust mite nor LPS, induced a dose-dependent luciferase reporter activity (Figure 2A and Figure S3A). These data suggest that Ahr may participate in the features of dog allergen-induced AAI. The effect of Ahr blockade was evaluated using an antagonist as a curative treatment. The Ahr antagonist CH-223191 was administered through the diet during the challenge phase. In allergic mice, it reduced BAL total cell and neutrophil recruitment and AHR, but neither BAL eosinophils and lymphocytes nor the humoral response compared with non-treated mice (Figure 2B and Figure S3B). Dog allergen-induced *IL-22* production but not the other cytokines including *IL-17* was down-regulated by Ahr antagonist

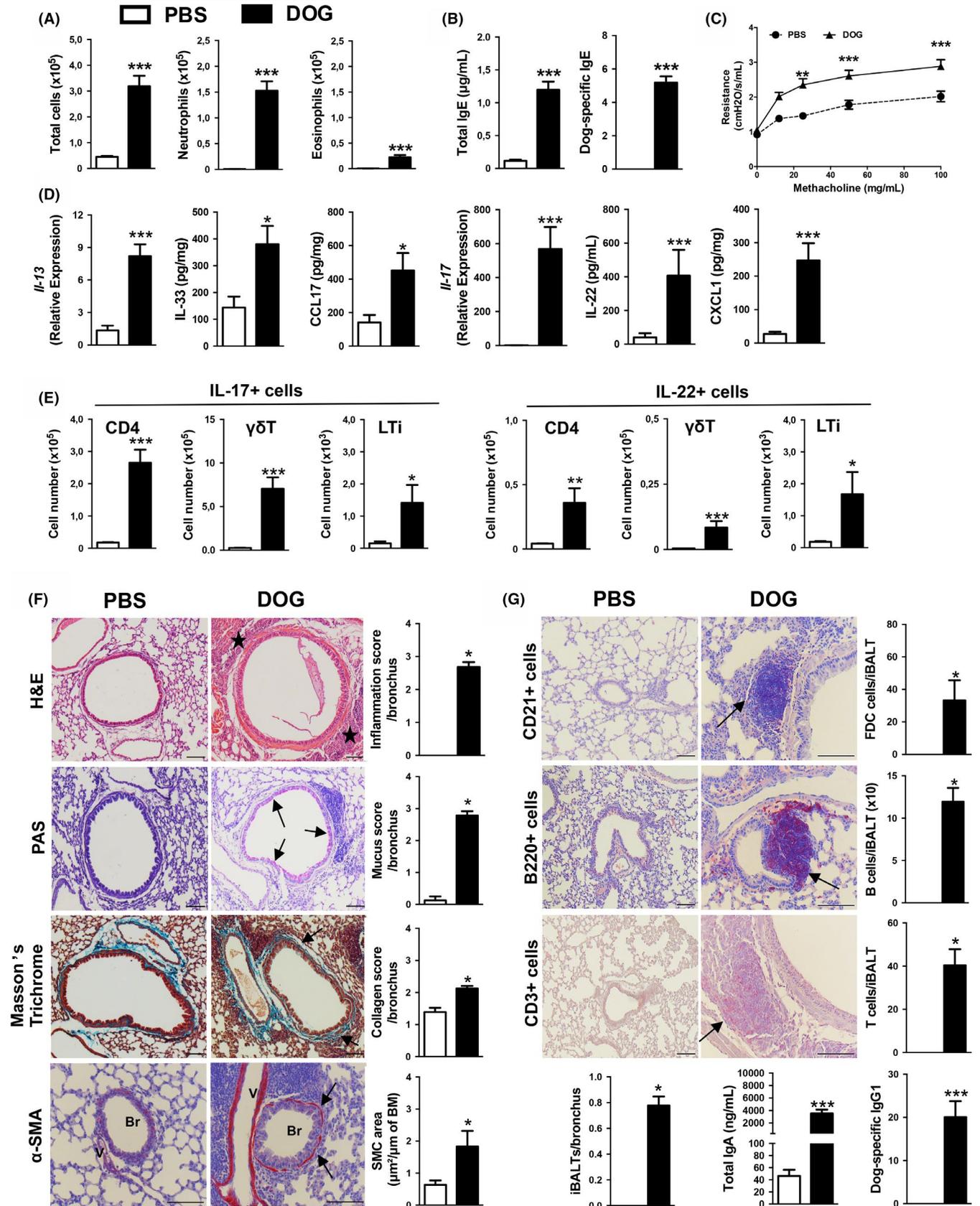


FIGURE 1 Dog allergen extract induces neutrophilic airway inflammation, AHR, bronchial remodelling and iBALT formation. A, BAL absolute number of cells. B, Total IgE and specific IgE (titres) in sera. C, Airway hyperresponsiveness. D, Levels of cytokines in lung extracts and BAL (IL-22). E, Numbers of IL-17⁺ and IL-22⁺ cells in the lungs. LTi: lymphoid tissue inducer cells. F, Representative photographs and quantification of stained lung sections for inflammation using H&E (black stars), mucus using PAS (pink colour), collagen using Masson's trichrome (blue/green staining), SMC using α -SMA antibody (positive cells are stained in red), BM: basement membrane. Black arrows show staining of interest (mucus, collagen and SMC). V: vessel, Br: bronchus. G, Representative photographs and quantification of iBALT: numbers per iBALT of FDC, B cells and T cells. Positive cells are stained in red. Black arrows show staining of interest. Numbers of iBALT, BAL total IgA and dog allergen-specific IgG1. Scale bars: 100 μ m. Data are presented as mean \pm SEM of n mice per group (n = 14-32 for A, B and C, n = 8-20 for D, n = 6-15 for E and n = 4-7 for histology, n = 13-22 for BAL in G). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, vs PBS. The Mann-Whitney test for all and two-way ANOVA for AHR

treatment (Figure 2C). Attenuated IL-22 production following Ahr antagonism may explain the decreased neutrophil infiltration and AHR, through IL-22 capacity to recruit neutrophils,⁶ which are involved in AHR induction.⁷ Histological analysis of lung sections from treated allergic mice evidenced no changes in the inflammation score, or collagen deposition, but showed a decrease in mucus production and in the thickness of SMC (Figure 2D and Figure S3C). Decreased mucus production may be attributed either to direct inhibition of Ahr that has been involved in mucin production or to decreased IL-22 that may also participate in the decreased hyperplasia of airway SMC.⁸ Interestingly, the number of iBALTs was increased

in Ahr antagonist-treated allergic mice (Figure S3D), as were BAL allergen-specific IgG1 antibodies (Figure 2E), FDC and B cell numbers, whereas the number of CD3⁺, Foxp3⁺ regulatory T cells and BAL total IgA antibodies (Figure 2E,F and Figure S3D) was not modified. As IgG1 antibodies bind the inhibitory Fc γ RIIB receptor able to suppress AAI,⁹ this induction might be beneficial in our model. This study provides a novel preclinical model of asthma to assess new therapeutic strategies for the Th17-type endotype. Altogether, these results indicate that the Ahr pathway may provide a therapeutic approach for neutrophilic asthma, not targeted by currently available biotherapies.

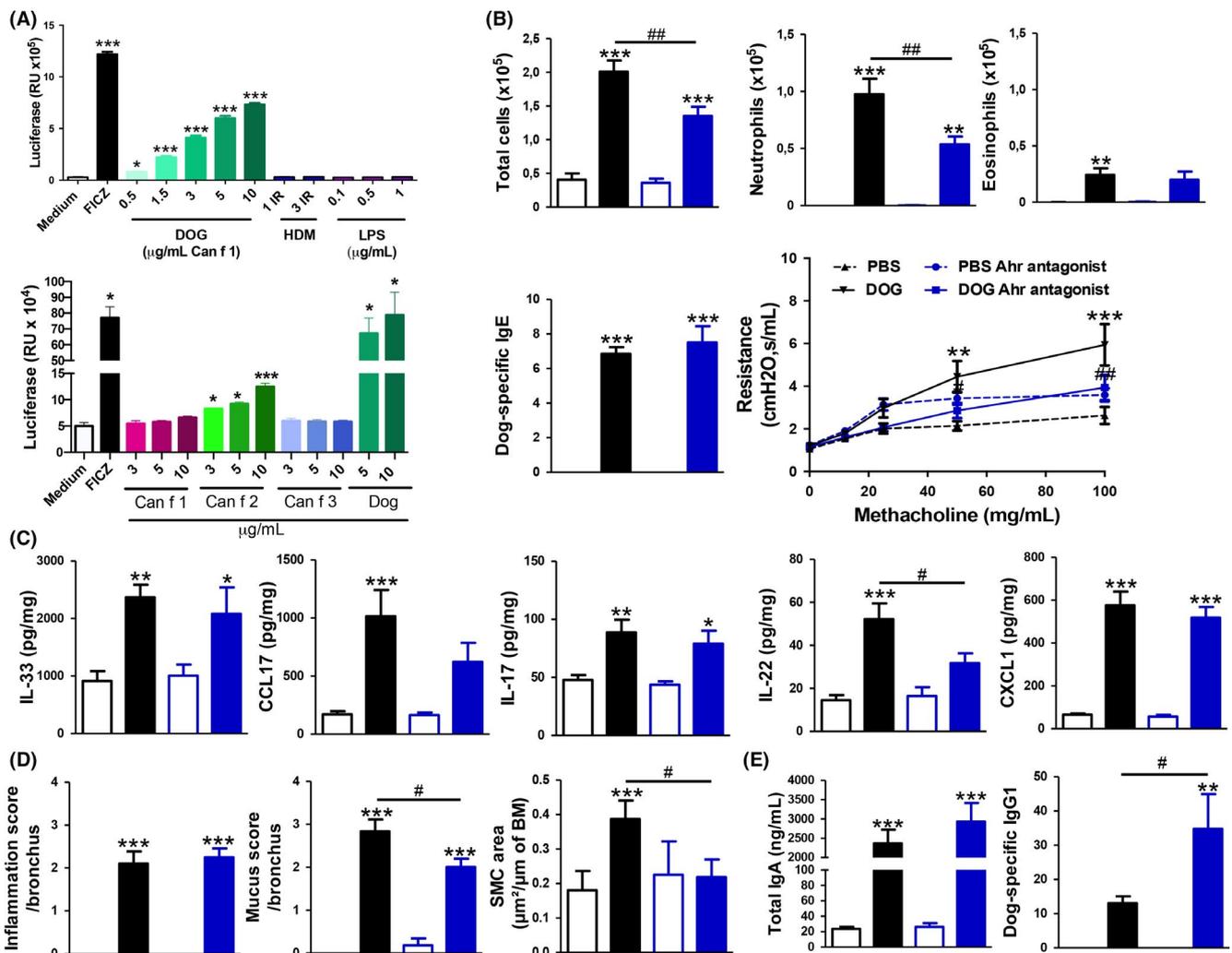


FIGURE 2 (Continued)

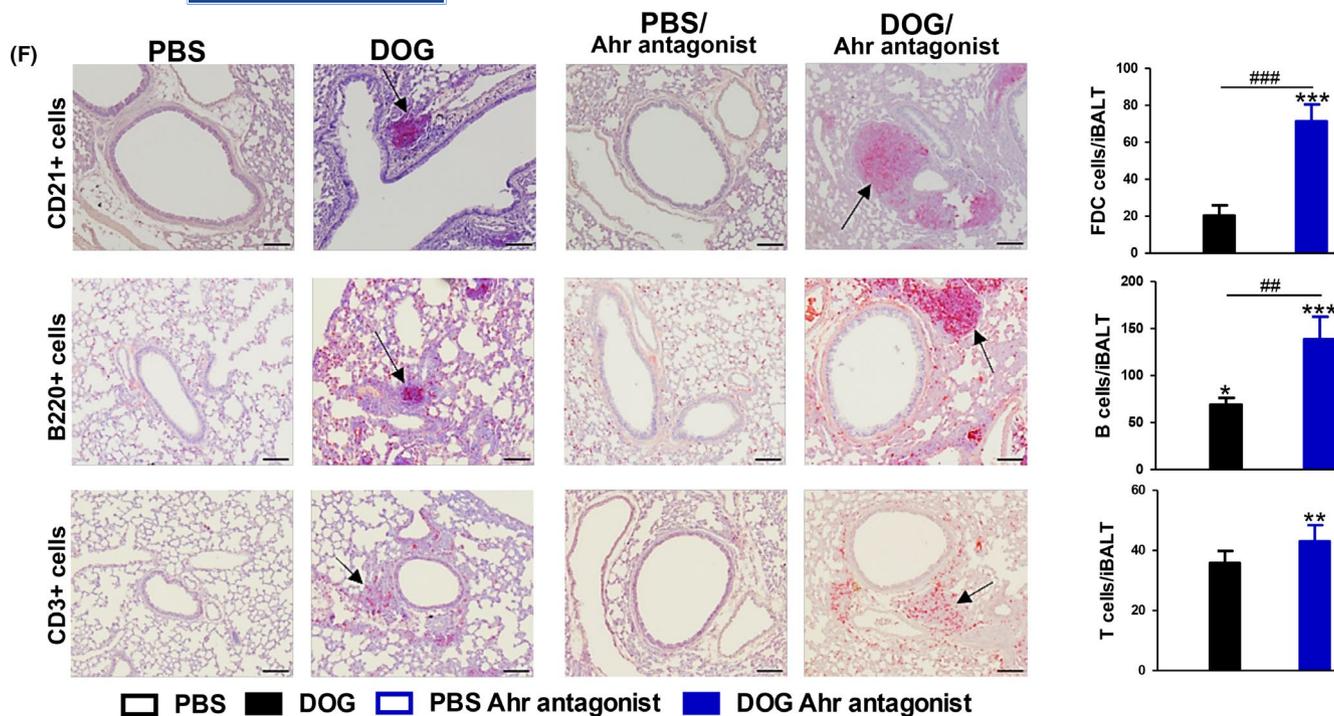


FIGURE 2 Ahr antagonist alleviates AHR, BAL neutrophil infiltration and lung IL-22 production and increases BALT formation. A, Human Ahr reporter activity of dog allergen. Mean relative luciferase luminescent unit in response to positive control FICZ, negative control (medium and LPS) and to dog, Can f 1, Can f 2, Can f 3 and HDM allergens. IR: index of reactivity. Data are expressed as mean \pm SEM of 2 separate experiments in quadruplicate. B, BAL absolute number of cells, serum total and specific IgE (titres), AHR. C, Lung cytokine production. D, Quantification of lung sections for inflammation score using H&E, mucus score using PAS, SMC using α -SMA antibody (positive cells are stained in red), BM: basement membrane. E, BAL total IgA and dog allergen-specific IgG1. F, Representative photographs and/or quantification of iBALT for FDC, B cells and T cells. Positive cells are stained in red, scale bars: 100 μ m. Black arrows show staining of interest. Data are presented as mean \pm SEM of *n* mice per group (*n* = 6-14 for B and C; *n* = 4-6 for histology, *n* = 6-8 mice for BAL). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, versus control, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001. One-way ANOVA for all, except for the antibody response, SMC and T cells (Kruskal-Wallis), and two-way ANOVA for AHR

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the generous support from the NIAID (National Institutes of Health) Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA) for supplying CD1d tetramers and Dr. W. Ouyang (Genentech, San Francisco, CA) for the anti-IL-22 Ab (clone 3F11). The murine Ahr reporter cell line (H1L7.5c3 mouse hepatoma) was kindly provided by Michael Denison (Davis University, CA). This work was supported by a grant from Santelys and by a fellowship to MB by Fonds de Recherche en Santé Respiratoire.

FUNDING INFORMATION

Fonds de Recherche en Santé Respiratoire; Santelys

CONFLICT OF INTEREST

Dr. Chenivresse reports grants from AstraZeneca and Santelys; personal fees from ALK-Abello, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, GlaxoSmithKline, Novartis, Roche, Sanofi and TEVA; and non-financial support from ALK-Abello, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Chiesi, GlaxoSmithKline, MEDA Pharma, Medexact, Novartis, Pierre Fabre and Pfizer, outside the submitted work. Dr. Tscopoulos reports grants from Santelys, during the conduct of the

study; non-financial support from AstraZeneca; and personal fees from ALK-Abello, outside the submitted work. All other authors declare that they have no relevant conflict of interest.

Mélodie Bouté
Saliha Ait Yahia
Julie Nanou
Daniel Alvarez-Simon
Camille Audoussat
Han Vorng
Joanne Balsamelli
Fan Ying
Philippe Marquillies
Elisabeth Werkmeister
Patricia de Nadai 
Cécile Chenivresse
Anne Tscopoulos 

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

Correspondence

Anne Tsicopoulos, Center for Infection and Immunity of Lille,
U1019 Pulmonary Immunity Institut Pasteur de Lille, 1 rue
du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.
Email: anne.tsicopoulos@pasteur-lille.fr

Cécile Chenivesse and Anne Tsicopoulos are the authors equally
contributed to the work.

