



**HAL**  
open science

# Régulation de la réaction asthmatique par des agents microbiens : quelle place pour les cellules natural killer ?

Justine Devulder

## ► To cite this version:

Justine Devulder. Régulation de la réaction asthmatique par des agents microbiens : quelle place pour les cellules natural killer ?. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS005 . tel-02275027

**HAL Id: tel-02275027**

**<https://theses.hal.science/tel-02275027>**

Submitted on 30 Aug 2019

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

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

**Université de Lille – Ecole Doctorale Biologie Santé**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Discipline : IMMUNOLOGIE**

Titre :

**Régulation de la réaction asthmatique par des agents microbiens : quelle place pour les cellules Natural Killer ?**

Présentée et soutenue publiquement le 29 Mars 2019 par

**Justine DEVULDER**

Devant le jury composé de :

**Professeur Cécile CHENIVESSE**

**Présidente**

Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Hôpital Calmette, Lille

**Professeur Hamida HAMMAD**

**Rapporteure**

Département de Médecine Interne, Université de Gent, Belgique

**Docteur Thierry WALZER**

**Rapporteur**

Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon

**Docteur Cindy BARNIG**

**Examineur**

Service de Physiologie, Pôle de Pathologie Thoracique, CHRU de Strasbourg

**Docteur Philippe GOSSET**

**Examineur**

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 12, Lille

**Docteur Catherine DUEZ**

**Directrice de thèse**

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 13, Lille

**CENTRE D'INFECTION ET D'IMMUNITE DE LILLE, INSERM U1019, CNRS UMR8204,  
EQUIPE 13, UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE, INSTITUT PASTEUR DE LILLE**

# REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Anne Tsicopoulos de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès mon Master 2.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, le professeur Hamida Hammad et le professeur Thierry Walzer, pour leurs conseils précieux et leurs commentaires bienveillants.

Un grand merci aux membres du jury d'avoir accepté de relire et d'assister à la présentation de ce travail.

Au Docteur Catherine Duez. Merci, ce mot me paraît dérisoire mais c'est le seul qui exprime toute la gratitude que j'ai pour toi. Merci pour tout : pour m'avoir fait découvrir et aimer ce métier, pour avoir toujours été là scientifiquement et humainement, pour ta bienveillance, ta disponibilité, tes conseils, et aussi pour les énormes fous rires (tes accents me manqueront). Ça a été un plaisir de travailler avec toi, et j'espère qu'un jour nous aurons l'occasion de retravailler ensemble.

Au Professeur Cécile Chenivresse, présidente de ce jury de thèse. Merci d'y avoir cru, d'avoir apporté ta vision des choses, ton ouverture d'esprit et ton dynamisme. Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans le soutien du service Pneumologie-Allergologie du CHRU de Lille. Je remercie également les Docteurs Stéphanie Fry et Victor Valentin, ainsi que les infirmières et les internes pour leur implication dans ce projet.

Je remercie également les Docteurs Patricia de Nadaï et Corine Glineur pour leur soutien durant ces dernières années. Que ce soit scientifiquement, techniquement ou moralement, vous savoir assises derrière moi ou à côté de moi a été d'un grand réconfort.

Aux Docteurs Hélène Bauderlique et Christelle Faveeuw pour leur aide et leur expertise en cytométrie en flux.

A toute l'équipe du Plateau Technique de Haute Technologie et d'Expérimentation Animale, Jean-Pierre, Thierry, David, Romain, Philippe, Nathalie pour leur aide dans le maintien des élevages et pour le soin apporté aux animaux.

Aux Docteurs Philippe Gosset et Catherine Daniel, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, pour leurs conseils avisés et bienveillants.

A Philippe Marquillies et Valérie Ledroit pour leur soutien technique et moral.

A tous les membres de l'équipe 13 « Immunité Pulmonaire » du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Odile, Nathalie, Joanne, Julie, Maxence, Madleen, Camille, Alexandre, Lucie, Mélodie, et Saliha.

A mes amis, ma famille et mes grands-parents. Votre appui et votre amour ont été ma béquille durant ces trois dernières années. Je vous sais fier de moi et j'espère être toujours à la hauteur de cette fierté. Merci pour tout.

A ma maman. Merci pour ton soutien sans faille. Jamais je ne serais allée aussi loin sans toi. Tu es la femme la plus forte que je connaisse. Tu es mon modèle, et je suis aussi fière de toi que tu es fière de moi, c'est-à-dire immensément. Tu m'as construit de magnifiques ailes. Ce travail t'est entièrement dédié. Je t'aime.

# RESUME

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes. L'asthme sévère représente un problème de santé majeur. Le rôle des microbes dans l'asthme est complexe. D'une part, un ensemble d'études épidémiologiques et expérimentales a montré que l'exposition chronique à certaines bactéries ou des composés microbiens, en particulier au cours de la petite enfance, conférerait une protection vis-à-vis de l'asthme allergique. D'autre part, les virus respiratoires sont à l'origine de 80% des exacerbations et sont associés chez l'enfant à un risque accru de développer de l'asthme, allergique ou non. Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire innée antivirale. Elles ont des fonctions cytotoxiques en lysant différents types de cellules et régulent la réponse immunitaire. Leur rôle dans l'asthme et ses exacerbations reste encore à identifier même si des modifications phénotypiques ont été observées chez des patients asthmatiques et qu'il a été récemment montré dans un modèle murin qu'elles n'intervenaient pas dans le développement de l'asthme allergique. L'objectif de la thèse était de mieux comprendre la place des cellules NK dans la pathologie asthmatique en se focalisant sur deux aspects : l'exacerbation viro-induite et l'inhibition par des composants microbiens.

L'hypothèse pour la 1ère partie de la thèse était que les cellules NK de patients asthmatiques pouvaient présenter une dysfonction dans leur réponse à des agents microbiens qui pourrait favoriser l'exacerbation de la réaction asthmatique. Pour cela, nous avons analysé l'activation, la cytotoxicité et la production de cytokines de cellules NK provenant de patients asthmatiques sévères stimulées avec des molécules mimant des microorganismes ou un rhinovirus vivant (HRV), en comparaison avec des donneurs sains. Nous avons montré que les cellules NK de patients sévères étaient moins cytotoxiques que les cellules NK de donneurs sains en réponse à la stimulation avec un agoniste de Toll-Like Receptor 3 ou du TLR7/8 et avec HRV. En outre, lorsqu'elles sont stimulées avec de l'IL-12 et de l'IL-15, des cytokines produites pendant l'infection virale, les cellules NK de patients asthmatiques sévères expriment moins d'IFN- $\gamma$  que les cellules NK de donneurs sains. Nos résultats suggèrent que l'activation des cellules NK de patients asthmatiques pourrait être insuffisante pendant les infections respiratoires et pourraient participer à l'aggravation de l'asthme.

L'hypothèse pour la 2ème partie de la thèse était que les cellules NK pourraient participer à l'inhibition de la réaction asthmatique allergique dans un modèle murin. Dans des souris C57BL/6

sensibilisées à l'ovalbumine, l'instillation de FSL1, un agoniste de TLR2/6 inhibe la réaction asthmatique allergique. Cette inhibition étant associée à des modifications de la population des cellules NK, nous avons analysé leur rôle grâce à des souris déficientes en cellules NK. En l'absence de cellules NK, les souris développent un asthme allergique, et l'inhibition par FSL1 est maintenue. Par conséquent, les cellules NK ne jouent pas de rôle dans le développement de l'asthme allergique expérimental, ni dans son inhibition induite par un agent microbien. Cependant, elles pourraient être modifiées par l'environnement allergique, et avoir ainsi un rôle dans les exacerbations viro-induites. Cette question cruciale rejoint le travail réalisé dans la première partie de la thèse.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les fonctions des cellules NK seraient modifiées dans la pathologie asthmatique, qu'elle soit allergique ou non. Notre hypothèse est que le défaut d'activation des cellules NK participerait aux exacerbations viro-induites de l'asthme. Les perspectives de ces travaux sont de poursuivre la caractérisation des cellules NK chez les patients asthmatiques sévères et d'évaluer le rôle des cellules NK dans un modèle murin d'exacerbation de la réaction asthmatique.

Mots clés : Asthme, Cellules NK, Exacerbations, PRRs, Rhinovirus

# ABRÉVIATIONS

GINA : Global Initiative for Asthma

ACT : asthma control test

VEMS : volume expiratoire maximale par seconde

SARP : Severe Asthma Research Program

IMC : indice de masse corporelle

NK : Natural Killer

TSLP : thymic stromal lymphopoietin

ILC : innate lymphoid cell

IL : interleukine

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor

IgE : Immunoglobuline E

TNF : tumor necrosis factor

EET : eosinophils extracellular traps

ROR $\gamma$ t : retinoic acid related  $\gamma$ t

LBA : lavages broncho-alvéolaires

IFN : interferon

LPS : lipopolysaccharide

PAMPs : pathogen associated molecular patterns

DAMPs : damage associated molecular patterns

PRRs : pattern recognition receptors

TLR : toll like receptor

RLR : RIG-I like receptor

NLR : nucleotide oligomerization domain (NOD) like receptor

CLR : C-type lectin receptor

Poly(I:C) ou PIC : acide polyinosinique-polycytidylique

R848 : resiquimod

MDP : muracyl dipeptide

RIG-1 : retinoic acid-inducible gene-I-like receptor

MDA-5 : melanoma differentiation-associated gene 5

RSV : virus syncytial respiratoire

RV : rhinovirus

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

KIRs : Killer Ig-like receptors (KIR)

LIRs : Leukocytes Ig-like receptors

NCRs : Natural Cytotoxicity Receptors

pDC : cellule dendritique plasmacytoïde

mDC : cellule dendritic myéloïde

CMN : cellule mononucléée

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	2
<b>RESUME</b> .....	4
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	6
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	12
<b>Chapitre 1 : L'asthme</b> .....	13
A. Définition et données épidémiologiques .....	13
B. Les traitements de l'asthme .....	14
C. L'asthme sévère.....	15
D. Les phénotypes et les endotypes de l'asthme .....	16
1. Quels critères pour définir un phénotype d'asthme ? .....	16
2. Les endotypes de l'asthme.....	17
E. Pathophysiologie de l'asthme .....	19
1. L'asthme T2-high : l'exemple de l'asthme allergique .....	20
2. L'asthme T2-low.....	24
a) La voie Th17.....	24
b) La voie Th1 .....	25
3. Evolution des profils inflammatoires .....	25
4. Caractéristiques communes entre les endotypes de l'asthme .....	26
i. <i>Le remodelage bronchique</i> .....	26
ii. <i>Défaut de la résolution de l'inflammation dans l'asthme</i> .....	27
<b>Chapitre 2 : Les microorganismes dans l'asthme : ami ou ennemi ?</b> .....	30
A. Comment sont reconnus les microorganismes dans les poumons ?.....	30
1. Les Toll-Like receptors (TLRs) .....	30
2. Les Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) ...	33
3. Les Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) .....	34
4. Les récepteurs aux lectines de type-C (CLRs) .....	35
B. Lorsque les microorganismes participent à la tolérance immunitaire dans les voies respiratoires.....	35
1. La théorie de l'hygiène et ses hypothèses dérivées .....	36
2. Comment les récepteurs aux microorganismes participent à la tolérance immunitaire ?.....	37

C.	Lorsque les microorganismes aggravent les symptômes asthmatiques ou favorisent le développement de la maladie .....	39
1.	Rôle des infections virales dans le développement de l'asthme .....	40
2.	L'exacerbation de la réaction asthmatique par les virus.....	40
a)	Le Rhinovirus.....	41
b)	Pathophysiologie de l'exacerbation de l'asthme viro-induit .....	42
<b>Chapitre 3</b>	<b>Les cellules Natural Killer .....</b>	<b>44</b>
A.	Caractéristiques et sous-populations .....	44
B.	Le développement des cellules NK .....	46
1.	Le développement des cellules NK humaines .....	46
2.	Le développement des cellules NK murines .....	48
C.	Activation des cellules NK.....	49
1.	Des récepteurs pour reconnaître le soi et le non-soi .....	50
a)	Les récepteurs spécifiques du CMH de classe 1.....	50
i.	La superfamille des immunoglobulines .....	50
1)	Les Killer Ig-like receptors (KIR).....	50
2)	Les leukocytes Ig-like receptors (LIR) .....	51
ii.	La superfamille des lectines de type C (CD94/NKG2 et Ly49).....	52
1)	CD94/NKG2.....	52
2)	Ly49 .....	52
b)	Les récepteurs non-spécifiques du CMH de classe 1.....	53
i.	NKG2D .....	54
ii.	Les Natural Cytotoxicity Receptor (NCR) .....	54
iii.	Les PRRs .....	56
1)	Expression des PRRs dans les cellules NK .....	56
2)	L'activation des cellules par les agonistes PRRs nécessite une interaction avec d'autres cellules.....	57
2.	Interaction des cellules NK avec d'autres cellules immunitaires.....	58
3)	L'épuisement des cellules NK : quand l'activation des cellules NK devient chronique	60
D.	Les cellules NK dans l'asthme.....	62
1)	Modification des cellules NK humaines.....	62
2)	Apport des modèles murins .....	63
3)	Les cellules NK et l'exacerbation de la réaction asthmatique .....	65

<b>OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE</b> .....	66
<b>RESULTATS</b> .....	68
<b>PARTIE 1 : La réponse des cellules Natural Killer au rhinovirus est défectueuse dans l'asthme sévère</b> .....	69
A. Matériels et Méthodes.....	69
1. Patients.....	69
2. Purification des cellules mononucléées du sang et des cellules NK.....	70
3. Production du rhinovirus .....	70
4. Stimulation des cellules .....	70
5. Analyse en cytométrie en flux.....	71
6. Mesure des cytokines et des chimiokines.....	72
7. Analyses statistiques.....	73
B. Résultats .....	73
1. L'asthme sévère est associé à une diminution de l'activation et de la cytotoxicité des cellules NK en réponse à la stimulation des CMN avec des molécules mimant des pathogènes .....	73
2. L'asthme sévère est associé à une diminution de la production d'IFN- $\gamma$ par les cellules NK en réponse à la stimulation avec l'IL-12+IL-15 .....	75
3. L'asthme sévère est associé à une réponse défectueuse des cellules NK à la stimulation in vitro avec RV .....	76
4. Les cellules NK des patients asthmatiques sévères présentent un phénotype d'épuisement .....	79
C. Discussion.....	81
<b>PARTIE 2 : Les cellules NK ne jouent pas de rôle dans le développement de la maladie asthmatique mais sont modifiées dans les poumons</b> .....	84
A. Matériels et Méthodes.....	84
1. Souris et modèle d'asthme allergique .....	84
2. Mesure de la résistance pulmonaire.....	85
3. Composition cellulaire du lavage broncho-alvéolaire.....	85
4. Analyse de l'expression des gènes.....	86
5. Quantification des niveaux de cytokines et de chimiokines .....	86
6. Mesure de la concentration d'IgE sérique .....	87
7. Cytométrie en flux.....	87
8. Transfert des cellules NK .....	88
9. Statistiques .....	88

B.	Résultats .....	89
1.	La déplétion ou l'absence constitutive de cellules NK n'affecte pas le développement de l'asthme allergique expérimental .....	89
a)	La déplétion des cellules NK dans les souris ROSA <sup>DTR+</sup> NKp46 <sup>iCre</sup> sur la réaction asthmatique expérimentale .....	89
b)	Effet de l'absence constitutive des cellules NK dans les souris ROSA <sup>DTA+</sup> NKp46 <sup>+</sup> sur la réaction asthmatique expérimentale .....	91
2.	Inhibition de la réaction asthmatique expérimentale par FSL1 : rôle des cellules NK94	
a)	L'administration de FSL1 inhibe la réaction asthmatique expérimentale induite par l'ovalbumine .....	94
b)	Le transfert de cellules NK provenant de souris stimulées avec du FSL1 ne modifient pas l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire des souris sensibilisées avec de l'ovalbumine .....	97
c)	Le traitement des souris NKp46-DTA sensibilisées avec du FSL1 ne restaure pas l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique .....	99
3.	Les cellules NK de souris sensibilisées présentent une réponse anormale au FSL1 100	
C.	Discussion.....	103
<b>CONCLUSION GENERALE / DISCUSSION / PERSPECTIVES .....</b>		<b>105</b>
<b>Les cellules NK sont-elles modifiées par l'environnement inflammatoire asthmatique ou présentent-elles ces modifications avant le développement de la maladie asthmatique ?</b> .....		<b>106</b>
<b>La modification des fonctions des cellules NK participent-elles au maintien de l'inflammation respiratoire dans les poumons ?</b> .....		<b>108</b>
<b>Quels autres facteurs pourraient influencer la fonction des cellules NK ?</b> .....		<b>110</b>
A.	La corticothérapie .....	110
B.	L'obésité.....	111
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>113</b>

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

# Chapitre 1 : L'asthme

## A. Définition et données épidémiologiques

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes. Elle se manifeste par des symptômes variables comme une respiration sifflante, des essoufflements, une sensation d'oppression thoracique, une toux persistante, et à plus ou moins long terme, par la diminution de la capacité pulmonaire. Ces symptômes sont réversibles spontanément ou suite à la prise de médicaments, et peuvent varier en intensité et au cours du temps (GINA, 2017) L'asthme est un problème de santé mondial : 334 millions de personnes sont asthmatiques. La prévalence globale de l'asthme est de 4,3% chez les adultes et peut atteindre 21% chez les enfants. Cependant, ces prévalences mondiales sont très certainement biaisées car de grands écarts sont constatés entre les pays, et la prévalence de l'asthme dans les pays sous-développés est largement sous-estimée. En France, l'asthme touche 6 à 7% des adultes et 10% des enfants âgés de 10 ans ou plus. Malgré une forte augmentation ces trente dernières années, la prévalence de l'asthme s'est stabilisée dans les pays industrialisés, reflétant un meilleur diagnostic et une meilleure prise en charge des patients. Mais la prévalence de l'asthme est toujours en progression dans les pays en voie de développement (Papi et al., 2018). En France, le taux d'hospitalisation des adultes pour asthme est stable depuis l'an 2000, en revanche le taux d'hospitalisation des enfants reste en constante progression (Figure 1) (Delmas and Fuhrman, 2010). L'asthme a un coût économique et humain non négligeable : aux Etats-Unis, l'asthme coûte en moyenne 4912\$ par an et par personne, incluant des dépenses de santé directes (médicaments, hospitalisations en urgence et visite de contrôle) et des coûts indirects (congés maladies, incapacité de travail) (Cisternas et al., 2003). Dans le monde, 346 000 décès sont directement causés par l'asthme chaque année (Lozano et al., 2012).

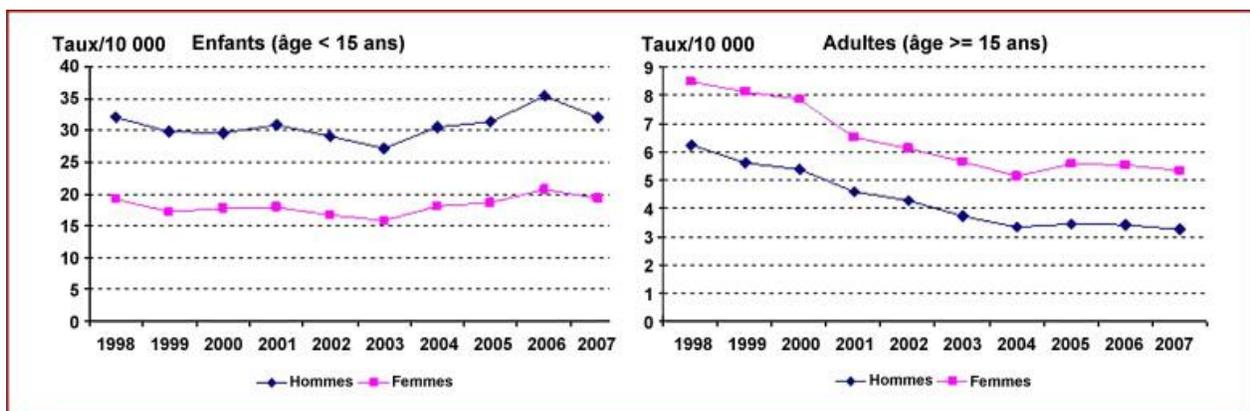


Figure 1 : Taux standardisés d'hospitalisation pour asthme chez les enfants et les adultes en France métropolitaine entre 1998 et 2007 (Delmas and Fuhrman, 2010)

## B. Les traitements de l'asthme

La prise en charge de l'asthme a deux objectifs à long terme :

- Assurer le bon contrôle des symptômes en maintenant un mode de vie normal
- Limiter les risques d'exacerbations futures, la perte des capacités pulmonaires et les effets secondaires

Pour atteindre ces objectifs, le patient doit recevoir des conseils afin d'adapter son environnement et son style de vie pour éviter au maximum les facteurs aggravant l'asthme (allergènes, tabagisme, pollution...). Dans la majorité des cas, cette prévention est insuffisante et le patient doit suivre une pharmacothérapie au long cours. En 2012, La « Global Initiative for Asthma » (GINA) a décrit 5 stades de thérapies (Figure 2). Les corticoïdes inhalés (ICS) sont la base de ces traitements. Les patients souffrant d'un asthme « léger » ou « intermittent » reçoivent des traitements correspondant au stade 1 ou 2, c'est-à-dire des corticoïdes inhalés et un bronchodilatateur à courte durée d'action en cas de crises d'asthme. Lorsque le patient, malgré ces traitements, souffre encore de symptômes non contrôlés, les doses de corticoïdes inhalés sont augmentées et des thérapies additionnelles sont prescrites : des bronchodilatateurs à longue durée d'action, des antagonistes de récepteurs aux leucotriènes ou de récepteurs muscariniques, des corticoïdes systémiques, ou des anticorps monoclonaux dirigés contre les IgE ou l'interleukine (IL)-5. Au cours du temps, ces traitements peuvent évoluer : ils peuvent être augmentés si les symptômes du patient deviennent incontrôlés ou s'il souffre d'exacerbations aiguës, et à l'inverse les traitements peuvent être allégés si l'état du patient le permet. Ainsi, les traitements sont continuellement ajustés en fonction de l'évolution du patient, de ses symptômes, et de ses attentes (GINA, 2017; Van Buul and Taube, 2015).

STEP1	STEP2	STEP3	STEP4	STEP5
	Low dose ICS	Low dose ICS/LABA	Med/High ICS/LABA	Refer for add-on treatment e.g tiotropium, anti-IgE, anti-IL5
Consider low dose ICS	Leukotriene receptor antagonist (LTRA) Low dose theophylline	Med/high dose ICS Low dose ICS + LTRA (or +theoph)	Add tiotropium Med/high dose ICS + LTRA (or theoph)	Add low dose OCS
As needed short-acting beta <sub>2</sub> -agonist (SABA)		As needed SABA or low dose ICS/formoterol#		

Figure 2 : Les différents stades du traitement de l'asthme selon les recommandations GINA

ICS : corticoïdes inhalés, SABA : bronchodilatateur à courte durée d'action, LABA : bronchodilatateur à longue durée d'action, LTRA : antagonistes des récepteurs aux leukotriènes, OCS : corticoïdes oraux (GINA, 2017)

### C. L'asthme sévère

Selon l'European Respiratory Society et l'American Thoracic Society, l'asthme sévère est un asthme contrôlé en réponse aux traitements de stade 4 et 5, ou qui demeure incontrôlé malgré ces traitements. Un asthme non contrôlé est défini par au moins l'un des critères suivants : un score inférieur à 20 à l'ACT (asthma control test), au moins 2 exacerbations sévères dans l'année écoulée (nécessitant une prise de corticostéroïdes oraux pendant au moins 3 jours), une exacerbation sévère dans l'année écoulée (nécessitant une hospitalisation et/ou une ventilation mécanique), la diminution irréversible de la capacité pulmonaire (volume expiratoire forcée par seconde (VEEMS) inférieur à 80% après la prise de bronchodilatateurs) (Chung et al., 2014) . Cette définition de l'asthme sévère n'inclut pas de biomarqueurs biologiques ou de mécanismes physiopathologiques, elle décrit un groupe de patients pour lesquels les traitements actuels sont incapables de contrôler adéquatement les symptômes ou pour qui les risques de développer des effets secondaires dus aux hautes doses de traitements sont préoccupants à long terme. L'asthme sévère est un enjeu majeur à la fois humain et économique (Ray et al., 2016). La mortalité est plus élevée chez les patients asthmatiques sévères : la sévérité de l'asthme et la diminution du contrôle des symptômes asthmatiques sont associées à une augmentation de la mortalité (Omachi et al., 2008). De plus, même si les patients asthmatiques sévères représentent 5 à 10% de la population asthmatique, ils contribuent à 50% des dépenses de santé liées à l'asthme (Ray

et al., 2016). Ainsi, aux Etats-Unis, les dépenses de santé pour un patient asthmatique modéré sont estimées à 4530\$ par an alors qu'elles s'élèvent à 12813\$ par an pour un patient asthmatique sévère (Cisternas et al., 2003).

## D. Les phénotypes et les endotypes de l'asthme

### 1. Quels critères pour définir un phénotype d'asthme ?

Les patients asthmatiques ne forment pas une population homogène. Le terme « asthme » désigne davantage un syndrome qu'une maladie unique. Les premières descriptions des phénotypes de l'asthme ont mis en opposition deux sous-groupes de patients : les patients asthmatiques allergiques (appelé asthme extrinsèque) et les patients asthmatiques non-allergiques (appelé asthme intrinsèque). D'autres méthodes de classification basées sur d'autres variables cliniques ont caractérisé l'asthme précoce et tardif, l'asthme induit par l'exercice physique, l'asthme lié à l'obésité et l'asthme lié au tabagisme, toutefois toutes ces méthodes ne sont pas étayées par des études longitudinales (Wenzel, 2012). Afin d'éliminer ces biais cliniques et d'obtenir des résultats pertinents, plusieurs groupes de travail ont recruté de larges cohortes de patients afin de les regrouper selon des caractéristiques robustes statistiquement. Parmi ces programmes de recherche, le SARP (Severe Asthma Research Program) a identifié 5 groupes de patients asthmatiques. Le premier groupe comprend des individus jeunes, qui ont développé un asthme allergique dans leur enfance, et dont l'asthme ne nécessite pas de traitement quotidien. Ce sont donc des patients souffrant d'asthme léger et ils représentent 15% des asthmatiques recrutés. 44% des patients appartiennent au groupe 2. Comme les individus du groupe 1, ces patients sont asthmatiques allergiques depuis l'enfance et ont une fonction pulmonaire normale. Ce groupe se distingue du premier par une consommation plus importante de médicaments : 74% des patients sont sous traitement (majoritairement des corticoïdes inhalés). Le troisième groupe est composé à 66% de femmes entre 34 et 68 ans. Elles souffrent en majorité d'asthme non allergique, qui s'est déclenché après 23 ans, et qui pourrait être lié à de l'obésité (58% des patients ont un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 30). Leur fonction pulmonaire est diminuée (71% ont une VEMS inférieur à 80%) et elles souffrent fréquemment d'exacerbations nécessitant la prise de corticoïdes oraux. Les patients inclus dans les groupes 4 et 5 répondent aux critères de l'ERS et de l'ATS définissant l'asthme sévère. La capacité pulmonaire de ces patients est fortement diminuée, cependant le VEMS des patients du groupe 4 revient à la normale après la prise de bronchodilatateurs, alors que celui des patients du groupe 5 reste inférieur à 80%. Le groupe 4 est caractérisé par des patients présentant un asthme allergique depuis l'enfance, alors

que le groupe 5 est composé en majorité de femmes qui ont déclaré un asthme non-allergique plus tardivement dans leur vie (Moore et al., 2010). Basée sur des méthodes statistiques différentes et sur d'autres variables, deux études sur des cohortes britanniques et européennes ont obtenus des résultats semblables à ceux obtenus dans le programme SARP (Haldar et al., 2008; Siroux et al., 2011). Cependant, les variables utilisées dans ces études n'incluent pas de données immunologiques et ne permettent donc pas de relier ces groupes caractéristiques de patients à des mécanismes physiopathologiques. Etablir ce lien est pourtant indispensable au développement de biomarqueurs et de nouvelles thérapies ciblées (Braido et al., 2018).

## 2. Les endotypes de l'asthme

Les phénotypes de l'asthme, bien que pertinent sur le plan clinique, dressent le tableau de l'ensemble des caractéristiques observables des patients mais ne permettent pas la compréhension des mécanismes immunologiques, des anomalies physiopathologiques et inflammatoires à l'origine de ces symptômes. Ces différents phénotypes de l'asthme décrit selon la sévérité, l'origine de la maladie ou la réponse aux traitements reflète pourtant l'hétérogénéité des mécanismes impliqués (Kuruvilla et al., 2018). Le terme « endotype » désigne le sous-type d'une maladie défini par un mécanisme fonctionnel ou pathophysiologique distinct. Pour caractériser un endotype de l'asthme, il est nécessaire de prendre en compte un grand nombre de facteurs : la réponse immunitaire innée et adaptative, le génome du patient, son exposition à certains facteurs comme des pathogènes respiratoires ou des polluants, le microbiome du patient, les facteurs psychosociaux ainsi que les voies métaboliques (Figure 3). L'objectif d'un endotype est de définir des biomarqueurs simples permettant d'établir à quel endotype appartient le patient et de développer de nouvelles thérapies ciblant des composants précis et adaptés au patient (Agache and Akdis, 2016).

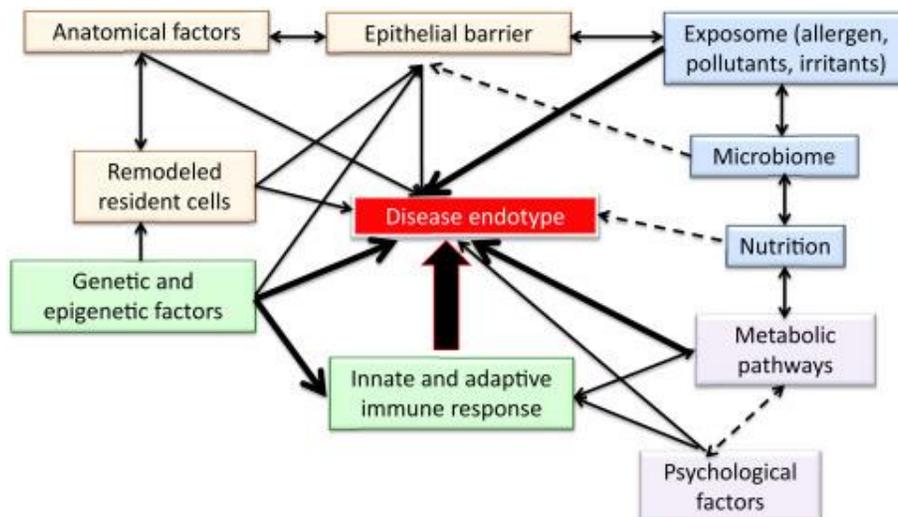


Figure 3 : Les facteurs affectant l'endotype. La définition d'un endotype nécessite une approche mécanistique, basée sur la compréhension des interactions entre la réponse immunitaire et l'exposition du patient aux polluants, aux infections et au microbiome, la génétique et l'épigénétique, les facteurs psychosociaux, la nutrition, les voies métaboliques et les facteurs anatomiques (Agache and Akdis, 2016).

Deux endotypes majeurs de l'asthme ont été décrit : T-helper type 2 cell (Th2) high (ou T2-high) et Th2-low (ou T2-low) (Figure 4). L'endotype T2-high est caractérisé par la présence d'éosinophiles et de lymphocytes Th2 dans les expectorations induites et les voies respiratoires des patients. L'endotype T2-high inclut l'asthme allergique, l'asthme éosinophilique sans maladie atopique, les mycoses broncho-pulmonaires allergiques, l'asthme induit par l'exercice physique et l'asthme exacerbé par l'aspirine. Les biomarqueurs de l'asthme T2-high sont un taux d'éosinophiles sanguins supérieur à 400 cellules par microlitre de sang, l'augmentation de la concentration d'IL-5 sérique, l'augmentation du taux d'IgE sérique, l'augmentation du taux d'oxide nitrique expiré et la concentration sérique de périostine (Carr and Kraft, 2018; Kuruvilla et al., 2018). L'endotype T2-high est très bien caractérisé et plusieurs thérapies ciblées sur ses composants ont été développées : l'omalizumab est un anticorps monoclonal spécifique des IgE administré aux patients asthmatiques allergiques sévères, et deux anticorps monoclonaux spécifiques d'IL-5, le mépolizumab et reslizumab, ont également été développés et sont administrés à des patients asthmatiques hyper-éosinophiliques (Stokes and Casale, 2016).

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'endotype T2-low sont insuffisamment décrits et compris. L'endotype T2-low se distingue de l'endotype T2-high par la présence de neutrophiles dans les voies respiratoires (en présence ou non d'éosinophiles) et par la présence de lymphocytes Th1 et/ou Th17. L'endotype T2-low comprend l'asthme associé à l'obésité, l'asthme associé au tabagisme, l'asthme tardif et l'asthme paucygranulocytaire (caractérisé par l'absence de cellules inflammatoires, éosinophiles ou neutrophiles dans les expectorations induites des patients). Les patients présentant un endotype T2-low souffrent généralement d'un asthme plus sévère que les patients T2-high dans la mesure où ces patients sont résistants aux corticostéroïdes et ne répondent pas aux traitements ciblés anti-IgE ou anti-IL5. De plus, peu de biomarqueurs spécifiques existent et c'est souvent l'absence de biomarqueur T2-high qui détermine l'endotype T2-low. L'un des biomarqueurs possibles pour cet endotype est l'augmentation de la concentration d'une chimiokine inflammatoire, CXCL8, dans les expectorations induites de patients. Cependant, aucune thérapie ciblée sur cette chimiokine inflammatoire n'a encore été développée (Ordonez et al., 2000; Samitas et al., 2017).

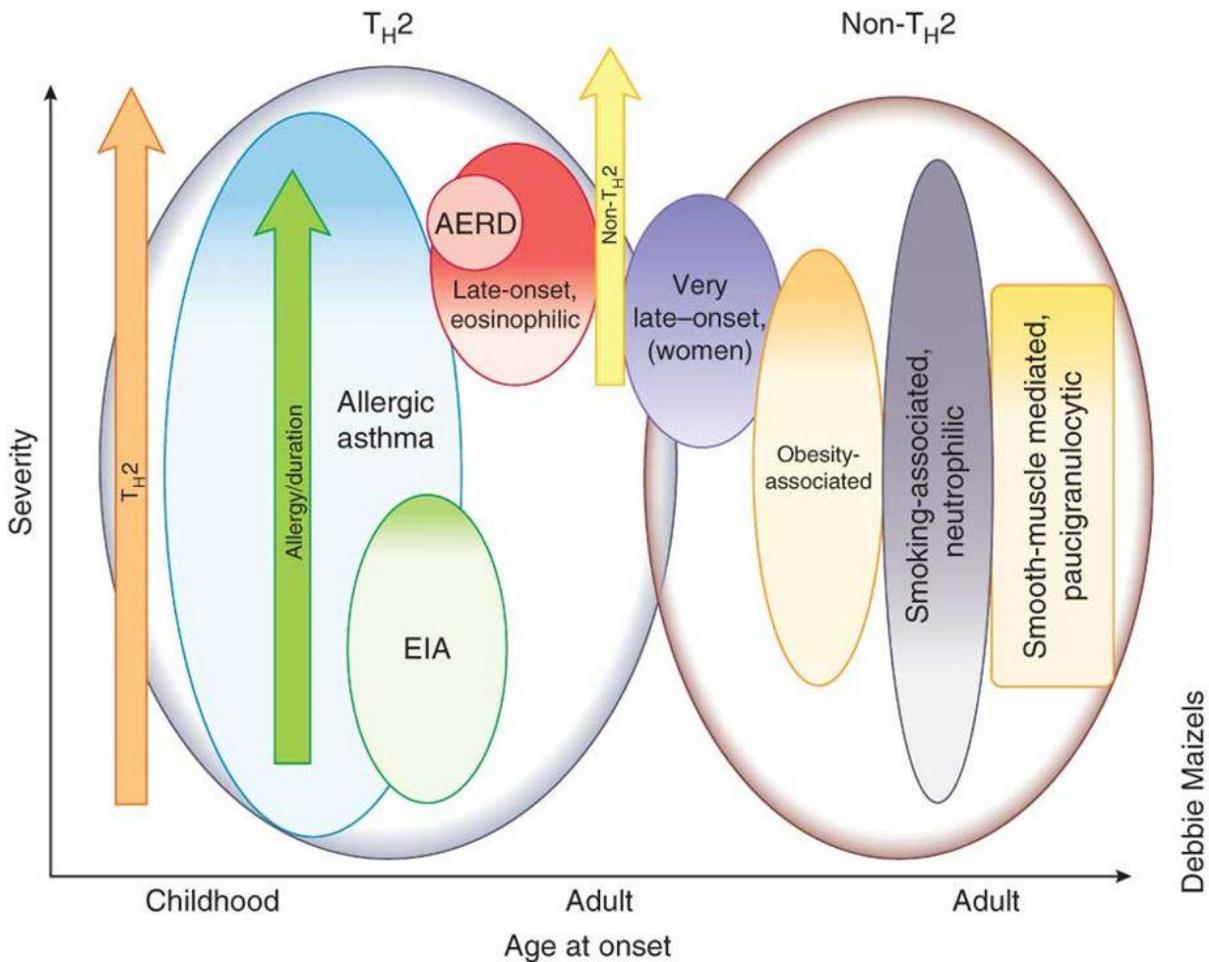


Figure 4 : Regroupement des phénotypes de l'asthme selon leur endotype. L'endotype T2-high (ou Th2) comprend des asthmes qui se sont développés précocement dans la vie du patient. La majorité des asthmes allergiques et des asthmes induit par l'exercice (EIA) sont des asthmes modérés alors que l'asthme éosinophilique et l'asthme exacerbé par l'aspirine (AERD) sont des formes plus sévères. Les T2-low (Non-Th2) incluent l'asthme à développement très tardif, l'asthme associé à l'obésité, l'asthme associé au tabagisme et l'asthme paucigranulocytaire (Wenzel, 2012)

### E. Pathophysiologie de l'asthme

La principale caractéristique de l'asthme est le recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons. Dans des circonstances normales, l'inflammation est une réponse du système immunitaire, bénéfique pour l'hôte lors d'une infection. Cependant, le système immunitaire des patients asthmatiques répond de manière aberrante à des stimuli non-pathogéniques conduisant à une réponse inflammatoire chronique des voies aériennes. Cette inflammation chronique provient de l'interaction complexe des cellules de l'immunité innée, des cellules de l'immunité adaptative et des cellules de structure (épithéliales, endothéliales, musculaires lisses). Ce dialogue s'organise autour d'un vaste réseau de médiateurs : cytokines, chimiokines, anticorps et facteurs de transcription. Les deux principaux endotypes décrits représentent deux profils

inflammatoires différents caractérisés par des cellules différentes (Lambrecht and Hammad, 2014).

### 1. L'asthme T2-high : l'exemple de l'asthme allergique

La réaction asthmatique allergique se déroule en trois phases distinctes : la sensibilisation, la réaction immédiate et la réaction tardive.

La sensibilisation reflète la capacité d'un allergène à stimuler la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 et la production d'IgE par les lymphocytes B (Figure 5). Plusieurs facteurs peuvent affecter la sensibilisation : le génotype de l'hôte, le type d'allergène, sa concentration dans l'environnement et la co-exposition de l'allergène avec d'autres agents facilitant la sensibilisation (infections virales, agents polluants) (Galli et al., 2008). L'épithélium bronchique et les cellules dendritiques sont les acteurs importants de la sensibilisation : ils reconnaissent l'allergène et initient la réponse immunitaire de type Th2 dans les poumons. Les jonctions serrées reliant les cellules épithéliales sont déficientes chez les patients asthmatiques et peuvent être clivées par l'activité protéasique de certains allergènes facilitant leur passage dans le tissu pulmonaire et les rendant plus accessibles aux cellules dendritiques (Xiao et al., 2011). Après la provocation allergénique, les cellules épithéliales bronchiques des patients asthmatiques produisent des chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires : CCL11, CCL13, CCL26 et CCL24 sont des chimiokines spécifiques du récepteur CCR3 exprimé par les éosinophiles et les basophiles, CCL17 et CCL22 sont spécifiques du récepteur CCR4 exprimé les lymphocytes Th2, les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules Natural Killer (NK) (Pease, 2006). La diminution de l'intégrité de la barrière épithéliale engendre le relargage d'alarmines : les cytokines IL-25, IL-33 et TSLP (Thymic Stomal Lymphopoietin) stimulent la polarisation Th2 des lymphocytes T naïfs, l'activation des cellules dendritiques et des innate lymphoid cells (ILC)2 (Mitchell and O'Byrne, 2017). Les ILC sont des cellules de l'immunité innée appartenant à la lignée lymphoïde mais n'exprimant pas de récepteur spécifique de l'antigène. Les ILC sont divisés en trois familles (ILC1, ILC2 et ILC3) par analogie avec les familles de lymphocytes Th1, Th2 et Th17 (Vivier et al., 2018). Dans les expectorations induites de patients asthmatiques, le nombre d'ILC2 augmente et elles expriment les récepteurs des cytokines TSLP et IL-33. Leur activation par ces cytokines conduit à la libération de grande quantité d'IL-5 et d'IL-13 (Allakhverdi et al., 2009).

Les cellules dendritiques jouent un rôle fondamental dans l'initiation de la réponse allergique. Ce sont des cellules sentinelles : elles se situent du côté basolatéral des cellules épithéliales et scannent constamment les antigènes présents dans la lumière des bronches grâce à leurs dendrites qui s'étendent à travers la barrière épithéliale. Elles permettent l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative lorsqu'elles reconnaissent un pathogène, ou initient la tolérance immunitaire lorsque le microorganisme reconnu n'est pas un pathogène. Chez le patient asthmatique allergique, les cellules dendritiques se « trompent » et initient une réponse immunitaire contre l'allergène. Sous la couche épithéliale, les cellules dendritiques sont immatures : elles doivent être activées pour devenir matures et initier la réponse immune. Les cellules dendritiques sont activées directement par l'allergène et par des cytokines produites par l'épithélium : GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), TSLP, IL-25 et IL-33. La migration des cellules dendritiques est dépendante d'un gradient de chimiokines CCL19 et CCL21 dont le récepteur CCR7 est surexprimé par les cellules dendritiques activées. Les cellules dendritiques contrôlent la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2, mais les mécanismes impliqués restent flous. Les cellules dendritiques ne produisent pas d'IL-4, cytokine indispensable au développement d'une réponse Th2. L'IL-4 pourrait être produite par d'autres cellules immunes, les basophiles ou les ILC, et influencerait la polarisation Th2 des lymphocytes. Les cellules dendritiques pourraient également induire une polarisation Th2 « par défaut » : lorsqu'elles échouent à produire les cytokines polarisantes Th1 ou Th17 (IL-12, TGF- $\beta$ , IL-23 et IL-6), les cellules dendritiques pourraient favoriser la voie Th2 (Gill, 2012; Hammad and Lambrecht, 2006).

Les lymphocytes et les cytokines Th2, IL-4 et IL-13, sont nécessaires à la production d'IgE par les lymphocytes B. L'activation des récepteurs à l'IL-4 et l'IL-13 à la surface des lymphocytes B induit l'activation des Janus family tyrosine kinases (JAK) 1 et 3 et la phosphorylation de STAT6, induisant la commutation de classe des IgE. Un contact cellulaire direct entre les lymphocytes Th2 et les lymphocytes B est cependant nécessaire à la production d'IgE : cette interaction se produit par le biais des molécules de costimulation CD28 et CD40 ligand exprimés par les lymphocytes T, et CD80/86 et CD40 exprimés par les lymphocytes B. Une fois la production d'IgE initiée, elle peut être amplifiée par d'autres cellules immunitaires, les basophiles, les mastocytes et les éosinophiles, qui expriment le récepteur de haute affinité Fc $\epsilon$ RI (Janeway et al., 2001) et peuvent donc fixer les IgE spécifiques de l'allergène.

En l'absence d'une autre stimulation allergénique, l'inflammation pulmonaire n'est pas initiée : la sensibilisation est totalement asymptomatique pour le patient.

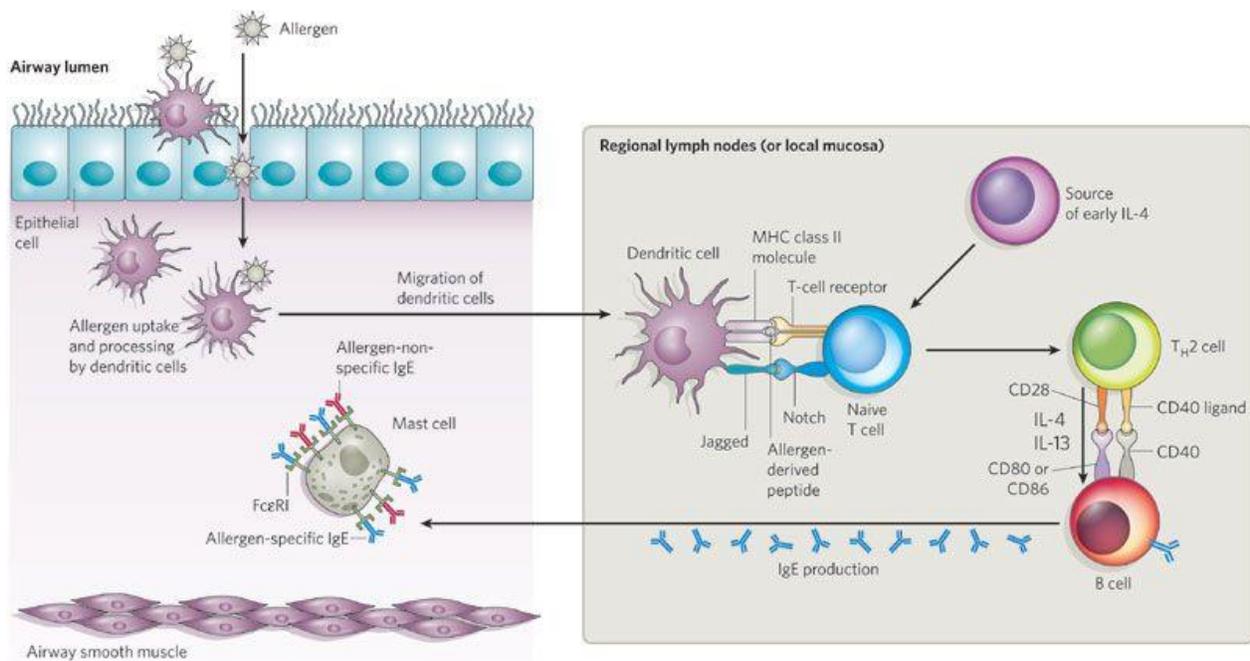


Figure 5 : La sensibilisation à l'allergène dans les voies respiratoires. L'allergène est capté par les cellules dendritiques. Celles-ci mûrissent et migrent vers les ganglions drainants où elles présentent les peptides dérivés de l'allergène aux lymphocytes T naïfs via le MHC de classe II. Les lymphocytes T naïfs se polarisent alors en lymphocytes Th2 et stimulent la production d'IgE par les lymphocytes en produisant de l'IL-4 et de l'IL-13. Les IgE se fixent ensuite sur les récepteurs FcεRI des mastocytes (Galli et al., 2008).

Après la sensibilisation, la réexposition du patient à l'allergène induit la réaction asthmatique allergique. Cette réponse allergique se déroule en 2 temps : une réaction immédiate pendant laquelle le patient souffre des symptômes asthmatiques (dyspnée, toux, difficulté à respirer, sensation d'oppression) et une réaction plus tardive mais qui, sur le long terme, entraîne la diminution des fonctions respiratoires du patient.

Lorsque l'allergène pénètre une seconde fois l'épithélium bronchique, il est reconnu par les cellules dendritiques et par les mastocytes. Les mastocytes sont entièrement coâtés par des IgE spécifiques de l'allergène fixés à leur récepteur de haute affinité ( $1.10^6$  molécules IgE peuvent se fixer sur les mastocytes). Les mastocytes sont localisés dans le parenchyme pulmonaire et ils possèdent dans leur cytoplasme un très grand nombre de granules. Ces granules, ou organelles, peuvent contenir des substances préformées, des médiateurs lipidiques et des cytokines/chimiokines. De l'héparine, de l'histamine et des chondroïtines sulfates sont stockées sous une forme préformée dans les granules et peuvent donc être relarguées très rapidement après l'activation des mastocytes. Les médiateurs lipidiques sont rapidement métabolisés à partir

d'acide arachidonique par la prostaglandine endoperoxyde synthase pour former les prostaglandines D2 et par la 5-lipoxygénase pour former des leukotriènes B4. Enfin, les mastocytes peuvent produire un large spectre de cytokines et de chimiokines. Certaines sont stockées dans leurs granules, par exemple le tumor necrosis factor (TNF), mais la plupart des cytokines et chimiokines sont transcrites puis traduites : elles sont donc relarguées plus tardivement que les autres médiateurs suite à l'activation des mastocytes. Lorsque l'allergène se fixe sur les IgE, les récepteurs FcεRI s'agrègent et forment un signal intracellulaire complexe permettant un influx de calcium puis l'exocytose des granules du mastocyte. Le mastocyte libère alors les substances préformées, les dérivés de lipides et quelques cytokines proinflammatoires. Ces médiateurs induisent la vasodilatation, la contraction des muscles lisses (donc une bronchoconstriction) et une augmentation de la sécrétion de mucus (Amin, 2012; Reuter et al., 2010).

L'expansion clonale des lymphocytes Th2 par les cellules dendritiques en réponse à l'allergène et le relargage de cytokines et chimiokines par les mastocytes induisent le recrutement de cellules inflammatoires au sein du parenchyme pulmonaire. Ce recrutement a lieu 2 à 6 heures après l'exposition à l'allergène : c'est la réaction tardive. Les cytokines Th2 IL-5 et IL-13 ont un rôle fondamental dans la réaction tardive. L'IL-13 induit la métaplasie des cellules en gobelets, et leur surproduction de mucus, riche en MUC5A et MUC5B, dans la lumière des bronches. L'IL-13 est également nécessaire au développement de l'hyperréactivité bronchique. Dans les lavages bronchoalvéolaires et les biopsies pulmonaires de patients asthmatiques, le nombre de lymphocytes produisant de l'IL-5 augmente et est corrélé au nombre d'éosinophiles. L'IL-5 est une cytokine indispensable au développement des éosinophiles dans la moelle osseuse et à leur recrutement dans les poumons, via la production de CCL11, CCL24 et CCL26. Les médiateurs relargués par les mastocytes, l'IL-3, l'IL-6 et le GM-CSF participent au maintien des éosinophiles dans le tissu pulmonaire en favorisant leur survie, leur prolifération et leur développement. Les éosinophiles sont des granulocytes produisant des produits toxiques : l'éosinophile peroxydase induit par exemple l'hyperréactivité bronchique. Les éosinophiles peuvent également jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène et induire la polarisation Th2 des lymphocytes T. Lorsqu'elles sont activées, les éosinophiles libèrent très rapidement des EET (Eosinophils Extracellular Traps) composés d'ADN et de protéines granulaires. Ces protéines, parmi lesquelles l'éosinophile derived neurotoxin, les protéines cationiques (comme la peroxydase) et la major basic protein, sont des toxines qui entraînent des dommages irréversibles aux cellules de structures des poumons conduisant à une perte des fonctions respiratoires du patient (Lambrecht and Hammad, 2014).

## 2. L'asthme T2-low

Les mécanismes impliqués dans l'endotype T2-low sont assez peu décrits. En effet, un asthme est classé par défaut T2-low lorsqu'il ne présente aucune caractéristique T2-high. Dans la mesure où cibler la voie Th2 chez ces patients n'est pas efficace, comprendre le rôle des autres populations de lymphocytes T dans la pathophysiologie de l'asthme pourrait permettre le développement de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles thérapeutiques.

### a) La voie Th17

L'inflammation pulmonaire diffère entre les patients souffrant d'asthme sévère et ceux souffrant d'asthme léger à intermittent. En effet, en plus des éosinophiles, des neutrophiles sont retrouvés dans les voies aériennes des patients asthmatiques sévères et le nombre de neutrophiles est corrélé à la sévérité de l'obstruction bronchique. De plus, des cytokines non-Th2 sont retrouvées en grande quantité dans des biopsies de patients asthmatiques sévères. Parmi ces cytokines, l'IL-8 et l'IL-17 sont des cytokines pro-inflammatoires participant au recrutement des neutrophiles. L'IL-8 est surexprimé dans les cellules épithéliales bronchiques de patients asthmatiques sévères présentant un nombre élevé de neutrophiles dans les expectorations induites (Shannon et al., 2008). La famille des cytokines IL-17 comprends plusieurs membres : l'IL-17A et l'IL-17F sont exprimés par les lymphocytes Th17, les cellules NKT et les lymphocytes  $\gamma\delta$ . Les lymphocytes Th17 se distinguent des autres populations de lymphocytes T par l'expression du facteur de transcription retinoic-acid related (ROR) $\gamma$ t. Leur polarisation à partir des lymphocytes T naïfs nécessite de l'IL-23, de l'IL-6, de l'IL-1 $\beta$  et/ou du TGF- $\beta$ . Dans des biopsies bronchiques et des expectorations induites de patients asthmatiques sévères, l'expression d'IL-17 est augmentée et corrélée à la présence de neutrophiles (Al-Ramli et al., 2009; Bullens et al., 2006). Les cytokines IL-17A et IL-17F induisent la production de mucines et l'hypercontractilité des muscles lisses. Stimulés in vitro avec un anti-CD3 et de l'IL-2, les cellules mononucléées de patients asthmatiques expriment significativement plus d'IL-17A et d'IL-22 que les cellules mononucléées de donneurs sains. De plus, la proportion de cellules positives pour IL-17A est plus élevée chez les patients résistants aux corticothérapies comparés aux patients cortico-sensibles, suggérant que l'IL-17 et les cellules Th17 pourraient jouer un rôle dans la corticorésistance des patients asthmatiques sévères (Nanzer et al., 2013).

## b) La voie Th1

Les lymphocytes Th1 sont spécifiques de l'immunité antibactérienne, antifongique et antivirale alors que les lymphocytes Th2 sont spécialisés dans la défense antiparasitaire. Plusieurs études ont montré qu'un déséquilibre dans la balance Th1/Th2 pouvait être à l'origine de la maladie asthmatique. Ainsi, l'administration d'IL-12 et d'IL-18, des cytokines stimulant le développement d'une réponse Th1, à des souris sensibilisées à l'ovalbumine réduit la concentration en IgE sérique, l'hyperréactivité bronchique et l'infiltrat d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) (Hofstra et al., 1998). L'administration d'un anticorps bloquant l'IFN- $\gamma$ , la cytokine « signature » des lymphocytes Th1, restaure l'hyperréactivité bronchique et l'éosinophilie des LBA induit par les lymphocytes Th2 (Huang et al., 2001). Basée sur ces observations, la stimulation de la voie Th1 a été proposée comme approche thérapeutique dans l'asthme allergique. Cependant, la voie Th1 est impliquée dans la réaction asthmatique. Dans un modèle murin d'asthme, il a été montré que l'administration d'IFN- $\gamma$  inhibe l'hyperplasie des cellules en gobelets induite par IL-13 et la présence de neutrophiles et d'éosinophiles dans les voies respiratoires, mais que l'administration d'IFN- $\gamma$  et d'IL-13 augmente l'inflammation péri-bronchique et alvéolaire ainsi que le nombre de cellules NK et la concentration en IL-6 dans les LBA (Ford et al., 2001). L'IFN- $\gamma$  pourrait également jouer un rôle dans l'hyperréactivité bronchique des patients asthmatiques : dans un modèle murin d'asthme induit par l'ovalbumine, l'hyperréactivité bronchique se développe indépendamment des cytokines Th2, par contre l'administration d'un anticorps bloquant l'IFN- $\gamma$  inhibe significativement l'hyperréactivité bronchique (Kumar et al., 2006). Enfin, une étude récente suggère que les cytokines Th1 promeuvent la résistance aux corticoïdes dans les muscles lisses de patients asthmatiques (Britt et al., 2018).

### 3. Evolution des profils inflammatoires

Il est clair que l'asthme est une maladie très complexe, difficilement définissable sur un seul facteur, que ce soit le profil inflammatoire ou l'agent déclenchant. C'est également une maladie instable dans le temps, particulièrement chez les enfants : dans les expectorations induites recueillies trois fois à trois mois d'intervalles, 63% des enfants asthmatiques ont montré une modification du profil inflammatoire (éosinophilique, neutrophilique, mixte ou paucygranulocytique) indépendamment de la sévérité de la maladie et du traitement (Fleming et al., 2012). Les endotypes de l'asthme ne sont donc pas fixés et peuvent évoluer dans le temps.

Les voies Th2 et Th17 se régulent mutuellement dans l'asthme. La stimulation de cellules épithéliales bronchiques avec de l'IL-13 induit l'expression de gènes associés à la signalisation

Th2 (POSTN, CLCA1 et SERPINB2) alors que l'IL-17 induit l'expression des gènes Th17 (CSF3, CXCL1, CXCL2, CXCL3 et IL-8). Cependant, l'IL-13 réprime l'expression des gènes Th17 et, de la même manière, l'IL-17 inhibe l'expression des gènes Th2. Dans des biopsies bronchiques de patients asthmatiques, une corrélation négative a été démontrée entre l'expression des gènes Th2 et Th17, appuyant l'idée que l'IL-13 et l'IL-17 régulent mutuellement l'expression de leurs gènes cibles dans les poumons (Choy et al., 2015). Toutefois, un patient asthmatique peut présenter les caractéristiques des deux endotypes : des lymphocytes Th2 et Th17, et une inflammation pulmonaire dite mixte avec un recrutement d'éosinophiles et de neutrophiles. De plus, un sous-type de lymphocytes T capable de produire des cytokines IL-17 et IL-22, en plus des cytokines Th2, a été décrit chez l'humain et la souris. Ce sont des lymphocytes mémoires qui expriment à la fois les facteurs de transcription GATA3 et ROR $\gamma$ t. Ils sont retrouvés en plus grand nombre dans le sang et dans les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques, comparativement aux donneurs sains, et sont associés à une augmentation de l'hyperréactivité et de l'obstruction bronchique ainsi qu'à la corticorésistance (Irvin et al., 2014; Wang et al., 2010).

#### 4. Caractéristiques communes entre les endotypes de l'asthme

##### *i. Le remodelage bronchique*

Le remodelage des voies respiratoires se définit par les altérations structurelles dans les bronches des patients asthmatiques à l'origine de la diminution irréversible des capacités pulmonaires. Ces altérations comprennent des changements morphologiques de l'épithélium bronchique (perte de l'intégrité de la barrière épithéliale, diminution du nombre de cellules ciliées, hyperplasie des cellules en gobelet), l'activation des fibroblastes en myofibroblastes qui sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires et des protéines de la matrice extracellulaire entraînant une fibrose sous-épithéliale, une augmentation du nombre et de la taille des cellules musculaires lisses et enfin une augmentation de l'angiogenèse (Al-Muhsen et al., 2011). Le remodelage des voies bronchiques dans l'asthme a longtemps été considéré comme le résultat de l'inflammation chronique qui entraîne la destruction et la réparation chronique des tissus pulmonaires. Ainsi, l'asthme a longtemps été considéré comme une maladie principalement inflammatoire et le remodelage bronchique comme un dommage collatéral. Les éosinophiles, caractéristiques de la voie Th2, et les neutrophiles, caractéristiques de la voie Th17, participent au remodelage bronchique, mais il n'est pas certain que les changements structurels associés soient distincts entre les deux endotypes. Des études suggèrent que l'inflammation chronique n'est pas nécessairement à l'origine du remodelage et que ces deux événements se déroulent parallèlement. De très jeunes

enfants asthmatiques (âgé de 3 ans en moyenne) montrent un épaississement de la paroi bronchique et une inflammation tissulaire de type éosinophilique. Dans une étude récente, les biopsies d'enfants asthmatiques ont montré des signes de remodelage (épaississement de la paroi bronchique, des cellules musculaires lisses, et de la vascularité) mais aucune corrélation entre la présence de cellules inflammatoires et le remodelage n'a pu être mise en évidence. Le remodelage bronchique pourrait donc apparaître précocement dans la vie d'un asthmatique, quel que soit son endotype. Le remodelage est un facteur essentiel de la maladie asthmatique et évaluer la contribution de chaque changement structurel chez un patient pourrait permettre le développement d'une thérapie personnalisée (Fehrenbach et al., 2017; Saglani and Lloyd, 2015).

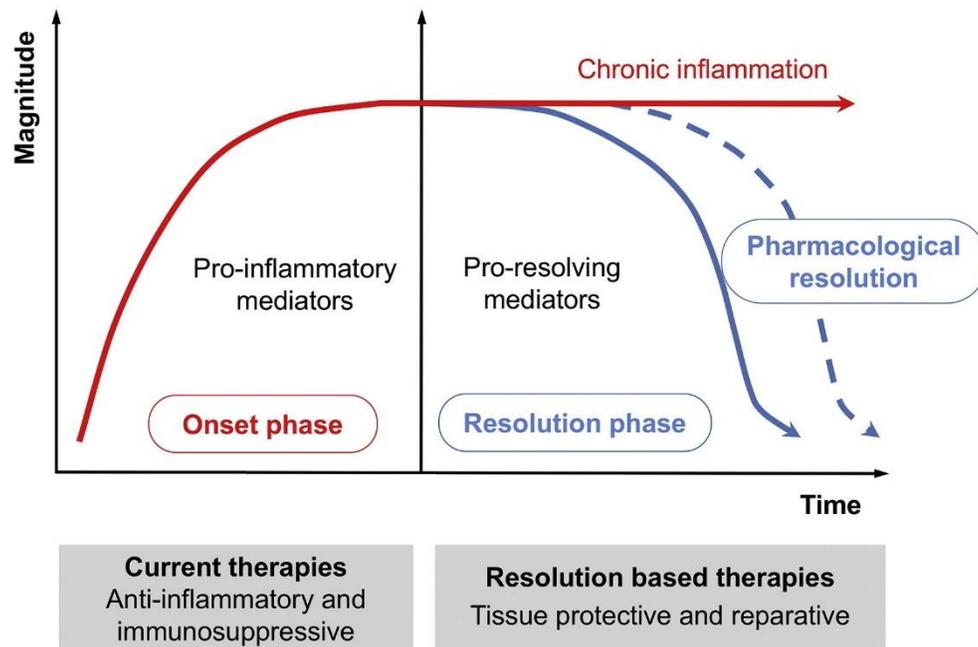
*ii. Déficit de la résolution de l'inflammation dans l'asthme*

L'inflammation est une réponse normale de l'hôte en réponse à une lésion tissulaire ou une infection : elle a pour but d'éviter la propagation du pathogène dans l'hôte. La réaction inflammatoire se limite aux tissus endommagés mais elle est également limitée dans le temps : si l'inflammation persiste, elle devient délétère et compromet l'intégrité des tissus inflammés. L'inflammation chronique des voies aériennes est un paramètre central de la maladie asthmatique, quel que soit le type d'inflammation. La résolution de l'inflammation est un phénomène actif, étroitement contrôlé, qui implique des médiateurs pro-résolution (pro-resolving mediator), et des mécanismes cellulaires (Figure 6). Elle comprend le catabolisme des médiateurs pro-inflammatoires, la diminution du nombre de cellules immunitaires soit par mort cellulaire soit par migration du tissu inflammé vers le sang circulant, et enfin l'activation des mécanismes de réparation tissulaire (Barnig et al., 2018; Schett and Neurath, 2018).

L'une des étapes clés de la résolution de l'inflammation est la clairance des granulocytes tissulaires. Ces granulocytes sont éliminés par mort cellulaire programmé (ou apoptose) puis sont phagocytés par les macrophages lors d'un phénomène appelé efferocytose. Dans les expectorations induites de patients asthmatiques sévères, le pourcentage d'éosinophiles est augmenté alors que leur taux d'apoptose est diminué comparativement aux éosinophiles de patients asthmatiques légers. De plus, les macrophages alvéolaires d'enfants asthmatiques sévères sont plus apoptotiques que les macrophages de donneur sains, et leurs fonctions phagocytaires sont diminuées lorsqu'elles sont stimulées in vitro avec du lipopolysaccharide (LPS) (Duncan et al., 2003; Fitzpatrick et al., 2008).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) représentent une sous-population de lymphocytes T produisant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- $\beta$ ) et capables de réguler les fonctions des autres lymphocytes. Ils expriment le facteur de transcription Foxp3. Récemment, dans un modèle murin d'asthme allergique, il a été montré que les lymphocytes Treg sont capables d'inhiber l'activation des ILC2 et de diminuer l'inflammation allergique (Krishnamoorthy et al., 2015). Chez des patients asthmatiques sévères, le nombre de lymphocytes Treg dans le sang périphérique et dans les expectorations induites est réduit, et leurs fonctions sont défectueuses comparés aux lymphocytes Treg provenant de donneurs sains. Les fonctions des lymphocytes Treg sont déficientes chez les patients asthmatiques, particulièrement envers la réponse Th2. Dans le sang périphérique d'enfants sensibilisés aux acariens, une sous population de Treg coexprimant Foxp3 et GATA3 est capable d'inhiber la production de cytokines Th1 par des cellules mononucléées, mais n'a pas d'effet sur la production de cytokines Th2 (Hartl et al., 2007). Ceci suggère que, chez les patients asthmatiques, les lymphocytes Treg pourraient favoriser une réponse de type Th2 au lieu de la contrôler.

Enfin, des médiateurs anti-inflammatoires et pro-résolution sont produits afin de restreindre et de résoudre l'inflammation. Les médiateurs anti-inflammatoires freinent l'inflammation en inhibant les voies de signalisation pro inflammatoires, en réduisant la migration des granulocytes dans le tissu et en exerçant des fonctions immunosuppressives. Les facteurs pro-résolution ne sont pas des immunosuppresseurs, ils ont plutôt un rôle de protection et de réparation des tissus. Ils stimulent le recrutement des monocytes, induisent l'apoptose des granulocytes, stimulent l'efferocytose, promeuvent la migration des cellules non-apoptotiques vers les vaisseaux lymphatiques et sanguins, et stimulent la régénération des tissus. Dans le sang, les lavages broncho-alvéolaires et les expectorations induites de patients asthmatiques sévères, la diminution de la concentration d'un de ces facteurs, la lipoxin A4, a été montrée ainsi qu'une corrélation entre la concentration de facteurs pro-résolution et la sévérité de la maladie (Barnig et al., 2018).



**Figure 6 : Dynamique de la réponse inflammatoire.** La réponse inflammatoire aiguë est caractérisée par (i) une phase initiale coordonnée par des chimiokines, des cytokines et des médiateurs pro inflammatoires suivi par (ii) une phase de résolution impliquant des mécanismes cellulaires spécifiques sous le contrôle de médiateurs pro-résolution. L'échec du processus de résolution prolonge l'action des mécanismes pro inflammatoires entraînant une inflammation chronique. Les agents thérapeutiques actuels sont principalement anti-inflammatoires et la plupart d'entre eux sont des immunosuppresseurs. Ces thérapeutiques étant inefficaces chez certains patients, une meilleure compréhension des mécanismes de résolution de l'inflammation pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques (Barnig et al., 2018).

L'asthme est une maladie complexe dans laquelle les cellules de l'immunité innée et adaptative interagissent avec les cellules de structures, aboutissant à l'inflammation chronique des voies respiratoires. La caractérisation des médiateurs cellulaires et moléculaires responsables de la réaction T2-high a permis le développement de biomarqueurs et de thérapeutiques ciblés. Des questions importantes restent cependant en suspens particulièrement dans l'asthme sévère : la contribution des autres populations lymphocytaires et des populations de cellules innées, les mécanismes de résistance aux corticostéroïdes et l'absence de résolution de l'inflammation. Tous ces mécanismes représentent autant de biomarqueurs ou de thérapeutiques potentiels à développer.

## Chapitre 2 : Les microorganismes dans l'asthme : ami ou ennemi ?

### A. Comment sont reconnus les microorganismes dans les poumons ?

Les voies respiratoires sont constamment en contact avec l'environnement et tout ce qu'il contient : poussières, bactéries, allergènes, virus, pollution, fumées... L'épithélium bronchique, le surfactant pulmonaire et les mouvements mucociliaires constituent la première ligne de défense du tractus pulmonaire. Afin d'initier une réponse immunitaire appropriée et d'assurer ce rôle de défense, les voies aériennes sont équipées d'un ensemble très diversifié de récepteurs capables de détecter les molécules dérivées de composés microbiens (appelées PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) ou les molécules de danger d'origine endogène (appelés DAMPS, damage-associated molecular pattern). Ces récepteurs sont exprimés par tous les leucocytes, principalement les cellules dendritiques et les macrophages, mais également par les cellules de structure, comme les cellules épithéliales. Lorsqu'un motif microbien est reconnu, les Pattern Recognition Receptors (PRRs) activent des voies de signalisation complexes aboutissant à l'initiation d'une réponse immunitaire innée, l'inflammation par exemple, mais participant également à l'induction d'une immunité adaptative spécifique de l'antigène. Plusieurs types de récepteurs ont été caractérisés : les Toll-like receptors (TLRs), les RIG-I like receptors (RLRs), les NOD-like receptors (NLRs), les C-lectin type receptor (CLRs), les AIM2-like receptors (ALRs).

#### 1. Les Toll-Like receptors (TLRs)

Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 comprenant plusieurs domaines :

- Un domaine extracellulaire très variable nécessaire à la reconnaissance des différents agonistes. Ce domaine contient des motifs répétés riches en leucine comprenant un feuillet beta et une hélice alpha reliés par une boucle. Ainsi, ils forment une structure en fer à cheval directement impliquée dans la reconnaissance spécifique du ligand.
- un domaine transmembranaire,
- une région intracellulaire, appelée domaine TIR (Toll/IL-1R domain), qui présente de fortes homologies de séquences avec le récepteur à l'IL-1 (IL-1R) et qui conduit à l'activation des voies de signalisation intracellulaire.

A ce jour, 11 TLRs humains et 12 TLRs murins ont été identifiés. Chaque TLR détecte des PAMPs différents dérivés de virus, de bactéries, de mycobactéries, de champignons et/ou de parasites (Figure 7). La localisation cellulaire des TLRs participe à leur spécificité, en plus du domaine extracellulaire : les TLRs spécifiques d'acides nucléiques sont exprimés dans des compartiments intracellulaires et les autres TLRs sont localisées à la surface des cellules. Les compartiments intracellulaires incluent le réticulum endoplasmique, les lysosomes et les endolysosomes. Les TLRs intracellulaires reconnaissent le matériel génétique des virus et autres pathogènes après leur internalisation dans la cellule. L'expression et la localisation de ces TLRs sont donc étroitement contrôlées afin d'éviter la reconnaissance du matériel génétique de la cellule hôte (donc du soi) ce qui pourrait conduire à l'initiation de maladies auto-immunes (Akira and Takeda, 2004; Kawai and Akira, 2011).

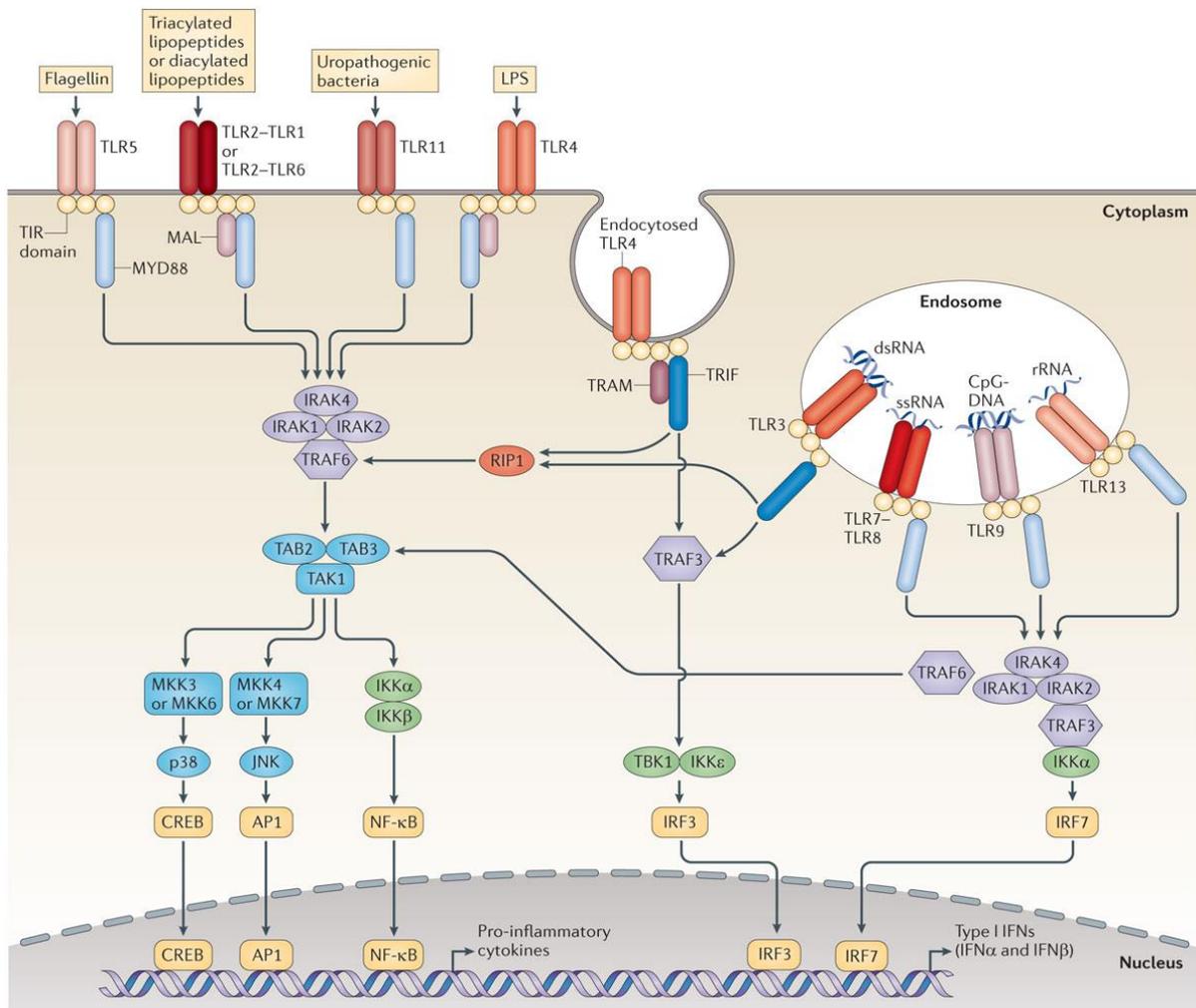
Récepteur	Ligand naturel	Origine du PAMPs	Ligand synthétique
TLR1/2	Lipopeptides triacylés	Bactéries, Mycobactéries	Pam3CSK4
TLR2/6	Lipopeptides diacylés Peptidoglycans Zymosan $\beta$ -glucan Protéines structurales (capside)	Bactéries, Mycobactéries Bactérie Gram+ Champignons Bactéries champignons Virus	FSL1
TLR3	ARN double brin	Virus	Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C))
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) Glycoinositolphospholipides Protéines de structure	Bactérie Gram négative Parasites Virus	LPS
TLR5	Flagelline	Bactéries	
TLR7/8	ARN simple brin	Virus	Imidazoquinoline (R848)
TLR9	ADN riche en îlots CpG	Bactéries, virus, parasites, champignons	Unmethylated CpG oligonucleotide (ODN)
TLR10	Indéterminé	Indéterminé	
TLR11	Molécule profilin-like	Parasites	

Figure 7 : Les Toll-like receptor humains et leurs ligands

Lorsque le TLR fixe son ligand, il se dimérise et initie la transduction du signal via son domaine TIR. Les voies de signalisation des TLRs sont complexes et nécessitent le recrutement d'un grand nombre de protéines adaptatrices (Figure 8). Deux grandes voies de signalisation ont été caractérisées : la voie MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) dépendante et la voie TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) dépendante. La voie dépendante de MyD88 est utilisée par tous les TLRs, à l'exception de TLR3. Elle aboutit à l'induction de beaucoup de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p40 alors que la voie TRIF-dépendante aboutit à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type 1.