ORCID

Patricia de Nadai  <https://orcid.org/0000-0001-6084-7447>

Anne Tsicopoulos  <https://orcid.org/0000-0002-1579-2763>

REFERENCES

1. Poulain-Godefroy O, Boute M, Carrard J, et al. The aryl hydrocarbon receptor in asthma: friend or foe? *Int J Mol Sci.* 2020;21:8797.
2. Perzanowski MS, Ronmark E, James HR, et al. Relevance of specific IgE antibody titer to the prevalence, severity, and persistence of asthma among 19-year-olds in northern Sweden. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:1582-1590.
3. Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz G-H, et al. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol.* 2011;12:639-646.
4. Fleige H, Haas JD, Stahl FR, et al. Induction of BALT in the absence of IL-17. *Nat Immunol.* 2011;13:1; author reply 2.
5. Barone F, Nayar S, Campos J, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:11024-11029.
6. Stacey MA, Marsden M, Pham NT, et al. Neutrophils recruited by IL-22 in peripheral tissues function as TRAIL-dependent antiviral effectors against MCMV. *Cell Host Microbe.* 2014;15:471-483.
7. Ekstedt S, Safholm J, Georen SK, et al. Dividing neutrophils in subsets reveals a significant role for activated neutrophils in the development of airway hyperreactivity. *Clin Exp Allergy.* 2019;49:285-291.
8. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J.* 2012;26:5152-5160.
9. Dharajiya N, Vaidya SV, Murai H, et al. FcγRIIb inhibits allergic lung inflammation in a murine model of allergic asthma. *PLoS One* 2010;5:e9337.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

Role of Nrf2 in Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches -Pulmonary Disease/Asthma

Camille Audoussset¹, Toby K. McGovern^{2, 1*}, James G. Martin¹

¹Research Institute of the McGill University Health Center (RI-MUHC), Canada, ²McGill University, Canada

Submitted to Journal:
Frontiers in Physiology

Specialty Section:
Respiratory Physiology

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
727806

Received on:
19 Jun 2021

Revised on:
13 Aug 2021

Journal website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

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

Author contribution statement

Camille Audoussert - conception, drafting, revising, figure creation
Toby McGovern - conception, organization, drafting, revising
James G Marin - organization, conception of topics, drafting, revising

Keywords

Nrf2, respiratory disease, Oxidative Stress, Inflammation, NRF2- KEAP1 pathway, Asthma, Oxidative Stress, molecular mechanism, therapeutic

Abstract

Word count: 227

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a major transcription factor involved in redox homeostasis and in the response induced to oxidative injury. Nrf2 is present in an inactive state in the cytoplasm of cells. Its activation by internal or external stimuli, such as infections or pollution, leads to the transcription of more than 500 elements through the antioxidant response element (ARE) sequence. The lungs are particularly susceptible to factors that generate oxidative stress such as infections, allergens and hyperoxia. Nrf2 has a crucial protective role against these reactive oxygen species (ROS). Oxidative stress and subsequent activation of Nrf2 have been demonstrated in many human respiratory diseases affecting the airways, including asthma and COPD, or the pulmonary parenchyma such as acute respiratory distress syndrome (ARDS) and pulmonary fibrosis. Several compounds, both naturally occurring and synthetic, have been identified as Nrf2 inducers and enhance the activation of Nrf2 and expression of Nrf2-dependent genes. These inducers have proven particularly effective at reducing the severity of the oxidatively driven lung diseases in various animal models. In humans, these compounds offer promise as potential therapeutic strategies for the management respiratory pathologies associated with oxidative stress. The purpose of this review is to summarize the involvement of Nrf2 and its inducers in acute respiratory distress syndrome (ARDS), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), lung fibrosis in both human and in experimental models.

Contribution to the field

The purpose of this review is to summarize the involvement of Nrf2 and its inducers in acute respiratory distress syndrome (ARDS), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and lung fibrosis in both human and in experimental models. It is a comprehensive, detailed review of Nrf2 pathways that affect pulmonary disease processes as well as therapeutic targets. This review will serve to summarize how each disease is affected by the Nrf2 pathway, outlining fundamental differences of how the pathology of each disease can modify Nrf2, therapeutic approaches and the contribution of oxidative stress to each diseases' unique pathology.

Role of Nrf2 in Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches – Pulmonary Disease/Asthma

1 **Camille Audousset¹, Toby McGovern¹, James G. Martin¹.**

2 ¹Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Montréal, Québec, Canada

3 *** Correspondence:**

4 James Martin

5 james.martin@mcgill.ca

6 **Keywords: Nrf2, respiratory disease, oxidative stress, inflammation**

7 **Abstract**

8 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a major transcription factor involved in redox
9 homeostasis and in the response induced by oxidative injury. Nrf2 is present in an inactive state in
10 the cytoplasm of cells. Its activation by internal or external stimuli, such as infections or pollution,
11 leads to the transcription of more than 500 elements through its binding to the antioxidant response
12 element (ARE). The lungs are particularly susceptible to factors that generate oxidative stress such as
13 infections, allergens and hyperoxia. Nrf2 has a crucial protective role against these reactive oxygen
14 species (ROS). Oxidative stress and subsequent activation of Nrf2 have been demonstrated in many
15 human respiratory diseases affecting the airways, including asthma and chronic obstructive
16 pulmonary disease (COPD), or the pulmonary parenchyma such as acute respiratory distress
17 syndrome (ARDS) and pulmonary fibrosis. Several compounds, both naturally occurring and
18 synthetic, have been identified as Nrf2 inducers and enhance the activation of Nrf2 and expression of
19 Nrf2-dependent genes. These inducers have proven particularly effective at reducing the severity of
20 the oxidative stress-driven lung injury in various animal models. In humans, these compounds offer
21 promise as potential therapeutic strategies for the management of respiratory pathologies associated
22 with oxidative stress but there is thus far little evidence of efficacy through human trials. The purpose
23 of this review is to summarize the involvement of Nrf2 and its inducers in ARDS, COPD, asthma and
24 lung fibrosis in both human and in experimental models.

25 **Article**

26 **1 Structural Features of Nrf2**

27 The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) plays a central role in controlling both
28 constitutive and inducible resistance to oxidants and electrophiles (1). Nrf2 is a master regulator of
29 redox homeostasis, involved in the regulation of more than 500 genes, including genes that regulate
30 oxidative stress (heme oxygenase (HO)-1, glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM), and
31 glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), inflammation (transforming growth factor
32 (TGF)- β and Nuclear Factor Kappa (NF- κ)B), xenobiotic metabolism and excretion (NAD(P)H
33 quinone oxidoreductase (NQO1), Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C1 (AKR1C1), and
34 multidrug resistance-associated protein (MRP)-1), apoptosis (Bcl-2 and BclxL), and autophagy (p62)
35 (2-4). Nrf2 is a member of the vertebrate Cap'n'Collar (CNC) transcription factor subfamily of basic
36 leucine zipper (bZip) transcription factors. In addition to Nrf2, the CNC subfamily of transcription
37 factors comprises nuclear factor E2-related factors 1 and 3 (Nrf1 and Nrf3), and p45 NF-E2. Nrf2

38 activation occurs under various conditions of stress, such as exposure to mild oxidative or
39 electrophilic stress. Multiple classes of chemical inducers are known to elevate endogenous
40 antioxidants by activating Nrf2 (5). The most important feature of Nrf2 is its rapid mobilization and
41 nuclear translocation that reflects the mechanisms that control its cytoplasmic free concentration.

42 Ubiquitin proteasome system (UPS)-mediated mechanisms direct the meticulous regulation of Nrf2.
43 While cells are in homeostatic conditions, Nrf2 is targeted for constant degradation through the UPS.
44 This results in low levels of free Nrf2 protein and constrains the transcription of Nrf2-dependent
45 genes. In an unstressed state cellular degradation occurs through Kelch-like ECH-associated protein 1
46 (Keap1), an adaptor protein of a cullin3 (Cul3)–ring-box 1 (Rbx1) containing E3 ubiquitin ligase
47 complex (6, 7). Dimeric Keap1 is responsible for recognition of Nrf2 through two key motifs in the
48 Neh2 domain of Nrf2 located in its N-terminus (7). The Kelch domain of each Keap1 binds to the
49 ‘DLG’ and ‘ETGE’ motifs, recognized as the low affinity and high-affinity-binding sites,
50 respectively (8). Nrf2 is subsequently polyubiquitinated at seven key lysine residues within the
51 Neh2 domain, leading to Nrf2 proteasomal destruction (9). Upon activation, the levels of Nrf2 rise
52 and nuclear Nrf2 heterodimerizes with one of the small Maf proteins. These Nrf2–Maf heterodimers
53 recognize antioxidant response elements (AREs), 11- (or 16) bp enhancer sequences in the regulatory
54 region of Nrf2 target genes, thereby allowing the recruitment of key factors for transcription (10).
55 Typically, genes that contain the ARE are redox-balancing factors, detoxifying enzymes,
56 transporters, stress-response proteins and metabolic enzymes (3, 11). Activation of Nrf2 occurs
57 primarily through increased stability of the Nrf2 protein resulting in enhanced availability for binding
58 to the ARE. Subsequently, this allows for increased transcription of the antioxidant genes without the
59 requirement for the synthesis of Nrf2 de novo.

60 **1.1 Keap1-Dependent Regulation of Nrf2 Activity**

61 The most studied and widely accepted mechanism of Nrf2 regulation is through Keap1–Cul3–Rbx1
62 E3 ubiquitin ligase. Many reactive oxygen species are thiol-reactive compounds that inhibit Keap1
63 activity. Exposure of thiol-reactive compounds induces a conformational change in Keap1, impeding
64 the ubiquitinylation of Nrf2 by Cul3. Upon introduction of electrophiles or reactive oxygen species
65 (ROS), the Nrf2-mediated cytoprotective response is activated. Although several mechanisms have
66 been proposed, explicit molecular mechanisms detailing how Nrf2 escapes the Keap1 gate are not
67 fully understood. One such mechanism involves the modification of a cysteine in Keap1 resulting in
68 Nrf2 dissociation from Keap1 (12). A more widely accepted model proposes a Keap1 hinge and
69 latch dissociation mechanism in which Nrf2 binds to the Keap1 homodimer through a high-affinity
70 ETGE motif as the “hinge” and a low-affinity DLG motif as the “latch.” The modification of cysteine
71 in Keap1 results in a conformational change but does not trigger the dissociation of Nrf2. Ubiquitin
72 binding to Nrf2 may therefore disrupt the weak latch binding site (13). Activation of Nrf2 by Keap1
73 ubiquitinylation has also been proposed and involves the modification of a cysteine in Keap1 which
74 allows the ubiquitin conjugation from Nrf2 to itself (14). The likely critical cysteine residues in
75 Keap1 that play a role have been identified. Specifically, cysteine residues in Keap1, especially
76 Cys¹⁵¹, have been shown to act as sensors and become covalently modified by electrophilic species or
77 ROS (15). Other studies have shown a role for Cys-273 and Cys-288 in Keap1 which appear to
78 contribute to the structural integrity and activity of Keap1 required for maintaining ubiquitin ligase
79 activity (16). Such modifications induce a conformational change in Keap1, probably by disrupting
80 the low-affinity interaction between the Kelch domain and the DLG-motif, which leads to impaired
81 ubiquitinylation of Nrf2, blocking UPS-mediated degradation and thus increasing Nrf2 protein levels
82 (17). Newly synthesized Nrf2 accumulates as a result of the altered stoichiometry and cytosolic Nrf2
83 is then free to translocate into the nucleus and transcriptionally activate its target genes. Once

84 homeostasis is restored in the cell, karyopherin alpha 6 (importin alpha 7) (KPNA6) translocates
85 Keap1 to the nucleus. Nuclear Keap1 facilitates nuclear export of Nrf2, and the cycle of Keap1-
86 mediated ubiquitinylation and degradation in the cytosol resumes. These events effectively “turn off”
87 the transcription of the Nrf2 target genes, and the low basal levels of free Nrf2 are re-established (18,
88 19).

89 **1.2 Keap1-Independent Regulation of Nrf2 Activity**

90 Keap1-independent mechanisms that can control Nrf2 activity have been identified. In 2004, a
91 redox-insensitive degron within the Neh6 domain of Nrf2 was reported (20) followed by the
92 discovery that the Neh6 domain of mouse Nrf2 contains a group of serine residues that can be
93 phosphorylated by the serine/threonine kinase glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). This
94 phosphorylation event in the Neh6 domain creates a phosphorylated destruction motif
95 (phosphodegron), which can then be recognized by the β -TrCP-Skp1-Cul1-Rbx1 E3 ubiquitin ligase
96 complex (21). Additionally, Nrf2 can be regulated by other proteins through disruption of the Nrf2-
97 Keap1 interaction. In 2014, Hast et al., identified a stabilizing mechanism for Nrf2 which included
98 numerous proteins with motifs identical (or similar) to the ETGE motif of Nrf2. These proteins were
99 shown to compete with Nrf2 for Keap1 binding, resulting in the stabilizing effect (22). Protein
100 kinases have also been shown to play an essential role in Keap1-independent Nrf2 activation where
101 phosphorylation at a specific amino acid residue of Nrf2 can increase its stability and transactivation
102 activity (23). Identified protein kinase pathways associated with Keap1-independent activation of
103 Nrf2 include phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), MAPKs, PKC, and glycogen synthase kinase-3
104 (GSK-3) (24). PI3K, PKC, c-Jun, N-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated protein
105 kinase (ERK) have all been shown to positively regulate Nrf2 (13), whereas p38 MAPK regulates the
106 Nrf2 pathway both positively and negatively (16, 25-27). Other positive regulators of Nrf2 include
107 (E/S)TGE containing proteins such as dipeptidyl peptidase 3 (DPP3) and partner and localizer of
108 BRCA2 (PALB2), although perhaps the most recognized positive regulator of Nrf2 involves p62, a
109 protein containing the STGE motif (10).

110 **1.3 Transcriptional regulation of Nrf2**

111 Nrf2 can also be transcriptionally regulated through oncogenes; Nrf2 can be up-regulated by
112 oncogenic activation of K-Ras^{G12D}, B-Raf^{V619E} and Myc^{ERT2} (28). The first demonstration of Nrf2
113 modulation at the transcriptional level was shown through activation of Nrf2 by oncogenic K-rat
114 sarcoma (Ras) and facilitated through a 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-responsive
115 element (TRE) in the regulatory region of *Nrf2* (29). Although the precise mechanisms by which B-
116 Raf^{V619E} and Myc^{ERT2} up-regulate the transcription of Nrf2 are currently unknown, these studies
117 suggest a possible therapeutic benefit of Nrf2 inhibitors, such as brusatol, in this context to facilitate
118 chemotherapy (30).

119 **2 Nrf2 and disease**

120 **2.1 Acute respiratory distress syndrome (ARDS) and Nrf2**

121 ARDS describes a severe clinical syndrome defined by acute respiratory failure with substantial
122 morbidity and mortality. Although the etiology has proven complex with a high degree of
123 variability, severe pneumonia, sepsis, viral infections, major traumas, transfusions, and inhalation of
124 noxious substances are some of the major causes. Clinical symptoms include dyspnea, rapid
125 breathing, hypoxemia, and bilateral opacities on a chest radiograph (31, 32). Despite the various
126 etiologies leading to ARDS, many of the hallmark signs and symptoms are shared. In the acute phase

127 of ARDS (days 1-6), rapid onset of widespread inflammation in the lungs and the disruption of the
128 epithelial-vascular barrier caused by the loss of epithelial and endothelial integrity results in
129 interstitial and alveolar edema (33). Pulmonary inflammation is characterized by large numbers of
130 neutrophils and macrophages and epithelial cell damage is often observed as a denudation of airways
131 and alveolar spaces (34). The subacute phase (days 7-14) typically show reabsorption of edema, and
132 evidence of repair in the form of cell proliferation, particularly of alveolar type II cells. Neutrophilia
133 persists and infiltration of fibroblasts may be observed at this point as well as evidence of collagen
134 deposition.(35). In the chronic phase (day 14+) neutrophil numbers wane and are replaced by an
135 increase in mononuclear cells, alveolar macrophages and increasing fibrosis. The consequence of
136 these pathologies results in immediate, severe airway damage and dysfunction often with long term
137 lung function impairment (35).

138 The mechanism driving the pathogenesis of ARDS remains elusive and therefore specific, effective
139 therapeutics are lacking. However, several studies have shown there to be two recurring,
140 indispensable and interactive factors, namely, lung inflammation and oxidative stress. It is well
141 established that oxidative injury to the lung can be largely mediated by reactive oxygen species
142 (ROS).(36) Biologically important ROS include superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide
143 (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^-), and hypochlorous acid ($HOCl$).(37) Additionally, reactive nitrogen
144 species, including peroxynitrite ($ONOO^-$), a derivative of nitric oxide, have also been shown to
145 contribute to ARDS pathogenesis (38, 39). The generation and presence of ROS and nitrogen species
146 leads to tissue damage, cell injury and cell death by several mechanisms. Strand breaks and point
147 mutations can directly damage DNA leading to an increase in lipid peroxidation, resulting in the
148 formation of vasoactive and proinflammatory molecules such as thromboxane (40). Oxidation of
149 proteins, particularly at sulfhydryl groups, can alter their activity (41). Presence of oxidized proteins
150 induces the release of proteases, inactivation of antioxidants and reduced production of antiprotease
151 enzymes.(42) Finally, oxidation can enhance the activity of transcription factors, such as activator
152 protein-1 (43) and NF- κ B (44), leading to enhanced expression of proinflammatory genes (45).