TLR4 est le seul TLR qui induit à la fois la voie MyD88 dépendante et la voie TRIF dépendante. Lorsqu'il reconnaît son ligand, il recrute une protéine adaptatrice, TIRAP, qui facilite le recrutement de MyD88 pour initier l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK. TLR4 est ensuite internalisé dans la cellule et rejoint l'endosome, où il initie la signalisation TRIF dépendante qui conduit à l'activation d'IRF3, et des voies NF- $\kappa$ B et MAPK.

Les voies de signalisation induites par TLR7 et TLR9 sont également uniques car elles activent la voie de signalisation dépendante de MyD88 mais stimulent tout de même l'expression d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires. TLR7 et TLR9 sont exprimés principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et sont directement impliqués dans l'immunité antivirale. Lorsque TLR7 et TLR9 reconnaissent le génome du virus, MyD88 forme un complexe protéique qui aboutit à la phosphorylation d'IRF7 et à sa translocation dans le noyau de la cellule où il stimule l'expression d'IFN de type I (Akira and Takeda, 2004).



Fi Nature Reviews | Immunology et recrutent des protéines adaptatrices contenant un domaine TIR (MyD88 ou TRIF). L'engagement de ces molécules adaptatrices stimulent les voies de signalisation impliquant d'autres protéines comme la famille des IRAK et les TRAF qui induisent l'activation de la voie des MAPK et de facteurs de transcription. La signalisation des TLR a pour cible deux grandes familles de facteurs de transcription, les NF-κB et les IRFs, mais d'autres facteurs de transcription comme des CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein) et AP-1 (activator protein 1) sont également activées. La conséquence majeure de la signalisation TLR est l'induction de cytokines pro-inflammatoires et, dans le cas des TLRs endosomaux, l'induction des interférons de type I (O'Neill et al., 2013).

## 2. Les Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)

Les récepteurs de la famille des NLRs sont composés d'une région centrale appelée NACHT (composé de NAIP, CIITA, HET-E et IP-2) impliquée dans la transduction du signal, un domaine effecteur en N-terminal et une région riche en leucine en C-terminal. Les NLRs sont classés en quatre familles selon leur domaine N-terminal : les NLRA et NLRB qui contiennent chacun un

membre, la famille des CARD (NLRC) et la famille des NLRP. La famille NLRC contient six récepteurs : NLRC1 (NOD1), NLRC2 (NOD2), NLRC3, NLRC4, NLRC5 et NLRX1. La famille NLRP est composée de 14 membres (NLRP1 à 14).

Les NLRs reconnaissent des ligands variés provenant de pathogènes microbiens (peptidoglycans, flagelline, ARN viral, champignons etc) ; des cellules hôtes (ATPs, cholestérol, acide urique etc) et de l'environnement (alum, silices, radiation UV etc). Les NLRs ont des fonctions variées en particulier la formation de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multiprotéique qui active la caspase 1. L'activation de la caspase 1 aboutit à la maturation des cytokines proinflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 ainsi qu'à un processus de mort cellulaire inflammatoire appelé pyroptose. L'inflammasome peut être formée par 8 NLRs : NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4, et NAIP. La formation de l'inflammasome est initiée par la reconnaissance et la liaison du NLRs avec son ligand. Quand les récepteurs détectent ces PAMPs ou DAMPs, les NLRs se lient, via une interaction pyrine-pyrine, à l'apoptosis-associated speck like protein (ASC) qui contient un domaine CARD. Ensuite, la procaspase 1 se lie à l'ASC via son domaine CARD, ce qui complète la formation de l'inflammasome. NAIP et NLRC4 forment l'inflammasome après avoir reconnu la flagelline. NLRP1 est activé par le muracyl dipeptide (MDP), un peptidoglycan exprimé par les bactéries Gram positive et Gram négative, et par la toxine léthale de l'anthrax. L'inflammasome NLRP3 reconnaît plusieurs PAMPs et DAMPs incluant l'alum, la silice, l'ATP et l'acide urique. NLRP7 est activé par le lipopeptide bactérien. Le ligand de NOD1 est l'acide gamma-D-glutamyl-diaminopimelic, qui est un composant du peptidoglycan trouvé uniquement dans les bactéries Gram négative. NOD2 reconnaît le muracyl dipeptide, exprimé par les bactéries Gram positive et négative, et peut aussi détecter l'ARN simple brin viral, ce qui active la production d'interférons et la défense antivirale (Kim et al., 2016).

### 3. Les Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs)

Les RLRs sont des hélicases cytosoliques capables de détecter les ARN viraux. La famille des RLR comprend le retinoic acid-inducible gene-I-like receptor (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA-5) et laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). RIG-I et MDA5 reconnaissent spécifiquement certains ARN viraux : RIG-I jouent un rôle important dans la reconnaissance des paramyxovirus, des orthomyxovirus, des rhabdovirus et des flavivirus alors que MDA5 est essentiel à la reconnaissance des picornavirus, des reovirus et des flavivirus. Certains virus sont reconnus à la fois par RIG-I et MDA5 : le virus de la Dengue ou le virus West Nile. RIG-I reconnaît préférentiellement les courts ARN double brin alors que MDA5 reconnaît les

longs ARN double brin, les molécules poly(I:C) incluses, d'une longueur supérieur à 1000 nucléotides. Les RLRs sont également capables de percevoir les ADN viraux et bactériens après que l'ARN polymérase III l'ait transcrit en ARN.

Lorsqu'ils sont activées, RIG-I et MDA5 initient la réponse antivirale grâce à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et IRF3/7 et donc à la production d'IFN de type 1 et de cytokines pro-inflammatoires (Yu and Levine, 2011).

#### 4. Les récepteurs aux lectines de type-C (CLRs)

Les CLRs sont des protéines de liaisons aux glucides, aux lipides et aux protéines, contenant un domaine C-type lectin-like (CTLD). La famille des CLRs contient plus de 1000 récepteurs, organisés en 17 familles avec des fonctions diverses dont l'adhésion cellulaire, la phagocytose, l'activation du complément, et l'immunité innée. Les CLRs reconnaissent des motifs microbiens appartenant aux champignons, aux bactéries, aux virus, aux parasites et aux acariens. Ils sont également capables de lier des antigènes du soi endommagés ainsi que des antigènes tumoraux. Leur voie de signalisation aboutit à l'activation de NF- $\kappa$ B et à l'induction d'une réponse inflammatoire avec la production de cytokines et de composés antimicrobiens (Hadebe et al., 2018).

Les récepteurs aux pathogènes sont très variés et sont chargés de reconnaître les microorganismes. Lorsque ce microorganisme est un pathogène, les PRRs participent à l'initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Les microorganismes peuvent avoir différents effets sur l'asthme : ils peuvent protéger l'individu contre le développement d'un asthme ou au contraire aggraver les symptômes asthmatiques. Dans ces deux processus, les PRRs ont un rôle primordial.

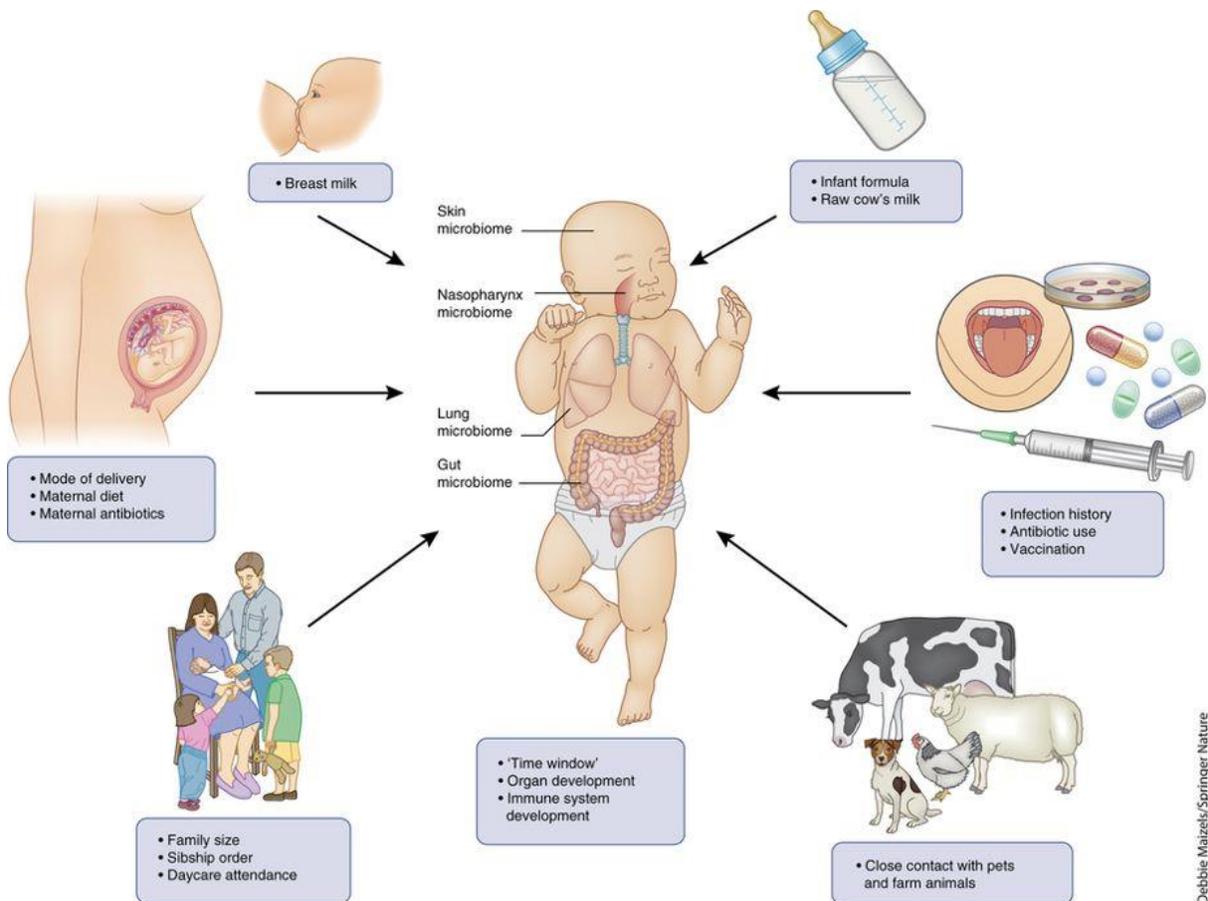
#### B. Lorsque les microorganismes participent à la tolérance immunitaire dans les voies respiratoires

Depuis les années 1950, la prévalence de l'asthme et des maladies allergiques a fortement augmenté : l'incidence de l'asthme a quadruplé et la prévalence des maladies allergiques n'a cessé d'augmenter. Cette augmentation ne pouvant être liée à des modifications génétiques, l'origine de l'expansion des maladies allergiques a été attribuée au développement d'agents antimicrobiens, des pratiques d'hygiène ainsi qu'à des modifications comportementales et environnementales.

## 1. La théorie de l'hygiène et ses hypothèses dérivées

La théorie de l'hygiène a été énoncée pour la première fois en 1989 par le Dr Strachan et suggérait que les infections transmises durant la petite enfance, par contact entre fratries ou acquis durant la grossesse prévenaient le risque d'apparition des maladies allergiques (Lambrecht and Hammad, 2017). L'influence des facteurs environnementaux et des microbes sur le développement de l'asthme a été mis en évidence par plusieurs études épidémiologiques. Les facteurs associés à une diminution du risque de développer un asthme sont multiples : une économie agricole, faire partie d'une fratrie, l'allaitement maternel, grandir avec des animaux de la ferme, la fréquentation précoce des crèches et garderies, la consommation de lait de ferme ou d'eau contaminée, et grandir au côté d'animaux domestiques (Figure 9) (Lambrecht and Hammad, 2017).

Chaque compartiment du corps humain communiquant avec l'environnement externe est colonisé par une communauté bactérienne distincte : ceci inclut le microbiote intestinal, le microbiote de la peau et le microbiote pulmonaire. Le mode de vie occidental est caractérisé par une baisse de l'activité physique, une augmentation du temps passé à l'intérieur, un régime pauvre en fibres et riche en glucides et en graisses saturées, tous des facteurs favorisant l'obésité. Les changements d'environnement, de mode de vie, de régimes et de poids influencent fortement la composition et la diversité du microbiome dans l'intestin et la peau. Une alternative à la théorie de l'hygiène a donc été proposée : l'hypothèse des « vieux amis » ou « l'hypothèse de la biodiversité » affirme que l'augmentation de la prévalence des allergies est due à la perte des relations symbiotiques avec les parasites et les bactéries qui étaient autrefois bénéfiques à notre évolution. Des modifications du microbiome pulmonaire ont été mis en évidence chez les patients asthmatiques. L'analyse d'échantillons bronchiques a montré que les protéobactéries sont plus fréquentes dans les voies aériennes inférieures des patients asthmatiques comparativement aux donneurs sains. La prévalence plus élevée des protéobactéries a également été rapportée dans les expectorations induites de patients asthmatiques, avec et sans traitements aux corticoïdes inhalés, suggérant que cette dysbiose pulmonaire est bien une caractéristique de la maladie asthmatique et non le reflet des effets immunosuppresseurs des corticoïdes inhalés (Huang and Boushey, 2015; van Tilburg Bernardes and Arrieta, 2017).



Debbie Maizels/Springer Nature

Figure 9 : Facteurs de protection et de risque pour le développement d'allergies au début de la vie. Beaucoup des facteurs de risque de développement des maladies allergiques affectent le microbiote de la peau, du nasopharynx, des poumons et de l'intestin, particulièrement pendant la période postnatale au moment où les organes et le système immunitaire sont encore en développement. Les infections peuvent avoir des effets protecteurs ou exacerbateurs sur l'allergie. De nombreux facteurs de risque sont associés, et l'absence d'un facteur de protection ne signifie pas nécessaire que la maladie allergique se développera (Lambrecht and Hammad, 2017).

Les microorganismes, pathogènes ou commensaux, peuvent avoir une influence sur le développement d'une maladie asthmatique allergique ou non. L'altération du microbiote intestinal ou pulmonaire, due à la modification des conditions de vie ou à une infection avec un pathogène, pourrait modifier l'expression ou l'activation des PRRs et donc participer au développement de la pathologie.

## 2. Comment les récepteurs aux microorganismes participent à la tolérance immunitaire ?

Plusieurs études ont établi un lien entre des polymorphismes de PRRs et le risque de développer un asthme. Des polymorphismes de TLR1, TLR6 et TLR10 ont été associés à une diminution du

risque de développer un asthme allergique. Ces polymorphismes sont bénéfiques aux TLRs : les cellules mononucléées humaines portant ces allèles et stimulées avec un agoniste de TLR1/2 (Pam3CSK4) ou un agoniste de TLR2/6 (zymosan) produisent plus de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  et moins d'IL-4 que les cellules wild type (Kormann et al., 2008). D'autres polymorphismes ont au contraire été associés à un risque accru de développer un asthme : c'est le cas par exemple pour NOD1 et NOD2 (Chaput et al., 2013). L'analyse métagénomique de 3538 patients asthmatiques et 4090 donneurs sains a révélé que le polymorphisme rs3804099 du TLR2 et le polymorphisme rs4986791 de TLR4 était associé à l'augmentation du risque de développer un asthme (Zhao et al., 2017). Chez 47 sujets afro-américains et nord-américains, 78 polymorphismes nucléotidiques de TLR10 ont été caractérisés. Une association significative entre deux de ces polymorphismes et la maladie asthmatique a été observé chez des sujets nord-américains (517 asthmatiques, 509 sujets sains) (Lazarus et al., 2004). D'autres polymorphismes du gène TLR10 ont un effet protecteur sur l'asthme atopique : ceux-ci ont été liées à une augmentation de l'expression d'IFN- $\gamma$  et une diminution de l'IL-4 (Kormann et al., 2008).

Une étude sur deux populations humaines, les Amish et les Huttériens, a mis en évidence l'implication des TLRs dans le risque de développer de l'asthme. Les Amish pratiquent l'agriculture traditionnelle, et les Huttériens vivent dans de grandes fermes communautaires hautement industrialisées. Ces modes de vie légèrement différents sont suffisants pour que les Huttériens présentent des taux d'asthme augmentés comparés aux enfants Amish. L'équipe de Stein et al a recueilli et analysé les poussières de maisons dans ces deux populations et a montré que le taux d'endotoxine était significativement plus élevé dans les poussières provenant d'habitations Amish comparativement aux maisons huttériennes. Dans un modèle d'asthme expérimental, l'administration des poussières provenant des Huttériens exacerbe l'inflammation allergique expérimental, alors que les extraits de poussière Amish n'ont pas d'effet, confirmant l'impact des pratiques agricoles industrialisées sur l'asthme et les maladies atopiques. Les lymphocytes circulants d'enfants (7 à 14 ans) Amish produisent moins d'IL-17, d'IL-33, d'IL-25, d'IL-4, d'IL-5 lorsqu'ils sont stimulés par du LPS, que les lymphocytes circulant d'enfants Huttériens (Stein et al., 2016). L'expression du TLR4 n'a malheureusement pas été analysée à la surface de ces lymphocytes.

Les modèles murins d'asthme allergique ont montré que l'activation des TLRs pouvaient soit aboutir à l'inhibition de la réaction asthmatique, soit à la promotion de l'inflammation. Dans un modèle murin d'asthme induit par le champignon *Aspergillus fumigatus*, l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation des voies aériennes et les niveaux de cytokines Th2 dans les poumons

sont moins élevés chez les souris TLR2<sup>-/-</sup> comparativement aux souris wild type (Buckland et al., 2008). En accord avec ces résultats, l'équipe de Redecke et al a montré que l'administration de Pam3Cys conjointement avec de l'ovalbumine lors de la sensibilisation aggrave l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation éosinophilique, ainsi que la concentration en IL-5 et IL-13 dans les poumons (Redecke et al., 2004). Cependant, l'administration d'un agoniste de TLR2/6 conjointement avec un pollen, après la sensibilisation, inhibe l'inflammation éosinophilique et la concentration en cytokines Th2 dans les poumons (Fuchs et al., 2010). De la même manière, l'administration de MALP2 conjointement avec de l'IFN-γ après la sensibilisation et avant les nébulisations d'ovalbumine, réduit significativement l'hyperréactivité bronchique, la concentration en IL-5 et en IL-13 dans les lavages broncho-alvéolaires (Weigt et al., 2005). L'activation de certains TLRs peut également participer à l'induction de la sensibilisation à un allergène. Dans un modèle murin d'asthme, l'administration d'un agoniste de TLR4 (LPS) ou de TLR3 (poly(I:C)) conjointement avec de l'ovalbumine entraîne l'augmentation de la migration des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques, de la concentration en IgE sérique, de l'inflammation pulmonaire et de la production de mucus. L'administration d'un agoniste de TLR7/8 (R848) ne participe pas à la sensibilisation des souris (Reuter et al., 2012). De plus, l'administration de R848 après la sensibilisation mais avant les nébulisations d'ovalbumine inhibe l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation éosinophilique, l'hypersécrétion de mucus, ainsi que la production des cytokines IL-5, IL-13 et IL-17 (Jirno et al., 2016). L'activation des TLRs semble donc important lors de la sensibilisation et peut avoir un impact sur la réaction asthmatique. Toutefois, l'effet des TLRs sur l'asthme expérimental varie en fonction des modèles, des TLRs activés, de la dose d'agoniste administrée aux souris. Le rôle des TLRs dans l'asthme reste donc une question controversée qui demande des recherches plus approfondies.

### C. Lorsque les microorganismes aggravent les symptômes asthmatiques ou favorisent le développement de la maladie

Les infections virales respiratoires peuvent avoir de profonds effets sur des aspects importants de l'asthme. Durant la petite enfance, de nombreux enfants souffrent de maladies respiratoires dues à des infections virales. Ces virus incluent le virus respiratoire syncytial (RSV), les rhinovirus humain (RV), le metapneumovirus, le parainfluenza, et le coronavirus entre autres. Pour la plupart des enfants, ces épisodes diminuent à mesure que l'enfant grandit, mais pour certains, ces infections à répétition marquent le début de la maladie asthmatique. Les virus respiratoires peuvent également avoir une influence sur les patients présentant un asthme diagnostiqué : 80%

des exacerbations de l'enfant et 60-70% des exacerbations de l'adulte ont pour origine une infection virale pulmonaire.

### 1. Rôle des infections virales dans le développement de l'asthme

Le rôle des infections virales dans l'étiologie de l'asthme demeure controversé. Plusieurs études ont suggéré que les infections virales respiratoires pouvaient être à l'origine du développement d'un asthme, allergique ou non. Cependant, les infections avec le RSV ou le rhinovirus sont très fréquentes chez les enfants, entre 80-90% des enfants sont infectés par ces virus pendant leur deux premières années de vie, et tous ne développent pas d'asthme. Un simple mécanisme de cause à effet n'est pas suffisant. L'équipe de Sigurs et al a analysé les relations entre une infection RSV suffisante pour causer l'hospitalisation de l'enfant et le développement d'un asthme. L'analyse des enfants à 7 ans et demi a révélé que ceux qui avaient à la fois des antécédents familiaux d'asthme et d'hospitalisation pour des bronchiolites due aux RSV présentaient des taux élevés d'asthme comparativement à ceux qui ne présentaient qu'une seule de ces variables. L'âge de l'enfant lors de la première infection avec le RSV semble également primordiale.

Dans un modèle murin d'infection avec le RSV, l'ARN viral est détecté dans les poumons de souriceaux (infectés à 1 jour de vie) et connaît un pic 4 jours après l'infection, similairement à ce qui est observé chez les adultes. Toutefois, alors que l'expression d'IFN- $\gamma$  est détectée 2 jours après l'infection au RSV dans les poumons des souris adultes, l'expression d'IFN- $\gamma$  est significativement diminuée dans les poumons des souriceaux et est détectée 7 jours après l'infection. Ces souris réinfectées à l'âge adulte (12 semaines de vie) présentent une infection plus grave et un recrutement inflammatoire plus important que les souris infectées une première fois à 1, 4 ou 8 semaines de vie (Culley et al., 2002). En conclusion, le développement d'un asthme est multifactoriel et influencé par des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs environnementaux, dont l'exposition aux infections virales respiratoires. L'âge lors de la primo-infection est déterminant dans la production de cytokines et dans la modulation de la réaction immunitaire à l'âge adulte (Busse et al., 2010; Oliver et al., 2014).

### 2. L'exacerbation de la réaction asthmatique par les virus

Les infections virales pulmonaires de l'enfant favorise le développement d'un asthme. Elles sont également à l'origine de 80% des exacerbations. L'exacerbation de la réaction asthmatique est l'aggravation des symptômes du patient, nécessitant un ajustement de son traitement

(augmentation des doses de corticoïdes inhalés ou prise de corticoïdes systémiques) ou, dans les cas les plus graves, une hospitalisation et/ou une ventilation mécanique. Le principal virus à l'origine des exacerbations est le rhinovirus, dans 50 à 60% des cas.

#### a) Le Rhinovirus

Le rhinovirus est l'un des pathogènes viraux les plus communs et a été découvert dans les années 1950. Le rhinovirus se retrouve dans toutes les régions du monde et connaît traditionnellement des pics saisonniers au printemps et à l'automne. Le rhinovirus infecte les voies respiratoires supérieures, ses manifestations les plus courantes comprennent la rhinite ou la congestion nasale, bien que plus de 15% des patients infectés soient asymptomatiques.

C'est un virus non enveloppé de la famille des picornavirus dont le génome est un ARN simple brin. Sa capsidie contient 4 protéines virales (VPs), VP1, VP2, VP3 et VP4 formant une structure icosaédrique. Trois espèces génétiquement distinctes ont été décrites : RV-A, RV-B et RV-C. Il existe 74 espèces de RV-A, 26 espèces de RV-B et 50 espèces de RV-C. Les RV-A et RV-C sont les espèces détectées le plus fréquemment chez les humains, même si leur pic n'a pas lieu à la même saison. Les RV-C sont les virus les plus retrouvés dans les échantillons nasopharyngés d'enfants souffrant d'exacerbation asthmatique (Moreno-Valencia et al., 2015). Tous les sérotypes A et la majorité des sérotypes B se lient et fusionnent avec leurs cellules cibles en adhérant à la molécule ICAM-1. Une dizaine de sérotypes B utilisent la low-density lipoprotéine (LDL receptor). Les virus du sérotype C utilisent des récepteurs distincts des autres sérotypes. L'un de ces récepteurs est le CDHR3, une protéine membre de la famille des cadhérines et son association avec des exacerbations sévères a récemment été mise en évidence. Lorsque le HRV se lie à son récepteur, il perd sa capsidie. La particule virale est alors internalisée dans un endosome où la diminution du pH conduit à la libération de l'ARN viral. Les protéines virales sont alors traduites, le brin négatif complémentaire est synthétisé permettant la transcription d'autres brins d'ARN positifs et donc la formation de nouvelles particules virales. Les particules nouvellement formées sont libérées lors de la lyse des cellules entraînant l'infection des cellules voisines (Stone and Miller, 2016)

L'infection avec le rhinovirus conduit à une inflammation neutrophilique dans les voies pulmonaires supérieures. Cette inflammation entraîne l'augmentation de la perméabilité vasculaire et une augmentation de la production de mucus. Les cellules épithéliales et les cellules dendritiques sont les premières à rentrer au contact du rhinovirus (Figure 10). La capsidie du

rhinovirus est reconnue par le TLR2. Le rhinovirus adhère à l'ICAM-1 et est internalisé par la cellule épithéliale. Dans la cellule épithéliale, le matériel génétique du virus est reconnu par TLR3, TLR7/8, MDA-5 et RIG-I. L'activation de ces récepteurs induit l'expression d'interféron de type 1 (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) et de type III (IL-28A, IL-28B et IL-29), mais aussi IL-6, IL-12 et IL-15. Les interférons limitent directement la réplication du virus et initient la réponse immunitaire adaptative. L'IL-15 participe au recrutement, à la cytotoxicité et la survie des cellules NK. L'infection au rhinovirus entraîne la production de facteurs de croissance, comme G-CSF et GM-CSF, et de chimiokines, comme CXCL8, CXCL5, CXCL10 et CCL5, qui favorisent le recrutement et l'activation des granulocytes, principalement les neutrophiles. Les lymphocytes T CD4 et CD8 se développent consécutivement à l'infection par le rhinovirus. Les lymphocytes CD4 sont largement polarisés Th1 et leur production d'IFN- $\gamma$  contribue à l'immunité antivirale ainsi qu'au développement de la réponse humorale. Les lymphocytes T CD8 sont cytotoxiques et contrôlent l'éradication du rhinovirus (Jayaraman et al., 2014; Kennedy et al., 2012).

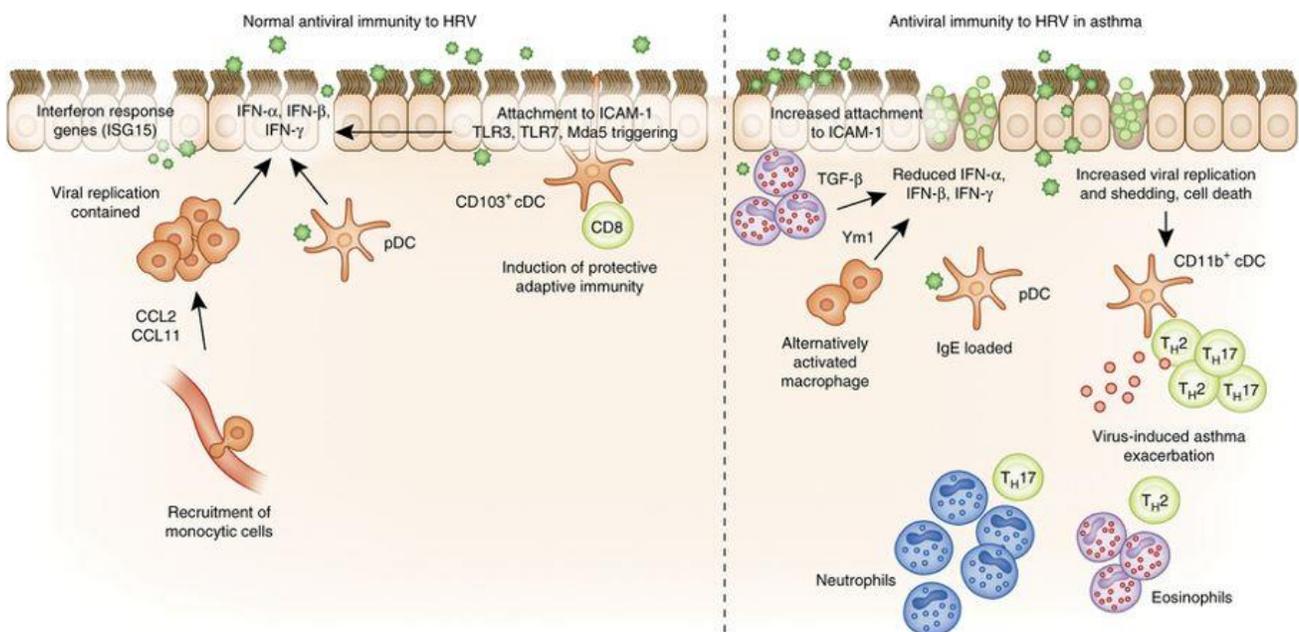
#### b) Pathophysiologie de l'exacerbation de l'asthme viro-induit

Le rhinovirus infecte les voies aériennes supérieures car la température optimale pour sa prolifération est de 33°C. La présence du RV dans les voies aériennes inférieures de patients asthmatiques, où il ne peut normalement pas survivre, a été analysée. Dans une étude, 13 sujets asthmatiques allergiques et 6 sujets sains ont été infectés avec RV16 et la présence du RV a été analysée par PCR dans les sécrétions nasales, les expectorations induites, les lavages bronchoalvéolaires et les biopsies bronchiques. Le rhinovirus a été détecté dans toutes les sécrétions nasales et les expectorations induites, et dans 5 LBA et biopsies sur 19. Les différences entre les patients asthmatiques et donneurs sains n'ont pas été analysées, mais les patients étaient asthmatiques légers et ces analyses n'ont pas été effectuées sur des patients asthmatiques sévères (Mosser et al., 2005).

La réponse antivirale est défectueuse chez les patients asthmatiques (Figure 10). Des cellules épithéliales pulmonaires de patients asthmatiques stimulées in vitro avec RV16 produisent moins d'IFN- $\beta$  et la concentration en virus est très supérieure dans les surnageants de cultures comparativement aux cultures de cellules épithéliales de donneurs sains (Wark, 2005). Ce défaut de production d'IFN- $\alpha$  a pour origine un défaut de signalisation de TLR3 et MDA5, cependant aucun défaut d'expression n'a été mis en évidence (Parsons et al., 2014). Un défaut de production d'IFN- $\beta$  et d'IFN- $\lambda$  suite à une stimulation avec du RV16 ou avec du poly(I:C) a également été

rapporté sur des cellules épithéliales bronchiques d'enfants asthmatiques sévères et a été associé à un défaut d'expression de TLR3, RIG-I et MDA-5 (Edwards et al., 2013).

Enfin, l'inflammation Th2 dans les poumons des patients asthmatiques pourraient interférer avec l'immunité antivirale. Sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes d'enfants asthmatiques allergiques, l'expression du récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) est augmentée comparativement aux sujets sains. La liaison du FcεRI avec des IgE avant la stimulation des cellules dendritiques avec le HRV entraîne la diminution de la production d'IFN-α et d'IFN-λ par ces cellules (Durrani et al., 2012). Enfin, des cellules épithéliales mise en culture avec des éosinophiles puis stimulées avec des RV ou poly(I:C), produisent moins d'IFN de type I et III, via le TGF-β produit par les éosinophiles (Mathur et al., 2013). Cependant, l'effet de la réponse immunitaire Th17 sur la réponse antivirale n'a pas encore été décrite.



Kim Caesar/Nature Publishing Group

**Figure 10 : L'immunité antivirale chez les donneurs sains et les patients asthmatiques.** Chez le sujet sain, HRV entre les cellules épithéliales bronchique en adhérant à ICAM-1. Dans les cellules épithéliales, le virus est reconnu par des TLRs et par MDA5 ce qui induit la production d'interferons de type I et III. L'immunité antivirale est initiée et les lymphocytes T CD8 sont générés grâce aux cellules dendritiques plasmacytoïdes. Chez les patients asthmatiques, ICAM-1 est surexprimé par les cellules épithéliales ce qui conduit à une augmentation de la charge virale. Pourtant, la production d'interferons est fortement diminuée. Ce défaut peut être intrinsèque à l'asthme ou résulter des fonctions suppressives des éosinophiles. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes chargées d'IgE échouent à produire des interferons de type I. L'augmentation de la charge virale cause des dommages épithéliaux, ainsi que le recrutement de cellules Th2 et/ou Th17 à l'origine de l'inflammation pulmonaire éosinophilique ou neutrophilique (Lambrecht and Hammad, 2014).

## Chapitre 3 : Les cellules Natural Killer

### A. Caractéristiques et sous-populations

Les cellules Natural Killer (NK) ont été découvertes il y a 40 ans. Ce sont des lymphocytes granuleux de grande taille dotés de la capacité intrinsèque à reconnaître et à tuer les cellules étrangères, infectées ou malignes et à moduler les fonctions du système immunitaire par leur production rapide de nombreuses cytokines et chimiokines. Les cellules NK représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants et représentent donc, avec les lymphocytes T et B, l'une des trois principales lignées lymphocytaires. Les cellules NK présentent de nombreuses similarités fonctionnelles et phénotypiques, particulièrement avec les lymphocytes CD8<sup>+</sup>. Toutefois, leur développement et leurs mécanismes de reconnaissance et d'activation sont totalement distincts. Alors que les lymphocytes T se développent dans le thymus et s'activent lorsque l'antigène est présenté par les cellules dendritiques au TCR, les cellules NK se développent en dehors du thymus dans d'autres tissus et elles n'expriment pas de TCR. L'activation des cellules NK est régulée par l'expression d'un ensemble de récepteurs activateurs, qui reconnaissent des molécules induites par le stress ou exprimées par des pathogènes, et inhibiteurs, qui reconnaissent les molécules du soi.

Définir phénotypiquement les cellules NK reste difficile car à ce jour, il n'existe pas de marqueurs de surface les identifiant spécifiquement et sans équivoque. Les cellules NK humaines sont traditionnellement définies par l'absence des marqueurs spécifiques d'autres populations leucocytaires, principalement le CD3 mais aussi CD5, CD19, CD20, CD13 et CD14, et par l'expression du Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM ou CD56) et le récepteur de faible affinité FcγRIII (CD16). CD56 et CD16 sont cependant exprimés par d'autres cellules immunitaires, par exemple les lymphocytes NKT, les lymphocytes γδ, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Freud et al., 2017). De plus, les cellules NK murines n'expriment pas le CD56 et sont donc définies sur d'autres marqueurs rendant les comparaisons entre les cellules NK murines et les cellules NK humaines problématiques. Les cellules NK murines sont CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>. Le marqueur le plus spécifique des cellules NK murines est le NKp46 (ou Ncr1), même s'il est également exprimé par les ILC1 et une sous-population d'ILC3 (Walzer et al., 2007).

Basée sur la densité d'expression du CD56 et la présence ou non du CD16, deux sous-populations de cellules NK, présentant des fonctions distinctes, ont été caractérisées chez l'homme : les cellules CD56<sup>dim</sup> et les cellules CD56<sup>bright</sup>. Traditionnellement, les cellules NK

CD56<sup>dim</sup> sont considérés comme les cellules les plus cytotoxiques et les cellules CD56<sup>bright</sup> comme des cellules capables de produire de grandes quantités de cytokines et de chimiokines. Leurs fonctions ne sont toutefois pas aussi tranchées : les cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> sont activées rapidement après leur stimulation (2 à 4h) et ont une activité cytotoxique accrue mais elles sont également capables de produire rapidement de l'IFN- $\gamma$ . Les cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> sont moins cytotoxiques, mais elles produisent un large panel de cytokines et de chimiokines 16h après leur stimulation. Elles ont également des capacités de prolifération plus importantes que les cellules CD56<sup>dim</sup>. Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> et CD56<sup>bright</sup> sont distribuées différemment dans l'organisme : les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont largement prédominantes dans le sang périphérique (90%), alors qu'elles sont minoritaires dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires (De Maria and Moretta, 2011). Avec l'expression du récepteur CD27, deux sous-populations de cellules NK murines ont été caractérisées (Figure 11). Les cellules CD27<sup>high</sup> produisent de grandes quantités de cytokines suite à leur stimulation avec de l'IL-12 et de l'IL-18 et sont capables de migrer grâce à l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CXCR4. Les cellules NK CD27<sup>low</sup> sont impliquées dans la reconnaissance des cellules du soi puisqu'elles expriment fortement les récepteurs inhibiteurs Ly49C/i et KLRG1. Ceci explique pourquoi les fonctions de ces cellules sont plus étroitement régulées que celles des cellules CD27<sup>high</sup>. Les sous-population de cellules NK murines sont distribuées dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes dont la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques, le sang périphérique, le foie et les poumons. Les cellules NK les plus immatures (Mac-1<sup>low</sup> et quelques CD27<sup>high</sup>) sont localisées dans la moelle osseuse. Les cellules NK matures (CD27<sup>high</sup> et CD27<sup>low</sup>) sont retrouvées dans la rate. Les cellules NK CD27<sup>low</sup> ne sont pas présentes dans les ganglions lymphatiques, mais cette sous-population est représentée en majorité dans les poumons et le sang périphérique. Les cellules NK CD27<sup>high</sup> expriment un panel de récepteurs similaire à celui des cellules NK humaines CD56<sup>bright</sup>. Toutefois, les cellules NK CD27<sup>high</sup> sont très cytotoxiques contrairement aux cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Les cellules NK CD27<sup>high</sup> produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  comparativement aux cellules NK CD27<sup>low</sup>, ce qui est assez similaire aux observations sur les cellules NK humaines CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> (Hayakawa et al., 2006).