153 Cells synthesize a number of endogenous Nrf2-dependent antioxidants including superoxide
154 dismutase, catalase, and glutathione peroxidase designed to neutralize ROS and mitigate damage
155 during ARDS (46). Several studies in both animals and humans have demonstrated the importance of
156 Nrf2 activity in the context of ARDS. In a hyperoxia-induced murine model of ARDS, Nrf2 has been
157 identified as a susceptibility gene, as single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been found in
158 hyperoxia-susceptible C57BL/6J and hyperoxia-resistant C3H/HeJ mice (47). Nrf2-deficient mice
159 have demonstrated an increased likelihood of developing ARDS, and have enhanced lung
160 hyperpermeability, epithelial injury, and inflammation following exposure to hyperoxia or treatment
161 with butylated hydroxytoluene (48, 49). Not surprisingly, basal and induced expression levels of
162 Nrf2-dependent genes were reduced in Nrf2^{-/-} mice suggesting that Nrf2 transcriptional activity is
163 key in the response to hyperoxia-induced acute lung injury (50). In humans, over 500 single-
164 nucleotide polymorphisms (SNPs) of Nrf2 have been identified to date. Importantly, the risk of
165 developing ARDS after severe trauma was shown to be enhanced in European and African American
166 individuals possessing a functional Nrf2 SNP (Figure 1) that affected the binding affinity at a
167 promoter site upstream of the Nrf2 gene (51). This study also suggested that Nrf2 autoregulated its
168 expression via binding to this site.

169 Recently, studies have focused on exploiting Nrf2 activity using various Nrf2 activators in an effort
170 to protect against the effects of ARDS. The Nrf2 activator, oleanane triterpenoid CDDO-imidazole
171 (CDDO-Im) is reported to activate Nrf2/ARE signaling by interfering with the interaction between
172 Keap1 and Nrf2 in the cytosol (52). CDDO-Im inhibits pulmonary hemorrhage, proteinaceous

173 edema, and inflammatory cell infiltration in hyperoxia-induced ARDS in mice (53). Another Nrf2
174 activator, tert-butylhydroquinone (tBHQ), was shown to reduce lipopolysaccharide (LPS)-induced
175 mortality and lung injury in mice and to down-regulate pro-inflammatory mediators and up-regulate
176 anti-inflammatory mediators (Figure 1) (54). Interestingly, it appears that tBHQ confers its protection
177 primarily by promoting the polarization of M2 macrophages by inhibiting the p65 nuclear factor- κ B
178 pathway and activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ , while suppressing the
179 polarization of M1 macrophages. Resveratrol is a dietary polyphenol found in wine and red-skinned
180 fruit with many anti-inflammatory properties and it also activates Nrf2. Similarly to tBHQ,
181 resveratrol has been shown to suppress the M1 macrophage population as well as several pro-
182 inflammatory cytokines and chemokines [tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) - 1 β ,
183 IL - 6, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)/monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, CCL4/
184 macrophage inflammatory protein-1 β (MIP1 β), CCL5/Regulated on activation, normal T cell
185 expressed and secreted (RANTES) and CXCL10/Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10)]
186 following LPS-induced acute lung injury in mice (55). Perhaps the most well-studied Nrf2 activator
187 is sulforaphane (SFN), a naturally occurring sulphur-rich isothiocyanate found in cruciferous
188 vegetables. While the precise mechanisms by which SFN acts as an Nrf2 activator are not fully
189 understood, the chemical properties of SFN suggest direct interaction with Keap1. Cysteine residues
190 with low pKa values are particularly reactive with isothiocyanates. These cysteines are thiolate
191 anions at physiological pH, and therefore primed for efficient nucleophilic attack on electrophilic
192 substrates. Upon entry into the cell, SFN interacts with Keap1, which contains a number of cysteine
193 residues. These residues are sensors for oxidants and electrophiles, including isothiocyanates (56).
194 SFN triggers a conformational change in Keap1, freeing Nrf2 and allowing it to translocate to the
195 nucleus, where it binds to the ARE and initiates the subsequent transcription of antioxidants begins.
196 In addition to activating Nrf2 directly through interaction with Keap1, SFN may also protect against
197 ARDS indirectly. In a mouse model of ARDS induced by LPS, SFN was shown to inhibit the
198 increase of NF- κ B, prevent increases in several proinflammatory mediators and enzymes
199 cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as well as activating the Nrf2
200 pathway(57). As with most of the pathologies that we discuss further in this review, there is a lack of
201 favourable evidence through clinical trials in human ARDS and in some instances outcomes suggest
202 possible harmful effects of treatments (58).

203 **2.2 Nrf2 and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)**

204 COPD contributes significantly to the global burden of disease as one of the main causes of
205 preventable morbidity and mortality worldwide (59). COPD is a slowly progressive disease
206 characterized by persistent airflow obstruction, dyspnea, wheeze, productive cough, and increased
207 susceptibility to respiratory infection. The progressive decline of pulmonary function, mostly
208 frequently assessed from the forced expiratory volume in one second (FEV₁), is a characteristic of
209 COPD and may lead to chronic respiratory failure and death. Decline in lung function has been
210 linked to polymorphisms of Nrf2-related genes and susceptibility to cigarette smoke-induced decline
211 in lung function (reviewed in (60)). Acute exacerbations of respiratory symptoms are also a typical
212 and important feature of COPD. They can be triggered by infection, pollution or other factors (61).
213 Several factors are proposed to contribute to the development and pathogenesis of COPD but
214 interactions between host genetic susceptibility and exposure to particulates are the most widely
215 accepted mechanisms. Genetic risk factors associated with an increased risk of COPD are alpha
216 antitrypsin deficiency in smokers, represented by the homozygous PiZZ and heterozygous PiMZ
217 genotype (62) and an elastin mutation (63). Other associations have been demonstrated with GWAS

218 studies but consistently replicated (64). The postulated pathogenesis of COPD includes protease-anti-
219 protease imbalance, recruitment of inflammatory cells, peri-bronchiolar fibrosis and oxidative stress.

220 Cigarette smoke (CS) exposure, in particular, has been identified as the primary and most preventable
221 cause of COPD (65). A single puff of cigarette smoke contains more than 1×10^{15} oxidant molecules
222 (66). In the rat, chronic exposure to CS induced an up-regulation of the anti-oxidant genes controlled
223 by Nrf2 and development of a COPD-like phenotype (67). Surprisingly, in smokers with emphysema,
224 the nuclear localisation of Nrf2 and the expression of HO-1 are decreased in the lung and, more
225 specifically in the macrophage population compared to healthy subjects and to smokers without
226 emphysema (Figure 2) (68). This decrease in the nuclear localization of Nrf2 in macrophages is
227 associated with an increase in the expression of both Keap1 and Bach1, a repressor of HO-1
228 expression (69), in smokers with emphysema. HO-1 mRNA level is significantly negatively
229 correlated with airways obstruction and lung hyperinflation (68). CSE treatment of murine
230 macrophages inhibits LPS-induced expression of the scavenger receptor MARCO (Macrophage
231 Receptor with Collagenous Structure) but concomitantly promotes the degradation of Keap1. The
232 resultant increase in nuclear translocation of Nrf2 is offset by interference with Nrf2 acetylation that
233 impairs DNA binding of Nrf2. Proteasome inhibitors prevent the suppression of MARCO expression.
234 Thus, the effects of CSE are complex and overall interfere with a favorable host response to
235 oxidative stress and immunity (70).

236 On the genetic level, the study of the structure of the Nrf2 gene on whole blood samples revealed
237 three single nucleotide polymorphisms and one triplet repeat polymorphism in the gene promoter,
238 although without a strong correlation with COPD in this study (71). Such a link with COPD has been
239 made by other investigators that observed that the haplotype of the Nrf2 gene promoter affects its
240 activity and may also be associated with more severe COPD and risk of respiratory failure (72). In
241 addition, several studies suggest a modification of the activation of the Nrf2 pathway depending on
242 the cell type and smoking status in COPD patients. Alveolar macrophages of patients with COPD
243 exhibit less nuclear and cytosolic Nrf2 protein (68) and less Nrf2 mRNA compared to healthy
244 subjects (73). In peripheral blood mononuclear cells of mild-moderate COPD patients, regardless of
245 smoking status, the expression level of Nrf2 and Nrf2-related genes is increased (74, 75). However,
246 interestingly in COPD patients, after an average follow-up of 49.7 ± 6.9 months, a decline in Nrf2
247 expression in PBMC was observed and correlated with a significant decrease in respiratory function,
248 as measured by FEV₁ (75). In addition, the smoking status (former or current smoker) in COPD
249 patients may affect the level of transcription of Nrf2 target genes (NQO1, HO1, AKR1C1, AKR1C3)
250 in the bronchial epithelium, in nasal epithelial cells (AKR1B10) and in peripheral blood mononuclear
251 cells (HO-1) whereas none is altered in alveolar macrophages (76).

252 The above findings are supported by numerous *in vitro* and *ex vivo* studies. Nrf2^{-/-} mice exposed to
253 cigarette smoke (CS) develop earlier onset emphysema (77, 78), increased markers of oxidative
254 stress, as assessed by 8-oxo-dG positive cells and more severe inflammation revealed by
255 bronchoalveolar lavage (77). In addition, the up-regulation of antioxidant enzymes, including HO-1,
256 glutathione- S-transferase- α 1 (GST- α 1), G6PD, glutathione reductase (GSR) and peroxiredoxin I
257 (PrxI) induced by CS in wild type mice was not found in Nrf2^{-/-} mice (Figure2) (77, 78). In
258 agreement with these data, activation of Nrf2 by a selective inhibition of Keap1 in club cells in mice,
259 leads to an increased amount of glutathione (GSH) and NQO1 in the lung and an attenuation of
260 pulmonary inflammation caused by cigarette smoke (79). *In vitro*, inhibition of Keap1 by siRNA in
261 human bronchial epithelial cells exposed to hydrogen peroxide mitigates the oxidative stress assessed
262 by DCFDA fluorescence (79). As CS exposure is not the unique pathologic mechanism for COPD,
263 the involvement of Nrf2 in the pathogenesis of other models of emphysema has been tested.

264 Protease/anti-protease imbalance and oxidative stress may also participate in the formation of
265 emphysema (80) and has led to the development of protease-induced emphysema murine models
266 (81). Intra-tracheal injection of porcine pancreatic elastase (PPE) in mice induces a robust pulmonary
267 inflammation and alveolar destruction (Figure 1). This exposure triggers a strong antioxidant
268 response by increasing NQO1, GST-Yc, HO-1, and PrxI. In Nrf2^{-/-} mice, the PPE-induced
269 emphysema is more severe and, as expected, the antioxidant response is reduced. Transplantation of
270 WT bone marrow cells into Nrf2^{-/-} mice 14 days prior to treatment by PPE delays the initial
271 pulmonary inflammation and the appearance of emphysema, attributed to the presence of Nrf2
272 expressing macrophages in lung (82). Furthermore, in two mouse models of COPD induced either by
273 cigarettes or by orotracheal instillation of porcine pancreatic elastase (83), the expression of the
274 WNT/ β -catenin signaling pathway is significantly decreased. In these models, preventive or curative
275 administration of an agonist of the WNT/ β -catenin pathways, lithium chloride (LiCl), improves lung
276 function and limits airspace enlargement (84). Recently, the protective effect of WNT/ β -catenin
277 activation by LiCl has been shown to be abrogated in an Nrf2^{-/-} mouse model of elastase-induced
278 emphysema. Nrf2 is a downstream signal in the protective effect of Wnt3a/ β -catenin and AMP-
279 activated protein kinase (AMPK) in the attenuated lung inflammatory response (85).

280 The above-mentioned data suggest that Nrf2 is involved in the antioxidant response to several
281 underlying pathogenic mechanisms of COPD. However, COPD is a disease with systemic features
282 and the involvement of Nrf2 is not limited to the regulation of the antioxidant response. For instance,
283 CS exposure triggers airway inflammation and can result in cilia shortening, impaired mucociliary
284 clearance and epithelial cell dysfunction (86). Ciliary shortening is mediated by histone deacetylases
285 6 (HDAC6) through an autophagy-dependent mechanism (87). However, it has been shown that Nrf2
286 inhibition may also increase autophagy (88). In Nrf2^{-/-} mice, the level of HDAC6 was increased,
287 suggesting that Nrf2 could counteract the increased expression of HDAC6 by oxidative stress and
288 proteolytic stress (87).

289 Skeletal muscle dysfunction is among the systemic effects of COPD (89). Recent work has shown
290 that the level of irisin, a skeletal muscle cell-derived hormone, is correlated with the severity of
291 emphysema in COPD patients and that it inhibits apoptosis induced by CS on human A549 alveolar
292 cells (90). Physical activity in mice exposed to CSE increases the levels of irisin that is associated
293 with an increased pulmonary expression of Nrf2 and HO-1 and less emphysema (91).

294 Nrf2 is involved in acute infectious exacerbations and in corticosteroid resistance, two major
295 characteristics of COPD. Respiratory viruses, such as influenza, are responsible for severe infectious
296 exacerbations in COPD patients. Nrf2^{-/-} mice exposed to cigarette smoke and subsequently infected
297 with influenza have a higher rate of mortality, an enhanced peribronchial inflammation, a higher
298 oxidant burden and NF- κ B-mediated inflammatory gene expression (92). Interestingly, knockdown
299 of Nrf2 in human nasal epithelial cells (hNEC) is associated with a significantly increased influenza
300 virus entry and replication in the infected cells whereas the Nrf2 activators, SFN and epigallocatechin
301 gallate treatment of native hNEC cell significantly reduce the viral entry and replication (93).
302 Therefore, Nrf2 activation is a plausible therapeutic strategy to reduce the sensitivity of COPD
303 patients to viral infections.

304 Bacteria, especially *non-typeable Haemophilus influenzae* (NTHI), can cause acute exacerbations of
305 COPD. In mice with NTHI infection, prior exposure to CS for two weeks enhances BAL
306 macrophage and neutrophil recruitment, greater oxidative stress and pulmonary inflammation
307 compared to infected but air-exposed mice (89). Andrographolide is a labdane diterpene lactone
308 extracted from the leaf of *Andrographis paniculata*, a medicinal herbal used in Asian countries,

309 which enhances Nrf2 translocation to the nucleus (109). Administered after the NTHI infection it
310 attenuates the lung inflammation in treated mice and it up-regulates the translocation of Nrf2 into the
311 nucleus, enhances HO-1, glutathione reductase (GSR), GCLM, glutathione peroxidase-2 (GPx-2),
312 and NQO1 gene expression in the lungs (Table 1) (94). The evidence, in particular from murine
313 models, supports the potential for a role for Nrf2 in the exacerbations of COPD.

314 Airway inflammation in COPD is characterized by corticosteroid insensitivity. This characteristic
315 may be linked to the phosphorylation and the degradation of HDAC2 by the activation of the
316 PI3K/Akt pathway (95). In Nrf2^{-/-} mice exposed to CS smoke and LPS, the loss of Nrf2 is associated
317 with a steroid-insensitive pulmonary inflammation. Nrf2^{-/-} mice exhibit a decreased HDAC2 activity
318 and level in the lung at baseline and after CS and LPS challenge (96). In COPD peripheral blood
319 mononuclear cells and in CS-exposed mouse lung, the phosphorylation of Akt and p70s6K are
320 increased and the HDAC2 level and its activity are reduced by phosphorylation. Andrographolide
321 prevents the phosphorylation of Akt, p70S6K and HDAC2 induced by CS exposure. This inhibition
322 leads to an enhancement of HDAC2 activity and restores the steroid sensitivity of the lung.
323 Andrographolide increases the nuclear localisation of Nrf2 and the up-regulation of antioxidant
324 genes, HO-1 (decycling) 1 (HMOX1) and NQO1 (97). The above results suggest that the Nrf2-
325 HDAC2 axis is one of the mechanisms involved in the steroid resistance of COPD.

326 Targeting the interactions between Nrf2 and Keap1 may be a potential therapeutic approach in
327 COPD. Currently, the Nrf2 inducers target the Nrf2-Keap1 interaction (98). SFN administration to
328 the alveolar macrophages of COPD patients improves their phagocytic capacity for bacteria such as
329 *Pseudomonas aeruginosa* and NTHI. Nrf2 siRNA treatment of macrophages of COPD patients and
330 of a Nrf2^{-/-} murine model of COPD has confirmed improved bacterial clearance secondary to an
331 Nrf2-dependent up-regulation of MARCO (99). Furthermore, SFN decreased the oxidative stress
332 induced by CS extract in rat epithelial cells through the Nrf2 pathway (100). Unfortunately, daily oral
333 administration of SFN for a month in COPD patients failed to increase the expression of Nrf2 in
334 alveolar and bronchial epithelial cells in a randomized, double blind, placebo-controlled phase 3 trial
335 (101). In cells harvested from COPD patients and in related in vivo models, the pharmacological up-
336 regulation of Nrf2 enhances the anti-infectious response against the most frequent bacterial
337 pathogens but to date these effects have not been confirmed in intact humans.

338 In rats, resveratrol inhibited LPS induced pulmonary inflammation (Table 1) (102). Human alveolar
339 epithelial cells (A549) exposed to CS and treated with resveratrol exhibited a significant decrease in
340 ROS production and restored GSH depletion by an Nrf2-dependent induction of glutamate-cysteine
341 ligase (GCL) (103). The ability of resveratrol to induce Nrf2 activation has recently been confirmed
342 but its therapeutic use is compromised by its low bioavailability and its low efficacy (104). Topical
343 administration of resveratrol by intra-tracheal instillation has been performed once a month and
344 reduces accelerated lung aging in telomerase-deficient mice (105), suggesting an alternative route of
345 administration might achieve superior results. Recently a new Nrf2 activator, the trans-4,
346 4'-dihydroxystilbene (DHS), derived from resveratrol has been administered intra-peritoneally and it
347 decreases the markers of oxidation (malondialdehyde, 8-oxo-dG), alleviates fibrosis and leukocyte
348 infiltration by activating Nrf2 response in cigarette smoke exposed mice (104).

349 Natural triterpenes and the synthetic triterpenoid CDDO-Im are inducers of Nrf2 (Table 1). Thus,
350 mice, chronically exposed to CS and fed with CDDO-Im, have significantly reduced pulmonary
351 oxidative stress assessed by 8-OHdG positive cells, alveolar destruction and pulmonary hypertension.
352 This protective effect was abolished in Nrf2^{-/-} mice (106) suggesting a potential therapeutic effect of
353 the Nrf2 inducer. Despite this promising in vivo result, the molecule cannot be used in humans due to

354 its toxicity. Indeed, a phase 3 clinical trial in diabetic nephropathy was prematurely stopped for
355 increased mortality and adverse effects (107). However, new natural triterpenes like triterpene acid
356 derived from loak leaf have been discovered and reduce CS-induced inflammation in mice (108).

357 In a murin model of exposure to 4% CS f (one hour for 5 consecutive days), intraperitoneal
358 administration of andrographolide 2 hours before CSE prevents the pulmonary inflammation (BAL
359 cell recruitment and pro-inflammatory cytokines), oxidative lung injury induces by CSE and
360 increased the anti-oxidative response (GPX, glutathione reductase activity) in human bronchial
361 epithelial cell by nuclear translocation of Nrf2 (110). Interestingly, the upregulation of nuclear and
362 cytoplasmic Nrf2 was significantly increased by andrographolide after 24 h of treatment and
363 exposure to CS while exposure to CS itself upregulated Nrf2 at 4h but not at 24h. Table 1 summarize
364 the effects of Nrf2 inducers in the COPD model. Despite the promising in vivo and in vitro results,
365 no Nrf2 inducer has thus far shown benefit in COPD patients.

366 **2.3 Nrf2 and pulmonary fibrosis**

367 Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is one of the most frequent interstitial pulmonary diseases. The
368 incidence of IPF is 3 to 9 / 100 000 people/year in Europe and North America (111). The diagnosis
369 rests on the association of compatible histological or radiological patterns with clinical symptoms
370 and signs including dyspnea, dry cough and velcro-like crackles on the chest examination (112). IPF
371 is a progressive fibrotic disease often leading to respiratory failure and death within 3-5 years (112,
372 113). The precise etiology of IPF remains unknown but several risk factors for IPF have been
373 described such as aging, tobacco smoke, and environmental exposure (114). The histologic hallmarks
374 of IPF are excessive accumulation of protein in the extracellular matrix and fibroblast foci. These
375 pulmonary lesions are distributed within healthy pulmonary parenchyma creating spatial
376 heterogeneity of the fibrotic lesions (115). The pathogenesis of IFP involves multiple interactions
377 among the lung cells, including epithelial cells, fibroblast and immune cells. Recent findings have
378 revealed a central role for alveolar epithelial cells, especially alveolar Type II cells, in the genesis of
379 pulmonary fibrosis in response to distal lung injury. Alteration of the alveolar epithelial barrier
380 promotes dysregulated wound repair and harmful activation of fibroblasts (116). This process
381 involves several signaling pathways, including those triggered by TGF- β (117). Oxidant burden and
382 oxidative stress are additional important mechanisms for lung fibrosis (118). Patients with IPF
383 exhibit increased lung oxidant burden (119, 120). The antioxidant molecule, GSH, is not increased in
384 the lungs of IPF patients and was reportedly significantly reduced in the sputum and epithelial lining
385 fluid of IPF patients (121, 122). While this suggests an inadequate host response to oxidative stress,
386 these differences may be caused by sampling issues and by the analysis of different cells.

387 This redox imbalance has led to the investigation of the expression of Nrf2 in the lungs of IPF
388 patients. Nrf2 protein was 5-fold higher by Western analysis on lung homogenates of patients with
389 IPF compared to healthy subjects (123). However the finding was not confirmed in another study
390 (124). Small sample sizes in each study and the variability in the expression of Nrf2 based on the cell
391 type could perhaps explain the discrepancies in findings since Western blot of the lung homogenate
392 does not take account of the spatial variation of Nrf2 protein. In addition, the cellular localization of
393 the Nrf2 protein, whether cytoplasmic or nuclear, is essential information to assess its activation. By
394 immunohistochemistry, the expression of Nrf2 was confirmed in the alveolar epithelial type II cells
395 and in the nuclear compartment of hyperplastic alveolar epithelium of IPF patients but was absent in
396 the fibroblastic foci (Figure 3) (123, 124). The expression of Nrf2 and its nuclear localization were
397 reduced in fibroblasts of IPF patients; the related genes (HO-1, NQO1, epoxide hydrolase or EPHX)
398 were reduced also. In the IPF fibroblasts, Nrf2 impaired expression was associated with an increase

399 in expression of α -smooth muscle actin and collagen indicating a conversion to a myofibroblast
400 phenotype. The causal link between decreased Nrf2 expression and the myofibroblast phenotype was
401 confirmed by knock down of Nrf2 by siRNA in human fibroblasts. Interestingly, the up-regulation
402 of Nrf2 by SFN in IPF fibroblasts and in control fibroblasts decreases the expression of collagen 1
403 and α SMA (125). SFN also reduces the contraction of a collagen gel by IPF fibroblasts to a
404 somewhat greater extent than by control fibroblasts (125). The antifibrotic action of SFN is
405 substantially dependent on LOC344887, a long noncoding RNA. AREs are present in the promoter
406 and intron 1 of LOC344887. RNA-seq analysis has linked LOC344887 to fibrogenesis (126).

407 Stimulation of fibroblasts by TGF β induces an increase in oxidative stress that is dependent on
408 NADPH oxidase-4 (127). This alteration of the redox balance is also associated with a decrease in
409 nuclear expression of Nrf2 and differentiation into myofibroblasts (128). Allyl isothiocyanate, also a
410 product of cruciferous vegetables, activates Nrf2 and inhibits myofibroblast differentiation from a
411 human fibroblast cell line (129). The differentiation of fibroblasts into myofibroblasts likely plays a
412 pivotal role in the excessive production of extracellular matrix leading to distortion of the pulmonary
413 architecture. These results suggest that Nrf2 could play an anti-fibrotic role by correcting this
414 imbalance and by de-differentiating the pro-fibrotic myofibroblasts into fibroblasts. The above
415 findings are supported by several *in vivo* studies. The most common model used to study IPF is
416 bleomycin induced pulmonary fibrosis (Figure 3) (130). Intratracheal administration of bleomycin
417 provokes pulmonary fibrosis through the generation of ROS including hydroxyl radicals and DNA
418 cleaving superoxide (131). This model has led to the discovery of the involvement of TGF- β (132)
419 in the expansion of pulmonary fibrosis and the pre-clinical development of nintedanib (133). In
420 ICR/Sv129-Nrf2^{+/+} wild type mice, a single bleomycin intratracheal administration induced an
421 inflammatory cell recruitment, in particular neutrophils and lymphocytes within six days, and
422 pulmonary fibrosis as assessed by an accumulation of collagen, reflected in an elevated
423 hydroxyproline content. Bleomycin exposure of WT mice also increased TGF- β , pulmonary
424 expression of Nrf2 and its antioxidant response genes HO1, SOD3 and NQO1 (134). Nrf2^{-/-} mice,
425 similarly treated, exhibit a greater pulmonary inflammation, increased expression of TGF- β , and a
426 more substantial pulmonary fibrosis (134). Similar results have been found in bleomycin induced
427 pulmonary fibrosis in mice lacking extracellular SOD (135).

428 Nevertheless, bleomycin induced fibrosis fails to completely reproduce the pathophysiology of IPF.
429 One important limitation is the lack of evolution of the pulmonary fibrosis. In the murine model,
430 pulmonary fibrosis induced by bleomycin starts to resolve by 28 days after bleomycin administration
431 (130, 136) limiting the conclusions that can be drawn regarding pathogenesis. Other models have
432 been used to investigate the involvement of Nrf2 in the development of pulmonary fibrosis but to
433 date, none of the murine models reproduces in a relevant way the physiopathology of the IPF. In
434 radiation- induced pulmonary fibrosis in the mouse, the loss of Nrf2 impairs the recovery of lung
435 fibrosis by inhibition of the Np63 stem/progenitor cell mobilization and promotion of the radio-
436 induced myofibroblasts derived from alveolar type 2 cells (137).

437 Another pro-fibrotic agent used for *in vivo* experiments is paraquat (PRQ). PRQ is a powerful herbicide
438 widely used worldwide and responsible for numerous intentional poisonings in the world (138). In
439 humans, PRQ poisoning, regardless of the route of administration, leads to multi-organ failure,
440 pulmonary fibrosis causing respiratory failure and death (139). On human bronchial epithelial cells
441 (16HBE) and in mice, it has been shown that a high dose of PRQ inhibits autophagy, cell
442 proliferation, and promotes lung fibrosis by regulating the Keap1/P65/Nrf2 pathways (140).

443 Besides being involved in the regulation of the lung oxidative burden, Nrf2 also plays a role in aging

444 (Figure 3), one of the major predisposing factors for IPF (141) and other fibrotic diseases (142).
445 Increasingly evidence has linked age-related mechanisms, like genomic instability, telomere
446 shortening, epigenetic changes, cellular loss, or senescence to IPF pathogenesis. All of these
447 processes participate in the loss of the integrity of the alveolar epithelium and then in the aberrant
448 activation of the respiratory alveolar epithelium that participates in the formation of fibroblastic foci
449 and tissue remodeling (143). One of the hallmarks of age-related disease is the imbalance between
450 increases in oxidant production and/or decreases in the endogenous anti-oxidant response (144). The
451 ability to respond to oxidative stress through the activation of Nrf2 decreases with aging. This altered
452 response is attributable to several age related modifications like the loss of the electrophilic response,
453 the decrease of positive regulators of Nrf2 (PI3K, P62, CBP, BRCA1) and the increase in the
454 negative regulators (Keap1, Bach1 and cMyc) with age (145). Consistent with these observations,
455 young mice (2 months) that are treated with bleomycin intra-tracheally resolve the fibrotic process
456 more rapidly than aged mice (18 months)(146). Furthermore, the lack of resolution is associated with
457 an accumulation of senescent and apoptosis-resistant myofibroblasts. These specific cells were
458 characterized by an alteration of the redox balance with increased expression of NADPH oxidase-4
459 (NOX4) and impaired Nrf2 antioxidant response to oxidative stress (146). This imbalance in the
460 NOX4 /Nrf2 pathways has also been demonstrated in fibroblasts from patients with IPF (125). Thus,
461 Nrf2 is involved in the oxidative homeostasis of myofibroblasts whose alteration with age is
462 associated with the persistence of fibrosis (146).

463 Interestingly, daily fluctuations in endogenous Nrf2 levels seem to have an impact on the antioxidant
464 response related to lung fibrosis. The expression of Nrf2 shows a diurnal variation in the liver and in
465 the lungs of mice (147, 148), attributable to the E-box element in the Nrf2 gene promoter. This
466 circadian expression of Nrf2 regulates the expression of the ARE genes like *Hmox1*, *Gclm* and
467 *Gsta3*. Therefore, not surprisingly, the time of day at which exposure to bleomycin occurs impacts
468 upon the severity of the induced pulmonary fibrosis. Bleomycin induces a more severe pulmonary
469 fibrosis at 7 days if it is administered at the nadir of Nrf2 expression than if it is injected at the peak
470 of circadian expression (148). The antioxidant response measured by the expression of *Gclc*, *Gsta3*,
471 and *Hmox1* also depends on the time of the day of the bleomycin injection. This opens up the
472 possibility of a temporally targeted chemotherapeutic strategy (148).

473 As a plausible therapeutic target for the treatment of IPF, numerous biological compounds acting on
474 Nrf2 have been tested for that purpose. Well-known Nrf2 activators such as SFN and resveratrol and
475 natural bioactive components with multiple health-promoting properties including anti-inflammatory,
476 anti-oxidative and anti-fibrotic activity have been explored. The common pharmacological properties
477 of these substances on the lung fibrosis models are attributable to their anti-oxidant and anti-
478 inflammatory effects, and the consequent decrease of fibrosis. Firstly, up regulation of Nrf2 by these
479 compounds mitigates the PRQ and BLM-induced cellular oxidative stress. For instance, in BLM
480 induced lung fibrosis in mice, the amount of ROS (149, 150), malondialdehyde (MDA) (151, 152),
481 lipid peroxidation (150), 3-nitrotyrosine (153), lung 4-hydroxynonenal (153) are reduced by
482 epigallocatechin-3-gallate, salidroside, berberine, salvianolic acid B (SalB) and SFN, respectively.
483 Similar results have been demonstrated after exposure of the transformed epithelial cell line BEAS
484 2B to PRQ with a decrease of the amount of ROS generated in cells treated with resveratrol (11).
485 SalB also mitigates the TGF- β induced oxidative stress assessed by the decrease of ROS and MDA
486 levels (149). Its antioxidant activity is mediated by the PI3K / Akt / Nrf2 pathway (154). All of the
487 above compounds induced an Nrf2 up-regulation and enhanced the phase 2 enzymes response
488 compared to the non-treated groups (Table 2). Interestingly, SalB restores the expression of Nrf2 in
489 specific cell types that no longer express Nrf2 in IPF. In the lung biopsies of patients with IPF and as
490 well as in BLM-induced lung fibrosis, Nrf2 is absent in the fibroblastic foci (124, 149). However, the

491 administration of SalB in rat treated with BLM increased the expression of Nrf2 in the total lung
492 homogenate and also in the fibroblastic foci (149).

493 In addition to reducing the oxidative stress, the above-mentioned compounds (SFN, resveratrol,
494 epigallocatechin-3-gallate) mitigate the pulmonary inflammation induced by fibrosing factors (Table
495 2). The afore-mentioned treatments increase the pulmonary expression of IL-1 β , TNF α , IL-6 in
496 BLM-induced lung fibrosis (150, 151, 153) and in PRQ induced lung fibrosis in mice (155). EGCG,
497 berberine and salidroside also reduce the lung level of NF- κ B, the nuclear translocation of NF- κ B-
498 p65 and the inhibition of I κ B α phosphorylation, respectively (150, 152). In RAW264.7 cells, a
499 macrophage cell line, exposure to PRQ led to the expression of pro-inflammatory and pro-fibrotic
500 cytokines such as IL-6 and TNF α . Treatment with resveratrol prevents the expression of IL-6 and
501 TNF α in macrophages in a manner that is partially dependent on Nrf2. This decrease of the
502 pulmonary inflammation is associated with a reduction of the pulmonary fibrosis severity regardless
503 of the fibrosing factors.

504 The up-regulation of Nrf2 by its inducers mitigates the lung fibrosis in vivo assessed by the reduction
505 of pulmonary fibrosing score (150, 152, 153), the decrease in the lung collagen deposition (150, 151,
506 156, 157) and the amount of lung hydroxyproline (150, 152, 153). Most of the pharmacologic agents
507 have been tested in a preventive way but Berberin, a isoquinoline alkaloid extract, has been given
508 before the onset of fibrosis on days 0 to 14 or after the onset of fibrosis on days 14 to 28 in mice
509 administered BLM. Both drug administrations reduced the pulmonary fibrosis but the treatment was
510 more effective when instituted before the onset of fibrosis (152). The up-regulation of Nrf2 seems to
511 participate in the mitigation of the lung fibrosis severity through the involvement of Nrf2 in several
512 pro-fibrotic pathways. First, BLM exposure promotes the activation of the central mediator of
513 fibrosis, TGF- β and of its downstream targets Smad2/3 (158). This activation was weakened by
514 several Nrf2 inducers including SFN (153), salidroside (151), berberine (152) and salvianolic acid B
515 (SalB)(149). Secondly, Nrf2 inducers also counteract the transformation of fibroblast into pro-
516 fibrotic myofibroblasts. Thus, SalB significantly inhibits the TGF- β 1-induced myofibroblast markers
517 like α SMA in human embryonic fibroblasts (MRC-5 cell) and decreases the α SMA pulmonary
518 expression in rats treated with BLM (149). PRQ also promotes the trans-differentiation of WI38-
519 VA13, a human fibroblast cell line, into myofibroblasts as assessed by an increased expression of
520 α SMA. Resveratrol significantly mitigated this PRQ-induced phenotype in an Nrf2-dependent
521 manner in mouse embryonic fibroblasts from WT mice or Nrf2^{-/-} mice (155).