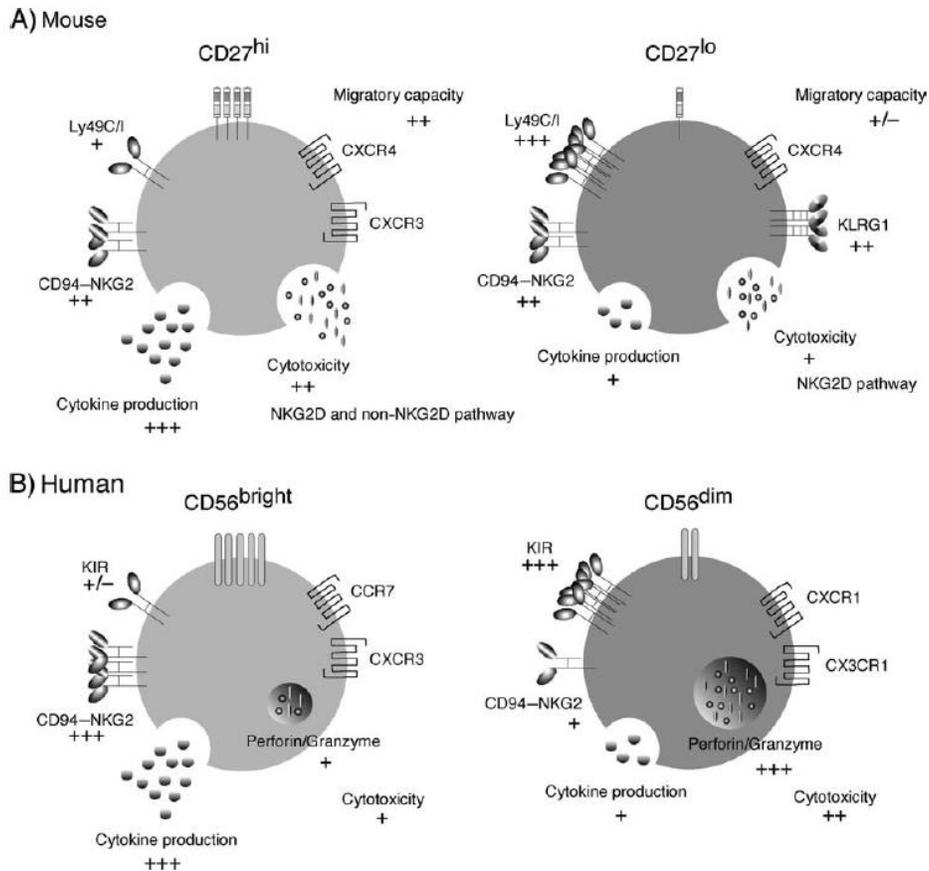


Figure 11 : Comparaison des sous-populations de cellules NK murines et humaines. (A) Deux sous-population de cellules NK murines sont caractérisées : les CD27<sup>high</sup> et les CD27<sup>low</sup>. Les cellules NK CD27<sup>high</sup> produisent de grandes quantités de cytokines lorsqu'elles sont stimulées par de l'IL-12 et de l'IL-18. Les cellules CD27<sup>low</sup> expriment les récepteurs inhibiteurs Ly49C/i et KLRG1. Les cellules NK CD27<sup>high</sup> expriment CXCR3 et ont des fonctions migratoires supérieures à celles des cellules CD27<sup>low</sup>. (B) Les cellules NK humaines sont distribuées en cellules NK CD56<sup>dim</sup> et CD56<sup>bright</sup>. Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> produisent de grandes quantités de cytokines comparativement aux cellules CD56<sup>dim</sup>. Les cellules CD56<sup>dim</sup> possèdent une activité cytotoxique plus importante que les cellules CD56<sup>bright</sup> grâce l'expression des récepteurs activateurs KIR et de molécules cytotoxique (perforine et granzyme). L'expression de CCR7, impliqué dans la migration dans les organes lymphoïdes secondaires, est trouvée uniquement sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup> (Hayakawa et al., 2006, p. Functional subsets of mouse natural killer cells).

## B. Le développement des cellules NK

### 1. Le développement des cellules NK humaines

Les cellules NK humaines se développent à partir d'une cellule souche hématopoïétique (HSC) pluripotente. A partir de cette cellule, 5 stades successifs de maturation ont été décrits et sont caractérisés par l'acquisition ou la perte séquentielle de récepteurs spécifiques, le plus important d'entre eux étant l'expression du récepteur à l'IL-15 (Figure 12).

Les stades 4 et 5 du développement des cellules NK correspondent aux sous-populations de cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>. Ce sont des cellules fonctionnelles qui ont acquis les récepteurs aux pathogènes et aux CMH de classe I. Plusieurs études suggèrent que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> sont les précurseurs des cellules CD56<sup>dim</sup>. Ainsi les cellules CD56<sup>bright</sup> ont des télomères plus longs que les cellules CD56<sup>dim</sup>, elles sont les premières à réapparaître dans le sang circulant après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, et elles se différencient en cellules CD56<sup>dim</sup> dans un modèle de souris humanisés greffés avec des cellules souches hématopoïétiques. Néanmoins, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> ne sont pas figées phénotypiquement et fonctionnellement, elles sont hétérogènes et ne représentent pas le stade final du développement de la cellule NK. Au cours d'un processus appelé « education » ou « licencing », les fonctions des cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont affinées grâce aux interactions entre les récepteurs de surface de la cellule NK, incluant les KIR ou NKG2A, avec des ligands HLA-I. L'interaction des KIR avec le CMH de classe I permet à la cellule NK d'étalonner ces capacités effectrices et de réagir plus efficacement contre les cellules transformées dont les HLA sont down-régulés (Fauriat et al., 2010). Indépendamment de ce mécanisme de licencing, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> continuent de se différencier. Elles perdent l'expression du NKG2A et acquièrent séquentiellement plusieurs récepteurs KIR. Elles se différencient alors jusqu'à un stade sénescence qui est caractérisé par l'expression du marqueur CD57 (Björkström et al., 2010).

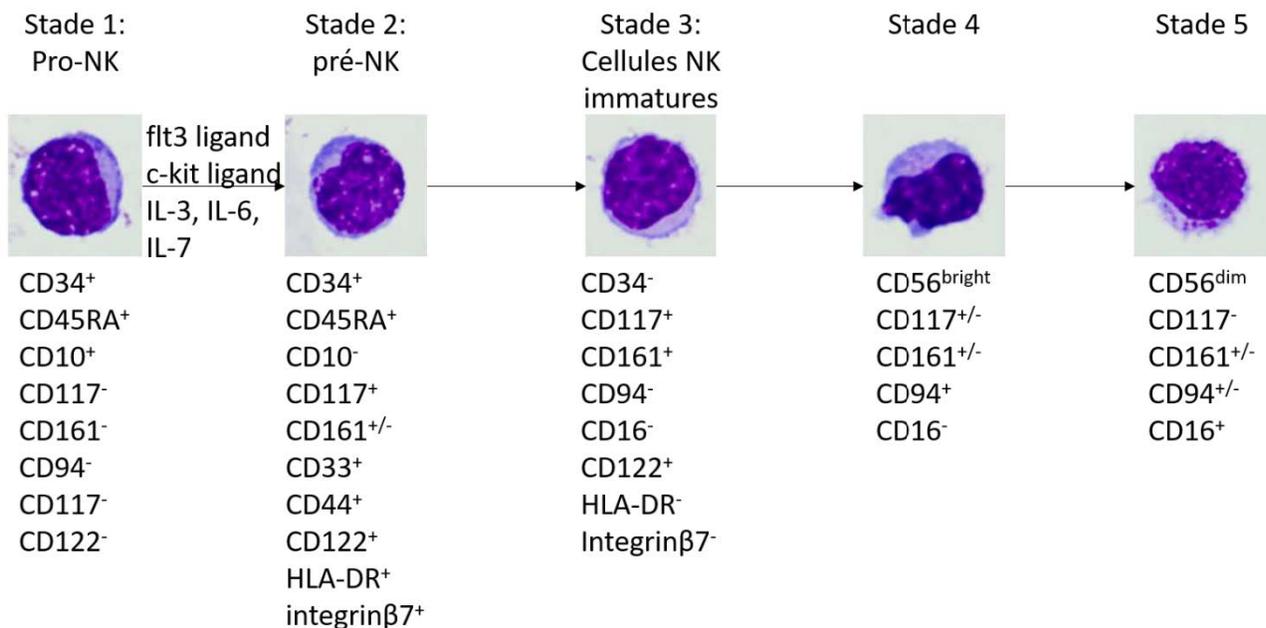


Figure 12 : Représentation schématique du développement des cellules NK humaines. Les cellules pro-NK se développent à partir de la cellule souche hématopoïétique et n'expriment pas la chaîne beta commune aux récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15. La stimulation des pro-NK avec flt3 ligand, c-kit ligand, IL-3, IL-6 et IL-7 permettent leur différenciation en pré-NK. Les pré-NK ont acquis le récepteur à l'IL-15, la suite du

développement des cellules NK est dépendante de cette cytokine. Les cellules NK de stade 3 sont définitivement engagées dans la voie des cellules NK, elles ne peuvent plus se développer en lymphocytes T ou en cellules dendritiques. Les stades 4 et 5 du développement des cellules NK représentent les deux sous-populations de cellules NK fonctionnelles, les cellules CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>. Schéma inspiré de (Freud et al., 2014).

## 2. Le développement des cellules NK murines

Similairement aux cellules NK humaines, les cellules NK murines se développent à partir d'une cellule souche hématopoïétique et traversent différents stades de maturation (Figure 13). C'est un processus continu assurant le renouvellement continu des cellules NK dans l'organisme. La maturation des cellules NK connaît trois grandes étapes : l'engagement des cellules souches hématopoïétiques dans la lignée des cellules NK (stade A), leur maturation phénotypique et fonctionnelle (stade B à E) et leur homéostasie dans les tissus périphériques (stage F).

La première étape du développement des cellules NK est l'engagement des HSCs dans la lignée des cellules NK. La cellule souche perd alors ses capacités pluripotentes et devient un précurseur de cellules NK (NKP). Les signaux régulant la transition des HSCs vers les cellules NKP restent très peu décrit. Des facteurs solubles comme flt3 ou ckit pourraient influencer la génération des NKP mais il semble qu'une interaction entre les HSCs et les cellules stromales soit essentielle. Les cellules NKP expriment le CD122 qui s'associe avec le CD132 pour former un récepteur actif à l'IL-15. La prolifération et la différenciation des cellules NKP en cellules NK matures est IL-15 dépendante. Les iNK sont définies comme toute cellule NK ne possédant pas toutes les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK matures. Elles ont toutefois des fonctions effectrices : elles expriment TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) à leur surface et peuvent utiliser cette molécule effectrice pour lyser des cellules cibles. Ces capacités cytotoxiques sont faibles et elles sont incapables de produire des cytokines (Di Santo, 2006). Les cellules NK matures (mNK) sont caractérisées par l'expression de CD43 et CD11b. L'acquisition des récepteurs Ly49 définit également les mNK : ces récepteurs incluent Ly49A, Ly49C/I, Ly49G, Ly49D et Ly49H. Un modèle de maturation des cellules NK en trois étapes en fonction de l'expression de CD27 et CD11b a été proposé : les cellules NK sont d'abord CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>, puis deviennent CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> et enfin CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> qui est la population de cellules NK la plus matures. Les mNK expriment le récepteur activateur CD49b et acquièrent le récepteur inhibiteur KLRG1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) qui est un marqueur de maturation terminal. Les cellules NK CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ont des fonctions effectrices augmentées comparativement aux cellules CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, ce qui suggère qu'au cours du processus de maturation, les cellules NK acquièrent des mécanismes de régulation de

leurs fonctions (Abel et al., 2018). Les cellules NK présentes dans les poumons sont des cellules NK à un stade avancé de maturation, 70% sont CD11b<sup>high</sup>CD27<sup>low</sup> (Wang et al., 2012).

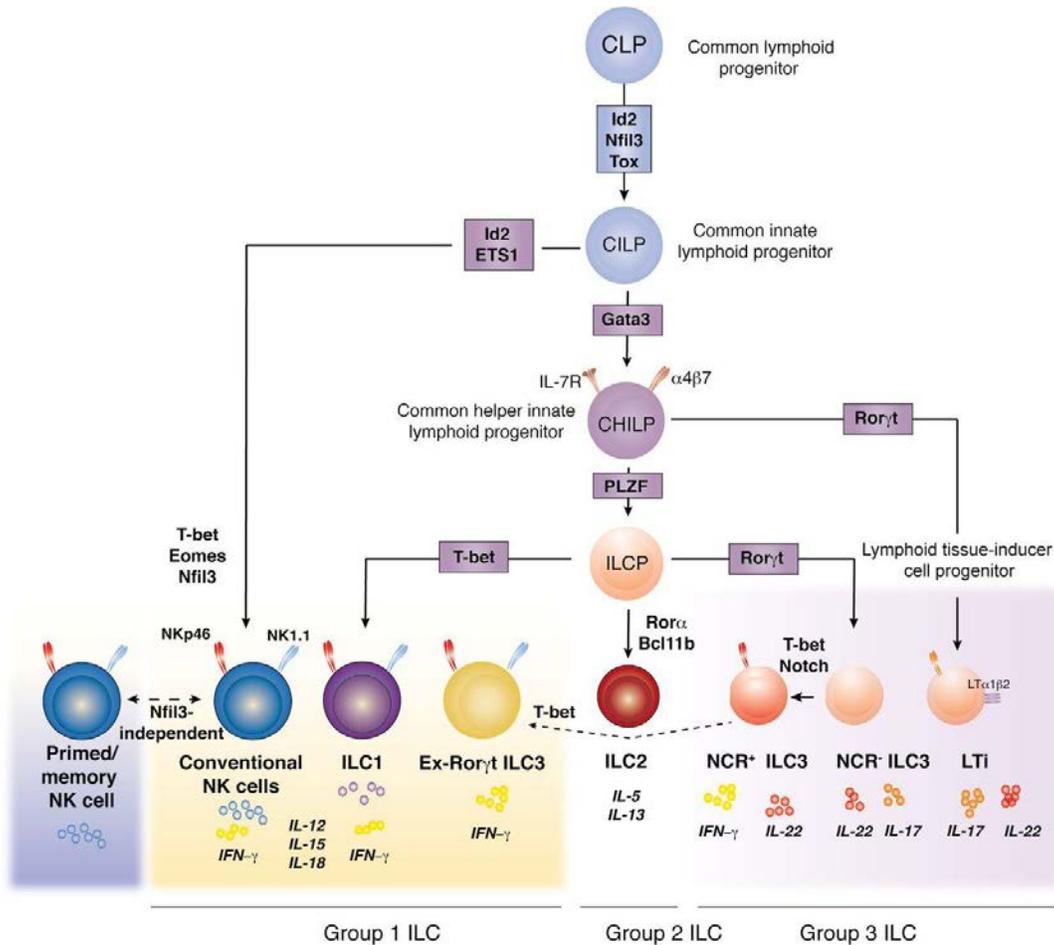


Figure 13 : Représentation schématique du développement des cellules NK et des ILCs murines. Les cellules NK et les ILC dérivent d'un progéniteur lymphoïde commun. Les marqueurs Id2 et ETS1 ainsi que les facteurs de transcription T-bet, Eomes et Nfil3 sont exprimés par les cellules NK. Les ILCs dérivent d'un progéniteur lymphoïde inné commun (Seillet and Belz, 2016)

### C. Activation des cellules NK

Les cellules NK ont un rôle essentiel dans l'immunité antivirale. Elles contiennent des protéines cytotoxiques, dont la perforine et le granzyme, dans des lysosomes sécrétoires aussi appelés granules lytiques. Lorsque les cellules NK reconnaissent une cellule cible, elles s'activent et libèrent ces granules lytiques. L'activation des cellules NK est régulée par la balance entre les signaux provenant des récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés par les cellules NK (Figure 14). Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent dans leur grande majorité les molécules CMH de classe 1, alors que les récepteurs activateurs reconnaissent des ligands cellulaires induit par le stress et des motifs microbiens exprimés à la surface des cellules cibles (Farang, 2002).

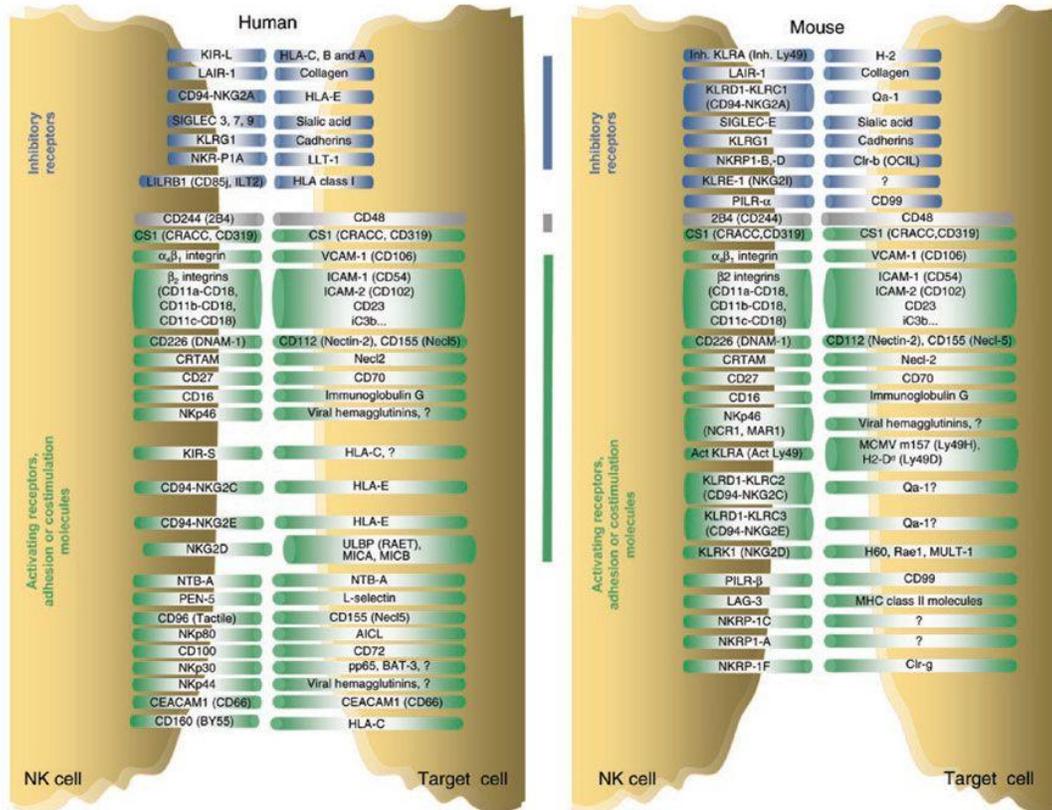


Figure 14 : Récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés par les cellules NK murines et humaines et leurs ligands. Les récepteurs inhibiteurs sont en bleus, les récepteurs activateurs en vert, le 2B4 qui peut agir comme un récepteur activateur ou inhibiteur est en gris (Vivier et al., 2008).

## 1. Des récepteurs pour reconnaître le soi et le non-soi

### a) Les récepteurs spécifiques du CMH de classe 1

#### i. La superfamille des immunoglobulines

##### 1) Les Killer Ig-like receptors (KIR)

Les KIRs sont des récepteurs clés contrôlant le développement et les fonctions des cellules NK. A ce jour, quatorze KIRs ont été identifiés. Ces récepteurs sont inhibiteurs (3DL1-3, 2DL1-3, 2DL5), activateurs (3DS1, 2DS1-5), ou les deux (2DL4). Les KIRs possèdent deux ou trois domaines extracellulaires immunoglobulin (Ig)-like impliqués dans la reconnaissance de leur ligand et une région intracellulaire longue ou courte associée à leur fonction. La nomenclature des KIRs est basée sur le nombre de domaines Ig-like et la longueur de la queue intracytoplasmique. Le premier chiffre suivant l'acronyme KIR correspond au nombre de domaines Ig-like et le « D » signifie domaine. Le « D » est suivi soit d'un « L » indiquant un long domaine cytoplasmique, soit

un « S » indiquant un domaine court, soit un « P » pour pseudogènes (2DP1 et 3DP1). Le dernier chiffre indique le gène codant la protéine. Donc, KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 sont trois récepteurs possédant deux domaines Ig-like et une longue queue intracytoplasmique, alors que KIR3DS1 correspond à un récepteur à 3 domaines Ig-like et un court domaine intracellulaire. Les régions intracellulaires longues sont caractéristiques des formes inhibitrices de KIRs. Les courts domaines cytoplasmiques des KIRs activateurs n'expriment pas ITIM, elles contiennent dans leur région transmembranaire un résidu aminoacide chargé positivement qui permet leur interaction avec DAP-12 (DNAX activation protein of 12 kDa). DAP12 est une protéine adaptatrice qui contient des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) qui déclenchent les signaux d'activation lorsque le récepteur est lié à son ligand.

Les cellules NK expriment une grande diversité de KIRs. Ils sont codés par une famille de gènes homologues groupés dans le leukocyte receptor complex qui couvre une région de 150 kb sur le chromosome 19. Deux groupes de KIR ont été définis : le groupe A, qui contient des KIRs génétiquement conservés, et le groupe B, dont le contenu génétique varie considérablement entre les individus. Tous les individus possèdent des KIRs, mais leurs fréquences varient énormément.

Les KIRs reconnaissent des motifs spécifiques des molécules de HLA classe 1. Bien que la spécificité des KIRs inhibiteurs ait été largement caractérisée, on en sait très peu sur les ligands des KIRs activateurs. Les KIRs activateurs présentent une importante homologie de séquences avec la portion extracellulaire du KIR inhibiteur qui lui correspond laissant présager que ces récepteurs partagent le même ligand. Par exemple, 3DS1 et 3DL1, qui partagent la plus forte homologie de séquence dans leur portion extracellulaire, lient tous les 2 HLA-Bw4. Cependant, alors que KIR2DL2 et 2DL3 reconnaissent HLA-C1, KIR2DS2 ne se lie à aucune molécule HLA de classe 1, même si son domaine extracellulaire diffère de 3 ou 4 acides aminés (Rajalingam, 2018).

## 2) Les leukocytes Ig-like receptors (LIR)

Comme les KIRs, les leukocytes Ig-like receptors font partie de la superfamille des immunoglobulines. 11 gènes codants ont été identifiés et sont également localisés sur le chromosome 9 dans le leukocyte receptor complexe. La famille des LIRs inclut des récepteurs activateurs et inhibiteurs, cependant les ligands et les fonctions de beaucoup de ces récepteurs n'ont pas été déterminés. Les LIRs ne sont pas uniquement exprimés par les cellules NK : ils sont exprimés par les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B. Un seul membre de la famille des LIRs est exprimé par les cellules NK : LILRB1, un récepteur inhibiteur. Les LIRs

reconnaissent un homologue du CMH-I codé par le cytomégalo­virus (HCMV), UL18, avec une meilleure affinité que les CMH-I de l'hôte. Donc, via les LIRs, le cytomégalo­virus peut inhiber la réponse antivirale des cellules NK (Li et al., 2011).

ii. La superfamille des lectines de type C  
(CD94/NKG2 et Ly49)

1) CD94/NKG2

Les récepteurs appartenant à la superfamille des lectines de type C sont des hétérodimères composés d'une sous-unité commune, le CD94, liée de manière covalente à une chaîne distincte codée par un gène de la famille des lectines C, les NKG2. Le CD94 ne possède pas de domaine cytoplasmique, il ne peut donc pas transduire le signal intracellulaire. La spécificité fonctionnelle de ces récepteurs est déterminée par les domaines extra et intracellulaires des molécules NKG2. Cette famille comprend 4 membres : NKG2A (et son variant d'épissage NKG2B), NKG2C, NKG2E (et son variant d'épissage NKG2H), et NKG2F. Seul l'hétérodimère CD94/NKG2A (et CD94/NKG2B) a une activité inhibitrice, les autres hétérodimères transduisent des signaux activateurs. Le complexe CD94/NKG2A se lie à la molécule non-canonique HLA-E, qui est chargée avec des peptides leaders dérivés des séquences signal des molécules HLA-A, -B et -C. La fixation des peptides dérivés des séquences signal des molécules du CMH de classe 1 permet le transport et le maintien des molécules HLA-E à la surface de la cellule. CD94/NKG2 détecte donc l'expression globale des molécules HLA classe 1 à la surface des cellules. La détection de HLA-E par les molécules CD94/NKG2A permet à la cellule NK de surveiller indirectement la biosynthèse normale des molécules HLA de classe 1, un processus qui peut être altéré dans les cellules infectées par un virus ou transformées (Farak, 2002).

2) Ly49

Les récepteurs Ly49 sont des glycoprotéines de type II, spécifiquement exprimées chez les rongeurs, appartenant à la superfamille de lectin de type C. Ils sont codés par une famille de gènes très polymorphiques et très polygéniques dans le mouse natural killer gene complex, sur le chromosome 6. Cette famille de gènes est nommée *Kira*, et elle contient des récepteurs inhibiteurs et activateurs. Ainsi, la famille des Ly49 est composée de 15 membres exprimés différemment selon la souche de souris. Les Ly49 reconnaissent le CMH de classe 1 et les protéines CMH de classe 1-like à la surface des cellules normales et altérées. Ils sont structurellement distincts des KIRs humains mais possèdent des fonctions similaires. Ainsi,

l'acquisition des récepteurs inhibiteurs Ly49 est une étape clé dans l'éducation des cellules NK murines. La fonction inhibitrice ou activatrice des récepteurs Ly49 est déterminée par la présence des motifs ITIM ou ITAM dans leur domaine cytoplasmique. Lorsque la cellule NK murine est activée, la phosphorylation d'un résidu tyrosine dans le domaine ITIM permet le recrutement et l'activation de la phosphatase SHP-1. Les récepteurs Ly49 activateurs transduisent le signal en s'associant avec une protéine adaptatrice contenant le domaine ITAM, DAP12, dont la phosphorylation active les tyrosine kinase de la famille des Src et donc permet l'initiation de la signalisation intracellulaire (Rahim et al., 2014).

Les récepteurs KIR, CD94/NKG2A et LIRB1 sont complémentaires. La signification biologique des récepteurs inhibiteurs et activateurs demeure problématique. Pour les KIRs comme pour les récepteurs CD94/NKG2, l'affinité du récepteur activateur est plus faible que celle du récepteur inhibiteur correspondant, ce qui assure la prédominance du signal inhibiteur quand les deux récepteurs reconnaissent une molécule HLA. Cependant, une minorité de cellules NK coexpriment le récepteur activateur et inhibiteur reconnaissant la même molécule HLA. Plus communément, les clones de cellules NK expriment un récepteur activateur et un récepteur inhibiteur spécifiques de deux molécules HLA différentes. Mais le récepteur inhibiteur, quand il est engagé, prédomine toujours sur le récepteur activateur. Ainsi, les récepteurs activateurs spécifiques du CMH de classe 1 induisent un signal lorsque les cellules cibles ont perdu l'expression d'une molécule HLA reconnue par un récepteur inhibiteur. De cette manière, les cellules NK éliminent les cellules dont le CMH de classe 1 est down-régulé sans éliminer les cellules normales (Farag, 2002).

#### b) Les récepteurs non-spécifiques du CMH de classe 1

Bien que les récepteurs spécifiques des CMH de classe 1 soient importants dans l'initiation de la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules cibles, les mécanismes indépendants du CMH de classe 1 sont fondamentaux dans la reconnaissance des cellules étrangères, c'est-à-dire déficientes ou négatives pour le CMH de classe 1. Plusieurs récepteurs non spécifiques des CMH de classe 1 ont été décrits, ils transduisent un signal activateur et beaucoup agissent plus en coactivateur qu'en stimulateur direct de la fonction des cellules NK. La majorité des ligands de ces récepteurs n'ont pas encore été identifiée et leurs fonctions exactes doivent encore être explorées.

## i. NKG2D

Le NKG2D est un récepteur de la famille des lectines, exprimé sur les cellules NK, les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Il a été faussement associé à la famille des NKG2, car encodé lui aussi dans le natural killer cells complex gene sur le chromosome 6. Cependant, NKG2D ne s'associe pas avec le CD94, il agit en homodimère. Chez l'homme, les ligands de NKG2D sont classés en deux catégories : les MHC class-I chain related (MIC) antigen (MICA et MICB) et les UL16 binding proteins (ULPBs 1 à 6). Les ligands de NKG2D ne sont pas exprimés à la surface des cellules ou des tissus sains chez l'adulte, l'induction de leur expression est plutôt attribuée à un « stress » cellulaire, par exemple l'infection d'une cellule par un pathogène ou une cellule subissant une transformation. Certaines cellules saines qui subissent une prolifération importante, comme les tissus embryonnaires ou les cellules hématopoïétiques, peuvent exprimer certains ligands NKG2D. De plus, l'expression aberrante des ligands de NKG2D a été reportée dans des mécanismes inflammatoires pathologiques incluant la polyarthrite rhumatoïde, le diabète, les maladies coéliquies, la maladie de Crohn, l'athérosclérose, ou l'asthme.

Une stimulation persistante avec des ligands NKG2D conduit à la baisse de l'expression du NKG2D et altère les fonctions dépendantes du NKG2D dans les cellules NK. Cette perte de fonction apparaît après l'internalisation rapide de NKG2D de la membrane plasmique vers les compartiments endosomaux et les lysosomes où il est dégradé. L'endocytose du récepteur NKG2D joue également un rôle important dans les fonctions médiées par NKG2D. En effet, des études récentes ont démontré que l'endocytose du récepteur est nécessaire à la sécrétion des granules cytotoxiques et à la production d'IFN- $\gamma$  médiée par les kinases ERK1 et ERK2. La nature du ligand reconnu joue un rôle essentiel dans l'endocytose de NKG2D. MICA promeut une diminution plus rapide de l'expression de NKG2D comparativement à ULBP2, conduisant à une dégradation lysosomale plus forte. De ce fait, bien que MICA et ULBP2 permettent d'induire la cytotoxicité des cellules NK de manière équivalente, la stimulation prolongée des cellules NK avec MICA réduit leurs fonctions cytotoxiques due à la down-régulation de NKG2D. Ces résultats suggèrent donc que des ligands distincts activent des voies de signalisation différentes entraînant des mécanismes différents d'endocytose du récepteur (Lanier, 2015; Zingoni et al., 2018).

## ii. Les Natural Cytotoxicity Receptor (NCR)

Les NCRs comprennent trois récepteurs : NKp46, NKp44 et NKp30. Des orthologues de ces gènes ont été identifiés chez la souris, le rat et les primates, mais NKp46 est le seul NCR fonctionnel chez la souris. Les NCRs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et

contiennent des acides aminés chargés dans leur domaine transmembranaire associés à des molécules adaptatrices portant ITAM. NKp46 et NKp30 sont exprimés dans les cellules NK activées et au repos, alors que NKp44 est exprimé uniquement dans les cellules NK activées. Il a été suggéré qu'un dialogue fonctionnel existe entre les trois NCRs : l'activation d'un NCR entraîne l'activation des cascades de signalisation associées aux autres NCRs. Ces trois récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales ou infectées par un virus, cependant la nature et la distribution de leurs ligands restent peu caractérisées. NKp46 est exprimé par les cellules NK, mais également par des sous-populations de lymphocytes T ( $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ ) et par un sous-type d'ILC3 (Kruse et al., 2014).

Même s'ils restent très mal caractérisés, les ligands des NCRs peuvent être classés en trois catégories : les ligands dérivés de virus, les ligands dérivés de bactéries et de parasites, et les ligands cellulaires (Kruse et al., 2014).

Les premiers ligands identifiés pour les NCRs étaient des protéines virales. NKp46 et NKp44 sont capables de reconnaître l'hémagglutinine A de l'influenza et l'hémagglutinine neuraminidase du virus Sendai. La reconnaissance de l'hémagglutinine A par le NKp46 est suffisante pour activer les cellules NK et entraîner la lyse des cellules infectées (Arnon et al., 2001). Plus récemment, les hémagglutinines A des virus de la famille des poxvirus ont été identifiées comme des ligands de NKp46 et NKp30. Ceci indique que les différents NCRs interagissent avec un large panel d'hémagglutinine A et d'hémagglutinine neuraminidase de différents virus. La reconnaissance de l'hémagglutinine par les NCRs ne garantit pas l'activation de la cellule NK. Alors que la formation du complexe NKp46-hémagglutinine A entraîne l'activation de la cellule NK, l'hémagglutinin A du virus de la vaccine agit comme un antagoniste lorsqu'il se lie à NKp30, inhibant l'activation de la cellule NK. Cette inhibition permet aux virus « d'échapper » au système immunitaire (Jarahian et al., 2011).

La protéine pp65, qui appartient au tégument du cytomégalovirus humain, est également un antagoniste de NKp30. Il est capable d'interrompre l'interaction entre NKp30 et ces protéines adaptatrices, ce qui réduit l'état d'activation des cellules NK. Néanmoins, pour inhiber les cellules NK, NKp30 et pp65 doivent interagir directement, et la présence de pp65 dans le sang de patient infectés n'a pas encore été prouvé (Arnon et al., 2005; Müller et al., 2002).

Les cellules NK peuvent être activées par des composés bactériens, par exemple par *Mycobacterium bovis* (BCG). Le récepteur NKp44 est capable de se lier au BCG, ainsi qu'à *Nocardia farcinica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant, aucune

activation des cellules NK n'a pu être détectée suite à la reconnaissance de composés microbiens avec NKp44. Au contraire de NKp44, NKp46 reconnaît un ligand cellulaire, la vimentine, exprimé par les cellules infectées par *M. tuberculosis*. Cette interaction est suffisante pour entraîner la lyse des cellules infectées par les cellules NK.

Les cellules NK sont également capables de reconnaître des ligands qui ne sont pas d'origine microbienne. NKp46 est capable de reconnaître une glycoprotéine soluble, le facteur du complément P, qui active la voie alternative du complément en stabilisant les convertases C3 et C5. La reconnaissance du facteur du complément P par le NKp46 est nécessaire à la survie des souris infectées avec la bactérie *Neisseria meningitidis*. Toutefois, l'effet exact de la ligation entre NKp46 et le facteur du complément P sur la cellule NK reste à élucider (Narni-Mancinelli et al., 2017)

Les NCRs sont également capables de reconnaître des ligands exprimés à la surface des cellules tumorales. Ces ligands comprennent les héparanes sulfate, le prolifering cell nuclear antigen (PCNA), le NKp44L, HLA-B-associated transcript 3, le B7-H6 (Kruse et al., 2014).

### iii. Les PRRs

#### 1) Expression des PRRs dans les cellules NK

Différentes observations ont été reportées sur l'expression des PRRs dans les cellules NK. Une forte expression de TLR1, et des niveaux modérés d'expression de TLR2, TLR3, TLR5 et TLR6 ont été reportés. D'autres études ont rapporté que TLR2 était fortement exprimé, notamment par les cellules CD56<sup>bright</sup>, et que les TLR3, TLR5 et TLR6 étaient également exprimés par les cellules CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> (Adib-Conquy et al., 2014). L'expression de TLR7 et de TLR8 a été mise en évidence par PCR (Hart et al., 2005). L'utilisation d'amorces différentes et de différents degrés de pureté des cellules NK peuvent expliquer ces différences. En outre, l'expression de TLRs n'est pas figée dans les cellules NK : les cellules NK au repos expriment fortement le TLR2, très faiblement TLR4 et TLR3 et n'expriment pas de TLR8, mais suite à la stimulation de ces cellules avec des particules virales, l'expression des quatre TLRs est significativement augmentée (Saikh et al., 2003).

Ces analyses basées sur l'ARNm ne reflètent pas l'expression de la protéine qui a été traduite et qui a subi des modifications post-traductionnelles. Les méthodes basées sur la cytométrie en flux ont contribué à déterminer l'expression des TLRs par les cellules NK, mais ont également donné

des résultats différents. TLR2 et TLR4, bien qu'exprimés à la surface des cellules NK, peuvent être détectées dans le cytoplasme et à la surface des cellules NK, humaines comme murines. De plus, TLR2 est détecté à la surface des cellules NK purifiées après 24h de culture alors qu'il n'est pas détecté immédiatement après la purification. En conclusion, les cellules NK expriment les TLR2, 3, 6, 7, 8 et 9 mais leur expression n'est pas figée. Les TLRs peuvent être détectée à l'état d'ARNm et/ou protéine intracellulaire et leur expression à la surface des cellules est stimulée par une stimulation microbienne, par des particules virales ou des bactéries (Adib-Conquy et al., 2014).

Les TLRs ne sont pas les seuls PRRs décrits dans les cellules NK. Les cellules NK humaines expriment de hauts niveaux de NOD2 et de NLRP3, alors que NOD1 est exprimé très faiblement. De plus, même si les PRRs comprennent les TLR, NLR et CLR décrits précédemment, les autres récepteurs décrits, notamment les NCR, peuvent être considérés comme des PRRs dans la mesure où ils reconnaissent des motifs microbiens caractéristiques de pathogènes. Ainsi dans une étude récente, CD56 a été identifié comme un PRR exprimé par les cellules NK : elles reconnaissent et lient *Aspergillus fumigatus* conduisant à la réorganisation du récepteur CD56 à la surface de la cellule NK et à l'activation des cellules NK (Ziegler et al., 2017).

## 2) L'activation des cellules par les agonistes PRRs nécessite une interaction avec d'autres cellules

L'expression des PRRs à la surface des cellules NK a ouvert de nouvelles perspectives concernant le rôle et l'activation des cellules NK dans les infections bactériennes et virales. En réponse à des PAMPs, l'interaction entre les cellules NK et d'autres cellules immunitaires est nécessaire à l'activation des cellules NK.

Le dialogue entre les cellules NK et les cellules dendritiques est essentiel à la réponse antivirale. Les cellules NK purifiées et stimulées avec du poly(I:C), du CpG ou le virus de l'influenza ne s'activent pas, elles ne sont pas cytotoxiques et ne produisent pas d'IFN- $\gamma$ . Par contre, en coculture avec des cellules dendritiques, elles montrent des fonctions cytotoxiques et produisent de l'IFN- $\gamma$ , dépendamment de la sous-population de cellules dendritiques impliquée : en coculture avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), les cellules NK acquièrent leurs capacités cytotoxiques en réponse au virus de l'influenza, au poly(I:C), et au CpG alors que les cellules NK en coculture avec les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) sont cytotoxiques et produisent de l'IFN- $\gamma$  en réponse au poly(I:C) uniquement. Cette activation des cellules NK par les cellules

dendritiques plasmacytoïdes est dépendante d'un contact cellulaire direct et de la production d'IFN $\alpha/\beta$  et d'IL-12 : lorsque les cellules NK et les pDC sont stimulées avec le virus de l'influenza séparément (par transwell), les cellules NK sont moins cytotoxiques et expriment moins le marqueur d'activation CD69 ; de la même manière la neutralisation des IFN $\alpha/\beta$  et d'IL-12 diminue la cytotoxicité et l'activation des cellules NK. Par contre, l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques myéloïdes est dépendante principalement de la production d'IFN $\alpha/\beta$  et d'IL-12 : la stimulation en transwell avec du poly(I:C) n'a que peu d'effet sur l'activation des cellules NK, alors que la neutralisation d'IFN $\alpha/\beta$  et d'IL-12 diminue fortement leur cytotoxicité et leur production d'IFN- $\gamma$  (Gerosa et al., 2005). Les récepteurs impliqués dans le dialogue entre les cellules NK et les différentes sous-populations de cellules dendritiques sont différents : TLR9 est plutôt impliqué dans le dialogue NK/pDC, alors que TLR3 est engagé dans le dialogue NK/mDC. Mais dans l'immunité antivirale, les TLRs ne sont pas les seuls récepteurs engagés, et d'autres PRRs interviennent dans le dialogue NK/DC. Le poly(I:C) est reconnu par TLR3, mais également par RIG-I et MDA-5. La stimulation des cellules NK et des cellules dendritiques myéloïdes avec un poly(A:U), ciblant uniquement le TLR3, induit l'activation et la cytotoxicité des cellules NK, mais pas la production d'IFN- $\gamma$  ; alors que le poly(I:C), qui cible TLR3, RIG-I et MDA5, induit bien l'activation, la cytotoxicité et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Lysakova-Devine and O'Farrelly, 2014). Les cellules dendritiques ne sont pas les seules cellules accessoires participant à l'activation des cellules NK. La production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK stimulées avec R848, un agoniste de TLR7/8, nécessite la présence de monocytes (Hart et al., 2005).

## 2. Interaction des cellules NK avec d'autres cellules immunitaires

Les cellules NK ont un rôle de régulation de la fonction immune et sont capables d'interagir avec d'autres cellules immunitaire (Figure 15).

Les cellules NK établissent un dialogue bidirectionnel avec les cellules dendritiques. Des cellules NK, prétraitées avec de l'IL-2, stimulent la maturation des cellules dendritiques immatures et leur production d'IL-12. L'IFN- $\gamma$  et le TNF contribuent à la maturation des cellules dendritiques (Wehner et al., 2011). Les cellules NK ne participent pas uniquement à la maturation des cellules dendritiques, elles sont également capables de les lyser. Les cellules NK en coculture avec les cellules dendritiques à un ratio 1:5 stimulent la maturation des cellules dendritiques, alors qu'à un ratio 5:1, les cellules NK autologues lysent les cellules dendritiques immatures. Les deux phénomènes ont des mécanismes communs : ils sont dépendant de la production de facteurs solubles par les cellules NK (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et de contacts cellulaires directs notamment via

NKp30, CD40 et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Toutefois, comment le ratio NK-DC conduit à la maturation ou la lyse des cellules dendritiques et les mécanismes mis en jeu n'ont pas été décrit. En participant à la maturation ou à la lyse des cellules dendritiques, les cellules NK pourraient réguler l'homéostasie des cellules dendritiques et donc la balance entre tolérance et immunité. (Walzer, 2005).

Les cellules NK participent à l'activation et la polarisation des lymphocytes T de manière directe et indirecte. La maturation des cellules dendritiques par les cellules NK aboutit à la production d'IL-12 par les cellules dendritiques et inhibe la production d'IL-10. La production d'IL-12 par les cellules dendritiques favorise la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 (Wehner et al., 2009). Les cellules NK reconnaissent et lysent les lymphocytes T activés via NKp46 ou NKG2D. Ils sont également capables d'inhiber les lymphocytes T en produisant de l'IL-10. Les cellules NK exercent donc un rôle de régulation du système immunitaire adaptatif : ils sont capables directement ou indirectement de participer à l'expansion clonale et la polarisation des lymphocytes T naïfs mais sont également capables de les inhiber ou de les lyser afin d'éviter le développement de lymphocytes T autoréactifs, par exemple dans les cas d'infections virales chroniques (Pallmer and Oxenius, 2016). Les cellules NK peuvent modifier la production d'anticorps par les lymphocytes B. En produisant de l'IFN- $\gamma$  et par un contact cellulaire entre CD2 à la surface des cellules NK et le CD244 à la surface des lymphocytes B, les cellules NK peuvent stimuler la production d'IgG2a/c par les lymphocytes B (Yuan, 2013). Les cellules NK sont donc capables directement et indirectement de réguler la réponse immunitaire adaptative.

Les cellules NK interagissent avec les éosinophiles. Des expériences de cocultures ont montré que les cellules NK humaines pouvaient conduire à l'activation des éosinophiles et pouvaient induire leur apoptose (Awad et al., 2014; Barnig et al., 2013). Cette action des cellules NK sur les éosinophiles est dépendante d'un contact cellulaire directe via NKp46 et NKp30 (Pesce et al., 2017).

Les cellules NK peuvent lyser les neutrophiles via un mécanisme dépendant de NKp46 et de Fas (Thorén et al., 2012). Les neutrophiles participent également à la maturation et au développement des cellules NK, mais le mécanisme impliqué reste inconnu (Amano et al., 2015).

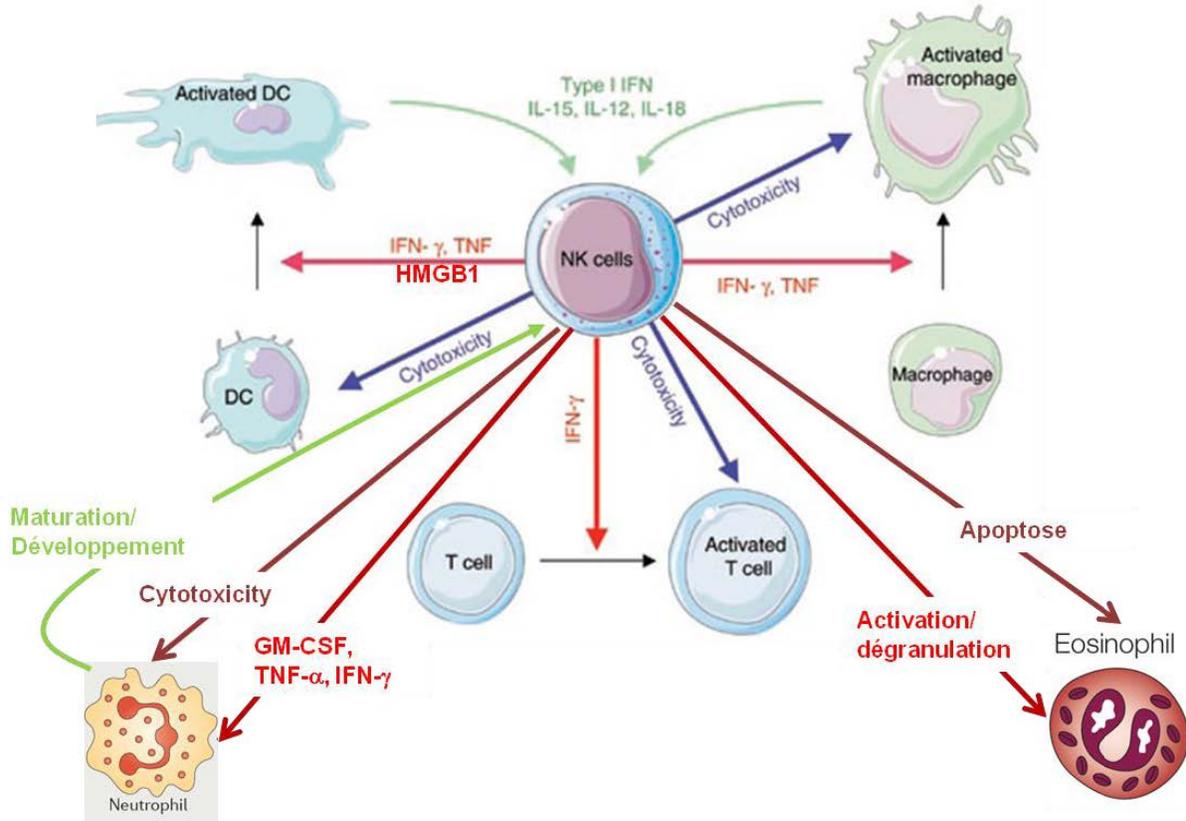


Figure 15 : Interaction des cellules NK avec d'autres types cellulaires. Les cellules NK établissent un dialogue bidirectionnel avec les cellules dendritiques et les neutrophiles ce qui aboutit à la maturation des cellules NK, la maturation des cellules dendritiques, ou à la lyse des cellules. Les cellules NK induisent également la polarisation des lymphocytes Th1 et l'activation des macrophages. Modifié de (Vivier et al., 2008)

### 3) L'épuisement des cellules NK : quand l'activation des cellules NK devient chronique

Récemment, des études ont suggéré que dans des conditions pathologiques, les cellules NK pouvaient devenir fonctionnellement épuisées. Ce phénomène d'épuisement des cellules immunitaires a d'abord été décrit dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> durant des infections virales chroniques. L'épuisement des lymphocytes T se caractérise par une perte progressive de leurs fonctions effectrices : tout d'abord, les lymphocytes épuisés ne produisent plus d'IL-2, puis ils perdent leurs capacités à proliférer et leurs fonctions cytotoxiques. Les lymphocytes T épuisés ne produisent plus d'IFN-γ et, à un stade avancé, deviennent apoptotiques (Wherry, 2011). De la même manière, l'épuisement des cellules NK se caractérise par une perte des fonctions effectrices : diminution de la production d'IFN-γ, diminution de l'expression de perforine, de

granzyme, de FasL et de TRAIL, diminution de l'activité cytolytique, et diminution de la prolifération. L'épuisement des cellules NK entraîne une diminution générale de la résistance aux maladies et a été décrit dans plusieurs pathologies chroniques par exemple l'hépatite C, les infections HIV et dans certains cancers (Bi and Tian, 2017).

La perte de fonction des cellules NK épuisées est due à une diminution de l'expression de certains récepteurs activateurs. Par exemple, le récepteur activateur NKG2D est downrégulé chez les patients atteints d'un cancer ou d'infections chroniques. L'expression de ces récepteurs peut être restaurée lorsque les patients sont en période de rémission. D'autres récepteurs chargés de moduler l'activation des cellules NK sont surexprimés lorsqu'elles sont épuisées : ce sont des « checkpoint molecules ». Trois checkpoints molecules ont été décrit sur les cellules NK épuisées : PD-1, NKG2A et Tim-3.

PD-1 (Programmed cell death-1) a été mis en évidence sur les lymphocytes T et B activées. C'est un récepteur inhibiteur spécifique des ligands PD-L1 et PD-L2 exprimés par les cellules tumorales, les cellules infectées, les cellules inflammatoires comme les éosinophiles et les cellules présentatrices d'antigènes. En plus des cellules NK, l'expression de PD-1 a été reporté sur les NKT ou les ILC2. L'augmentation de l'expression de PD-1 par les cellules NK a été identifiée dans certains cas de cancers, dont les sarcomes de Kaposi et les infections chroniques (HIV, M. tuberculosis, cytomégalovirus humain ou hépatite C). Les cellules NK PD-1<sup>+</sup> présentent des capacités prolifératives réduites, une activité cytotoxique limitée et une altération de la production en cytokines comparativement aux cellules NK PD-1<sup>-</sup>. Le blocage *in vitro* de la voie PD-1 inverse les défauts fonctionnels induit par l'interaction PD-1/PD-L1, confirmant son rôle dans l'épuisement des cellules NK (Beldi-Ferchiou and Caillat-Zucman, 2017).

Le récepteur inhibiteur NKG2A, qui a été décrit dans un chapitre précédent, est augmenté dans les cellules CD56<sup>dim</sup> de patients souffrant de carcinomes hépatocellulaires. Ces cellules NKG2A<sup>+</sup> ont des fonctions cytotoxiques défailantes et produisent moins d'IFN- $\gamma$  que les cellules NK NKG2A<sup>-</sup> (Sun et al., 2017). La présence du marqueur NKG2A a été associée à un mauvais pronostic. L'augmentation de l'expression NKG2A a été rapportée dans les hépatites chroniques humaines et les infections HBV dans des modèles murins. Dans ces modèles, NKG2A est inhibiteur et joue un rôle dans la persistance du virus (Beldi-Ferchiou and Caillat-Zucman, 2017).

Le T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3) est un corécepteur inhibiteur initialement décrit dans les lymphocytes T. Tim-3 est également détecté à la surface de plusieurs types de cellules immunitaires dont les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes B, les cellules

dendritiques, les macrophages, les mastocytes et les cellules Natural Killer. C'est une protéine membranaire de type 1 de 281 acides aminés comprenant un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracytoplasmique (He et al., 2018). Les ligands de Tim-3 comprennent la galectin 9, les phosphatidylsérines exposées par les cellules apoptotiques, l'alarmine HMGB1 et CEACAM1 (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1). L'expression de Tim-3 par les cellules NK est bien établie, mais ses conséquences restent controversées. Les cellules NK au repos de sujets sains expriment Tim 3, plus particulièrement les cellules NK CD56<sup>dim</sup>. Cette expression augmente fortement après la stimulation des cellules NK avec des cytokines, particulièrement IL-12+IL-18 ou IL-12+IL-15. Donc l'expression de Tim 3 semble être un marqueur d'activation et/ou de maturation des cellules NK. Les effets de la voie de signalisation de Tim-3 sur les fonctions des cellules NK ne sont pas claires, et des effets inhibiteurs et activateurs lui ont été attribués. Dans un contexte de stimulation chronique, comme l'adénocarcinome pulmonaire ou l'hépatite B chronique, l'expression de Tim-3 définit un sous-type de cellules NK fonctionnellement défectueuses, et le blocage de Tim-3 restaure ces fonctions (Beldi-Ferchiou and Caillat-Zucman, 2017; Bi and Tian, 2017; Schafer et al., 2015). En conclusion, il semble que le rôle de Tim-3 peut varier dans les cellules NK selon le milieu expérimental. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les effets de l'expression de Tim-3 sur l'épuisement des cellules NK

L'épuisement des cellules NK a été décrite plus particulièrement chez les patients porteurs du VIH. Stimulées in vitro avec poly(I:C), un agoniste de TLR3, les cellules NK de patients séropositifs sont moins cytotoxiques et produisent moins d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  que les cellules NK provenant de donneurs séronégatifs. Chez les patients séropositifs, une sous-population de cellules NK CD62L<sup>+</sup> exprime davantage de Tim-3, NKG2A et PD-1 comparativement aux cellules NK CD62L<sup>+</sup> provenant de donneurs sains, suggérant que les cellules NK CD62L<sup>+</sup> des patients séropositifs sont épuisées. L'épuisement des cellules NK des patients séropositifs pourrait donc expliquer la diminution de leurs fonctions effectrices en réponse au ligand du TLR3 (Lima et al., 2017).

## D. Les cellules NK dans l'asthme

### 1) Modification des cellules NK humaines

Plusieurs études ont rapporté des modifications de la fonction des cellules NK chez les patients asthmatiques. Timonen et al a montré que les cellules NK circulantes provenant de patients asthmatiques allergiques avaient une activité cytotoxique plus élevée que les cellules NK de donneurs sains (Timonen and Stenius-Aarniala, 1985). L'activité de ces cellules NK décroît

significativement 15 minutes après administration d'un allergène au patient, suggérant que l'activité cytotoxique des cellules NK est inhibée par l'allergène ou le milieu inflammatoire allergique (Jira et al., 1988). L'équipe de Wei et al a rapporté une modification des cytokines produites par les cellules NK. Ainsi, en cytométrie en flux, le pourcentage de cellules NK IL-4<sup>+</sup> est plus élevé chez les patients asthmatiques atopiques comparativement aux patients sains alors que la proportion de cellules NK IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> est diminuée chez les patients asthmatiques. Cette situation est réversible car après traitement avec des corticoïdes, la proportion de cellules NK positives pour IL-4 diminue au profit des cellules NK IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Wei et al., 2005).

Dans le sang périphérique de patients allergiques, la proportion de cellules NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, une sous-population de cellules NK capable d'interagir avec les cellules dendritiques, est significativement diminuée comparativement aux donneurs sains. En coculture avec les cellules dendritiques, les cellules NK de patients asthmatiques produisent moins d'IFN- $\gamma$  que les cellules NK de sujets sains. De plus, leur capacité à promouvoir la maturation des cellules dendritiques ou à lyser les cellules dendritiques immatures est réduite (Scordamaglia et al., 2008). Des modifications des cellules NK ont également été relevées dans l'asthme sévère. Le nombre de cellules NK est diminué dans le sang périphérique de patients asthmatiques sévères et, dans les lavages broncho-alvéolaires, le ratio cellules NK / lymphocytes T CD4<sup>+</sup> diminue significativement comparativement aux donneurs sains. Les cellules NK de patients asthmatiques expriment des niveaux plus élevés de NKG2D et de CD69 que les sujets sains, et l'expression de ces molécules est positivement corrélée au nombre d'éosinophiles dans le sang périphérique. Les cellules NK de patients asthmatiques sévères initient moins l'apoptose des éosinophiles que les cellules NK de donneurs sains ou d'asthmatiques légers. Enfin les cellules NK provenant de lavages broncho-alvéolaires ou du sang périphérique de patients asthmatiques sains lysent moins les cellules cibles (K562) malgré une production de médiateurs cytotoxiques augmentée (Barnig et al., 2013; Duvall et al., 2017).

Donc les cellules NK de patients asthmatiques présentent des modifications phénotypiques et fonctionnelles. Ces modifications pourraient participer au développement ou à la résolution de l'asthme et pourrait contribuer à l'inflammation chronique des voies aériennes.

## 2) Apport des modèles murins

Des études ont utilisé des modèles murins pour analyser le rôle des cellules NK dans l'asthme. Dans un modèle murin d'asthme induit par l'ovalbumine, le nombre de cellules NK augmente significativement dans les ganglions lymphatiques drainants suivant la sensibilisation. La

déplétion des cellules NK avec un anticorps anti asialo-GM1 conduit à la diminution du nombre d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires mais ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique (Ple et al., 2010). Des souris déficientes pour *Ncr1* (NKp46) présentent une diminution de l'hyperréactivité bronchique et une diminution de l'infiltrat cellulaire dans les poumons comparativement aux souris wild type (Ghadially et al., 2013). Dans un modèle d'asthme induit par HDM, des souris déficientes pour le NKG2D présentent une diminution du nombre d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires, une diminution du nombre de cellules Th2 dans les poumons ainsi qu'une diminution du taux d'IgE sérique. Le transfert de cellules NK provenant de souris wild-type restaure l'inflammation allergique pulmonaire alors que le transfert de cellules NK de souris déficientes pour granzyme B n'a pas d'effet (Farhadi et al., 2014). L'ensemble de ces études suggère un rôle pro inflammatoire des cellules NK dans le développement de l'asthme. D'autres études suggèrent un rôle dans la résolution de l'inflammation. Dans un modèle murin d'asthme induit par HDM, le nombre de cellules NK augmente dans les poumons et est corrélé à la réduction du nombre d'ILC2 dans les poumons. La déplétion des cellules NK avec un anticorps anti-NK1.1 restaure le nombre d'ILC2 et l'inflammation pulmonaire (Ferrini et al., 2017; Simons et al., 2017). De plus, dans un modèle murin d'asthme induit par l'ovalbumine, le nombre de cellules NK augmente dans les poumons 3 jours après l'arrêt des intranasales d'ovalbumine. Les cellules NK expriment la résolvine E1 et la déplétion des cellules NK avec un anticorps anti-asialo GM1 diminue la résolution de l'inflammation allergique médiée par la résolvine E1 (Haworth et al., 2011).

Ces résultats différents sont en partie dus à des stratégies différentes, des modèles différents, et des méthodes de déplétion des cellules NK non spécifiques. Dans une étude récente, le rôle des cellules NK a été analysé grâce à un modèle de déplétion des cellules NK beaucoup plus spécifique. Les souris sont issues d'un croisement entre des souris *Ncr1<sup>iCre</sup>*, qui expriment la Cre recombinase dans toutes les cellules *Ncr1<sup>+</sup>*, avec des souris ROSA-DTA ou ROSA-DTR. Les souris ROSA-DTA possèdent le gène de la chaîne alpha de la toxine diphtérique dont le promoteur est précédé d'un codon stop flanqué de deux sites loxP, alors que les souris ROSA-DTR possèdent le gène du récepteur à la toxine diphtérique dont le promoteur est précédé d'un codon stop flanqué de deux sites loxP. Les souris issues de ces croisements seront donc soit naturellement dépourvues de cellules *Ncr1<sup>+</sup>* (*Ncr1*-DTA) soit elles pourront être déplétées grâce à une injection de toxine diphtérique (*Ncr1*-DTR). Le nombre de cellules NK dans les ganglions lymphatiques drainants et le nombre de cellules NK CD69<sup>+</sup> dans la lumière broncho-alvéolaire sont augmentés chez les souris wild-type sensibilisées avec un acarien, montrant ainsi une modification des cellules NK dans le compartiment pulmonaire dans un modèle d'asthme.

Néanmoins, les souris Ncr1-DTA et Ncr1-DTR traitées par la toxine diphtérique, développent toutes les caractéristiques de l'asthme expérimental : l'hyperréactivité bronchique, la production de cytokines Th2, l'éosinophilie, une surproduction de mucus, et des taux élevés d'IgE sérique (Haspeslagh et al., 2018). Cette dernière étude, qui utilise un modèle très spécifique de déplétion de cellules NK, suggère donc que, même si les cellules NK sont recrutées au niveau du poumon lors de la sensibilisation, elles ne jouent pas de rôle dans le développement de la réaction asthmatique expérimentale.

### 3) Les cellules NK et l'exacerbation de la réaction asthmatique

Les mécanismes par lesquels les cellules NK participent à l'exacerbation de la réaction asthmatique n'ont pas été caractérisés. L'analyse des cellules NK d'enfants hospitalisés à cause d'une exacerbation de leur asthme a montré une augmentation de l'expression d'ICAM-1 et de CD62L comparativement aux enfants présentant un asthme contrôlé. L'expression de ces deux marqueurs revenait à des taux normaux après administration d'un traitement à base de corticoïdes (Lin et al., 2003). L'origine des exacerbations de ces enfants n'a cependant pas été notifiée.

Dans un modèle murin d'asthme, l'administration de poly(I:C), utilisé dans le but de mimer une infection virale, entraîne l'augmentation du nombre d'éosinophiles et de neutrophiles dans les LBA, la production de mucus, et la concentration d'IL-17A dans les poumons. Par cytométrie en flux, les cellules NK ont été identifiées comme source potentielle d'IL-17A. Comparativement aux souris wild-type, la déplétion des cellules NK avec un anticorps anti-asialo GM1 (cependant non spécifique des cellules NK, puisque toutes les cellules NK n'expriment pas l'asialo-GM1 et que d'autres cellules expriment cet antigène) réduit les effets exacerbateurs induits par poly(I:C) (Lunding et al., 2015).

Les cellules NK pourraient donc participer à l'exacerbation de la réaction asthmatique expérimental induite par un agoniste de TLR. Toutefois, ce modèle mime une infection virale et n'est pas étayé par des études humaines. La fonction des cellules NK dans l'exacerbation de la réaction asthmatique reste inconnue.

# **OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE**

La place des cellules NK dans la pathologie asthmatique est complexe. Des modèles murins ont décrit un rôle pro inflammatoire des cellules NK dans le développement de la maladie asthmatique. D'autres études ont suggéré que les cellules NK pourraient favoriser la résolution de l'inflammation pulmonaire. Plus récemment, il a été montré que la déplétion spécifique des cellules NK ne modifiait pas l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique, suggérant que les cellules NK ne jouent pas de rôle dans le développement de l'asthme. Chez les patients asthmatiques et particulièrement les patients asthmatiques sévères, les cellules NK sont modifiées phénotypiquement et fonctionnellement. La fonction majeure des cellules NK est de reconnaître et d'initier l'immunité antimicrobienne, principalement contre les virus mais également les bactéries. Les microbes ont un effet sur la maladie asthmatique : certains virus et bactéries participent à l'exacerbation de la pathologie alors que d'autres agents peuvent inhiber l'inflammation pulmonaire. Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la place qu'occupe les cellules NK dans ces deux phénomènes.

Dans la première partie de la thèse, nous nous sommes placés dans le cadre de l'exacerbation de la réaction asthmatique en nous posant plusieurs questions. Les cellules NK humaines de patients asthmatiques sévères sont-elles activées en réponse à des composés synthétiques agonistes de PRRs ou en réponse à un virus ? Peuvent-elles avoir des fonctions cytotoxiques en réponse à leur stimulation ? Expriment-elles et produisent-elles de l'IFN- $\gamma$  en réponse à ces stimulations ? Existe-t-il une différence dans leur activation entre les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères ? Les patients asthmatiques sévères présentent-ils un défaut de réponse des cellules NK suite à leur stimulation avec ces agents ? Ce défaut est-il intrinsèque à la cellule NK ? Le phénotype des cellules NK est-il modifié chez les patients asthmatiques ? Cette modification du phénotype des cellules NK pourrait-elle expliquer leur potentiel défaut d'activation ?

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons analysé l'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale médiée par un agoniste de TLR2/6, le FSL1. Cette partie visait à répondre à plusieurs interrogations : les cellules NK jouent-elles un rôle dans la sensibilisation et le développement de l'inflammation pulmonaire induite par l'ovalbumine ? L'inhibition de la réaction asthmatique par FSL1 est-elle, au moins en partie, dépendante des cellules NK ? Les cellules NK

pulmonaires sont-elles activées in vivo par FSL1 ? Leur activation par FSL1 participe-elle à l'inhibition de la réaction asthmatique ?

# RESULTATS

## **PARTIE 1 : La réponse des cellules Natural Killer au rhinovirus est défectueuse dans l'asthme sévère**

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique soumis le 26/12/2018 (soumission n°ERJ-02422-2018), intitulé « Aberrant Natural Killer cell response to rhinovirus in severe asthma ». Un brevet d'invention n°EP18306287.6, intitulé "Use of tim-3 inhibitors for the treatment of exacerbations in patients suffering from severe asthma" a été déposé le 01/10/2018.

### **A. Matériels et Méthodes**

#### **1. Patients**

Trente et un patients asthmatiques sévères ont été recrutés dans le service Pneumologie-Allergologie du Centre Hospitalo-universitaire de Lille. Le projet a été déclaré au Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation sous le numéro DC 2015-2575 et a reçu l'approbation du Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest (CP04/45). Tous les patients ont signé un formulaire de consentement éclairé. L'asthme sévère a été défini selon les critères établis par l'American Thoracic Society et l'European Respiratory Society. Les données collectées lors du recrutement incluent le nombre d'exacerbations sur l'année écoulée, les allergies respiratoires, le taux d'éosinophiles sanguins, le volume expiratoire forcé en 1 seconde et les traitements et doses de corticoïdes (Table 1). Tous les patients sont traités avec des corticoïdes inhalés. Les patients asthmatiques sévères ont été comparés à des sujets sains non atopiques non asthmatiques (Etablissement Français du Sang).

	<b>Healthy donors</b>	<b>Severe asthma patients</b>
<b>Subjects n</b>	11	31
<b>Age years</b>	38 (24 – 61)	57 (19 – 78)
<b>Females (%)</b>	64%	58%
<b>IMC &gt;30 (%)</b>	0%	47.2%
<b>ACT &gt;20 (%)</b>	NA	17.7%
<b>Exacerbations in the last year</b>	NA	4 (0 – 12)
<b>FEV1% predicted</b>	100 (95 – 105)	68 (34 – 112)
<b>Blood eosinophils per mm<sup>3</sup></b>	0 (0 – 168)	350 (0 – 1320)
<b>Atopy# (%)</b>	0%	35.4%
<b>Sinusitis (%)</b>	0%	9.5%
<b>GORD (%)</b>	0%	26.8%
<b>Long-term OCS (%)</b>	0%	45.2%

Table 1 : Caractéristiques des patients. Sauf indication contraire, les résultats sont présentés en médiane. ACT : test de contrôle de l'asthme, FEV1 : volume expiratoire forcé en 1 seconde, GORD : reflux gastro-œsophagien, OCS : corticostéroïdes oraux, NA : non-applicable. #basée sur test cutané positif.

## 2. Purification des cellules mononucléées du sang et des cellules NK

Les cellules mononucléées du sang (CMN) ont été isolées à partir de sang veineux héparinisé sur Ficoll-Paque Plus (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).  $2 \cdot 10^6$  CMN/ml ont été mises en culture dans du RPMI contenant 2mM de L-glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio, Courtaboeuf, France). Les cellules NK ont été purifiées à partir des CMN par séparation immunomagnétique (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada). La pureté des cellules NK a été vérifiée en cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD3, CD56 (Biolegend, San Diego, USA), CD14 et CD19 (Beckton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA). La pureté des cellules NK purifiées était supérieure à 95% et leur viabilité, mesurée avec du Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend, San Diego, USA), était supérieure à 90%.

## 3. Production du rhinovirus

La lignée cellulaire Vero (ATCC CCL-81) a été cultivée dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies, France) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Life Technologies, France). Le rhinovirus humain 9 (RV, ATCC VR-489) a été propagé dans des cellules Vero dans le DMEM supplémenté avec 2% de SVF. Les cellules infectées ont été congelées et décongelées trois fois, puis centrifugées à 3500 tr/min pendant 10 minutes, après quoi le surnageant a été récolté et utilisé comme stock de virus conservé à -80°C. La concentration virale a été évaluée dans les surnageants de cellules infectées à l'aide de l'essai de dilution au point final et la méthode statistique Spearman-Kärber a été utilisée pour déterminer la dose infectieuse de 50 % pour la culture tissulaire (TCID<sub>50</sub>). Le titre infectieux du stock de virus était de  $1,44 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml.

## 4. Stimulation des cellules

Les CMN ( $2 \cdot 10^6$ /ml) ou les cellules NK purifiées ( $1 \cdot 10^6$ /ml) ont été stimulées dans des plaques 24 puits avec de l'Interleukine (IL)-12 (10ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, USA) et de l'IL-15 (10ng/ml, Miltenyi, Bergish Gladbach, Allemagne), ou avec un agoniste de TLR3 : du Polyinosinic-polycytidylic acid (PIC) (10µg/ml, Invivogen, San Diego, USA), de TLR9 : ODN 2395 (CpG, 10µg/ml, Invivogen, San Diego, USA), du TLR7/8 : Resiquimod (R848, 1µg/ml Invivogen, San

Diego, USA), du TLR2/6 : FSL1 (1µg/ml, Invivogen, San Diego, USA), du NKp46 : Hemagglutinin A de l'Influenza A (1µg/ml, Interchim, San Diego, USA), ou avec du RV à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1, pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère humide saturée à 5% de CO<sub>2</sub>. La dose la plus faible (MOI 0,1) et la durée de la stimulation (24 heures) les plus faibles, qui augmentent significativement l'expression du CD69 par les cellules NK, ont été choisis pour le reste de l'étude (data non montrées). Pour analyser la dégranulation des cellules NK, les CMN ont été mises en culture avec des cellules tumorales myéloïdes K562 à raison de 100 CMN pour 1 K562 pendant 3 heures.

## 5. Analyse en cytométrie en flux

Les anticorps suivants ont été utilisés (les clones sont notés entre parenthèses) : anti-CD3 PECy7 (OKT3), anti-CD56 BV421 (HCD56), anti-CD56 BV510 (HCD56), anti-Tim3 PE (F38-2E2), anti-PD-1 PerCP Cy5.5 (NAT105) tous de Biolegend (San Diego, USA), anti-CD69 FITC (FN50) and mouse IgG1 κ FITC Isotype control (MOPC-21), anti-IFN-γ PerCP Cy5.5 (B27) and anti-mouse IgG1,κ PerCP Cy5.5 isotype control (MOPC-21) provenant de Beckton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, USA), anti-CD107a APC ef660 (H4A3) and anti-mouse IgG1,κ APC ef660 isotype control (P3.6.2.8.1), anti-CD62L APC ef780 (DREG56), de Life Technologies-Ebioscience (Carlsbad, USA), La viabilité des cellules a été mesurée avec du Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend, San Diego, USA).

Après la stimulation, les CMN ont été incubées avec le marqueur de viabilité pendant 20 minutes à température ambiante puis avec les anticorps extracellulaires pendant 30 minutes à 4°C. Pour les anticorps intracellulaires, les cellules ont été incubées avec du Cytofix/Cytoperm (Beckton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA) pendant 20 minutes à 4°C puis avec les anticorps intracellulaires pendant 30 minutes à 4°C. Pour analyser l'expression de CD107a dans les cellules NK, les CMN ont été mises en culture avec les cellules cibles, un anticorps anti-CD107a et de la monensine (Life Technologies Ebioscience, Carlsbad, USA) puis marquées comme précédemment décrit.

Les données ont été enregistrées sur le cytomètre de flux Canto II (Beckton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA) et analysées avec le logiciel FlowJo. La stratégie de gating est détaillée dans la Figure 1. Les cellules NK ont été identifiées comme une population lymphoïde n'exprimant pas le CD3 et exprimant CD56. L'activation des cellules NK a été analysée avec l'expression de CD69, CD107a et IFN-γ.

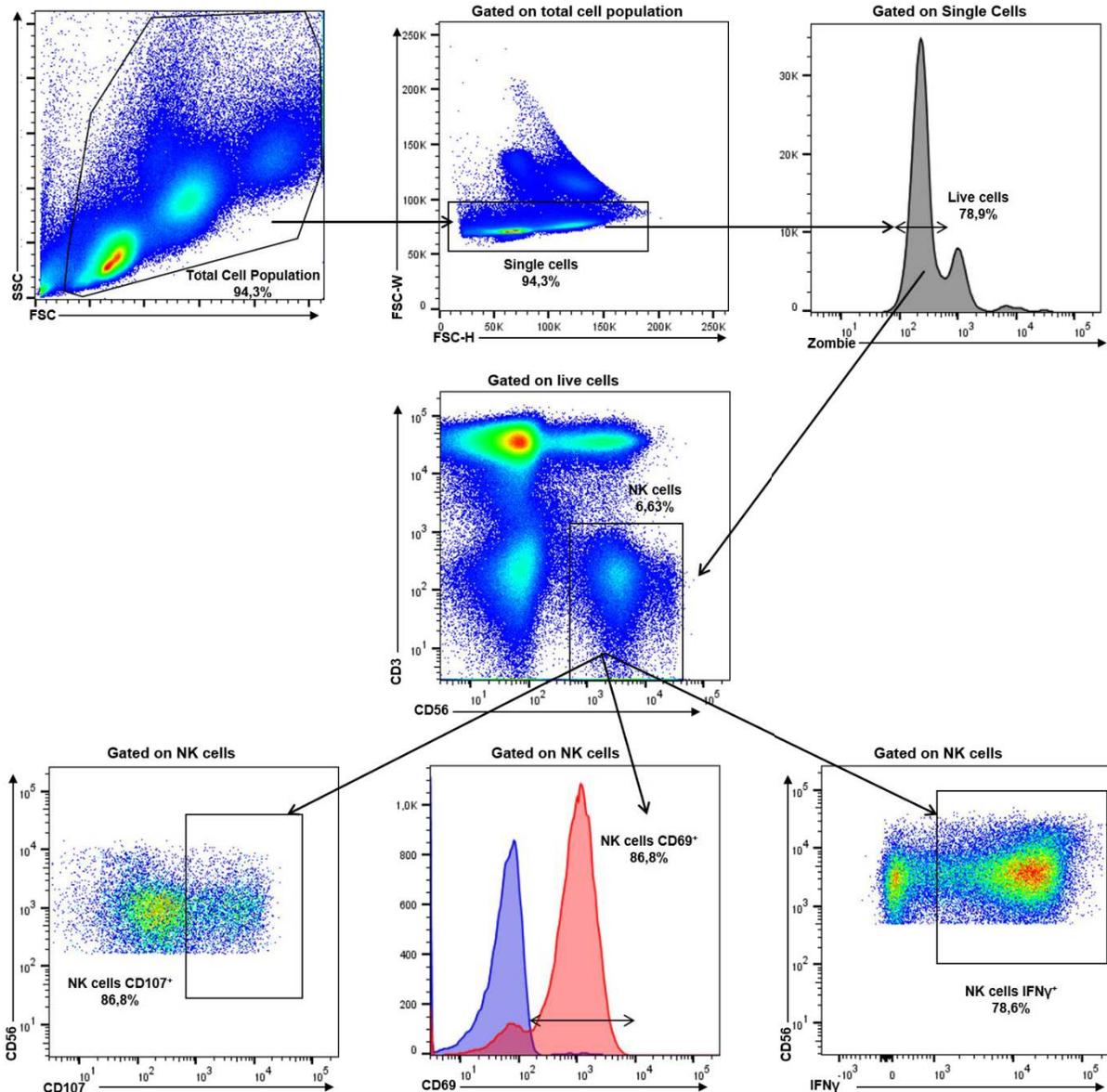


Figure 1 : Stratégie de gating en cytométrie en flux. Les singulets et les cellules vivantes ont été sélectionnés parmi les cellules mononucléées. Les cellules NK ont été identifiées comme des cellules lymphoïdes dépourvues de CD3 et exprimant le CD56. L'expression en surface de CD69, de CD107a et l'expression intracellulaire d'IFN- $\gamma$  ont été mesurées pour définir l'activation des cellules NK.