522 Finally, Nrf2 inducers mitigate the epithelial mesenchymal transition (EMT) in lung fibrosis. An
523 intra-gastric administration of PRQ in mice elicits pulmonary fibrosis and promotes an up-regulation
524 of vimentin, an EMT marker as well as a down-regulation of E-cadherin. Treatment with rapamycin
525 diminishes the EMT in a Nrf2 dependent manner (157). In a BLM-induced lung fibrosis model,
526 salidroside inhibit the same EMT marker. Thus, all of these results suggest that the pharmacological
527 activation of NRF2 by these inducers allows better control of oxidative stress, a decrease pulmonary
528 inflammation and a mitigation of the pulmonary fibrosis by defeating several pathways. Table 2
529 summarize the effects of Nrf2 inducers in the lung fibrosis model.

530 Despite these promising results and the implication of oxidative stress in the pathophysiology of IPF,
531 the administration of a non-specific antioxidant treatment, N-acetylcysteine has not shown any
532 benefits in terms of prevention of decline in respiratory function, mortality or exacerbations in
533 patients with moderate to severe IPF. Nevertheless, Nrf2 seems to participate in the anti-fibrotic
534 effects of pirfenidone, one of two treatments approved for IPF in human. This molecule slows the
535 decline in respiratory function in patients with moderate or severe IPF (159). Pirfenidone has

536 numerous effects including an attenuation of lipid peroxidation and a clearing of the active
537 intracellular oxygen. This suggests that pirfenidone could mitigate oxidative stress (160). Pirfenidone
538 enhanced the mRNA and protein expressions of Nrf2, and its related genes HO-1, Gpx1 in TGF- β
539 stimulated mouse lung fibroblasts and bleomycin-induced lung fibrosis. The upregulation of Nrf2
540 was associated with an inhibition of the mRNA and protein of Bach1, a Nrf2 competitive inhibitor.
541 These results suggest that pirfenidone participates in the regulation of oxidative stress by the
542 restoration of Nrf2/Bach1 equilibrium (161). Clinical trials of potent Nrf2 activators may be required
543 to demonstrate therapeutic relevance of this pathway in IPF in humans.

544 **2.4 Nrf2 and asthma**

545 There is considerable biological plausibility to the hypothesis that oxidative stress is involved in
546 asthma. Activated inflammatory cells and airway epithelial cells could both contribute to the
547 synthesis of reactive oxygen and nitrogen species. Additionally many inhaled allergens have
548 themselves the capacity to generate reactive oxygen species through intrinsic NADPH activity (162).
549 Allergens that provide an exogenous source of ROS are house dust mites (163) and pollens (164).
550 However, not all pollens with intrinsic NADPH activity evoke allergic responses that are augmented
551 by oxidative stress require this activity (165). Inhaled particulates such as diesel exhaust contain
552 chemicals that may trigger redox cycling and are noted for their augmentation of sensitization to
553 allergens (reviewed in (166)). Oxidative stress has been associated with asthma through the
554 demonstration of impaired antioxidant reserve in the blood of both children and adults (167-169). A
555 marker of oxidative stress, 8-isoprostane has also been shown to be elevated in the urine of severe
556 asthmatics and to be worsened by smoking (170). Cluster analyses of an asthma cohort have revealed
557 subsets associated with elevated 8-isoprostane in the blood (171). Elevated hydrogen peroxide levels
558 and 8-isoprostane can also be detected in exhaled breath condensate in asthma and are inversely
559 correlated with lung function (172, 173).

560 Most studies implicating Nrf2 in the protection against oxidative stress in airway disease have
561 involved the use of epithelial cells in culture or mice exposed to allergens or irritants to model
562 asthma driven by adaptive and innate immunity. There is convincing evidence of the role of Nrf2-
563 dependent proteins in both allergic and irritant models of “asthma” in the mouse. Particular attention
564 has been paid to murine models associated with neutrophilic inflammation. SFN attenuates
565 sensitization to allergen that is promoted by diesel exhaust particles (174) and airway responses to
566 sensitization and challenge with ovalbumin (175), house dust mite and *Alternaria* (176) (Figure 4).
567 Steroid insensitivity caused by exposing ovalbumin sensitized and challenged mice to cigarette
568 smoke was restored by SFN, an effect that was absent in Nrf2-deficient mice (177).

569 Attempts to activate Nrf2 in the airways in humans have met with less success. Combining a
570 potential cause of oxidative stress, namely cigarette smoking, with underlying severe asthma was not
571 associated with an increase in expression of Nrf2-dependent antioxidant proteins in bronchial
572 biopsies or brushings (170). A clinical trial of SFN administration (broccoli sprouts) in doses
573 sufficient to elevate levels of SFN in the blood failed to reduce airway neutrophilia caused by ozone
574 exposure of healthy subjects and failed to elevate phase II enzymes in the peripheral blood cells
575 (178). Similarly, SFN administration, again using broccoli sprouts given on three consecutive days
576 did not affect the fraction of exhaled nitric oxide or anti-oxidant enzymes in nasal epithelial cells in
577 atopic asthmatics despite achieving substantial blood levels of SFN (179). However, in asthmatics,
578 daily doses of SFN significantly ameliorated airway hyperresponsiveness to methacholine challenge
579 in 60% of the subjects (Figure 4) (180). SFN was also shown to reduce the nasal allergic response
580 and the number of inflammatory cells in nasal lavage fluid following inhalation of diesel exhaust

581 particles, a potent source of oxidative stress, in human subjects (181).

582 **Conclusions**

583 The lung parenchyma and the airways are constantly exposed to exogenous oxidants. The master
584 transcription factor of the anti-oxidant response, Nrf2, is a crucial element for the maintenance of the
585 redox balance. Altered Nrf2 expression has been demonstrated in many human respiratory diseases
586 affecting the airways, in asthma and COPD, and the lung parenchyma in ARDS and pulmonary
587 fibrosis. The loss of Nrf2 expression is associated with more severe induced respiratory diseases in
588 animal models. Interestingly, the restoration of its expression by specific inducers in these models
589 reduces the severity of the disease. Despite these encouraging results in cell and animal models, the
590 administration of SFN, a potent Nrf2-activator, in patients with asthma and COPD has failed to show
591 significant therapeutic benefit. Nevertheless, further investigation is warranted to further elucidate the
592 role of Nrf2 in oxidative stress-driven pulmonary disease as well as the therapeutic potential of Nrf2
593 inducers. Perhaps, by analogy with biologics, patients with demonstrated deficient anti-oxidant
594 responses to their disease should be selected for study in future clinical trials.

596 **References**

- 597 1. Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I
598 and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* 2002;3(5):481-90.
- 599 2. Rada P, Rojo AI, Evrard-Todeschi N, Innamorato NG, Cotte A, Jaworski T, et al. Structural
600 and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP
601 axis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(17):3486-99.
- 602 3. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via
603 the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89-116.
- 604 4. Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer.
605 *Genes Dev.* 2013;27(20):2179-91.
- 606 5. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-
607 Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1169-203.
- 608 6. Kobayashi A, KMI, Okawa H., Ohtsuji M., Zenke Y., Chiba T., Igarashi K., Yamamoto M.
609 Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate
610 proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004;24.
- 611 7. Zhang D.D. LSC, Cross J.V., Templeton D.J., Hannink M. Keap1 is a redox-regulated
612 substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* 2004;24.
- 613 8. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, et al. High sensitivity of
614 Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-
615 regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci.* 2001;59(1):169-77.
- 616 9. Dinkova-Kostova AT, M. A. Massiah, R. E. Bozak, R. J. Hicks, and P. Talalay. Potency of
617 Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on
618 their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98.
- 619 10. Harder B, Jiang, T., Wu, T., Tao, S., Rojo de la Vega, M., Tian, W., Chapman, E., & Zhang,
620 D. D. . Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for
621 disease intervention. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(4).
- 622 11. Malhotra D. P-CE, Singh A., Srivastava S., Arenillas D., Happel C., Shyr C., Wakabayashi
623 N., Kensler T.W., Wasserman W.W., Biswal S. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies
624 novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic
625 Acids Res.* 2010;38.
- 626 12. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch
627 Toxicol.* 2011;85(4):241-72.

- 628 13. Tong KI KY, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 recruits Neh2 through
629 binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol*
630 *Cell Biol.* 2006;26(8).
- 631 14. Dinkova-Kostova AT MM, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. Potency of Michael reaction
632 acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with
633 sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6).
- 634 15. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent
635 ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress.
636 *Mol Cell Biol.* 2003;23(22):8137-51.
- 637 16. Kobayashi A KM, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. Oxidative and
638 electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell*
639 *Biol.* 2006;26(1).
- 640 17. Baird L LD, Swift S, Dinkova-Kostova AT. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress
641 response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc Natl Acad*
642 *Sci U S A.* 2013;110(38).
- 643 18. Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-
644 mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2007;27(18):6334-
645 49.
- 646 19. Sun Z, Wu T, Zhao F, Lau A, Birch CM, Zhang DD. KPNA6 (Importin α 7)-mediated
647 nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Mol Cell Biol.*
648 2011;31(9):1800-11.
- 649 20. McMahon M TN, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Redox-regulated turnover of Nrf2 is
650 determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-
651 insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem.* 2004;279(30).
- 652 21. Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. SCF/ β -TrCP
653 promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a
654 Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2011;31(6):1121-33.
- 655 22. Hast BE GD, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Yan F, Hayes DN, Major MB. Proteomic
656 analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination.
657 *Cancer Research.* 2013;73(7).
- 658 23. Nguyen T SP, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. Increased protein stability as a mechanism
659 that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element.
660 Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 2003;278(7).
- 661 24. Liu Q, Gao Y, Ci X. Role of Nrf2 and Its Activators in Respiratory Diseases. *Oxid Med Cell*
662 *Longev.* 2019;2019:7090534.
- 663 25. Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2
664 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem.*
665 2008;105(1):192-202.
- 666 26. Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, et al. Role of a mitogen-activated
667 protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem.*
668 1999;274(39):27545-52.
- 669 27. Yu R. MS, Lei W., Fahl W. E., Tan T. H., Kong A. N. T. P38 mitogen-activated protein
670 kinase negatively regulates the induction of phase ii drug-metabolizing enzymes that detoxify
671 carcinogens. *The Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(4).
- 672 28. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, et al. Oncogene-
673 induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.*
674 2011;475(7354):106-9.
- 675 29. Tao S WS, Moghaddam SJ, Ooi A, Chapman E, Wong PK, Zhang DD. Oncogenic KRAS
676 confers chemoresistance by upregulating NRF2. *Cancer Research.* 2014.

- 677 30. Cai SJ, Liu Y, Han S, Yang C. Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. *Cell*
678 *Biosci.* 2019;9:45.
- 679 31. Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis
680 and Treatment. *JAMA.* 2018;319(7):698-710.
- 681 32. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, et al. The Berlin
682 definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care*
683 *Med.* 2012;38(10):1573-82.
- 684 33. Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J*
685 *Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(4):243-52.
- 686 34. Potey PM, Rossi AG, Lucas CD, Dorward DA. Neutrophils in the initiation and resolution of
687 acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J Pathol.*
688 2019;247(5):672-85.
- 689 35. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and
690 treatment. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:147-63.
- 691 36. Rocksén D, Ekstrand-Hammarström B, Johansson L, Bucht A. Vitamin E reduces
692 transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway
693 inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(2):199-207.
- 694 37. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung
695 injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(4):427-31.
- 696 38. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide
697 and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356(1):1-11.
- 698 39. Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine
699 levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2407-
700 13.
- 701 40. Gentile F, Arcaro A, Pizzimenti S, Daga M, Cetrangolo GP, Dianzani C, et al. DNA damage
702 by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS*
703 *Genet.* 2017;4(2):103-37.
- 704 41. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, Downey GP. Regulation of tyrosine phosphorylation in
705 neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem.*
706 1993;268(23):17131-7.
- 707 42. HR G. Antioxidants and protein oxidation. *Free Radic Res.* 2000.
- 708 43. Chaum E, Yin J, Yang H, Thomas F, Lang JC. Quantitative AP-1 gene regulation by
709 oxidative stress in the human retinal pigment epithelium. *J Cell Biochem.* 2009;108(6):1280-91.
- 710 44. Lingappan K. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol.* 2018.
- 711 45. Hong SY, Roze LV, Linz JE. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of
712 secondary metabolism. *Toxins (Basel).* 2013;5(4):683-702.
- 713 46. Fink MP. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome.
714 *Curr Opin Crit Care.* 2002;8(1):6-11.
- 715 47. Cho HY. Genomic structure and variation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Oxid*
716 *Med Cell Longev.* 2013;2013:286524.
- 717 48. Chan K. KYW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc*
718 *Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22).
- 719 49. Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY, et al. Role of NRF2
720 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26(2):175-82.
- 721 50. Rojo de la Vega M, Dodson M, Gross C, Mansour HM, Lantz RC, Chapman E, et al. Role of
722 Nrf2 and Autophagy in Acute Lung Injury. *Curr Pharmacol Rep.* 2016;2(2):91-101.
- 723 51. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lanken PN, et al. Functional
724 polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury.
725 *FASEB J.* 2007;21(9):2237-46.

- 726 52. Sussan TE, Rangasamy T, Blake DJ, Malhotra D, El-Haddad H, Bedja D, et al. Targeting
727 Nrf2 with the triterpenoid CDDO-imidazolide attenuates cigarette smoke-induced emphysema and
728 cardiac dysfunction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(1):250-5.
- 729 53. Reddy NM, Suryanaraya V, Yates MS, Kleeberger SR, Hassoun PM, Yamamoto M, et al.
730 The triterpenoid CDDO-imidazolide confers potent protection against hyperoxic acute lung injury in
731 mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(9):867-74.
- 732 54. Wei J, Chen G, Shi X, Zhou H, Liu M, Chen Y, et al. Nrf2 activation protects against
733 intratracheal LPS induced mouse/murine acute respiratory distress syndrome by regulating
734 macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(3):790-6.
- 735 55. Hu L, Chen Z, Li L, Jiang Z, Zhu L. Resveratrol decreases CD45(+) CD206(-) subtype
736 macrophages in LPS-induced murine acute lung injury by SOCS3 signalling pathway. *J Cell Mol*
737 *Med*. 2019;23(12):8101-13.
- 738 56. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Canning P. Keap1, the cysteine-based mammalian
739 intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch Biochem Biophys*. 2017;617:84-93.
- 740 57. Qi T, XF, Yan X., Li S., Li H. Sulforaphane exerts anti-inflammatory effects against
741 lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Nrf2/ARE pathway. *International*
742 *Journal of Molecular Medicine*. 2016;37(1).
- 743 58. Bo L, Jin F, Ma Z, Li C. Redox signaling and antioxidant therapies in acute respiratory
744 distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Respir Med*. 2021:1-11.
- 745 59. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional
746 mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the
747 Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9859):2095-128.
- 748 60. Okeleji LO, Ajayi AF, Adebayo-Gege G, Aremu VO, Adebayo OI, Adebayo ET.
749 Epidemiologic evidence linking oxidative stress and pulmonary function in healthy populations.
750 *Chronic diseases and translational medicine*. 2021;7(2):88-99.
- 751 61. Singh D, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, et al. Global Strategy for the
752 Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science
753 committee report 2019. *The European Respiratory Journal*. 2019;53(5).
- 754 62. Molloy K, Hersh CP, Morris VB, Carroll TP, O'Connor CA, Lasky-Su JA, et al. Clarification
755 of the risk of chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin deficiency PiMZ
756 heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(4):419-27.
- 757 63. Kelleher CM, Silverman EK, Broekelmann T, Litonjua AA, Hernandez M, Sylvia JS, et al. A
758 functional mutation in the terminal exon of elastin in severe, early-onset chronic obstructive
759 pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(4):355-62.
- 760 64. Barnes PJ, Burney PG, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic
761 obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15076.
- 762 65. Kohansal R, Martinez-Cambor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural
763 history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort.
764 *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009;180(1):3-10.
- 765 66. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate,
766 and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;686:12-27; discussion -8.
- 767 67. Gebel S, Gerstmayer B, Bosio A, Haussmann H-J, Van Miert E, Müller T. Gene expression
768 profiling in respiratory tissues from rats exposed to mainstream cigarette smoke. *Carcinogenesis*.
769 2004;25(2):169-78.
- 770 68. Goven D, Boutten A, Leçon-Malas V, Marchal-Sommé J, Amara N, Crestani B, et al. Altered
771 Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax*. 2008;63(10):916-24.
- 772 69. Alam J, Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-
773 1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(2):166-74.

- 774 70. Lee KH, Woo J, Kim J, Lee CH, Yoo CG. Cigarette smoke extract decreased basal and
775 lipopolysaccharide-induced expression of MARCO via degradation of p300. *Respirology*.
776 2021;26(1):102-11.
- 777 71. Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A, Ishii Y, Kure S, Koyama A, et al. Identification of
778 polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochemical and Biophysical*
779 *Research Communications*. 2004;321(1):72-9.
- 780 72. Hua C-C, Chang L-C, Tseng J-C, Chu C-M, Liu Y-C, Shieh W-B. Functional haplotypes in
781 the promoter region of transcription factor Nrf2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Disease*
782 *Markers*. 2010;28(3):185-93.
- 783 73. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, et al. Down-regulated NF-E2-
784 related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive
785 pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2008;39(6):673-
786 82.
- 787 74. Fratta Pasini AM, Ferrari M, Stranieri C, Vallerio P, Mozzini C, Garbin U, et al. Nrf2
788 expression is increased in peripheral blood mononuclear cells derived from mild-moderate ex-
789 smoker COPD patients with persistent oxidative stress. *International Journal of Chronic Obstructive*
790 *Pulmonary Disease*. 2016;11:1733-43.
- 791 75. Fratta Pasini AM, Stranieri C, Ferrari M, Garbin U, Cazzoletti L, Mozzini C, et al. Oxidative
792 stress and Nrf2 expression in peripheral blood mononuclear cells derived from COPD patients: an
793 observational longitudinal study. *Respiratory Research*. 2020;21(1):37.
- 794 76. Sidhaye VK, Holbrook JT, Burke A, Sudini KR, Sethi S, Criner GJ, et al.
795 Compartmentalization of anti-oxidant and anti-inflammatory gene expression in current and former
796 smokers with COPD. *Respiratory Research*. 2019;20(1):190.
- 797 77. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, et al. Genetic
798 ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of*
799 *Clinical Investigation*. 2004;114(9):1248-59.
- 800 78. Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, et al. Nrf2-deficient mice are
801 highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes to Cells: Devoted to Molecular &*
802 *Cellular Mechanisms*. 2005;10(12):1113-25.
- 803 79. Blake DJ, Singh A, Kombairaju P, Malhotra D, Mariani TJ, Tudor RM, et al. Deletion of
804 Keap1 in the Lung Attenuates Acute Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress and Inflammation.
805 *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2010;42(5):524-36.
- 806 80. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and
807 cellular mechanisms. *The European Respiratory Journal*. 2003;22(4):672-88.
- 808 81. Hayes JA, Korthy A, Snider GL. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in
809 hamsters. *The Journal of Pathology*. 1975;117(1):1-14.
- 810 82. Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, Kimura T, Kiwamoto T, Iizuka T, et al. Transcription factor
811 Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and
812 emphysema. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2005;175(10):6968-75.
- 813 83. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am*
814 *J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(1):L1-15.
- 815 84. Kneidinger N, Yildirim AÖ, Callegari J, Takenaka S, Stein MM, Dumitrescu R, et al.
816 Activation of the WNT/ β -catenin pathway attenuates experimental emphysema. *American Journal of*
817 *Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011;183(6):723-33.
- 818 85. Cui W, Zhang Z, Zhang P, Qu J, Zheng C, Mo X, et al. Nrf2 attenuates inflammatory
819 response in COPD/emphysema: Crosstalk with Wnt3a/ β -catenin and AMPK pathways. *Journal of*
820 *Cellular and Molecular Medicine*. 2018;22(7):3514-25.
- 821 86. Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey B-G, Crystal RG. Smoking is
822 associated with shortened airway cilia. *PloS One*. 2009;4(12):e8157.

823 87. Lam HC, Cloonan SM, Bhashyam AR, Haspel JA, Singh A, Sathirapongsasuti JF, et al.
824 Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates copd-associated cilia dysfunction.
825 Journal of Clinical Investigation. 2013;123(12):5212-30.

826 88. Rao VA, Klein SR, Bonar SJ, Zielonka J, Mizuno N, Dickey JS, et al. The antioxidant
827 transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer
828 redox agent mitochinone. The Journal of Biological Chemistry. 2010;285(45):34447-59.

829 89. Jaitovich A, Barreiro E. Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary
830 Disease. What We Know and Can Do for Our Patients. American Journal of Respiratory and Critical
831 Care Medicine. 2018;198(2):175-86.

832 90. Sugiyama Y, Asai K, Yamada K, Kureya Y, Ijiri N, Watanabe T, et al. Decreased levels of
833 irisin, a skeletal muscle cell-derived myokine, are related to emphysema associated with chronic
834 obstructive pulmonary disease. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
835 2017;12:765-72.

836 91. Kubo H, Asai K, Kojima K, Sugitani A, Kyomoto Y, Okamoto A, et al. Exercise Ameliorates
837 Emphysema Of Cigarette Smoke-Induced COPD In Mice Through The Exercise-Irisin-Nrf2 Axis.
838 International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2019;14:2507-16.

839 92. Yageta Y, Ishii Y, Morishima Y, Masuko H, Ano S, Yamadori T, et al. Role of Nrf2 in host
840 defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice. Journal of Virology.
841 2011;85(10):4679-90.

842 93. Kesic MJ, Simmons SO, Bauer R, Jaspers I. Nrf2 expression modifies influenza A entry and
843 replication in nasal epithelial cells. Free Radical Biology & Medicine. 2011;51(2):444-53.

844 94. Tan WSD, Peh HY, Liao W, Pang CH, Chan TK, Lau SH, et al. Cigarette Smoke-Induced
845 Lung Disease Predisposes to More Severe Infection with Nontypeable Haemophilus influenzae:
846 Protective Effects of Andrographolide. Journal of Natural Products. 2016;79(5):1308-15.

847 95. To Y, Ito K, Kizawa Y, Failla M, Ito M, Kusama T, et al. Targeting phosphoinositide-3-
848 kinase-delta with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary
849 disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2010;182(7):897-904.

850 96. Adenuga D, Caito S, Yao H, Sundar IK, Hwang J-W, Chung S, et al. Nrf2 Deficiency
851 Influences Susceptibility to Steroid Resistance via HDAC2 reduction. Biochemical and biophysical
852 research communications. 2010;403(3-4):452-6.

853 97. Liao W, Lim AYH, Tan WSD, Abisheganaden J, Wong WSF. Restoration of HDAC2 and
854 Nrf2 by andrographolide overcomes corticosteroid resistance in COPD. British Journal of
855 Pharmacology.n/a(n/a).

856 98. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as
857 potential preventive and therapeutic agents. Medicinal Research Reviews. 2012;32(4):687-726.

858 99. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S, Kong X, Yarmus L, Brown RH, et al. Targeting Nrf2
859 Signaling Improves Bacterial Clearance by Alveolar Macrophages in Patients with COPD and in a
860 Mouse Model. Science Translational Medicine. 2011;3(78):78ra32-78ra32.

861 100. Jiao Z, Chang J, Li J, Nie D, Cui H, Guo D. Sulforaphane increases Nrf2 expression and
862 protects alveolar epithelial cells against injury caused by cigarette smoke extract. Molecular
863 Medicine Reports. 2017;16(2):1241-7.

864 101. Wise RA, Holbrook JT, Criner G, Sethi S, Rayapudi S, Sudini KR, et al. Lack of Effect of
865 Oral Sulforaphane Administration on Nrf2 Expression in COPD: A Randomized, Double-Blind,
866 Placebo Controlled Trial. PloS One. 2016;11(11):e0163716.

867 102. Birrell MA, McCluskie K, Wong S, Donnelly LE, Barnes PJ, Belvisi MG. Resveratrol, an
868 extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory
869 mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. FASEB journal: official publication of
870 the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2005;19(7):840-1.

871 103. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang S-R, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces
872 glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative
873 stress in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular*
874 *Physiology*. 2008;294(3):L478-88.

875 104. Wang T, Dai F, Li G-H, Chen X-M, Li Y-R, Wang S-Q, et al. Trans-4,4'-dihydroxystilbene
876 ameliorates cigarette smoke-induced progression of chronic obstructive pulmonary disease via
877 inhibiting oxidative stress and inflammatory response. *Free Radical Biology & Medicine*. 2019.

878 105. Navarro S, Reddy R, Lee J, Warburton D, Driscoll B. Inhaled resveratrol treatments slow
879 ageing-related degenerative changes in mouse lung. *Thorax*. 2017;72(5):451-9.

880 106. Sussan TE, Rangasamy T, Blake DJ, Malhotra D, El-Haddad H, Bedja D, et al. Targeting
881 Nrf2 with the triterpenoid CDDO-imidazolide attenuates cigarette smoke-induced emphysema and
882 cardiac dysfunction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*
883 *of America*. 2009;106(1):250-5.

884 107. Rossing P. Diabetic nephropathy: Could problems with bardoxolone methyl have been
885 predicted? *Nature Reviews Nephrology*. 2013;9(3):128-30.

886 108. Jian T, Ding X, Li J, Wu Y, Ren B, Li J, et al. Triterpene Acids of Loquat Leaf Improve
887 Inflammation in Cigarette Smoking Induced COPD by Regulating AMPK/Nrf2 and NFκB Pathways.
888 *Nutrients*. 2020;12(3).

889 109. Yu A-L, Lu C-Y, Wang T-S, Tsai C-W, Liu K-L, Cheng Y-P, et al. Induction of heme
890 oxygenase 1 and inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule
891 expression by andrographolide in EA.hy926 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
892 2010;58(13):7641-8.

893 110. Guan SP, Tee W, Ng DSW, Chan TK, Peh HY, Ho WE, et al. Andrographolide protects
894 against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity. *British*
895 *Journal of Pharmacology*. 2013;168(7):1707-18.

896 111. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of
897 idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *The European Respiratory Journal*.
898 2015;46(3):795-806.

899 112. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of
900 Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline.
901 *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018;198(5):e44-e68.

902 113. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official
903 American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international
904 multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *American Journal of*
905 *Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013;188(6):733-48.

906 114. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of*
907 *Medicine*. 2018;378(19):1811-23.

908 115. Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual*
909 *review of pathology*. 2014;9:157-79.

910 116. Parimon T, Yao C, Stripp BR, Noble PW, Chen P. Alveolar Epithelial Type II Cells as
911 Drivers of Lung Fibrosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular*
912 *Sciences*. 2020;21(7).

913 117. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*.
914 2011;208(7):1339-50.

915 118. Cheresh P, Kim S-J, Tulasiram S, Kamp DW. Oxidative stress and pulmonary fibrosis.
916 *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013;1832(7):1028-40.

917 119. Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. Systemic
918 and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radical Biology & Medicine*.
919 1999;27(1-2):60-8.

- 920 120. Fois AG, Paliogiannis P, Sotgia S, Mangoni AA, Zinellu E, Pirina P, et al. Evaluation of
921 oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: a
922 systematic review. *Respiratory Research*. 2018;19.
- 923 121. Meyer A, Buhl R, Magnussen H. The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione
924 levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European Respiratory Journal*. 1994;7(3):431-6.
- 925 122. Beeh KM, Beier J, Haas IC, Kornmann O, Micke P, Buhl R. Glutathione deficiency of the
926 lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*.
927 2002;19(6):1119-23.
- 928 123. Markart P, Luboeinski T, Korfei M, Schmidt R, Wygrecka M, Mahavadi P, et al. Alveolar
929 oxidative stress is associated with elevated levels of nonenzymatic low-molecular-weight
930 antioxidants in patients with different forms of chronic fibrosing interstitial lung diseases.
931 *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11(2):227-40.
- 932 124. Mazur W, Lindholm P, Vuorinen K, Myllärniemi M, Salmenkivi K, Kinnula VL. Cell-
933 specific elevation of NRF2 and sulfiredoxin-1 as markers of oxidative stress in the lungs of
934 idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *APMIS*. 2010;118(9):703-12.
- 935 125. Artaud-Macari E, Goven D, Brayer S, Hamimi A, Besnard V, Marchal-Somme J, et al.
936 Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Nuclear Translocation Induces Myofibroblastic
937 Dedifferentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis [research-article]. 2012 [updated 2012-11-30].
- 938 126. Liu P, Luo G, Dodson M, Schmidlin CJ, Wei Y, Kerimoglu B, et al. The NRF2-LOC344887
939 signaling axis suppresses pulmonary fibrosis. *Redox biology*. 2021;38:101766.
- 940 127. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4
941 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nature Medicine*.
942 2009;15(9):1077-81.
- 943 128. Artaud-Macari E, Goven D, Brayer S, Hamimi A, Besnard V, Marchal-Somme J, et al.
944 Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Nuclear Translocation Induces Myofibroblastic
945 Dedifferentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(1):66-
946 79.
- 947 129. Yap JMG, Ueda T, Kanemitsu Y, Takeda N, Fukumitsu K, Fukuda S, et al. AITC inhibits
948 fibroblast-myofibroblast transition via TRPA1-independent MAPK and NRF2/HO-1 pathways and
949 reverses corticosteroids insensitivity in human lung fibroblasts. *Respir Res*. 2021;22(1):51.
- 950 130. Carrington R, Jordan S, Pitchford SC, Page CP. Use of animal models in IPF research.
951 *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2018;51:73-8.
- 952 131. Claussen CA, Long EC. Nucleic Acid Recognition by Metal Complexes of Bleomycin.
953 *Chemical Reviews*. 1999;99(9):2797-816.
- 954 132. Zhao J, Shi W, Wang Y-L, Chen H, Bringas P, Datto MB, et al. Smad3 deficiency attenuates
955 bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of Physiology Lung Cellular and*
956 *Molecular Physiology*. 2002;282(3):L585-93.
- 957 133. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of
958 nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *The European Respiratory Journal*.
959 2015;45(5):1434-45.
- 960 134. Cho H-Y, Reddy SPM, Yamamoto M, Kleeberger SR. The transcription factor NRF2 protects
961 against pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal*. 2004;18(11):1258-60.
- 962 135. Fattman CL, Chang L-Y, Termin TA, Petersen L, Enghild JJ, Oury TD. Enhanced bleomycin-
963 induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. *Free Radical Biology*
964 *& Medicine*. 2003;35(7):763-71.
- 965 136. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful
966 tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The International Journal of*
967 *Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(3):362-82.

- 968 137. Traver G, Mont S, Gius D, Lawson WE, Ding GX, Sekhar KR, et al. Loss of Nrf2 promotes
969 alveolar type 2 cell loss in irradiated, fibrotic lung. *Free Radical Biology & Medicine*. 2017;112:578-
970 86.
- 971 138. Zyoud SeH. Investigating global trends in paraquat intoxication research from 1962 to 2015
972 using bibliometric analysis. *American Journal of Industrial Medicine*. 2018;61(6):462-70.
- 973 139. Elenga N, Merlin C, Le Guern R, Kom-Tchameni R, Ducrot Y-M, Pradier M, et al. Clinical
974 features and prognosis of paraquat poisoning in French Guiana: A review of 62 cases. *Medicine*.
975 2018;97(15):e9621.
- 976 140. Yao J, Zhang J, Tai W, Deng S, Li T, Wu W, et al. High-Dose Paraquat Induces Human
977 Bronchial 16HBE Cell Death and Aggravates Acute Lung Intoxication in Mice by Regulating
978 Keap1/p65/Nrf2 Signal Pathway. *Inflammation*. 2019;42(2):471-84.
- 979 141. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of
980 idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
981 2006;174(7):810-6.
- 982 142. Duffield JS, Lupher M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and
983 fibrosis. *Annual Review of Pathology*. 2013;8:241-76.
- 984 143. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the
985 enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *American Journal of Respiratory and
986 Critical Care Medicine*. 2014;189(10):1161-72.
- 987 144. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*.
988 2000;408(6809):239-47.
- 989 145. Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging.
990 *Free Radical Biology & Medicine*. 2015;88(Pt B):314-36.
- 991 146. Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, et al. Reversal of
992 persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Science Translational Medicine*.
993 2014;6(231):231ra47.
- 994 147. Xu Y-Q, Zhang D, Jin T, Cai D-J, Wu Q, Lu Y, et al. Diurnal variation of hepatic antioxidant
995 gene expression in mice. *PloS One*. 2012;7(8):e44237.
- 996 148. Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, Yang N, Pathirana D, Guo B, et al. The
997 circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense
998 pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes & development*. 2014;28(6):548-60.
- 999 149. Liu M, Xu H, Zhang L, Zhang C, Yang L, Ma E, et al. Salvianolic acid B inhibits
1000 myofibroblast transdifferentiation in experimental pulmonary fibrosis via the up-regulation of Nrf2.
1001 *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;495(1):325-31.
- 1002 150. Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant
1003 activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis
1004 through Nrf2-Keap1 signaling. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009;22(3):221-36.
- 1005 151. Tang H, Gao L, Mao J, He H, Liu J, Cai X, et al. Salidroside protects against bleomycin-
1006 induced pulmonary fibrosis: activation of Nrf2-antioxidant signaling, and inhibition of NF- κ B and
1007 TGF- β 1/Smad-2/-3 pathways. *Cell Stress & Chaperones*. 2016;21(2):239-49.
- 1008 152. Chitra P, Saiprasad G, Manikandan R, Sudhandiran G. Berberine attenuates bleomycin
1009 induced pulmonary toxicity and fibrosis via suppressing NF-kappaB dependant TGF-beta activation:
1010 a biphasic experimental study. *Toxicol Lett*. 2013;219(2):178-93.
- 1011 153. Yan B, Ma Z, Shi S, Hu Y, Ma T, Rong G, et al. Sulforaphane prevents bleomycin-induced
1012 pulmonary fibrosis in mice by inhibiting oxidative stress via nuclear factor erythroid 2-related
1013 factor-2 activation. *Molecular Medicine Reports*. 2017;15(6):4005-14.
- 1014 154. Tongqiang L, Shaopeng L, Xiaofang Y, Nana S, Xialian X, Jiachang H, et al. Salvianolic
1015 Acid B Prevents Iodinated Contrast Media-Induced Acute Renal Injury in Rats via the
1016 PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016.