## 6. Mesure des cytokines et des chimiokines

25 cytokines et chimiokines (GM-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL12(p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , eotaxin, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10) et le granzyme B ont été dosées dans les surnageants de culture par Luminex® (Life

Technologies) ou ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) suivant les recommandations du fournisseur.

## 7. Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism a été utilisé pour analyser les résultats. Toutes les données sont exprimées en médiane (min-max). Un test de normalité a montré que les résultats ne suivent pas de distribution normale, et des tests non-paramétriques ont été utilisés. Des comparaisons statistiques ont été effectuées par les tests de Kruskal-Wallis (quand trois stimulations ou plus étaient comparées) ou le test de Mann-Whitney (quand deux conditions étaient comparées). Le test était considéré significatif quand  $p < 0,05$ .

### B. Résultats

1. L'asthme sévère est associé à une diminution de l'activation et de la cytotoxicité des cellules NK en réponse à la stimulation des CMN avec des molécules mimant des pathogènes

L'effet de la stimulation des cellules mononucléées sur l'activation des cellules NK a été mesuré grâce à l'expression de CD69 (Figure 2a). Suite à la stimulation avec le cocktail de cytokines IL-12 et IL-15, avec le PIC (l'agoniste de TLR3), le R848 (l'agoniste de TLR7/8) ou le CpG (l'agoniste de TLR9), la proportion de cellules NK CD69<sup>+</sup> augmente significativement chez les donneurs sains comparativement à la condition milieu, ce qui suggère que les cellules NK sont activées. De même, les cellules NK de patients asthmatiques sévères sont activées par la stimulation avec de l'IL-12 + IL-15, du R848 et du CpG. Cependant, en réponse au PIC, la proportion de cellules NK est significativement diminuée chez les patients asthmatiques sévères comparés aux donneurs sains.

La cytotoxicité des cellules NK a été évaluée grâce l'expression du CD107a et le relargage de granzyme B dans les surnageants des cellules mononucléées après la coculture avec les cellules cibles K562 (Figure 2b, 2c). Après la stimulation des cellules mononucléées avec l'IL-12 et l'IL-15, le PIC, le R848 et le CpG, les cellules NK des donneurs sains ont montré des signes de dégranulation puisque la proportion de cellules NK CD107a<sup>+</sup> augmente significativement comparativement à la condition en milieu. La concentration de granzyme B dans les surnageants était significativement augmentée en réponse à l'IL-12 et l'IL-15, et non significativement en réponse au PIC et au R848. De même, les cellules NK de patients asthmatiques sévères ont montré des signes de dégranulation en réponse à l'IL-12 et l'IL-15, le R848 et le CpG. Cependant,

le pourcentage de cellules NK CD107a<sup>+</sup> est significativement diminué en réponse au PIC, au R848 et au CpG chez les patients asthmatiques sévères comparés aux donneurs sains. La concentration en granzyme B est diminuée dans les surnageants de culture des cellules mononucléées des patients asthmatiques sévère après la stimulation au PIC, mais pas avec les autres stimulations. Aucune différence n'a été observée entre les différents phénotypes d'asthme sévère, comme l'asthme allergique vs non allergique, l'asthme éosinophilique vs non-éosinophilique, l'indice de masse corporel supérieur à 30 vs inférieur à 30, exacerbateurs ou non exacerbateurs. La comparaison entre les patients asthmatiques sévères traités par corticothérapie orale et les patients non traités n'a pas montré de différence. Ces résultats indiquent que les cellules NK des patients souffrant d'asthme sévère présentent une activation et une cytotoxicité altérée en réponse au CpG, au R848 et au poly(I :C).

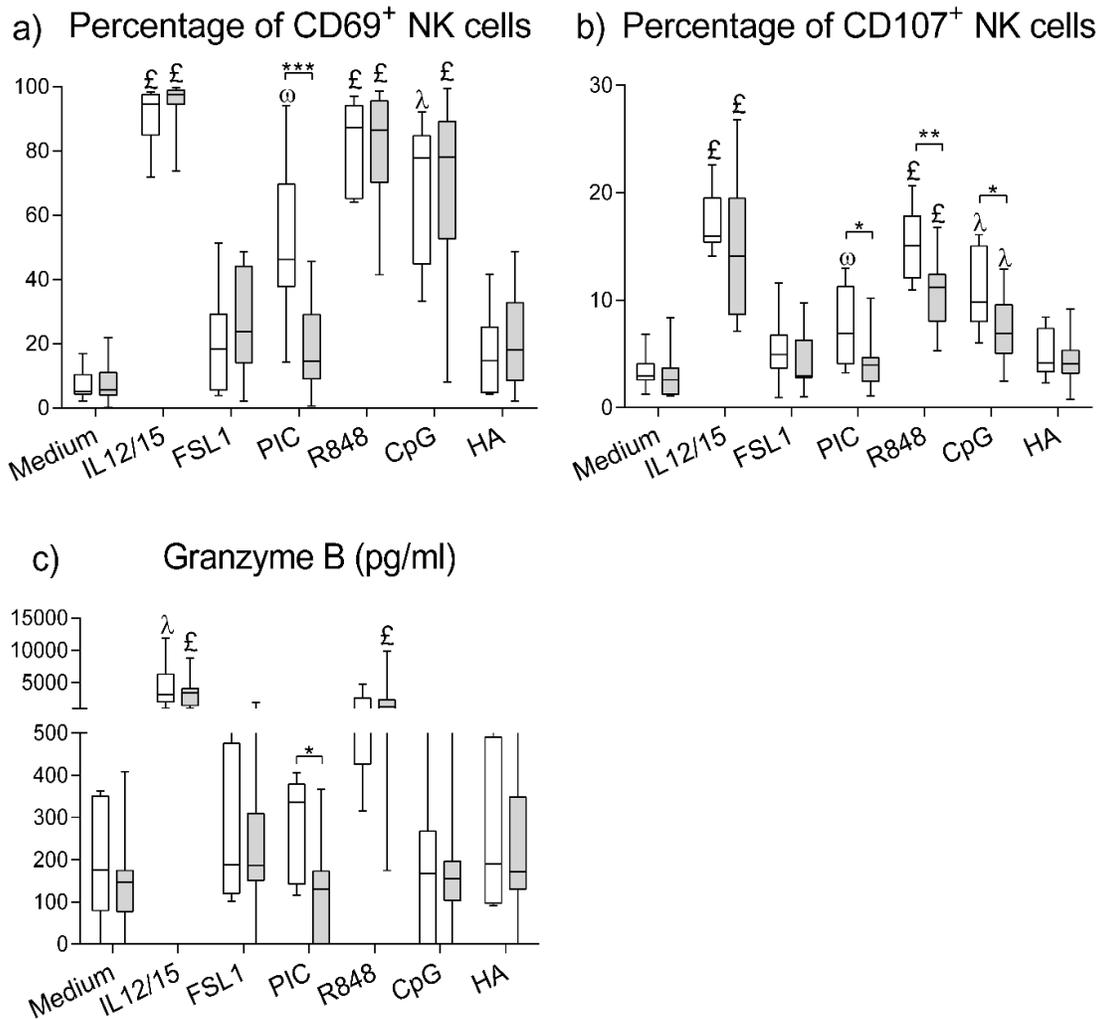
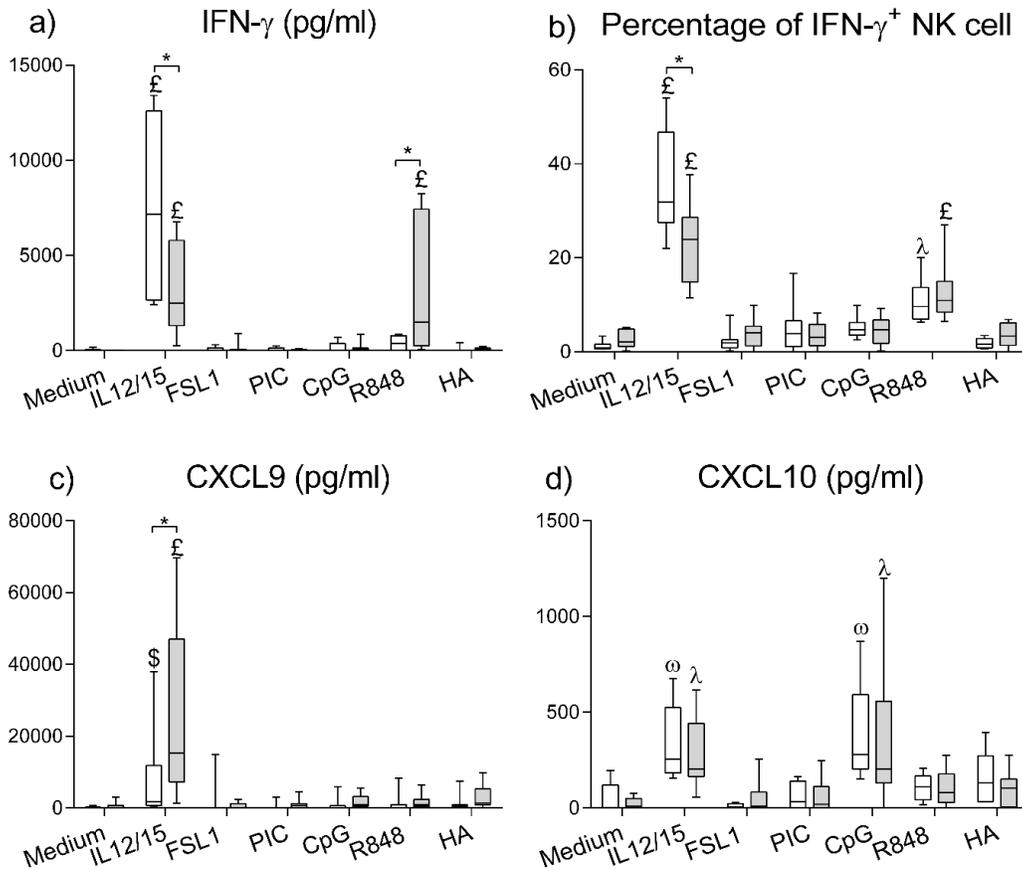


Figure 2 : Les cellules NK des patients asthmatiques sévères présentent une activation défectueuse suite à la stimulation des cellules mononucléées (CMN) avec des molécules mimant des composés microbiens. Les CMN de patients asthmatiques sévères et de donneurs sains ont été stimulées avec de l'IL-12 + IL-15, du FSL1 (l'agoniste de TLR2/6), de l'acide polyinosinic-polycytidylic (PIC, l'agoniste de TLR3), du resiquimod (R848, l'agoniste de TLR7/8), des oligonucléotides CpG (CpG, l'agoniste de TLR9), ou de l'hémagglutinine A de l'influenza A (HA, reconnu par le NKp46) pendant 24h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules NK positive pour le (a) CD69 ou (b) CD107a. (c) La concentration en granzyme B dans les surnageants des CMN est exprimée en pg/ml. Les comparaisons statistiques entre la condition milieu et les conditions de stimulations ont été calculées avec un test de Kruskal-Wallis ( $\epsilon p < 0.0001$ ,  $\lambda p < 0.01$ ,  $\omega p < 0.05$ ). Les donneurs sains (n=8, en blanc) et les patients asthmatiques sévères (n=14, en gris) ont été comparés avec un test de Mann-Whitney ( $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$ )

2. L'asthme sévère est associé à une diminution de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK en réponse à la stimulation avec l'IL-12+IL-15

L'IFN- $\gamma$  est la principale cytokine rapidement exprimée et produite par les cellules NK activées. La stimulation des CMN avec de l'IL-12+IL-15 augmente significativement la production d'IFN- $\gamma$  (Figure 3a), et la production de chimiokines induites par l'IFN- $\gamma$ , CXCL9 et CXCL10 (Figure 3c et 3d). Cependant, bien que la production d'IFN- $\gamma$  par les CMN de patients asthmatiques sévères soient plus faibles comparativement aux donneurs sains, les niveaux de CXCL9 et de CXCL10 sont augmentés ou inchangés, respectivement. Bien qu'aucune autre stimulation n'ait induit le CXCL9, la concentration en CXCL10 augmente significativement avec la stimulation CpG, similairement chez les deux types de patients, suggérant la régulation différentielle de ces deux chimiokines inductibles par l'interféron. Les cellules NK sont l'une des sources cellulaires d'IFN- $\gamma$ , car la stimulation avec de l'IL-12 et de l'IL-15 augmente significativement la proportion de cellules NK IFN- $\gamma^+$  chez les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères (Figure 3b). Le pourcentage de cellules NK IFN- $\gamma^+$  était significativement diminué chez les patients asthmatiques sévères comparativement aux donneurs sains. Cependant, alors que la stimulation au R848 augmente significativement la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les CMN uniquement chez les patients asthmatiques sévères, le pourcentage de cellules NK IFN- $\gamma^+$  était augmenté dans les deux types de patients, suggérant que d'autres cellules produisent de l'IFN- $\gamma$  après la stimulation des CMN avec le R848. L'augmentation de l'expression et de la production d'IFN- $\gamma$  après la stimulation avec le R848, alors que la concentration de CXCL9 et CXCL10 n'est pas modifiée, renforce l'idée que la production de ces derniers sont indépendants de l'IFN- $\gamma$ . Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les cellules NK des patients souffrant d'asthme sévère peuvent également être déficientes dans leur capacité à produire la cytokine antivirale IFN- $\gamma$ .



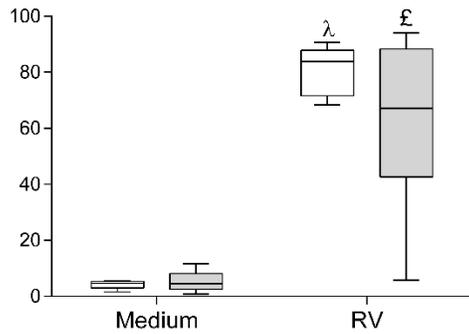
**Figure 3 : Diminution de la production d'IFN- $\gamma$  suivant la stimulation des CMN avec de l'IL-12+IL-15 mais augmentation de la production de CXCL9 et de CXCL10 chez les patients asthmatiques sévères.** Les CMN de patients asthmatiques sévères et de donneurs sains ont été stimulées avec de l'IL-12 + IL-15, du FSL1 (l'agoniste de TLR2/6), de l'acide polyinosinic-polycytidylic (PIC, l'agoniste de TLR3), du resiquimod (R848, l'agoniste de TLR7/8), des oligonucléotides CpG (CpG, l'agoniste de TLR9), ou de l'hémagglutinine A de l'influenza A (HA, reconnu par le NKp46) pendant 24h. (a) Concentration en IFN- $\gamma$  (pg/ml) dans les surnageants de culture. (b) Expression intracellulaire de l'IFN- $\gamma$  dans les cellules NK exprimée en pourcentage de cellules NK positive. (c) Concentration en CXCL9 et (d) CXCL10 (pg/ml). Les comparaisons statistiques entre la condition milieu et les conditions de stimulations ont été calculées avec un test de Kruskal-Wallis (£p<0.0001, §p<0.001, λp<0.01, ωp<0.05). Les donneurs sains (n=8, en blanc) et les patients asthmatiques sévères (n=14, en gris) ont été comparés avec un test de Mann-Whitney (\*p<0,05, \*\*\*p<0.001)

### 3. L'asthme sévère est associé à une réponse défectueuse des cellules NK à la stimulation in vitro avec RV

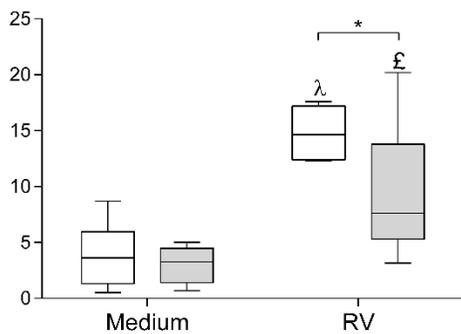
Pour mimer plus fidèlement les conditions pathophysiologiques, les CMN ont été stimulées avec le rhinovirus humain 9 (RV). Le rhinovirus augmente significativement la proportion de cellules NK CD69<sup>+</sup> chez les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères (Figure 4a), néanmoins le pourcentage de cellules NK CD69<sup>+</sup> est légèrement inférieur chez les patients asthmatiques

sévères comparativement aux donneurs sains. Les cellules NK purifiées ne sont pas activées par RV, suggérant que d'autres cellules activées par RV sont des intermédiaires nécessaires à l'activation des cellules NK (data non montrée). La proportion de cellules NK CD107<sup>+</sup> augmente significativement après la stimulation des CMN avec RV chez les deux types de patients, indiquant que les cellules NK étaient suffisamment activées pour dégranuler après l'ajout des cellules cibles. En parallèle, la libération de granzyme B augmente dans les surnageants de CMN (Figure 4c). Chez les patients asthmatiques sévères, la proportion de cellules NK CD107<sup>+</sup> et la concentration de granzyme B sont significativement diminuées comparé aux donneurs sains (Figure 4b, 4c). De même, le RV augmente l'expression d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et la production d'IFN- $\gamma$  dans les deux types de patients, mais l'expression et la production d'IFN- $\gamma$  sont significativement diminuées chez les patients asthmatiques sévères (Figure 4d, 4e). Ces résultats suggèrent que les cellules NK des patients asthmatiques sévères sont déficientes dans leur activation, leur cytotoxicité et leur production d'IFN- $\gamma$  en réponse au RV.

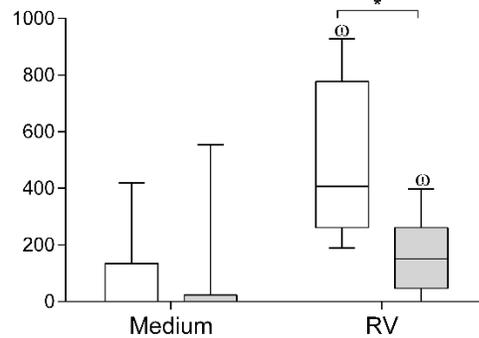
a) Pourcentage de CD69<sup>+</sup> NK cells



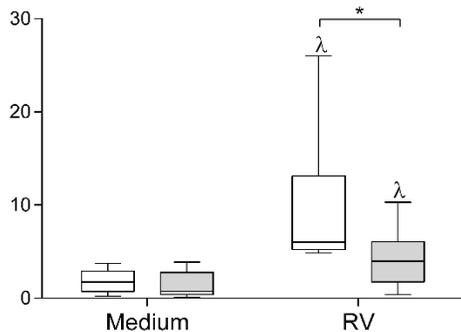
b) Pourcentage de CD107<sup>+</sup> NK cells



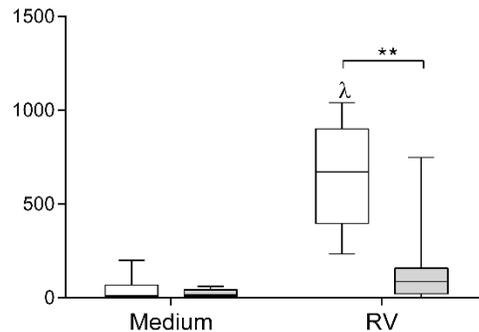
c) Granzyme B (pg/ml)



d) Pourcentage de IFN-γ<sup>+</sup> NK cells



e) IFN-γ (pg/ml)



**Figure 4 : Les cellules NK de patients asthmatiques sévères présentent une diminution de la cytotoxicité et de l'expression d'IFN-γ suivant la stimulation des CMN avec un rhinovirus humain (RV). Les CMN de donneurs sains (n=6, en blanc) et de patients asthmatiques sévères (n=9, en gris) ont été stimulées avec du HRV. (a) Pourcentage de cellules NK positives CD69 et (b) CD107a. (c) Concentration de granzyme B dans les surnageants de CMN. (d) Proportion de cellules NK IFN-γ<sup>+</sup> et (e) concentration en IFN-γ dans les surnageants de CMN. Les comparaisons statistiques entre la condition milieu et la condition HRV ont été effectuées avec un test de Mann-Whitney (£p<0.0001, λp<0.01, ωp<0.05). Les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères ont été comparés avec un test de Mann-Whitney (\*\*p<0.01, \*p<0.05).**

#### 4. Les cellules NK des patients asthmatiques sévères présentent un phénotype d'épuisement

Comme la stimulation des cellules NK par le RV est un processus indirect, nous nous sommes demandé si les cellules NK des patients asthmatiques sévères étaient intrinsèquement déficientes ou répondaient à une stimulation déficiente. L'IL-12 et l'IL-15 stimulent directement les cellules NK purifiées, et conduit à l'augmentation de l'expression d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Figure 5a) et à l'augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK purifiées provenant des deux types de donneurs (Figure 5b). Cependant, la proportion de cellules NK IFN- $\gamma^+$  et la concentration d'IFN- $\gamma$  sont significativement diminuées chez les patients asthmatiques sévères comparativement aux donneurs sains, suggérant que les cellules NK de patients asthmatiques sévères présentent un défaut intrinsèque à l'origine de la diminution de l'expression et de la production d'IFN- $\gamma$ . Par conséquent, bien que plusieurs autres cellules puissent se comporter anormalement chez les patients asthmatiques sévères en réponse au RV, les cellules NK présentent des fonctions intrinsèquement anormales.

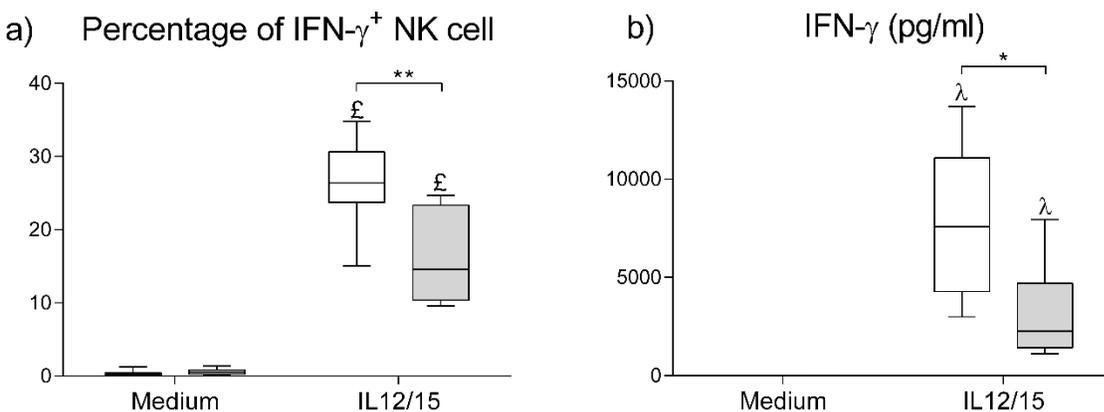
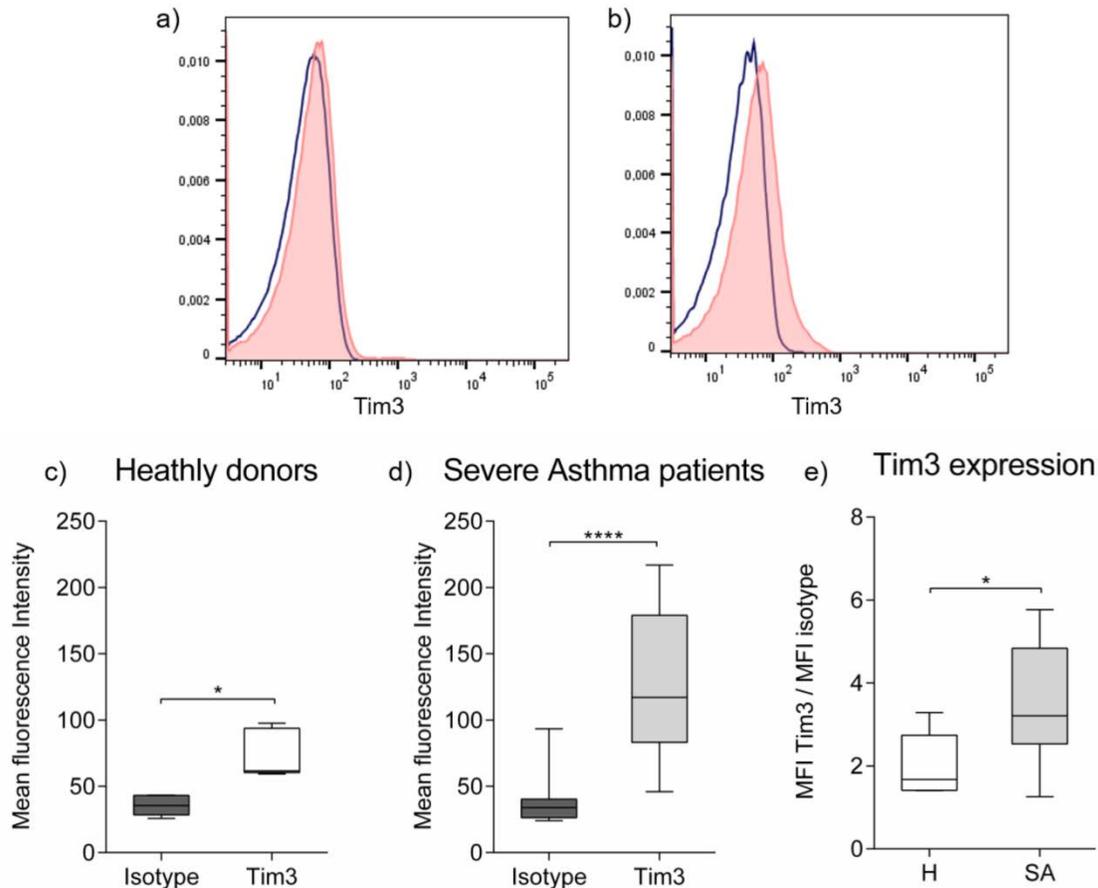


Figure 5 : Défaut d'expression et de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK de patients souffrant d'asthme sévère après leur stimulation directe avec de l'IL-12+IL-15. Les cellules NK de donneurs sains (n=8, en blanc) et de patients asthmatiques sévères (n=9, en gris) ont été purifiées et stimulées avec de l'IL-12+IL-15. (a) Pourcentage de cellules NK IFN- $\gamma^+$  et (b) concentration en IFN- $\gamma$  dans les surnageants de cellules NK. Les comparaisons statistiques entre la condition milieu et IL-12+IL-15 ont été calculées avec un test de Mann-Whitney ( $\xi p < 0.0001$ ,  $\lambda p < 0.01$ ). Les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères ont été comparés avec un test de Mann-Whitney (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

Un nombre croissant d'études suggèrent que les cellules NK peuvent devenir fonctionnellement épuisées lors d'infections chroniques. Les checkpoints moléculaires ou marqueurs d'épuisement NKG2A et le programmed cell death protein (PD-1) ont été détectés dans les cellules NK mais leur expression n'est pas modifiée entre les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères (data non montrée). Toutefois, l'expression de Tim 3 par les cellules NK est significativement

augmentée chez les patients asthmatiques sévères comparativement aux donneurs sains (Figure 6). Cette augmentation est restreinte aux cellules NK puisque l'expression de Tim 3 par les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> est identique entre les donneurs sains et les patients asthmatiques sévères (data non montrée). Ces résultats suggèrent que les cellules NK de patients asthmatiques sévères pourraient être épuisées, ce qui pourrait expliquer en partie la diminution de leurs fonctions effectrices en réponse aux composés mimant des microbes et en réponse au RV.



**Figure 6 : Augmentation de l'expression de Tim 3 par les cellules NK de patients asthmatiques sévères.** Les CMN ont été obtenus de donneurs sains (n=7) et de patients asthmatiques sévères (n=15), et marqués avec un anticorps monoclonal spécifique de Tim 3 ou avec un anticorps isotype contrôle. Un histogramme représentatif est présenté pour (a) les donneurs sains, et (b) pour les patients asthmatiques sévères, avec le marquage Tim 3 en gris et l'isotype contrôle en blanc. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est présentée pour Tim 3 et l'isotype contrôle pour les donneurs sains (c) et les patients asthmatiques sévère (d). Les ratios MFI Tim 3/MFI Isotype contrôle ont été comparés entre les donneurs sains (en blanc) et les patients asthmatiques sévères (en gris). \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001 (Test de Wilcoxon comparés l'isotype apparié à Tim 3, ou test de Mann-Whitney entre les patients asthmatiques sévères et les donneurs sains).

### C. Discussion

Dans cette étude, nous avons exploré les fonctions des cellules NK chez les patients asthmatiques sévères et les donneurs sains en réponse aux stimulations avec des molécules mimant des virus ou un virus humain. Nous avons choisi de stimuler les cellules mononucléées afin de permettre aux cellules accessoires d'interagir avec les cellules NK.

Pour mimer la stimulation des cellules mononucléées humaines avec RV, nous avons d'abord utilisé des agonistes synthétiques de TLRs et des cytokines produites durant l'infection virale. La stimulation avec IL-12+IL-15 ou via les TLRs impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques conduit à l'activation et la dégranulation significative des cellules NK chez les deux types de donneurs. L'expression de CD69 par les cellules NK est significativement diminuée chez les patients asthmatiques sévères uniquement après la stimulation du TLR3, et l'expression du CD107 est significativement diminuée après la stimulation de TLR3, TLR7/8 et TLR9. Le CD69 a été décrit à l'origine comme un marqueur d'activation précoce, mais il peut potentiellement réguler d'autres fonctions comme la rétention tissulaire et le métabolisme des cellules (Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017). De plus, les cellules NK associées aux tumeurs expriment des pourcentages élevés de CD69 mais possèdent une faible activité cytotoxique (Bellora et al., 2014), ce qui suggère que l'expression de CD69 peut être dissociée de la dégranulation des cellules NK. L'altération de la fonction cytotoxique des cellules NK après la stimulation des CMN avec de l'IL-12+IL-15 ou des TLRs impliqués dans la réponse immunitaire contre RV (TLR3 et TLR7/8) chez les patients asthmatiques sévères, est compatible avec les études publiées précédemment montrant que les cellules NK du sang périphérique des patients asthmatiques sévères présentent une cytotoxicité diminuée contre les cellules cibles K562 après leur stimulation avec de l'IL-2 (Duvall et al., 2017). Un parallèle entre l'expression de CD107 et la production de granzyme B n'a été observé qu'après la stimulation du TLR3, ce qui suggère que d'autres cellules parmi les PBMC peuvent libérer du granzyme B comme publié précédemment (Boivin et al., 2009), et que cette sécrétion de granzyme B n'est pas affectée dans les CMN des patients asthmatiques sévères. La cytotoxicité défectueuse des cellules NK des patients asthmatiques sévères après stimulation du TLR3 et TLR7/8, tous deux impliqués dans la réponse immunitaire contre RV, est en accord avec la cytotoxicité réduite (CD107a et granzyme B) observée après l'activation avec le RV. La cytotoxicité défectueuse des cellules NK est également compatible avec l'augmentation de la charge virale observée chez les patients asthmatiques pendant l'infection (Kennedy et al., 2014).

Une autre fonction importante des cellules NK consiste à produire des cytokines, et plus particulièrement de l'IFN- $\gamma$ . Une diminution de l'expression et de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  par les

PBMC a été constatée chez les patients asthmatiques sévères comparativement aux sujets sains. De même, les cellules NK de patients souffrant de dermatite atopique expriment moins d'IFN- $\gamma$  après la stimulation des CMN avec du phorbol-myristate acetate (PMA) et de la ionomycine (Luci et al., 2012). Bien la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK est dépendante de cellules accessoires après la stimulation des TLRs ou RV, nos résultats sur les cellules NK purifiées indiquent que le défaut de production IFN- $\gamma$  est, au moins partiellement, intrinsèque, c'est-à-dire indépendant des autres cellules.

Comme il a été montré *in vivo* (Hosoki et al., 2015) ou *in vitro* avec un autre type de cellules (Tan et al., 2018), nous avons observé une augmentation de la concentration en CXCL9 dans les surnageants de CMN de patients souffrant d'asthme sévère après stimulation avec de l'IL-12+IL-15. Les monocytes peuvent être la source de CXCL9, comme montré précédemment après stimulation avec de l'IL-12+IL-18, indépendamment de l'IFN- $\gamma$  (Coma et al., 2006). Nous n'avons pas pu détecter de cytokine soluble impliquée dans la stimulation des cellules NK, comme des IFN de type 1, IL-12, IL-15 ou IL-18, dans les surnageants de CMN après la stimulation des TLRs ou RV (data non montrées). Ces cytokines peuvent être déjà utilisées par des cellules, non impliquées, ou peuvent stimuler les cellules NK sous leur forme membranaire comme indiqué pour l'IL-15 (Ferlazzo et al., 2004) ou pour l'IL-18 qui peut être libérée à proximité immédiate des cellules NK (Bellora et al., 2012).

Nous n'avons pas pu montrer de diminution de l'expression des récepteurs aux composés microbiens sur les cellules chez les patients asthmatiques sévères (data non montrée). Par conséquent, nous nous sommes concentrés sur les signes d'épuisement des cellules NK. L'épuisement des cellules immunitaires décrit l'état de dysfonctionnement des cellules immunitaires, généralement dans le cadre de tumeurs ou d'infections chroniques, caractérisé par une diminution des fonctions effectrices et associé à une augmentation de l'expression des molécules de points de contrôle (checkpoint molecules) (Lima et al., 2017). Par exemple, chez les patients infectés par le VIH, les cellules NK polyfonctionnelles CD62L<sup>+</sup> expriment des taux élevés de programmed-cell death-1 (PD-1), NKG2A et T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing (Tim)-3. L'expression de ces marqueurs à la surface des cellules NK est associée à une diminution de la cytotoxicité et de l'expression de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation de TLR3 (Lima et al., 2017). Nous avons montré ici que l'expression de Tim-3 par les cellules NK était plus élevée chez les patients asthmatiques sévères comparativement aux donneurs sains. Ce résultat suggère que les cellules NK de patients asthmatiques sévères pourraient être épuisées, ce qui conduit à une activation inefficace des cellules NK en réponse au RV.

L'implication des corticostéroïdes dans le défaut des cellules NK doit être remise en question. En effet, les traitements pour l'asthme sévère sont principalement constitués de doses élevées de corticostéroïdes inhalés et/ou systémiques comme agents anti-inflammatoires. Il a été démontré que l'injection intramusculaire de triamcinolone modifie le phénotype des cellules NK dans les lavages broncho-alvéolaires. En outre, le traitement *in vitro* des CMN par la dexaméthasone inhibe la capacité des cellules NK à lyser des cellules cibles K562, tant chez les donneurs sains que chez les patients asthmatiques sévères (Duvall et al., 2017). Dans notre étude, tous les patients asthmatiques sévères ont été traités avec des corticostéroïdes inhalés, et 45,2% d'entre eux recevaient des corticostéroïdes systémiques. Cependant, la cytotoxicité et l'expression d'IFN- $\gamma$  ne sont pas modifiées entre les patients avec et sans corticostéroïdes systémiques (data non montrée). Nous avons analysé l'expression de Tim 3 sur des cellules NK après un traitement *in vitro* de CMN provenant de trois donneurs sains différents avec des doses croissantes de dexaméthasone. La dexaméthasone n'a pas augmenté l'expression de Tim 3, mais a réduit la viabilité des cellules NK à la dose la plus élevée (1 $\mu$ g/ml) (data non montrée). Par conséquent, bien que les corticostéroïdes puissent certainement modifier la réponse immunitaire induite par les cellules NK chez les patients asthmatiques sévères, et donc avoir des effets indésirables dans les exacerbations asthmatiques induites par le HRV, notre étude suggère fortement qu'un défaut des cellules NK peut être lié au statut asthmatique sévère plutôt qu'au traitement.

En conclusion, nous avons constaté que les cellules NK de patients asthmatiques sévères ont des fonctions altérées *in vitro* en réponse au rhinovirus. Ce défaut peut être lié à l'épuisement des cellules NK et peut participer à la sévérité des exacerbations de l'asthme d'origine virale chez les patients asthmatiques sévères. L'épuisement des cellules NK peut également être responsable de la diminution de la cytotoxicité des cellules NK contre les éosinophiles (Duvall et al., 2017). Par conséquent, notre étude souligne que les fonctions aberrantes des cellules NK peuvent participer à l'aggravation et à l'exacerbation de l'asthme viro-induit.

## **PARTIE 2 : Les cellules NK ne jouent pas de rôle dans le développement de la maladie asthmatique mais sont modifiées dans les poumons**

### A. Matériels et Méthodes

#### 1. Souris et modèle d'asthme allergique

Les souris wild-type ont été obtenues des Laboratoires Janvier. Les souris NKp46<sup>iCre</sup> ont été fournies par le Pr. Eric Viver (Narni-Mancinelli et al., 2011) : les cellules NKp46<sup>+</sup> de ces souris expriment la Cre-recombinase. Les souris Gt(ROSA)26Sortm1(DTA)Mrc sont notées ROSA<sup>DTA</sup> et ont été fournies par les Pr Bart Lambrecht et Hamida Hammad : ces souris possèdent le gène de la chaîne  $\alpha$  de la toxine diphtérique précédé d'un codon STOP qui est entouré de deux loxP sites (Voehringer et al., 2008). Les souris ROSA26iDTR sont notées ROSA<sup>DTR</sup> et ont été obtenues auprès des Dr Gérard Eberl et Ari Waisman (Buch et al., 2005) : ces souris possèdent le gène du récepteur de la toxine diphtérique précédé d'un codon STOP. Toutes ces souris ont un fond génétique C57BL/6. Les souris issues du croisement entre les souris NKp46<sup>iCre</sup> et ROSA<sup>DTA</sup> ou ROSA<sup>DTR</sup> sont notées respectivement NKp46-DTA et NKp46-DTR : dans les cellules NKp46<sup>+</sup>, la Cre recombinase excise le codon STOP permettant l'expression de la chaîne  $\alpha$  de la toxine diphtérique ou du récepteur à la toxine diphtérique, les souris NKp46-DTA sont donc constitutivement dépourvues de cellules NKp46<sup>+</sup> alors que dans les souris NKp46-DTR, la déplétion des cellules NKp46<sup>+</sup> peut être induite par une injection intra-péritonéale ou intraveineuse de toxine diphtérique. Toutes les souris sont issues de croisements hétérozygotes : les souris wild type issues de ces croisements ont été utilisées comme contrôles et notées littermate. Toutes les souris étaient des femelles et étaient âgées de 6 à 10 semaines. Les souris ont été hébergées et élevées au sein du Plateau Technique d'Expérimentation et de Haute Technologie Animale (PLEHTA) de l'Institut Pasteur de Lille, dans des cages ventilées avec un cycle jour/nuit contrôlé, de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Les expériences sont conformes à la loi française et ont reçu l'approbation du Comité D'Ethique Animale (n° 7874-2016070417344442v3).

La sensibilisation et les traitements des souris sont résumés dans la Figure 1.

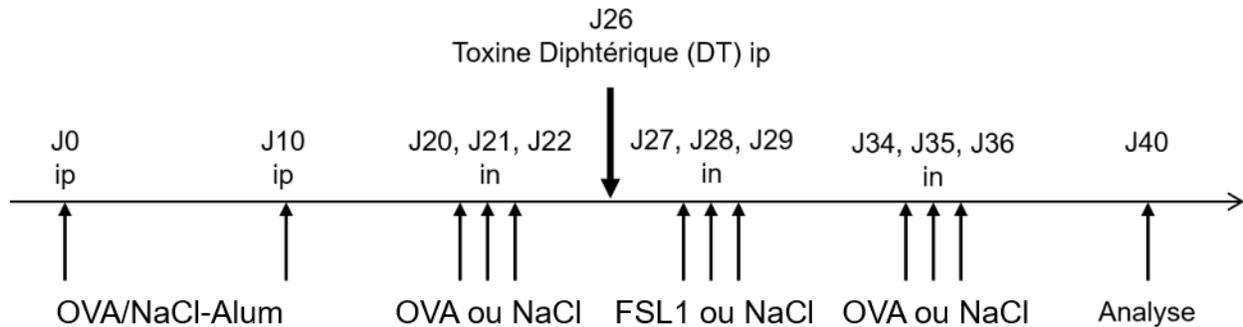


Figure 1 : Sensibilisation et traitements des souris. Les souris Wild type, NKp46-DTA et NKp46-DTR, et leurs contrôles littermate ont été sensibilisées aux jours 0 et 10 par une injection intrapéritonéale de 20µg d'ovalbumine (OVA) ou de la solution physiologique (NaCl) émulsionné dans 200µl d'aluminium hydroxide. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et ont reçu 100µg d'ovalbumine dans 25µl de NaCl aux jours 20, 21, 22, 34, 35 et 36. Le traitement avec l'agoniste de TLR2/6 (la lipoprotéine diacylée synthétique FSL1, Invivogen, San Diego, USA) a été administrée au jour 27, 28 et 29 par instillation intranasale (0,5µg/25µl). Pour dépléter les cellules NK, les souris NKp46-DTR ont reçu une injection intrapéritonéale de 200ng de toxine diphtérique au jour 26. 96 heures après la dernière instillation d'ovalbumine, les caractéristiques de l'asthme expérimental ont été analysées.

## 2. Mesure de la résistance pulmonaire

La résistance pulmonaire des souris a été mesurée par Flexivent® (Scireq®, Montreal, Canada). Les souris ont été anesthésiées (5ml/kg de 10% de medetomidine (Pfizer) et 10% kétamine (Merial)) et immédiatement intubées et ventilées avec un cathéter de 18G. La fréquence respiratoire a été fixée à 150 respirations par minute à un volume courant de 0,2ml, et une pression expiratoire positive de 2ml H<sub>2</sub>O a été appliquée. Les souris ont été exposées à du PBS nébulisé puis à de la métacholine nébulisée à des concentrations croissantes (de 5 à 100mg/ml dans du PBS) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Pour chaque dose, 10 cycles de nébulisations et de mesures ont été réalisés. La résistance pulmonaire a été mesurée par la technique d'oscillation forcée à fréquence unique. Le coefficient de détermination (COD) est un paramètre de contrôle de la qualité qui mesure la qualité de l'ajustement du modèle. Les valeurs de résistance correspondantes à des valeurs de COD supérieur à 0,95 ont été conservées. Pour chaque dose, la valeur maximale de la résistance pulmonaire a été retenue et exprimée en pourcentage de la valeur de la résistance maximale mesurée par rapport à la valeur mesurée en PBS (% d'augmentation par rapport au PBS).

## 3. Composition cellulaire du lavage broncho-alvéolaire

96 heures après la dernière instillation intranasale d'ovalbumine, et immédiatement après la mesure de la résistance pulmonaire, les poumons ont été lavés via la canule trachéale avec 1ml

de PBS. Les leucocytes totaux ont été comptés sur lame de Thoma, cytocentrifugés (Shandon cytospin 4 ; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham Massachussets) et colorés avec du May Grünwald Giemsa. Les macrophages, les éosinophiles, les neutrophiles et les lymphocytes ont été différentiellement identifiés et comptabilisés.

#### 4. Analyse de l'expression des gènes

Les extraits de poumons ont été conservés pendant au moins 24 heures dans du RNA later. Les ARN ont été isolés avec de l'acide guanidium thiocyanate et de l'éthanol selon les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les ADN complémentaires ont été obtenus par transcription inverse des ARN extraits (Applied Biosystems, Forter City, Calif). Les PCRs en temps réel ont été réalisées avec les primers listés dans le Tableau 1 et analysées sur le StepOne Software v2. Une fois l'amplification PCR terminée, une analyse de la courbe de fusion a été effectuée, confirmant la présence d'un seul amplicon. Les taux relatifs d'ARNm ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ont été déterminés en comparant le seuil du cycle PCR (Ct) pour le gène d'intérêt et le seuil du gène d'intérêt (GAPDH).

Gène	Séquence Sens	Séquence Anti-Sens
IL-5	5'-AACCCCTGAAGTTTCAGGACTCGCCTT-3'	5'- TCTTCAGCGCTGGCCTTCAGCAA-3'
IL-10	5' – GGTTGCCAAGCCTTATCGGA -3'	5' – ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-13	5'- GGGTGACTGCAGTCCTGGCT-3'	GTTGCTCAGCTCCTCAATAAGC-3'
IL-17	5'- TCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3'	TGAGCTTCCCAGATCACAGA -3'
IFN- $\gamma$	5'- TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'	5'- TGGCTCTGCAGGATTTTCATG -3'

Tableau 1 : Séquence des primers

#### 5. Quantification des niveaux de cytokines et de chimiokines

Pour l'extraction protéique, un lobe pulmonaire a été congelé dans l'azote liquide puis homogénéisé mécaniquement dans un tampon de lyse à froid (20mM Tris-HCl, 0,14M NaCl, 10% de glycérol et 20mg/ml de leupeptine). Les échantillons ont été conservés sur de la glace pendant 30 minutes suivis d'une centrifugation pour éliminer les débris. La quantité de protéines totales (Bradford Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif) et les quantités de cytokines et de chimiokines (R&D systems, Minneapolis, Minn) ont été mesurées. Les résultats sont exprimés en nanogrammes par milligrammes de protéines totales.

## 6. Mesure de la concentration d'IgE sérique

Les concentrations en IgE sériques ont été mesurées par ELISA. Des plaques 96 puits (Corning, Avon, France) ont été coatées avec un anticorps anti-IgE (2µg/ml, clone R35-72, BD Biosciences). Les sérums et la gamme ont été incubés sur la nuit à 4°C puis marqués avec un anticorps spécifique d'IgE biotinylé. La streptavidine-HRP a été incubée 20 minutes à température ambiante, puis le substrat TMB a été ajouté pendant environ 10 minutes. La réaction colorimétrique a été arrêtée avec de l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et la plaque a été enregistrée sur le MultiskanAccent (Thermofisher) à une densité optique (DO) de 450nm.

## 7. Cytométrie en flux

Nous avons détecté et quantifié simultanément les cellules NK dans les compartiments vasculaires marginés ou interstitiels dans les poumons de souris, comme décrit précédemment (153). Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et ont reçu par injection intraveineuse 4µg d'un anticorps anti-CD45-PeCy7 (clone 30-F11, Biolegend). Après 5 minutes, permettant la circulation de l'anticorps, les animaux ont été euthanasiés par une injection intrapéritonéale d'Euthazol (Barletta et al., 2012). La circulation pulmonaire a été lavée avec 10ml de PBS et les poumons ont été prélevés. Les cellules pulmonaires ont été isolées par digestion dans une solution de Collagénase IV/DNase, puis centrifugées dans une solution de Percoll. Elles ont ensuite été comptées et marquées *in vitro*.

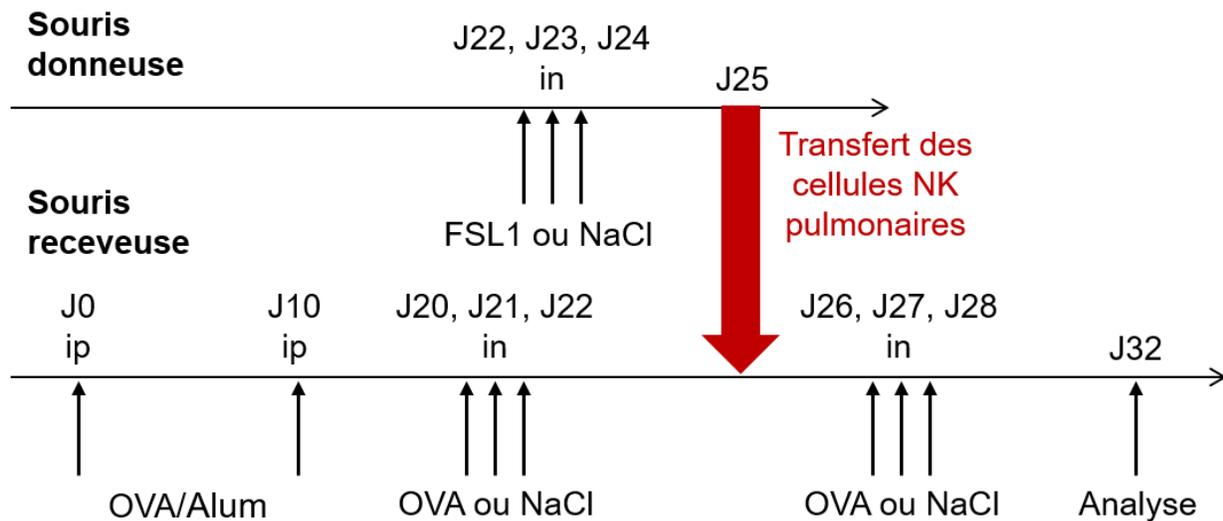
Les anticorps suivants ont été utilisés (les clones sont notés entre parenthèses) : PerCP anti-mouse CD45 (I3/2.3), FITC anti-mouse CD3 (17A2), BV421 anti-mouse NK1.1 (PK136), PeCy5 anti-mouse CD69 (H1.2F3) et AF647 anti-mouse NKp46 (29A1.4) (Biolegend, San Diego, USA). La viabilité des cellules a été analysée avec du Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (Biolegend, San Diego, USA). Après leur purification, les cellules pulmonaires ont été incubées 20 minutes avec le marqueur de viabilité, à température ambiante puis avec les anticorps pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été fixées pendant 20 minutes dans une solution à 1% paraformaldéhyde dans du PBS.

Les résultats ont été acquis sur le cytomètre Canto II (Beckton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA) et analysés grâce au logiciel FlowJo. Les cellules NK ont été identifiées comme une population lymphoïde CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>. Les cellules NK marginées sont doublement positives pour le CD45 PeCy7 et le CD45 PerCP, alors que les cellules parenchymateuses sont positives pour le CD45 PerCP.

## 8. Transfert des cellules NK

Les souris wild type ont été traitées comme montré sur la Figure 2.

Les souris donneuses ont été sacrifiées au jour 25. Les souris ont été euthanasiées et les cellules pulmonaires ont été isolées comme précédemment. Les cellules NK pulmonaires ont été marquées avec du CD3, NKp46, NK1.1 et la viabilité a été analysée avec du Zombie Viability Kit. Les cellules NK CD3-NK1.1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>Zombie<sup>-</sup> ont été triées sur l'ARIA II (BD Biosciences). La pureté des cellules NK étaient supérieures à 95%.



**Figure 2 : Protocole de transfert des cellules NK.** Les souris donneuses ont reçu du NaCl ou FSL1 (0,5µg par souris) aux jours 22, 23 et 24. Les souris receveuses ont été sensibilisées au jour 0 et 10 par une injection intrapéritonéale de 20µg d'ovalbumine (OVA) ou de solution physiologique (NaCl) émulsionnée dans 200µl d'aluminium hydroxyde. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et ont reçu 100µg d'ovalbumine dans 25µl du NaCl aux jours 20, 21 et 22. Le transfert de cellules NK a lieu au jour 25 par injection intraveineuse. Puis au jour 26, 27 et 28, les souris ont été anesthésiées et traitées avec de l'ovalbumine ou du NaCl. 96 heures après la dernière instillation d'ovalbumine, les caractéristiques de l'asthme expérimental ont été analysées.

## 9. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism. Tous les résultats sont exprimés en médiane (min-max) ou en médiane plus/moins l'écart à la moyenne. Un test de normalité a montré que les résultats ne suivaient pas une distribution normale, et des tests non paramétriques ont été utilisés. Les comparaisons entre trois groupes ou plus ont été effectuées par un test de Kruskal Wallis alors que les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées avec un test de Mann-Whitney. Les résultats sont considérés significatifs quand  $p < 0,05$ .

## B. Résultats

### 1. La déplétion ou l'absence constitutive de cellules NK n'affecte pas le développement de l'asthme allergique expérimental

#### a) La déplétion des cellules NK dans les souris ROSA<sup>DTR+</sup>NKp46<sup>iCre</sup> sur la réaction asthmatique expérimentale

Nous avons analysé l'effet de la déplétion des cellules NK dans notre modèle d'asthme expérimental induit par l'ovalbumine chez les souris ROSA<sup>DTR+</sup>NKp46<sup>iCre</sup> (noté NKp46-DTR) ou leur contrôle (noté littermate).

Dans les souris littermate, la sensibilisation à l'ovalbumine augmente la résistance pulmonaire (Figure 3). Le traitement des souris littermate par la toxine diphtérique ne peut modifier le compartiment des cellules NK. Néanmoins, l'administration de la toxine diphtérique aux souris littermate sensibilisées (littermate-OVA/DT) diminue la résistance pulmonaire comparativement aux souris littermate sensibilisées (littermate-OVA). Ainsi, même si la déplétion des cellules NK induite par l'injection de la toxine diphtérique diminue significativement la résistance pulmonaire des souris NKp46-DTR sensibilisées, il est difficile d'interpréter l'effet de la déplétion des cellules NK sur le développement de l'asthme dans ce modèle.

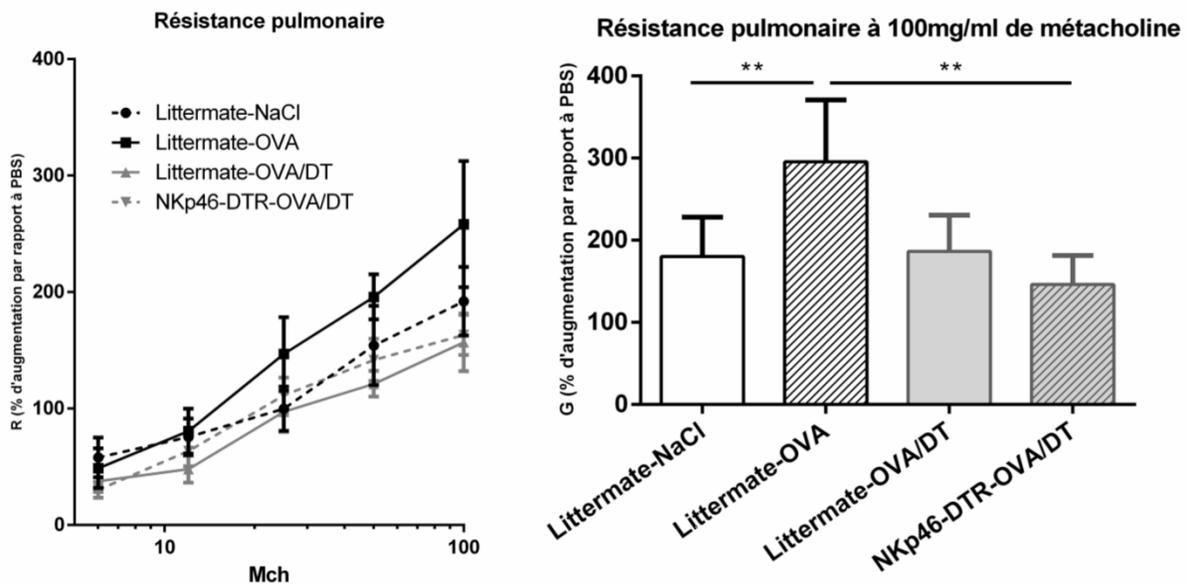


Figure 3 : Effet de la déplétion des cellules NK par la toxine diphtérique (DT) sur la résistance pulmonaire dans un modèle d'asthme expérimental. Le protocole expérimental est présenté dans la Figure 1. La résistance pulmonaire en réponse à des doses croissantes de métacholine (6 à 100 mg/ml) a été analysée par Flexivent®. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance pulmonaire

par rapport à la condition PBS en fonction des doses de métacholine. n=6 Littermate-NaCl, n=6 Littermate-OVA, n=5 Littermate-OVA/DT, n=7 NKp46-DTR-OVA/DT, \*\*p<0.01 (Test de Tukey)

Dans les souris littermate, la sensibilisation à l'ovalbumine augmente significativement le nombre total de cellules, le nombre de lymphocytes, de monocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) (Figure 4). Comme pour la résistance pulmonaire, l'administration de toxine diphtérique aux souris littermate/OVA (notées littermate-OVA/DT) diminue la cellularité des LBA comparativement aux souris littermate-OVA sans toxine diphtérique. Ainsi, même si la déplétion des cellules NK induite dans les souris NKp46-DTR sensibilisées diminue de manière non significative le nombre de cellules totales, le nombre

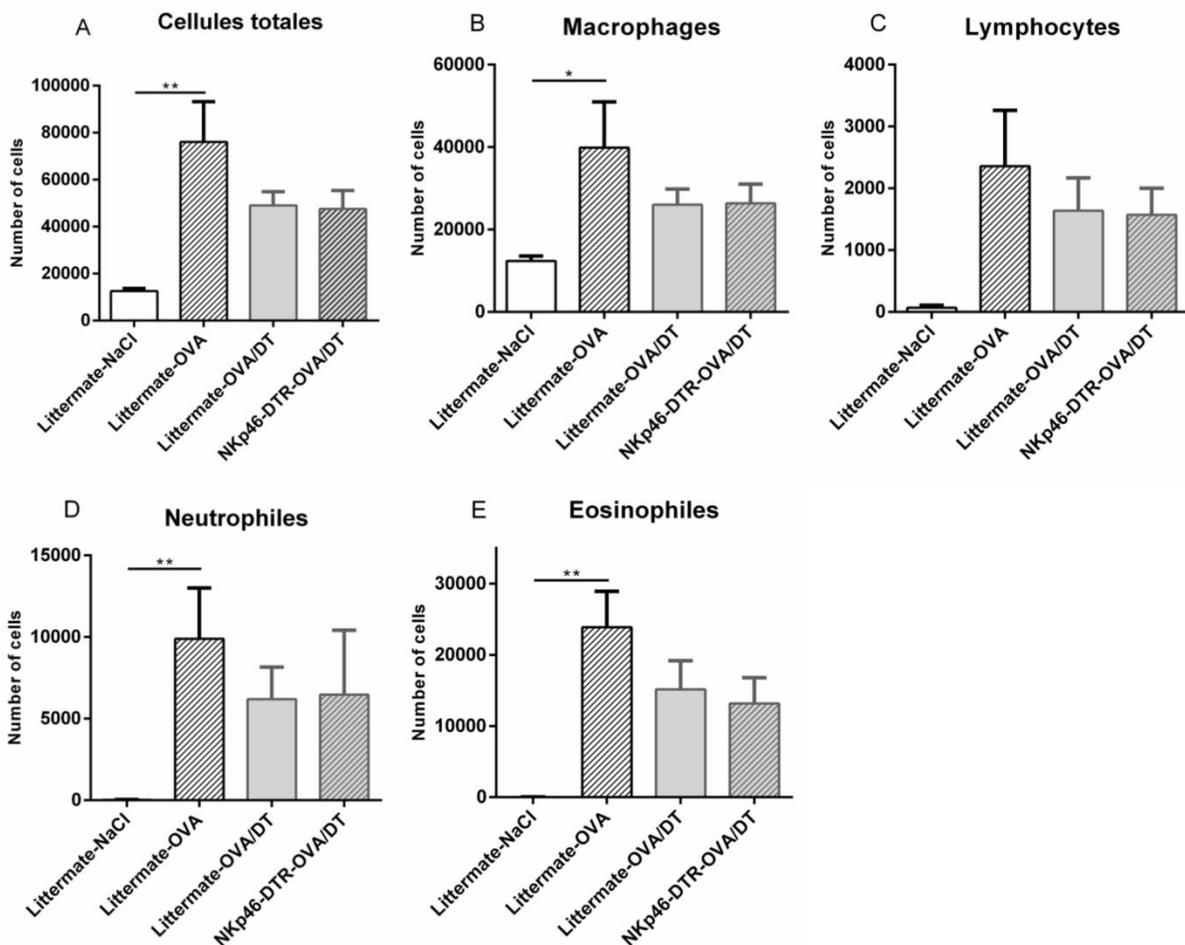


Figure 4 : Effet de la déplétion des cellules NK par la toxine diphtérique (DT) sur la composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires dans un modèle d'asthme expérimental. Les souris ont été traitées comme montré sur la Figure 1. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules. n=6 Littermate-PBS, n=6 Littermate-OVA, n=5 Littermate-OVA/DT, n=7 NKp46-DTR-OVA/DT, \* p<0.05, \*\*p<0.01 (Kruskal-Wallis)

Dans le sérum, la concentration en IgE totale augmente dans les souris littermate sensibilisées, les souris littermate-OVA/DT et les souris NKp46-DTR-OVA/DT comparativement aux souris littermate non sensibilisées (Figure 5). La concentration en IgE totales n'est pas modifiée entre les souris littermate-OVA/DT et les souris NKp46-DTR-OVA/DT. L'administration de la toxine diphtérique aux souris littermate OVA et aux souris NKp46-DTR ne modifie pas la concentration en IgE totales sérique comparativement aux souris littermate-OVA.

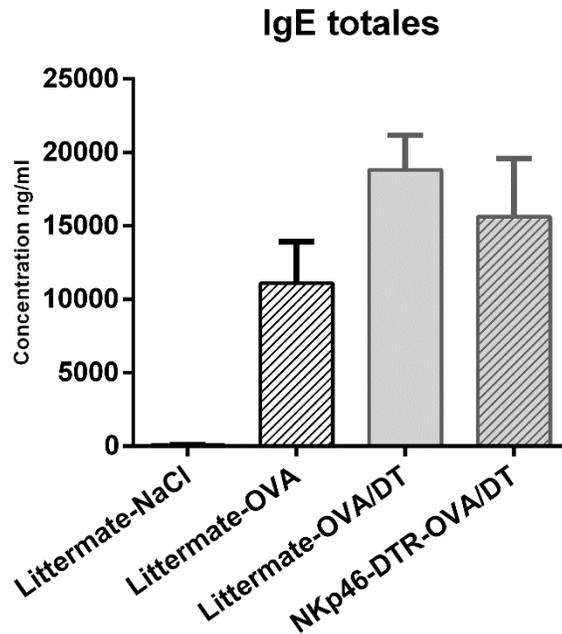


Figure 5 : Effet de la déplétion des cellules NK par la toxine diphtérique (DT) sur la concentration en IgE sérique dans un modèle d'asthme expérimental. Les souris ont été traitées comme montré sur la Figure 1. n=6 Littermate-PBS, n=6 Littermate-OVA, n=5 Littermate-OVA/DT, n=7 NKp46-DTR-OVA/DT

En conclusion, dans un modèle expérimental d'asthme induit par l'ovalbumine, l'administration de la toxine diphtérique à des souris littermate diminue la résistance pulmonaire et le nombre de cellules inflammatoires dans les LBA, compliquant l'interprétation dans les souris NKp46-DTR.

b) Effet de l'absence constitutive des cellules NK dans les souris ROSA<sup>DTA+</sup>NKp46<sup>+</sup> sur la réaction asthmatique expérimentale

Afin de s'affranchir des effets de la toxine diphtérique sur l'inflammation pulmonaire, nous avons utilisé des souris ROSA<sup>DTA+</sup>NKp46<sup>+</sup> (appelé NKp46-DTA) qui sont constitutivement dépourvues de cellules NK.

La résistance pulmonaire n'est pas modifiée chez les souris NKp46-DTA non sensibilisées par rapport aux souris littermate non sensibilisées (Figure 6). La résistance pulmonaire augmente significativement chez les souris sensibilisées, qu'elles soient littermate ou NKp46-DTA, comparativement aux souris non sensibilisées. Comparativement aux souris littermate sensibilisées, la résistance pulmonaire n'est pas modifiée chez les souris NKp46-DTA sensibilisées, montrant que l'absence de cellules NK n'a pas d'effet sur l'hyperréactivité bronchique dans notre modèle d'asthme allergique expérimental.

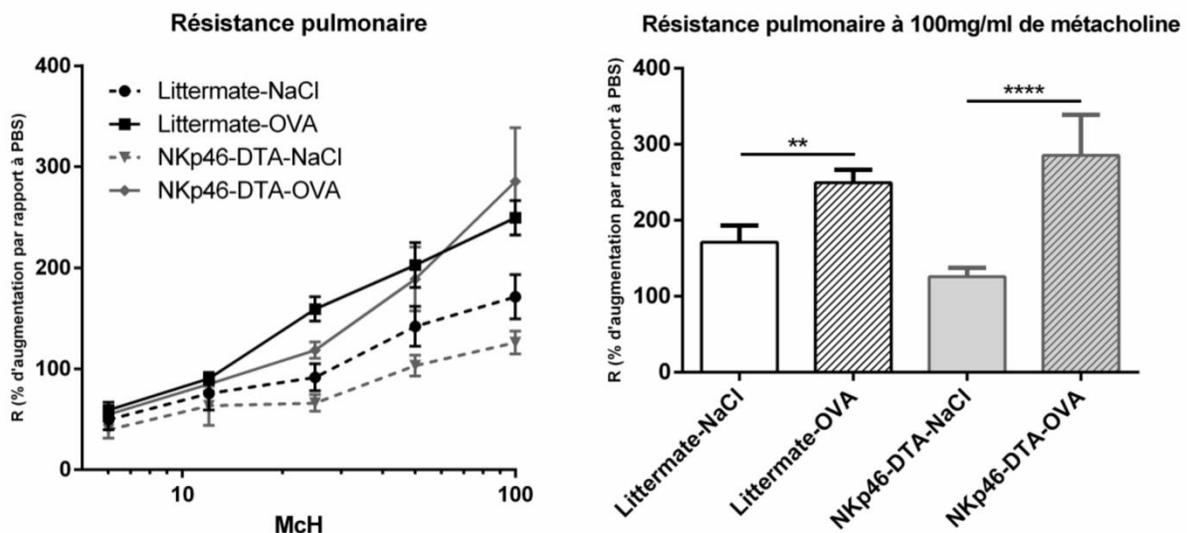


Figure 6 : Effet de l'absence constitutive des cellules NK sur la résistance pulmonaire dans un modèle d'asthme expérimental. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance pulmonaire par rapport à la condition PBS en fonction des doses de méthacholine. n=10 Littermate-PBS, n=12 Littermate-OVA, n=8 NKp46-DTA-PBS, n=11 NKp46-DTA-OVA, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (Test de Tukey)

De la même manière, la sensibilisation à l'ovalbumine augmente la cellularité dans les lavages broncho-alvéolaires (Figure 6) et la production d'IgE dans le sérum (Figure 7) que les souris soient littermate ou NKp46-DTA, suggérant que les cellules NK ne sont pas indispensables au développement d'un asthme allergique expérimental induit par l'OVA..

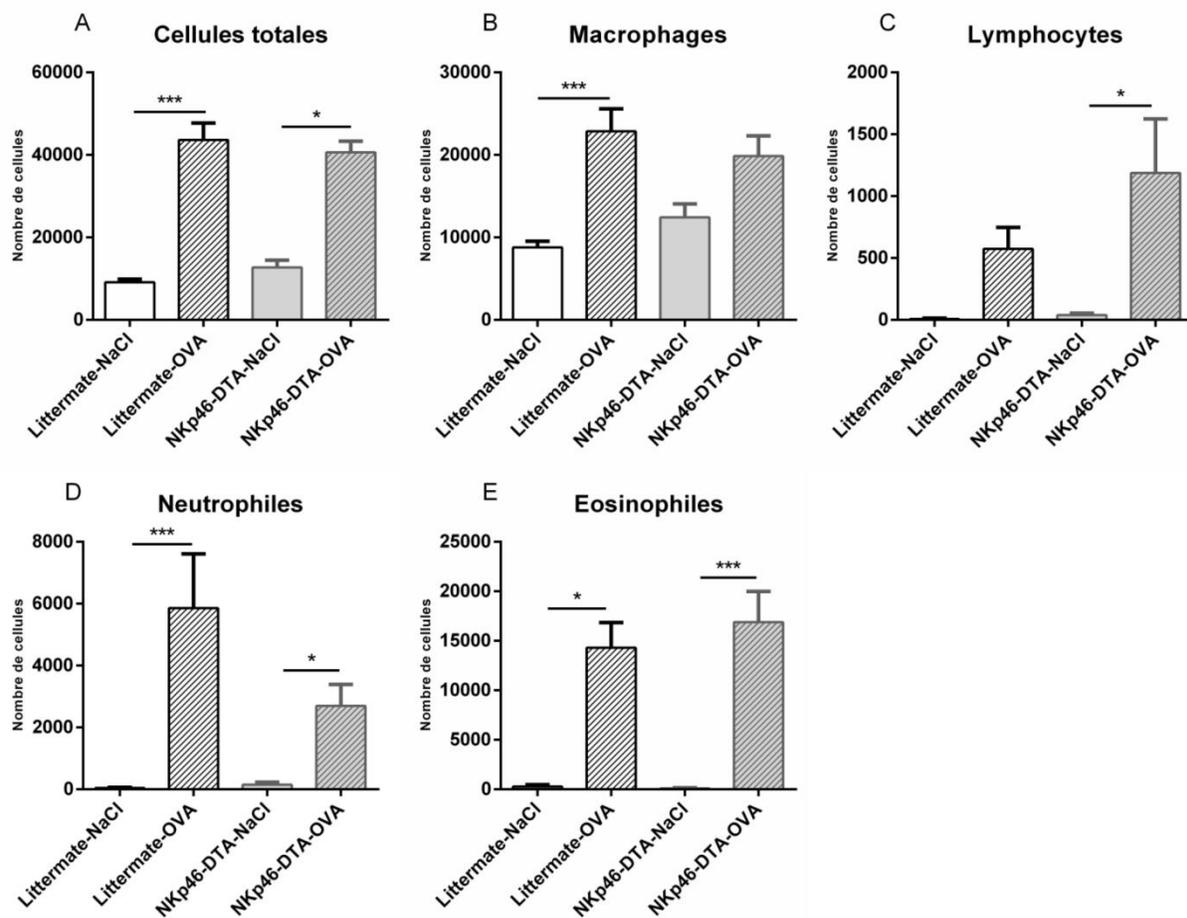


Figure 7 : Effet de l'absence constitutive des cellules NK sur la composition cellulaire des lavages broncho-alvéolaires dans un modèle d'asthme expérimental. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules. n=10 Littermate-PBS, n=12 Littermate-OVA, n=8 NKp46-DTA-PBS, n=11 NKp46-DTA-OVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (Kruskal-Wallis)

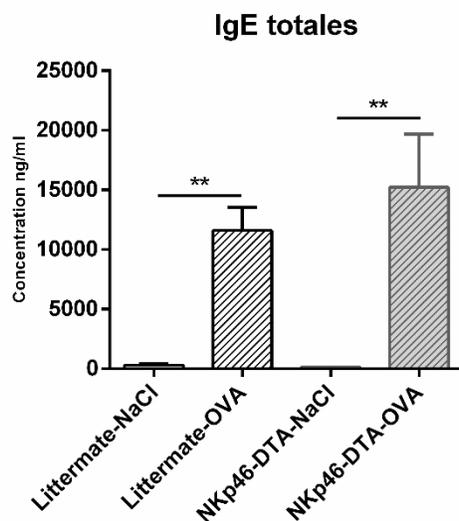


Figure 8 : Effet de l'absence constitutive des cellules NK sur la concentration sérique d'IgE totales dans un modèle d'asthme expérimental. n=10 Littermate-PBS, n=12 Littermate-OVA, n=8 NKp46-DTA-PBS, n=11 NKp46-DTA-OVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Kruskal-Wallis)

L'objectif suivant de notre étude a été d'analyser le rôle des cellules NK dans l'inhibition de la réaction asthmatique expérimental par un agoniste de TLR2/6, le FSL1.

2. Inhibition de la réaction asthmatique expérimentale par FSL1 : rôle des cellules NK

a) L'administration de FSL1 inhibe la réaction asthmatique expérimentale induite par l'ovalbumine

La résistance pulmonaire des souris sensibilisées à l'ovalbumine traitées avec du NaCl (souris notées OVA/NaCl) augmente significativement comparativement aux souris non sensibilisées. Alors que le traitement au FSL1 ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique des souris non sensibilisées, l'administration de FSL1 aux souris sensibilisées (souris notées OVA/FSL1) diminue significativement l'hyperréactivité bronchique comparativement aux souris sensibilisées et non traitées (Figure 9).

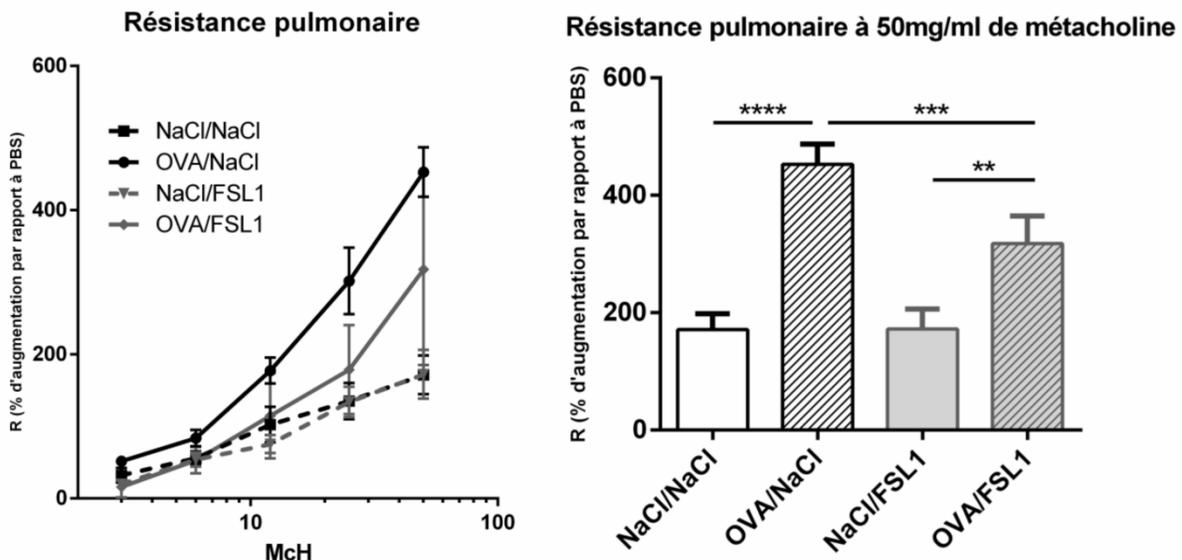


Figure 9 : L'administration de FSL1 après la sensibilisation à l'ovalbumine inhibe l'hyperréactivité bronchique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance pulmonaire par rapport à la condition PBS en fonction des doses de métacholine. n=10 NaCl/NaCl, n=10 OVA/NaCl, n=6 NaCl/FSL1, n=10 OVA/FSL1, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (Test de Tukey)

De la même manière, la sensibilisation à l'ovalbumine augmente la cellularité des LBA (Figure 10), la production d'IgE sérique, l'expression pulmonaire des cytokines Th2 (IL-5, IL-13) et d'IL-10, l'expression et la production d'IL-17 dans les poumons, et la production des chimiokines CCL17 et CXCL1 (Figure 11). L'administration de FSL1 ne modifie pas la cellularité des LBA, ni l'expression et la production de cytokines et de chimiokines dans les souris non sensibilisées. Toutefois, dans les souris sensibilisées, le FSL1 augmente de manière non significative le nombre de macrophages, de lymphocytes et de neutrophiles dans les LBA mais entraîne une diminution significative du nombre d'éosinophiles. La production d'IgE sérique (data non montrée), l'expression et la concentration des cytokines et chimiokines ne sont pas modifiées par le FSL1 (Figure 11).