- 1017 155. He X, Wang L, Szklarz G, Bi Y, Ma Q. Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress
1018 and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *The*
1019 *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012;342(1):81-90.
- 1020 156. Nakamura T, Matsushima M, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N, et al.
1021 Attenuation of transforming growth factor- β -stimulated collagen production in fibroblasts by
1022 quercetin-induced heme oxygenase-1. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.
1023 2011;44(5):614-20.
- 1024 157. Xu Y, Tai W, Qu X, Wu W, Li Z, Deng S, et al. Rapamycin protects against paraquat-induced
1025 pulmonary fibrosis: Activation of Nrf2 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research*
1026 *Communications*. 2017;490(2):535-40.
- 1027 158. Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, Morales MA. Bleomycin in the setting of lung
1028 fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res*. 2015;97:122-30.
- 1029 159. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al.
1030 Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials.
1031 *Lancet (London, England)*. 2011;377(9779):1760-9.
- 1032 160. Giri SN, Leonard S, Shi X, Margolin SB, Vallyathan V. Effects of pirfenidone on the
1033 generation of reactive oxygen species in vitro. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and*
1034 *Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*.
1035 1999;18(3):169-77.
- 1036 161. Liu Y, Lu F, Kang L, Wang Z, Wang Y. Pirfenidone attenuates bleomycin-induced
1037 pulmonary fibrosis in mice by regulating Nrf2/Bach1 equilibrium. *BMC Pulmonary Medicine*.
1038 2017;17.
- 1039 162. Dharajiya NG, Bacsı A, Boldogh I, Sur S. Pollen NAD(P)H oxidases and their contribution to
1040 allergic inflammation. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(1):45-63.
- 1041 163. Ye YL, Wu HT, Lin CF, Hsieh CY, Wang JY, Liu FH, et al. Dermatophagoides
1042 pteronyssinus 2 regulates nerve growth factor release to induce airway inflammation via a reactive
1043 oxygen species-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(2):L216-24.
- 1044 164. Boldogh I, Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, et al. ROS generated
1045 by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway
1046 inflammation. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2169-79.
- 1047 165. Shalaby KH, Allard-Coutu A, O'Sullivan MJ, Nakada E, Qureshi ST, Day BJ, et al. Inhaled
1048 birch pollen extract induces airway hyperresponsiveness via oxidative stress but independently of
1049 pollen-intrinsic NADPH oxidase activity, or the TLR4-TRIF pathway. *Journal of immunology*
1050 (Baltimore, Md : 1950). 2013;191(2):922-33.
- 1051 166. Li N, Nel AE. Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of
1052 inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxidants & redox*
1053 *signaling*. 2006;8(1-2):88-98.
- 1054 167. Sackesen C, Ercan H, Dizdar E, Soyer O, Gumus P, Tosun BN, et al. A comprehensive
1055 evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *J Allergy*
1056 *Clin Immunol*. 2008.
- 1057 168. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, Macnee W. Systemic oxidative stress in asthma,
1058 COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(4 Pt 1):1055-60.
- 1059 169. Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. Increased oxidative stress and altered levels of
1060 antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):72-8.
- 1061 170. Emma R, Bansal AT, Kolmert J, Wheelock CE, Dahlen SE, Loza MJ, et al. Enhanced
1062 oxidative stress in smoking and ex-smoking severe asthma in the U-BIOPRED cohort. *PloS one*.
1063 2018;13(9):e0203874.

- 1064 171. Nadif R, Febrissy M, Andrianjafimasy MV, Le Moual N, Gormand F, Just J, et al. Endotypes
1065 identified by cluster analysis in asthmatics and non-asthmatics and their clinical characteristics at
1066 follow-up: the case-control EGEA study. *BMJ open respiratory research*. 2020;7(1).
- 1067 172. Brussino L, Badiu I, Sciascia S, Bugiani M, Heffler E, Guida G, et al. Oxidative stress and
1068 airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clin*
1069 *Exp Allergy*. 2010;40(11):1642-7.
- 1070 173. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, et al.
1071 Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest*.
1072 2001;120(4):1136-9.
- 1073 174. Wan J, Diaz-Sanchez D. Antioxidant enzyme induction: a new protective approach against
1074 the adverse effects of diesel exhaust particles. *Inhalation toxicology*. 2007;19 Suppl 1:177-82.
- 1075 175. Park JH, Kim JW, Lee CM, Kim YD, Chung SW, Jung ID, et al. Sulforaphane inhibits the
1076 Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *BMB reports*. 2012;45(5):311-6.
- 1077 176. Danyal K, de Jong W, O'Brien E, Bauer RA, Heppner DE, Little AC, et al. Acrolein and
1078 thiol-reactive electrophiles suppress allergen-induced innate airway epithelial responses by inhibition
1079 of DUOX1 and EGFR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;311(5):L913-123.
- 1080 177. Sakurai H, Morishima Y, Ishii Y, Yoshida K, Nakajima M, Tsunoda Y, et al. Sulforaphane
1081 ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed
1082 asthmatic mice. *Free radical biology & medicine*. 2018;129:473-85.
- 1083 178. Duran CG, Burbank AJ, Mills KH, Duckworth HR, Aleman MM, Kesic MJ, et al. A proof-of-
1084 concept clinical study examining the NRF2 activator sulforaphane against neutrophilic airway
1085 inflammation. *Respiratory research*. 2016;17(1):89.
- 1086 179. Sudini K, Diette GB, Breysse PN, McCormack MC, Bull D, Biswal S, et al. A Randomized
1087 Controlled Trial of the Effect of Broccoli Sprouts on Antioxidant Gene Expression and Airway
1088 Inflammation in Asthmatics. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*.
1089 2016;4(5):932-40.
- 1090 180. Brown RH RC, Brooker A, Talalay P, Fahey JW. Sulforaphane improves the
1091 bronchoprotective response in asthmatics through Nrf2-mediated gene pathways. *Respiratory*
1092 *Research* 2015;16.
- 1093 181. Heber D, Li Z, Garcia-Lloret M, Wong AM, Lee TY, Thames G, et al. Sulforaphane-rich
1094 broccoli sprout extract attenuates nasal allergic response to diesel exhaust particles. *Food Funct*.
1095 2014;5(1):35-41.
- 1096 182. Dang X, He B, Ning Q, Liu Y, Guo J, Niu G, et al. Alantolactone suppresses inflammation,
1097 apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through
1098 activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF- κ B pathways. *Respiratory Research*. 2020;21(1):95.
- 1099 183. Veith C, Drent M, Bast A, Schooten FJv, Boots AW. The disturbed redox-balance in
1100 pulmonary fibrosis is modulated by the plant flavonoid quercetin. *Toxicology and Applied*
1101 *Pharmacology*. 2017;336:40-8.

1102

1103 **Conflict of interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any
1104 commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111 **Figure 1: Involvement of Nrf2 in ARDS in humans and in vivo models**

1112 In humans, the risk of developing an ARDS during severe trauma is associated with the possession of
1113 a functional promoter that has affected the binding affinity to a promoter site upstream of the Nrf2
1114 gene. Induction of hyperoxia-induced ARDS in Nrf2-deficient mice is associated with increased
1115 lung inflammation and capillary permeability. Conversely, in a LPS induced ARDS model, induction
1116 of Nrf2 is associated with a decrease in mortality and inflammation, notably via the M2 polarization
1117 of macrophages.

1118 ↑ Increase ↓ Decrease → reduce ; * : compared to wild type mice or healthy subjects; **:
1119 compared to un- treated mice;  : macrophages; WT: wild type

1120
1121

1122 **Figure 2: Involvement of Nrf2 in COPD in human and in experimental models**

1123 In smokers with emphysema, the nuclear localisation of Nrf2 is decreased in macrophages as well as
1124 the anti-oxidant response. This altered antioxidant response is inversely correlated with airflow
1125 obstruction. In Nrf2 deficient mice, CSE or pancreatic elastase intra-tracheal instillations evoke a
1126 decreased antioxidant response and an increase emphysema. In Nrf2-deficient mice, CSE or intra-
1127 tracheal instillation of pancreatic elastase results in a decreased antioxidant response and increased
1128 emphysema compared to wild-type mice. Upregulation of Nrf2 by physical activity, LiCl or Nrf2
1129 inducers reduces the induction of cigarette smoke-induced emphysema.

1130 ↑ Increase ↓ Decrease → reduce ; * : compared to wild type mice or healthy subject ; **: compared
1131 to non treated mice;  : macrophages;  : Cigarette smoke; WT: wild type; PPE: porcine
1132 pancreatic elastase; WT: wild type; LiCl: lithium chloride

1133
1134

1135 **Figure 3: Involvement of Nrf2 in IPF in humans and in experimental models**

1136 In IPF, Nrf2 expression varies between cells: increased in type II pneumocytes and reduced in
1137 fibroblasts and fibroblast foci. In a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model, Nrf2-deficient
1138 mice exhibit more severe pulmonary fibrosis, increased TGF β and pulmonary inflammation
1139 compared to wild-type mice. Downregulation of Nrf2 in fibroblasts induces myofibroblast
1140 differentiation. A Nrf2 inducer can inhibit this process.

1141 ↑ Increase ↓ Decrease → reduce;  : exposure ; * : compared to wild type mice or healthy subjects;
1142 KD= knock-down; WT: wild type

1143
1144

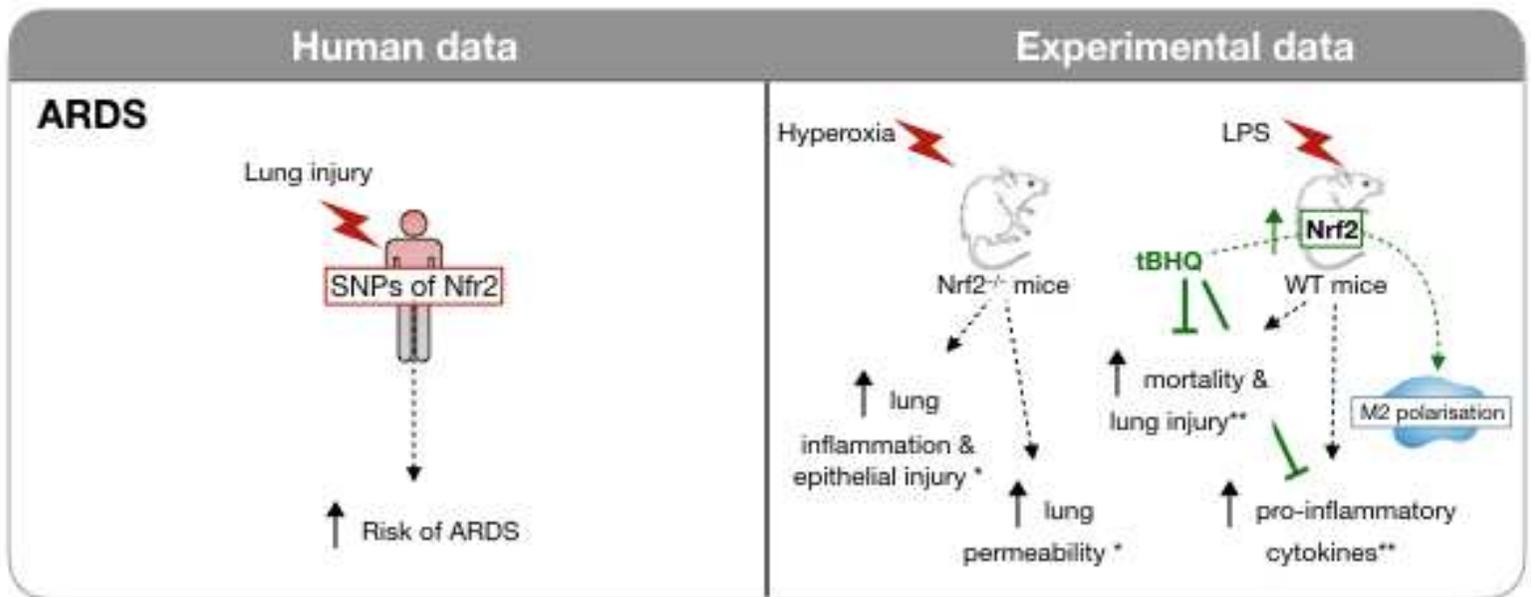
1144 **Figure 4: Involvement of Nrf2 in asthma in humans and in experimental models**

1145 The administration of foods rich in sulforaphane (broccoli sprouts) in atopic asthmatic subjects
1146 increased plasma SFN concentration without any modification of the FeNO or of the antioxidant
1147 response. Induction of asthma in Nrf2-deficient mice is associated with increased airway
1148 hyperresponsiveness and inflammatory cell recruitment in BAL. Administration of an Nrf2 inducer
1149 restores the corticosteroid sensitivity of ovalbumin-induced asthma concomitantly exposed to
1150 cigarette smoke.

1151 ↑ Increase ↓ Decrease → reduce;  : exposure ; * : compared to wild type mice or healthy subjects;
1152 **: compared to non treated mice; DE: diesel exhaust; OVA: ovalbumin; AHR: airway
1153 hyperresponsiveness; SFN: sulforaphane; BS : broccoli sprouts; FeNO: fraction of exhaled nitric
1154 oxide; WT: wild type

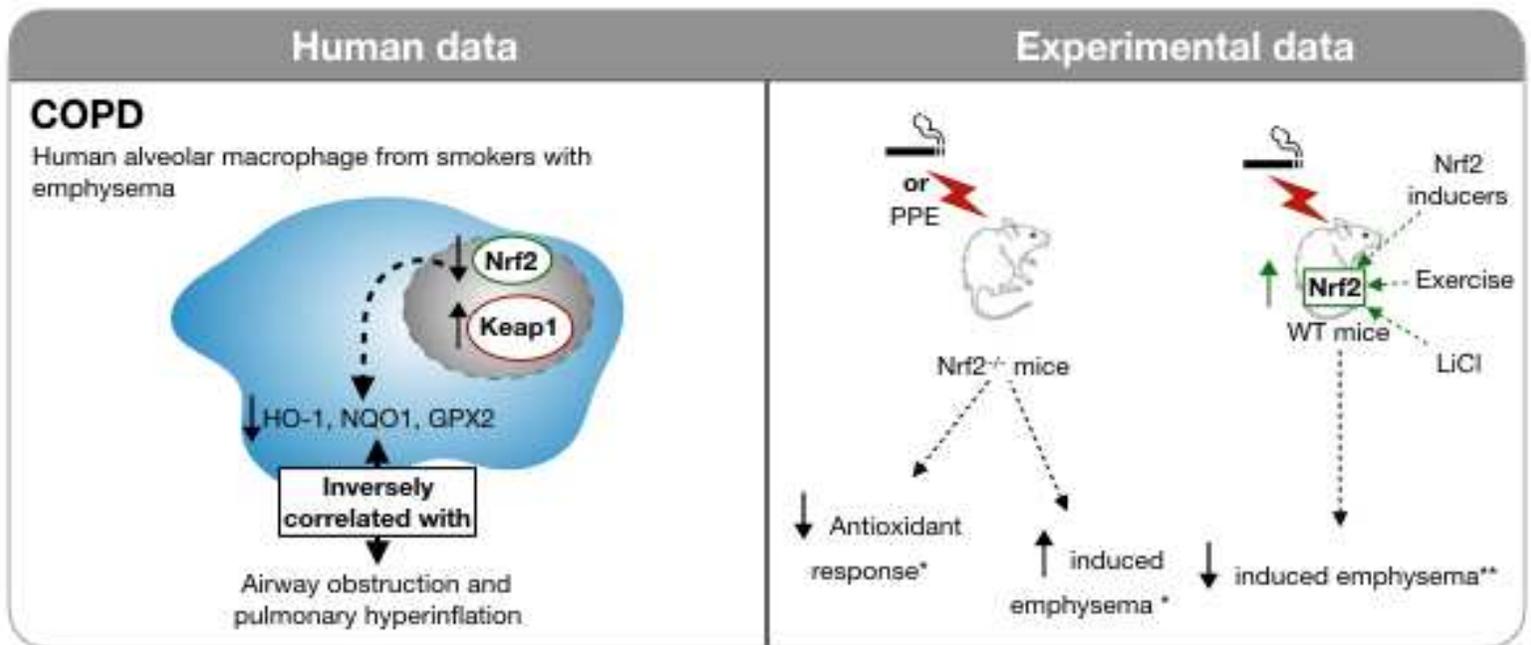
1155
1156
1157
1158

Figure 1



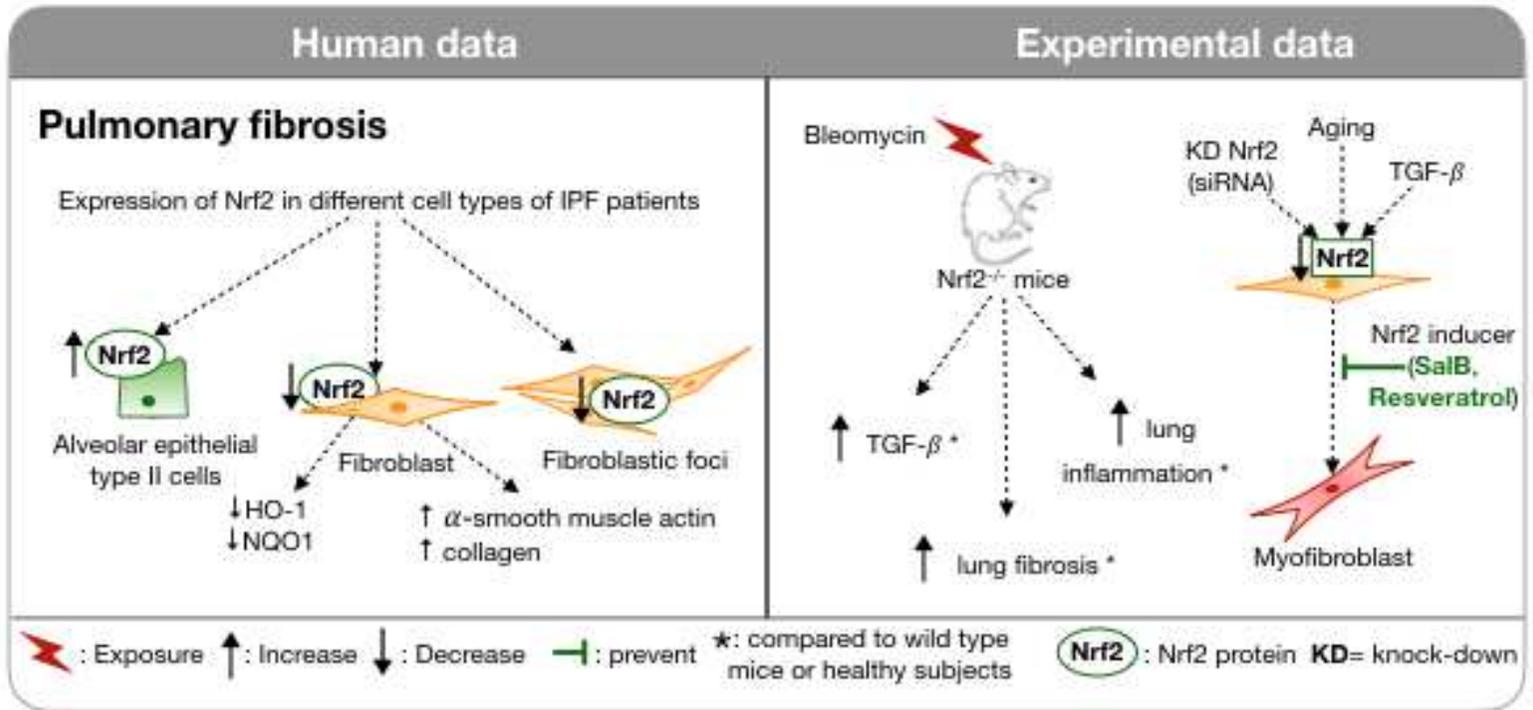
In review

Figure 2



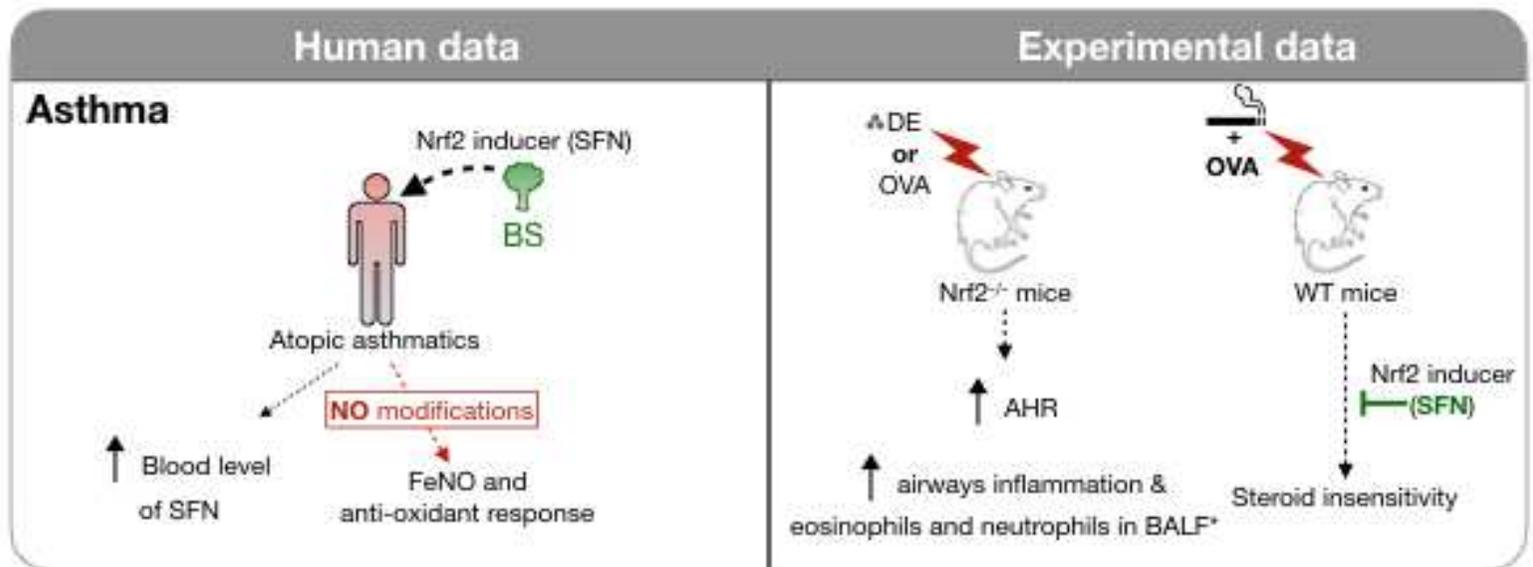
In review

Figure 3



In review

Figure 4



In review

1 **Table 1:** Effect of Nrf2 modulation on COPD characteristics

Bioactive Compound	Treatment Administration	Species	Model	Outcomes	↑ antioxidant response	Ref
SFN	10µM for 16h 0.5mg/day per mouse during 3 days, nb	Human macrophage Nrf2 ^{+/+} and Nrf2 ^{-/-} mice	Macrophage from COPD patients Exposure to CS (for 1w or 6m), challenge with PA 24h after SFN treatment	In macrophages from COPD subjects: - ↑ bacterial clearance of PA and NTHI through an enhancement of phagocytosis - ↑ increase the expression of the scavenger receptor MARCO In mouse model: - ↓ the bacterial burden and ↑ the phagocytosis of macrophage in Nrf2 ^{+/+} but not in Nrf2 ^{-/-} mice	Nrf2 ^b , NQO1 ^a , GPX2 ^a	(99)
	Pre-treatment with 0.5µM for 12h	Rat epithelial type II cells (RLE-6TN)	Exposure to different concentrations of CSE (1% to 20%) for 24h	- ↓ cell death by apoptosis and ↓ G1 phase cells cycle arrest - ↓ CS induced ROS production	Nrf2 ^{a,b}	(100)
	25 or 125 µmoles/day, orally for 4w	COPD Subjects	Parallel, placebo control, phase 2 trial	- no significant difference between groups in Nrf2 expression in alveolar macrophages and bronchial epithelial cells - clinically well tolerated	none	(101)
CDDO-Im	60 or 90 mg/kg diet throughout CS exposure	Nrf2 ^{+/+} and Nrf2 ^{-/-} mice	Exposure to CS for 5d/w for 6m	- ↓ alveolar destruction (MLI) in Nrf2 ^{+/+} but not in Nrf2 ^{-/-} mice - ↓ oxidative stress (OHdG) through with an increase glutathione production in Nrf2 ^{+/+} mice only - ↓ CS induced apoptosis (TUNEL-positive cells) in both strains of mice	HO-1 ^a , NQO1 ^a , Gclc ^a , Gclm ^a , Srx1 ^a , G6PD ^a	(106)
Resveratrol	10µM during 24h	A549 and SAE cells	1%, 2.5% and 5% CSE exposure for 24h	- ↓ CSE induced ROS production - ↑ GCLC and restored GSH level - ↑ nuclear translocation of Nrf2 ↓ CSE induced post transcriptional modification of Nrf2/Keap1 (tyrosine nitration)	Nrf2 ^{bd} ; GCL ^a ;	(103)

2
3
4
5
6
7

8 **Table 1 continued**

Bioactive compound	Treatment Administration	Species	Model	Outcomes	↑ antioxidant response	Ref
Alantolactone	1, 5, 10μM pre treatment for 2h before CSE exposure	Beas-2B and NHBE cells	5% CSE exposure for 24h	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ IL-1 β, TNF-α, IL-6 and IFN-γ CSE induced production - ↓ caspase 3 activity and apoptosis - ↓ ROS and MDA content - ↓ CS induced phosphorylation of p65 of the Nf-κB pathway 	Nrf2 ^b ; HO-1 ^b	(182)
Andrographolid ^e	0.1, 0.5, and 1mg·kg ⁻¹ , 2h	BALB/c mice	Exposure to CS for 1h during 5d, 2h after treatment	<ul style="list-style-type: none"> - ↓neutrophil and total cell recruitment - ↓ lung protein level of IL-1β, MCP-1, KC and IP-10 - ↓ cytokine production of MIP-2α, MMP12, TIMP-1, GMCSF, TNFα - ↓ oxidative stress (8-Isoprostane, 8-OHdG and 3-NT levels) 	Nrf2 ^{bd} , GCLM ^a , GCLC ^a , Gpx-2 ^a , HO-1 ^a , CAT ^c , SOD ^c , GPx ^c , GR ^c	(110)
	5mg/kg and 10mg/kg, ip	BALB/c mice	Exposure to CS twice/d, 5d/w during 2w Treatment 2h prior NTHi challenge	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ total cell count, neutrophils and macrophage in the BAL - ↓ lung inflammation induced by NTHi infection in the context of CS exposure - ↓ TNF-α, IL1-β - Change the protease anti-protease balance by ↓ MMP9 and MMP8 	Nrf2 ^b , GCLM ^a , Gpx-2 ^a , HO-1 ^a , NQO1 ^a , GR ^a	(94)
Triterpene Acids	50mg/kg or 100mg/kg, ig from the 7w CS exposure	C57BL/6J mice	Exposure to CS, 4 times/d for 5d/w during 12w	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ lung weight assessed by the lung index* and the lung alteration assessed by MLI and DI - ↓ IL-1β, IL-2, IL-6, and TNF-α - ↓ CS induced inflammation by ↓ p-NFκB - ↑ phosphorylation of AMP^c 	Nrf2 ^b	(108)

9 **Abbreviations:** nb: nebulisation; ip: intraperitoneally; iv: intravenously; it: intratracheal; ig: intragastric; w: week, m=month, CS; cigarette smoke, CSE: cigarette smoke extract.
10 A549: human type II alveolar epithelial cell line, SAEC cells: Human primary small airway epithelial cells; NHBE: normal human bronchial epithelial cells, TIMP-1: tissue
11 inhibitor of metalloproteinases-1; MIP-2: macrophage inflammatory protein 2- α; 3-NT: 3-nitrotyrosine; GSH: glutathione; GSL: Glutamate-cysteine ligase; GCLC, glutamate-
12 cysteine ligase catalytic; GCLM, glutamate-cysteine ligase modifier; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase, MARCO: Macrophage Receptor With Collagenous
13 Structure^amRNA expression; ^b protein expression; ^c enzymatic activity; ^d nuclear localisation, *Lung index (%) = lung weight (mg)/body weight (g) ×100; MLI = Mean linear
14 intercept; DI: destructive index

Table 2: Effect of Nrf2 modulation in pulmonary fibrosis

Bioactive compound	Treatment Administration	Species	FA (n inj; duration)	Outcomes	↑ antioxidant response	R
SFN	Subcutaneous injection (0.5mg/kg)	Mouse	BLM (1, 7 or 28 d)	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ pulmonary inflammation: ↓ TNFα and IL-1β - ↓ lung induced oxidative stress (3NT; 4HNE) - ↓ lung fibrosis: ↓ fibrosis score (Szapiel Score), ↓ level of TGFβ, ↓ hydroxyproline content 	NRF2 ^{a,b} , HO-1 ^{a,b} , NQO1 ^{a,b} , SOD ^{a,b} , CAT ^{a,b}	(1)
epigallocatechin-3-gallate	20mg/kg body weight, once daily ip	Rat	BLM (1; 28 d)	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ lung induced oxidative stress (↓ ROS and LPO) - Restores the reduced activities of the phase II enzymes NQO1 and GST induced by the BLM - ↓ pulmonary inflammation (NF-κB, IL-1β, TNFα) - ↓ pulmonary damages and ↓ the lung collagen and hydroxyproline content 	NRF2 ^b GST ^c ; NQO1 ^c ; SOD; CAT; GPX; GSH	(1)
salidroside	50, 100, or 200mg/kg ip	Rat	BLM (1; 28d)	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ lung induced oxidative stress (↓ MDA) - ↓ pulmonary inflammation: ↓ inflammatory BAL cells recruitment, ↓ level of IL-6, TNFα in the BAL, inhibit IκBα phosphorylation and (NF-κB) p65 nuclear accumulation - Inhibits the BLM induced EMT assessed by ↓ E-cadherin and ↑ vimentin, fibronectin, and α-smooth muscle actin (α-SMA) - ↓ TGF-β1 and the phosphorylation of Smad-2/-3, a downstream target 	NRF2 ^b , HO-1 ^b ; NQO1 ^b SOD ^c GSHpx ^c	(1)
berberine	200mg/kg i.p daily	Rat	BLM (1; 28d)	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ lung induced oxidative stress (↓ MDA and MPO in the BAL and in the whole lung) - ↓ collagen deposition assessed by hydroxyproline content, pulmonary fibrosis and ↓ level of TGF1β - ↓ pulmonary inflammation (↓ NF-κB-p65 nuclear translocation, IκB Ser32/36 phosphorylation) 	NRF2 ^b ; SOD ^c ; CAT ^c ; GPX ^c ; GSH ^c	(1)

Table 2 continued

Bioactive compound	Treatment Administration	Species	FA (n inj; duration)	Outcomes	↑antioxidant response	Ref
Salvianolic acid B	SalB at 20mg/kg/d from 14d to 28d	Rats and MRC-5 human embryonic lung fibroblast line	it BLM (1; 28d)	<ul style="list-style-type: none"> - In MRC-5 stimulated with TGF-β - ↓ markers of myofibroblast differentiation (vimentin, α SMA, fibronectin) - ↓ oxidative stress (ROS and MDA) - In rat exposed to BLM - ↓ markers of myofibroblast differentiation (α SMA) - Improved the induced pulmonary fibrosis 	Nrf2 ^{a,b,d} in cells line and NRF2 ^b	(149)
Quercetin	30mM	NIH3T3 ; NHLFs	TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> - ↓collagen production induced by TGF-b in human and murine fibroblasts - activates SMAD and MAPK pathways 	Nrf2 ^d , HO-1 ^b	(156)
	Different concentrations	BEAS 2B cells ;	BLM	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ ROS production induced by BLM - ↓IL-8 induced by BLM 	Nrf2 ^a , HO-1 ^a , catalase ^a , γ-GCS ^a	(183)
Resveratrol	10μM	BEAS2B cells; RAW264.7 ; MEF	ig PRQ (10 μM)	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ oxidative stress in BEAS2B cells - ↓ PRQ induced myofibroblast transformation of MEF and macrophages - ↓ PRQ induced inflammatory response (IL-6, TNFα; TNF β) in macrophages 	Nrf2 ^b ; NQO1 ^b ; HO-1 ^b in BEAS2B treated cells	(155)
Rapamycin	0.2mg/kg/d ig	Rats	Ig PRQ (1; 28)	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ mesenchymal cell marker (Vimentin) and the EMT associated transcription factor SNAIL - ↓ mRNA expression of collagens 1 and 3 	Nrf2 ^{a,b}	(157)

Abbreviations: ip:intraperitoneally ; iv : intravenously; it intratracheal; ig : intragastric BLM: bleomycin; PRQ: paraquat. MEF: mouse embryonic fibroblast; NIH3T3 : murine embryo fibroblasts ; NHLFs : normal human lung fibroblasts ; MAPK: mitogen-activated protein kinase ; NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), γ-glutamyl cysteine. ^a mRNA expression; ^b protein expression; ^c enzymatic activity ; ^d nuclear localisation