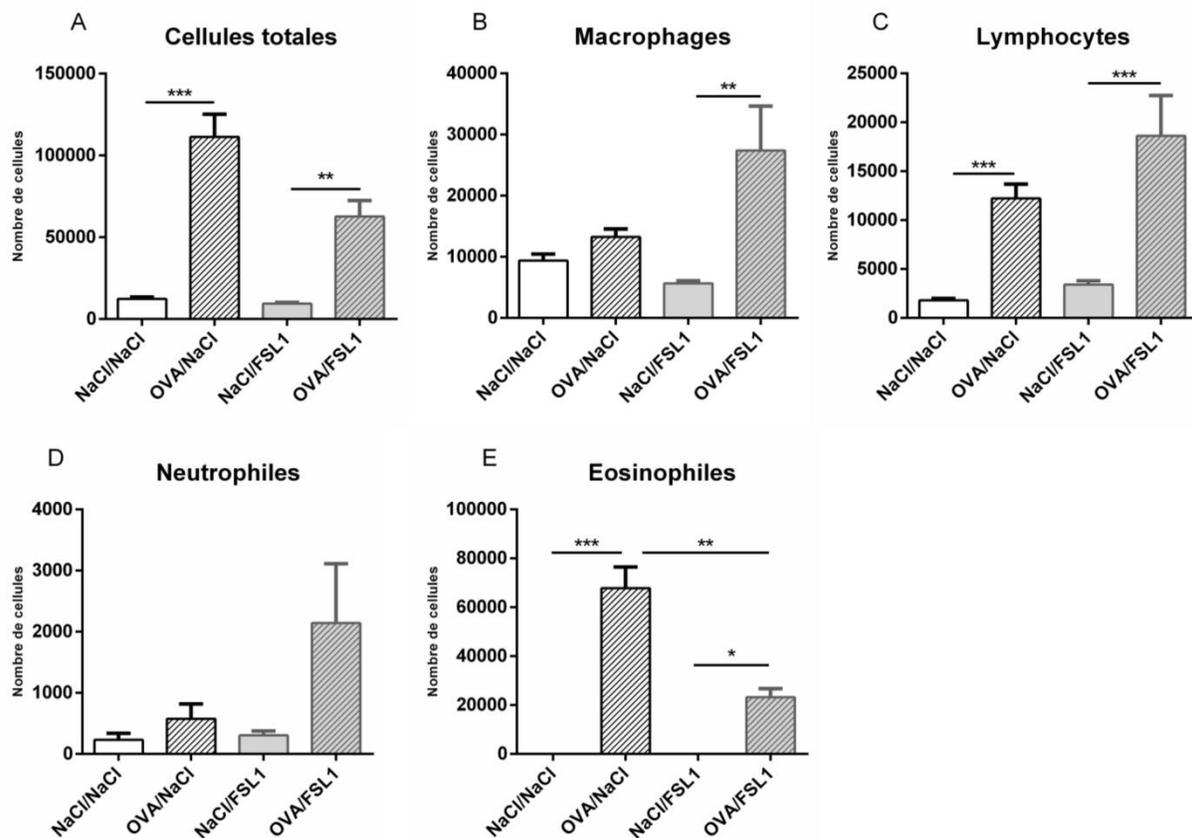


Figure 10 : L'administration de FSL1 après la sensibilisation inhibe l'éosinophilie des lavages broncho-alvéolaires. Les souris ont été traitées comme montré sur la Figure 1. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules. n=10 NaCl/NaCl, n=10 OVA/NaCl, n=6 NaCl/FSL1, n=10 OVA/FSL1, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 (Test de Tukey)

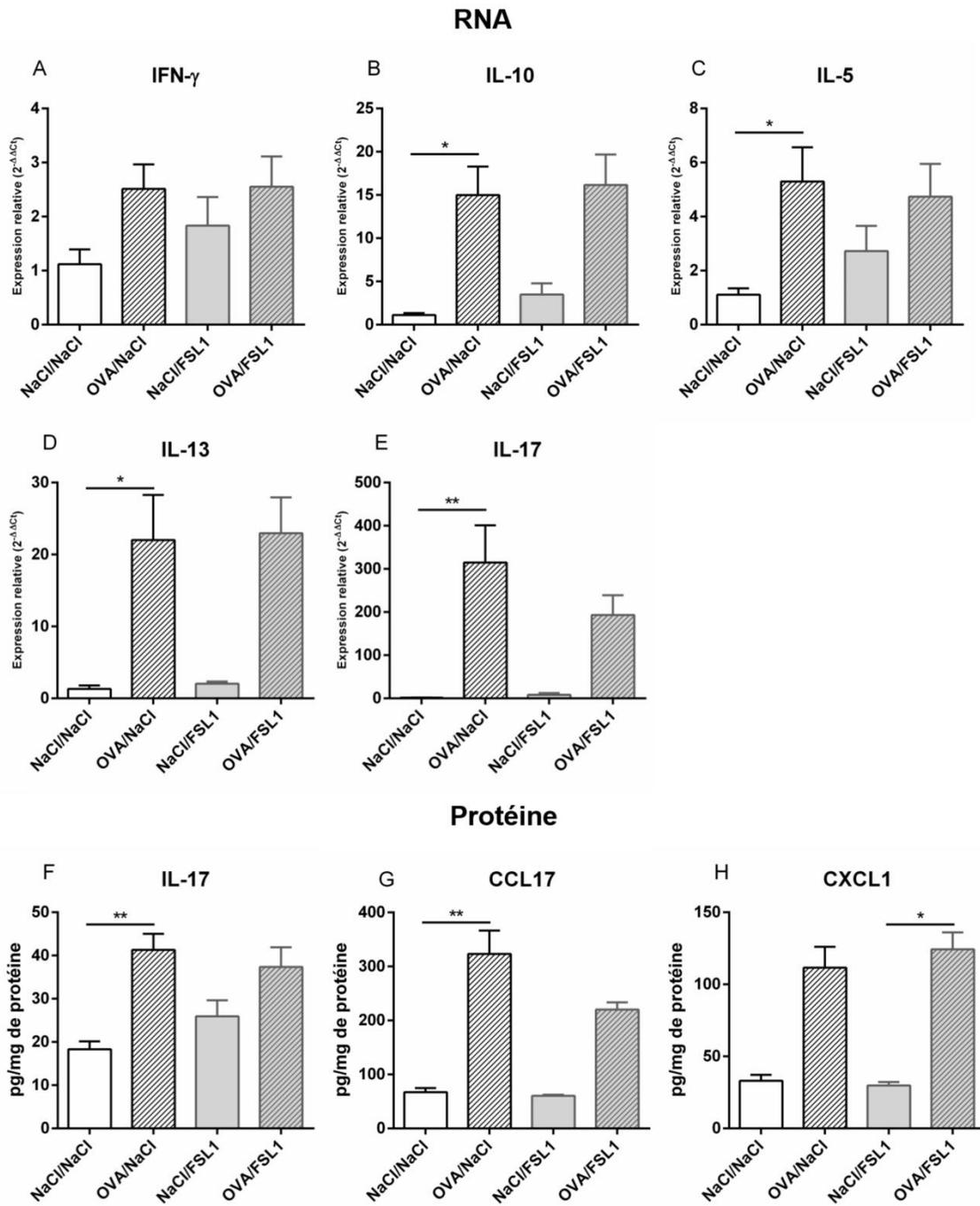


Figure 11 : L'administration de FSL1 ne modifie pas l'expression et la production de cytokines et de chimiokines dans les poumons des souris sensibilisées. n=10 NaCl/NaCl, n=10 OVA/NaCl, n=6 NaCl/FSL1, n=10 OVA/FSL1, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 (Test de Tukey)

L'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale par FSL1 est dépendante de TLR2. L'administration de FSL1 à des souris TLR2-KO sensibilisées n'entraîne pas de modification de l'hyperréactivité bronchique ni de l'inflammation dans les LBA (donnée non montrée).

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la réaction asthmatique par FSL1, nous nous sommes intéressés aux cellules NK. En effet, les cellules NK expriment TLR2 et leur stimulation *in vitro* avec un agoniste de TLR2 conduit à leur activation (Kim et al., 2012). Des résultats préliminaires indiquaient que l'administration de FSL1 aux souris sensibilisées augmentait le nombre de cellules NK dans les ganglions drainants, mais pas dans les poumons, comparativement aux souris sensibilisées et traitées avec du NaCl (donnée non montrée).

- b) Le transfert de cellules NK provenant de souris stimulées avec du FSL1 ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire des souris sensibilisées avec de l'ovalbumine

Afin d'évaluer si les cellules NK participaient à l'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale médiée par FSL1, nous avons transféré des cellules NK de souris traitées avec 3 instillations intranasales de FSL1 ou de NaCl dans des souris sensibilisées à l'ovalbumine.

Le transfert de cellules NK traitées au NaCl ne modifie pas significativement l'hyperréactivité bronchique des souris sensibilisées comparativement aux souris sensibilisées et non transférées. De plus, le transfert de cellules NK stimulées avec du FSL1 aux souris sensibilisées ne diminue pas la résistance pulmonaire (Figure 12).

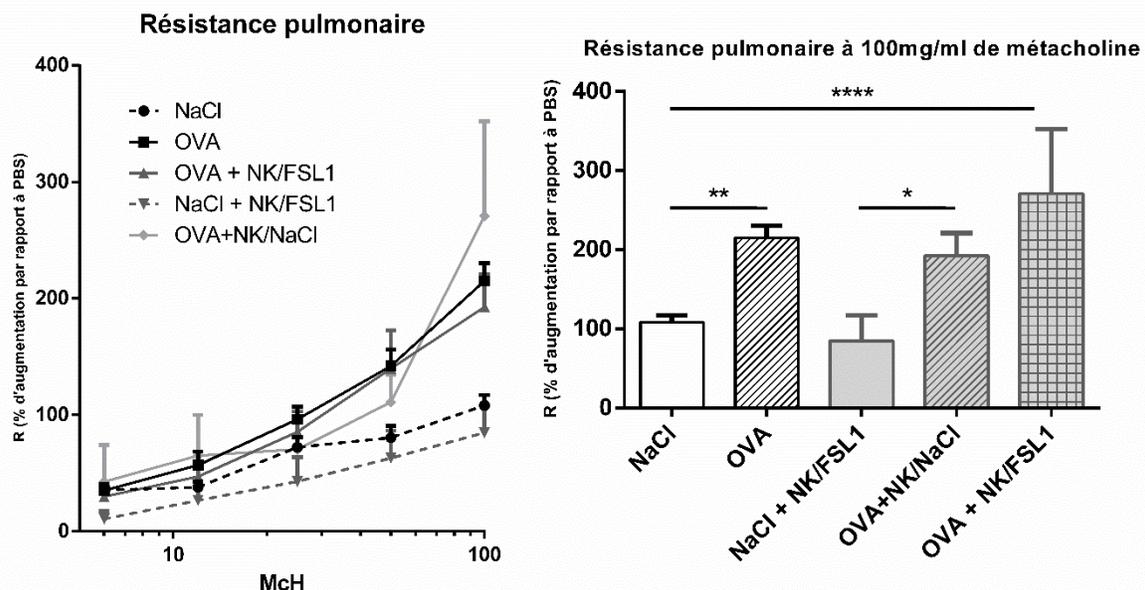


Figure 12 : Le transfert de cellules NK traitées avec du FSL1 ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique des souris sensibilisées. Les souris ont été traitées comme montré sur la Figure 2. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance pulmonaire par rapport à la condition PBS en fonction des doses de métacholine. n=9 NaCl, n=15 OVA, n=5 NaCl +NK/FSL1, n=9 OVA+NK/FSL1, n=3 OVA+NK/NaCl, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (Test de Tukey)

De même, l'administration de cellules NK stimulées avec du FSL1 ne modifie pas le nombre de macrophages, lymphocytes, neutrophiles et éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (Figure 13). Le transfert de cellules NK traitées avec du NaCl ne modifie pas la cellularité des lavages broncho-alvéolaires.

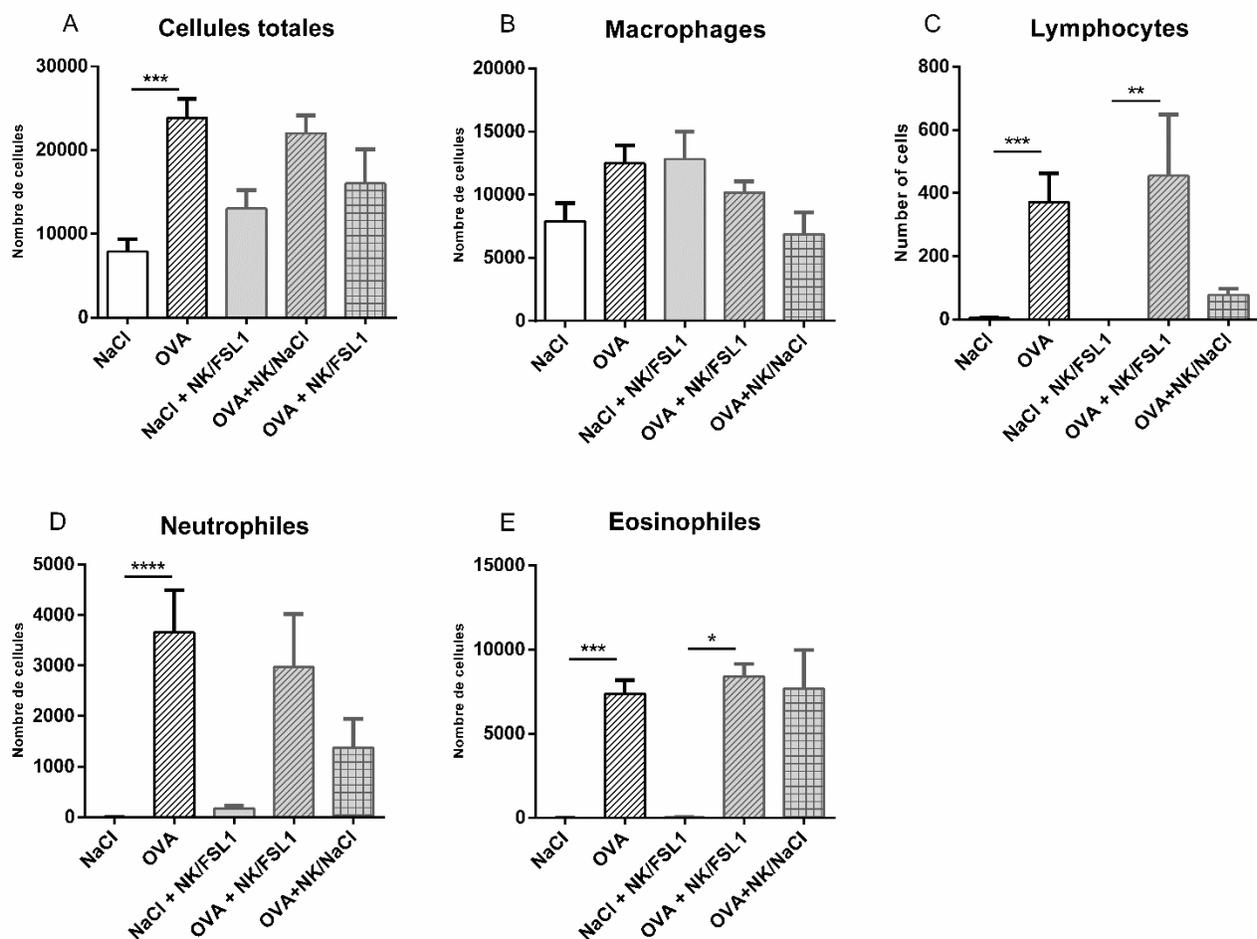


Figure 13 : Le transfert de cellules NK traitées avec du FSL1 ne modifie pas l'éosinophilie des lavages broncho-alvéolaires. Les souris ont été traitées comme montré sur la Figure 02. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules. n=9 NaCl, n=15 OVA, n=5 NaCl+NK/FSL1, n=9 NaCl+NK/FSL1, n=3 OVA+NK/NaCl, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (Test de Kruskal-Wallis)

En conclusion, le transfert de cellules NK stimulées avec du FSL1 ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique, ni l'inflammation dans les lavages broncho-alvéolaires, suggérant que les cellules NK n'ont pas de rôle dans l'inhibition de la réaction asthmatique par FSL1. Afin de confirmer ces résultats, nous avons traité les souris NKp46-DTA sensibilisées avec du FSL1.

- c) Le traitement des souris NKp46-DTA sensibilisées avec du FSL1 ne restaure pas l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique

Comme montré précédemment, la sensibilisation des souris NKp46-DTA conduit à l'augmentation de la résistance pulmonaire comparativement aux souris NKp46-DTA non sensibilisées (Figure 14). L'administration intranasale de FSL1 aux souris NKp46-DTA sensibilisées diminue la résistance pulmonaire comparativement aux souris NKp46-DTA sensibilisées et non traitées. Donc le FSL1 diminue la résistance pulmonaire même chez les souris constitutivement déplétées en cellules NK.

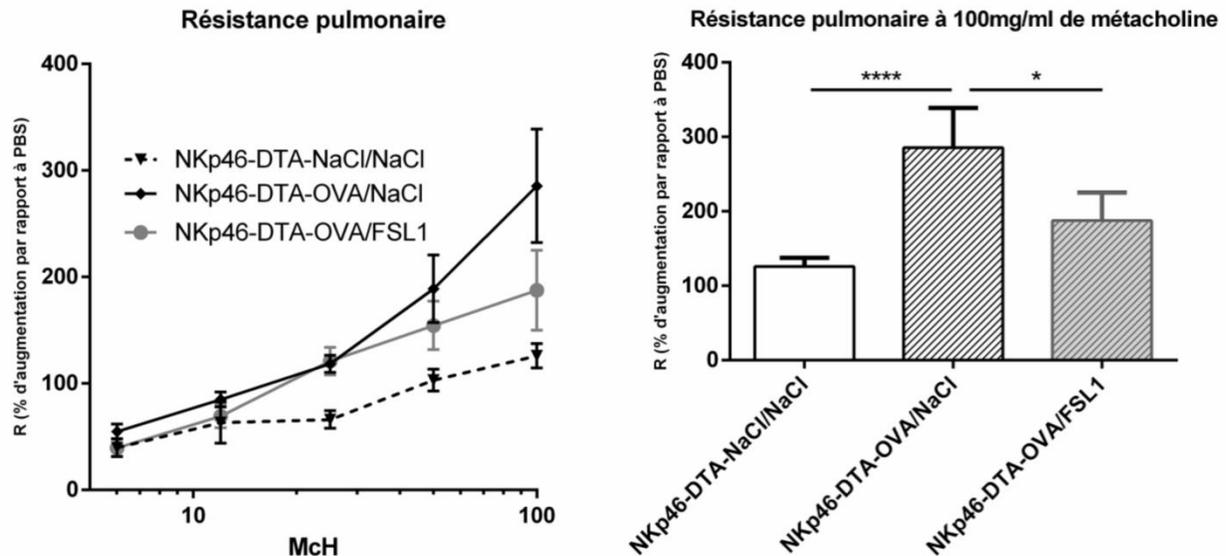


Figure 14 : Effet de l'absence constitutive des cellules NK sur la résistance pulmonaire dans l'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale par FSL1. Le traitement des souris est représenté dans la Figure 1. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport à la condition PBS. n=8 Littermate-OVA/NaCl, n=9 Littermate-OVA/FSL1, n=8 NKp46-DTA-OVA/NaCl, n=7 NKp46-DTA-OVA/FSL1, \*p<0.05 (Test de Tukey)

Dans les lavages broncho-alvéolaires, l'administration intranasale de FSL1 diminue le nombre de cellules totales, de macrophages, de neutrophiles et d'éosinophiles dans les souris NKp46-DTA comme dans les souris littermate sensibilisées (Figure 15). Le FSL1 inhibe donc l'inflammation éosinophilique chez les souris dépourvues de cellules NK comme chez les souris wild type.

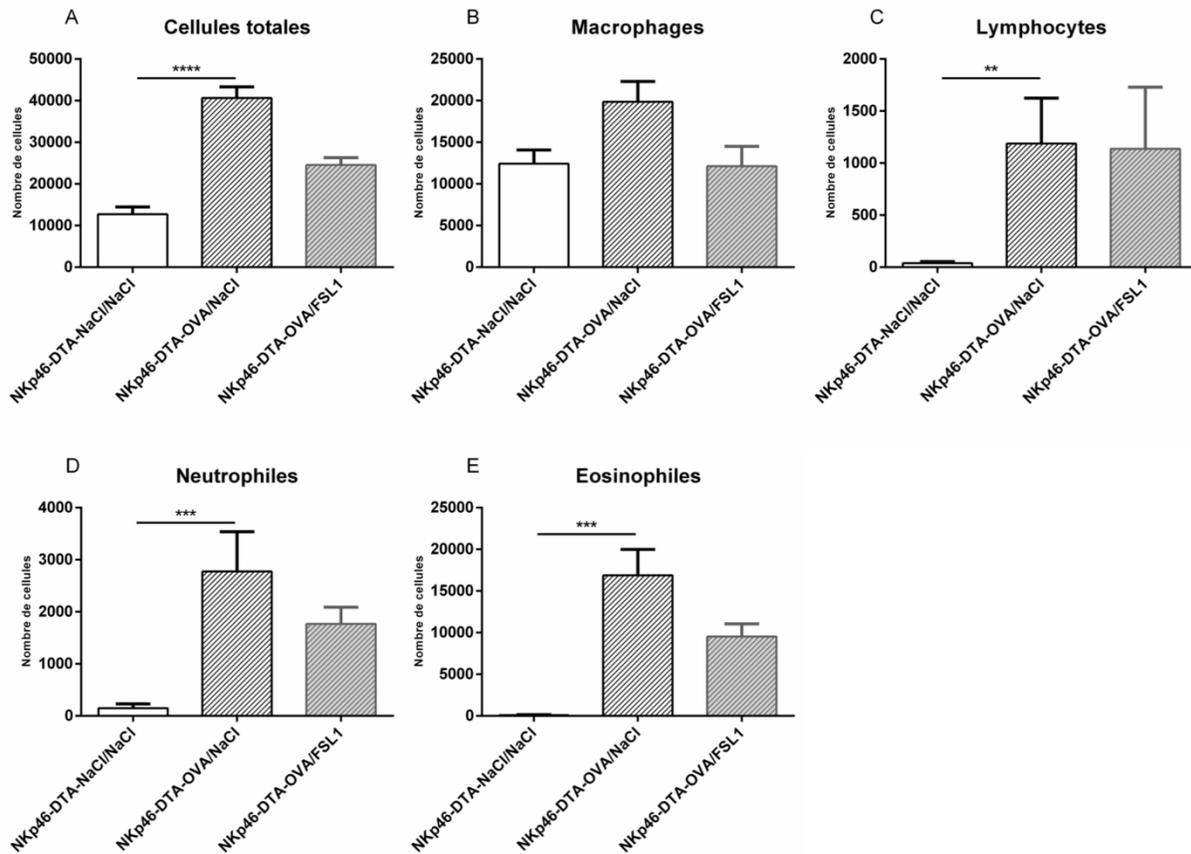


Figure 15 : Effet de l'absence constitutive des cellules NK sur la cellularité des LBA dans l'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale par FSL1 . Les souris ont été traitées comme montré sur la Figure 01. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules. n=8 Littermate-OVA/NaCl, n=9 Littermate-OVA/FSL1, n=8 NKp46-DTA-OVA/NaCl, n=7 NKp46-DTA-OVA/FSL1, \*p<0.05 (Test de Kruskal-Wallis)

En conclusion, les cellules NK n'ont pas de rôle dans le développement de l'asthme induit par l'ovalbumine, ni dans l'inhibition de la réaction asthmatique par FSL1 dans ce modèle murin d'asthme expérimental. Compte tenu des résultats de la partie 1 suggérant que les cellules NK des patients asthmatiques sévères étaient modifiées, nous avons néanmoins voulu savoir si les cellules NK étaient modifiées par l'un ou l'autre des traitements (sensibilisation allergique et administration de FSL1). Nous avons donc analysé les cellules NK chez les souris sensibilisées à l'OVA et traitées par FSL1.

### 3. Les cellules NK de souris sensibilisées présentent une réponse anormale au FSL1

24 heures après la dernière intranasale de FSL1, les souris ont été euthanasiées, les cellules pulmonaires ont été isolées et les cellules NK ont été marquées et analysées en cytométrie en flux.

La sensibilisation des souris à l'ovalbumine ne modifie pas le nombre total de cellules NK pulmonaires, ni le nombre de cellules NK marginées, c'est-à-dire adhérentes dans les vaisseaux pulmonaires (Figure 16A et B). De plus l'administration de FSL1 aux souris sensibilisées comme non sensibilisées n'entraîne pas de modification du nombre de cellules NK pulmonaires et de cellules NK marginées.

Le nombre de cellules NK localisées dans le parenchyme pulmonaire n'est pas modifié par la sensibilisation des souris (Figure 16C). Dans les souris non sensibilisées, les instillations intranasales de FSL1 augmente le nombre de cellules NK dans le parenchyme pulmonaire. Toutefois, lorsque les souris sont sensibilisées, le nombre de cellules NK parenchymateuses est significativement moins élevé après les traitements avec le FSL1, comparativement aux souris non sensibilisées et traitées.

De la même manière, l'administration de FSL1 active les cellules NK chez les souris non sensibilisées (Figure 16D) puisque le nombre de cellules NK CD69<sup>+</sup> augmente significativement. Mais lorsque les souris sont sensibilisées, les cellules NK sont moins activées par le FSL1 comparativement aux cellules NK de souris non sensibilisées.

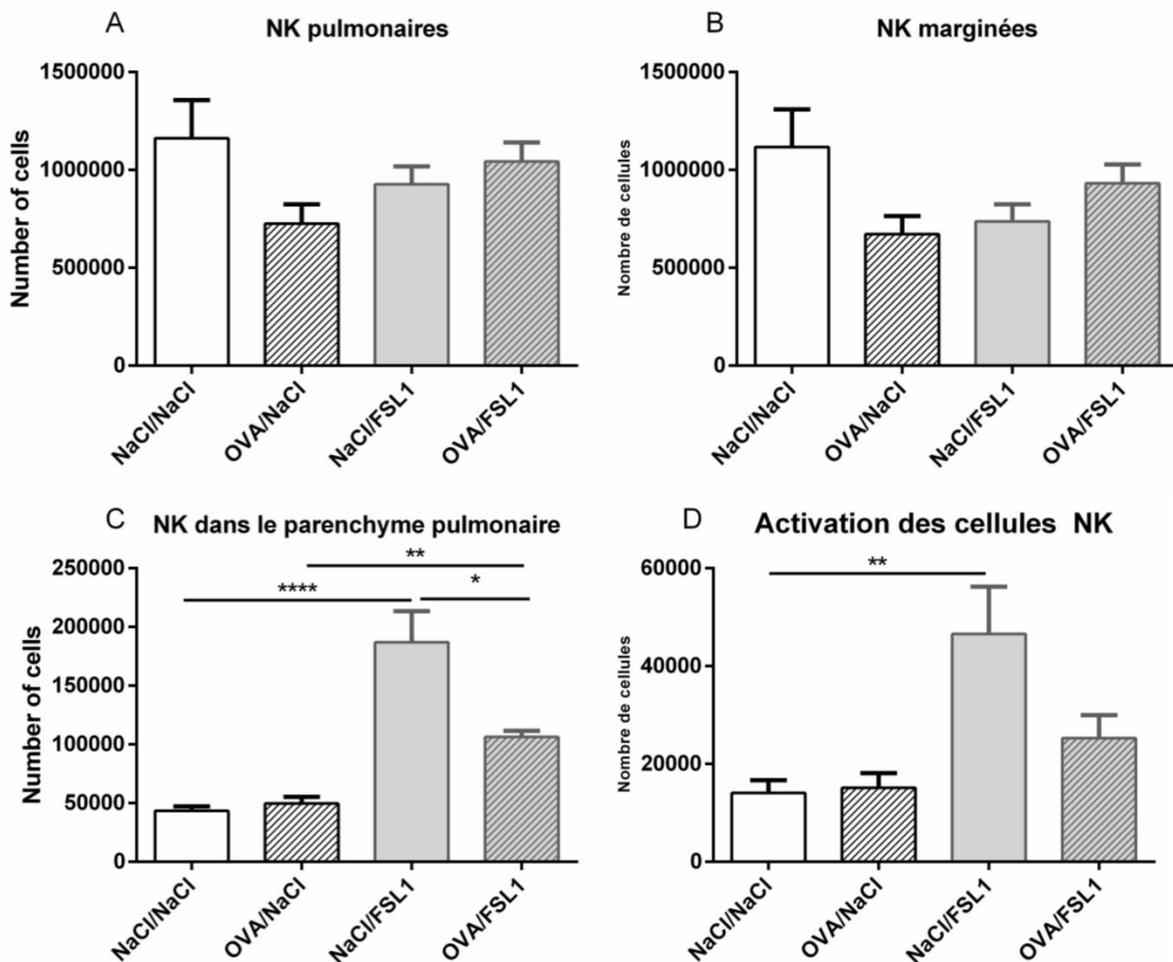


Figure 16 : Effet de l'administration intranasale de FSL1 sur le nombre et l'activation des cellules NK. Les cellules pulmonaires ont été isolées et les cellules NK ont été analysées en cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules NK et en (D) en nombre de cellules NK positives pour CD69. n=6 NaCl/NaCl, n=6 OVA/NaCl, n=6 NaCl/FSL1, n=6 OVA/FSL1. \*p<0.05 (Test de Kruskal Wallis)

En conclusion, les cellules NK ne jouent pas de rôle dans le développement de l'asthme expérimental induit par l'ovalbumine, ni dans l'inhibition de la réaction asthmatique par FSL1. Toutefois, les fonctions des cellules NK sont altérées chez les souris sensibilisées. En effet, le traitement des souris par FSL1 induit moins de recrutement et d'activation des cellules NK si les souris ont été préalablement sensibilisées. Ces résultats confirment que les cellules NK sont modifiées par l'environnement allergique ou asthmatique et que leurs fonctions en réponse à des composés microbiens pourraient être défectueuses.

## C. Discussion

Dans cette étude, nous avons exploré le rôle des cellules NK dans l'asthme expérimental et dans l'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale par FSL1. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des souris constitutivement dépourvues en cellules NKp46<sup>+</sup>. Le NKp46 n'est pas complètement spécifique des cellules NK : il est exprimé par les ILC1 et par une sous-population d'ILC3 produisant de l'IL-22. Les ILC1 sont localisés majoritairement dans la peau, le foie, le péritoine et les glandes salivaires et les ILC3 sont retrouvés dans l'intestin. Ces deux populations sont très rares dans les poumons (Crinier et al., 2017). Le NKp46 est également exprimé par une sous-population de lymphocytes NKT et par une sous-population de lymphocytes  $\gamma\delta$  (Stewart et al., 2007; Yu et al., 2011). Les souris NKp46-DTA sont donc dépourvues de cellules NK, mais également de ces populations cellulaires. Il semble donc que, comme les cellules NK, elles ne jouent pas de rôle dans le développement de l'asthme expérimental. D'autres modèles murins ont montré que la déplétion des cellules NK inhibaient l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire (Farhadi et al., 2014; Mathias et al., 2014; Ple et al., 2010). La déplétion des cellules NK était induite par l'administration d'anticorps anti-NK1.1, anti-NKG2D ou anti-asialo GM1 (ASGM1). Le NK1.1 est exprimé par les cellules NK et les lymphocytes NKT, mais également par certains lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Le NKG2D est exprimé par les cellules NK, mais également par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et des lymphocytes  $\gamma\delta$ . L'ASGM1 n'est pas spécifique de toutes les cellules NK murines, et est exprimé par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les basophiles. Ainsi, les modèles de déplétion des cellules NK murines n'étaient pas optimales et ne permettaient pas d'étudier réellement le rôle des cellules NK dans l'asthme expérimental.

A l'inverse, nos résultats sont concordants avec une précédente étude qui a montré que l'absence de cellules NK ou la déplétion des cellules NK induite par la toxine diphtérique ne modifie pas les caractéristiques de l'asthme expérimental (Haspeslagh et al., 2018). Cette constatation a été faite dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine et dans un modèle d'asthme induit par un acarien. Nous pouvons conclure que les cellules NK n'ont pas de rôle dans le développement de l'inflammation allergique, quel que soit l'allergène utilisé.

Nous avons montré que les cellules NK de souris sensibilisées à l'ovalbumine sont moins activées 24h après leur stimulation avec FSL1 comparativement aux cellules NK de souris non sensibilisées. Ces résultats montrent que les cellules NK sont activées par le FSL1 et que cette activation est défectueuse lorsque les souris sont sensibilisées. Les cellules Natural Killer n'ont donc pas de fonction pro ou anti-inflammatoire dans le développement de la réaction asthmatique expérimentale. Elles ne participent pas à l'inhibition de la réaction asthmatique par FSL1.

Toutefois, dans l'asthme expérimental, les fonctions des cellules NK sont modifiées, notamment en réponse au FSL1, dont le récepteur reconnaît des composés viraux, fongiques et bactériens. Cette modification des fonctions des cellules NK pourraient participer à d'autres phénomènes asthmatiques, par exemple à l'exacerbation de la réaction asthmatique.

# CONCLUSION GENERALE / DISCUSSION / PERSPECTIVES

La place des cellules NK dans la maladie asthmatique demeure indéterminée. Des modèles murins d'asthme ont décrit un rôle pro-inflammatoire des cellules NK (Korsgren et al., 1999; Mathias et al., 2014; Ple et al., 2010), alors que d'autres ont mis en évidence l'implication des cellules NK dans la résolution de l'inflammation (Haworth et al., 2011). Récemment, Haspeslagh et al a montré que les cellules NK ne participaient pas au développement de l'asthme expérimental (Haspeslagh et al., 2018). Des études sur des prélèvements sanguins humains ont suggéré que la proportion et le phénotype des cellules NK étaient modifiés dans l'asthme (Lin et al., 2003; Scordamaglia et al., 2008), ou même que leurs fonctions seraient défectueuses chez les patients asthmatiques sévères (Duvall et al., 2017).

Sachant que les cellules NK jouent un rôle essentiel dans la réponse antimicrobienne, et que les microorganismes ont un effet sur la pathologie asthmatique, nous avons évalué l'impact de ces microorganismes sur la fonction des cellules NK dans l'asthme. Nous avons montré les points suivants : 1) les caractéristiques de l'asthme expérimental induit par l'ovalbumine ne sont pas modifiés dans les souris naturellement dépourvues en cellules NKp46<sup>+</sup>, 2) les cellules NK ne participent pas à l'inhibition de la réaction asthmatique expérimentale médiée par un agent microbien, 3) en réponse à un composé microbien, le FSL1, les cellules NK murines sont recrutées et activées dans le tissu pulmonaire, 4) chez les souris sensibilisées avec de l'ovalbumine, les cellules NK sont moins activées en réponse au FSL1, 5) chez les patients asthmatiques sévères, les cellules NK sont moins activées et moins cytotoxiques suite à la stimulation des cellules mononucléées avec l'agoniste de TLR3, de TLR7/8 ou avec un rhinovirus, 6) les cellules NK provenant de patients asthmatiques sévères expriment et produisent moins d'IFN- $\gamma$  lorsqu'elles sont stimulées avec les cytokines IL-12 et IL-15, 7) les cellules NK de patients asthmatiques sévères présentent un phénotype d'épuisement qui pourrait être à l'origine de leur défaut d'activation en réponse aux composés microbiens et au rhinovirus.

Nos résultats, ainsi que ceux de la littérature, confirment que même si elles ne participent pas au développement de la pathologie, les fonctions des cellules NK sont modifiées dans l'asthme. Ce travail soulève toutefois quelques questions.

### **Les cellules NK sont-elles modifiées par l'environnement inflammatoire asthmatique ou présentent-elles ces modifications avant le développement de la maladie asthmatique ?**

Nous avons constaté un défaut des cellules NK dans leur réponse à des composés microbiens chez des patients adultes souffrant de la maladie depuis plusieurs années, ou dans des modèles

de souris préalablement sensibilisées. Nos modèles ont donc étudié les cellules NK dans un contexte inflammatoire établi. Toutefois, les études n'ont pas montré si les fonctions des cellules NK étaient normales ou non avant le développement de l'inflammation ou si elles étaient modifiées par l'inflammation. Si les cellules NK sont défectueuses avant l'apparition de la pathologie, cette dysfonction pourrait prédisposer l'individu au développement de la maladie asthmatique.

La modification précoce des cellules NK et leur implication dans le développement de la maladie asthmatique a été suggérée par Manners et al. Des souris gestantes ont été exposées de manière répétée à des particules de diesel. 5 jours après leur naissance, les souriceaux issus de ces femelles ont été sensibilisés avec une dose suboptimale d'ovalbumine. Les souriceaux dont les mères avaient été exposées au PBS n'ont pas développé d'inflammation pulmonaire, ni d'augmentation de la concentration en IgE sérique ou d'hyperréactivité bronchique alors que les souriceaux dont les mères ont été exposées aux particules diesel présentaient une augmentation du nombre d'éosinophiles et de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires, de l'hyperréactivité bronchique, de la concentration en IgE sérique ainsi qu'une augmentation de l'expression et de la production des cytokines Th2 et Th17. Une analyse en cytométrie en flux a montré que les cellules NK spléniques étaient la population principale exprimant de l'IL-5, de l'IL-13 et de l'IL-17. De plus, la déplétion des cellules NK avec un anticorps anti-NK1.1 diminue l'inflammation pulmonaire (Manners et al., 2014). Cependant, cette étude n'a pas analysé le phénotype et les fonctions des cellules NK avant l'administration de l'antigène.

Une étude américaine a recruté des nouveau-nés qui présentaient des risques élevés de développer une maladie allergique et/ou asthmatique : leurs ascendants (mère, père, grands-parents) souffraient d'asthme, de rhinites allergiques et/ou d'eczéma. Ces enfants ont été suivis jusqu'à leur 7 ans et le développement d'une sensibilisation à un aéroallergène ou le développement de la maladie asthmatique a été analysé aux âges de 3, 5 et 7 ans. Les cellules mononucléées de ces enfants ont été récoltées à l'âge de 2 ans et l'ARN de ces cellules a été extrait et séquencé. Les cellules mononucléées ont donc été récoltées alors que les enfants ne présentaient pas de sensibilisation allergique ni d'asthme. Chez les enfants asthmatiques et/ou allergiques, l'expression des gènes spécifiques des cellules NK était plus élevée, que l'asthme soit apparu précocement à 3 ans ou plus tardivement à 7 ans, comparativement aux enfants qui n'ont pas développé d'asthme ou d'allergie. La stimulation des cellules mononucléées des enfants asthmatiques allergiques avec des allergènes (des extraits d'acariens ou de blattes) entraîne l'augmentation de l'expression des gènes liés aux cellules NK et aux cellules dendritiques. Ainsi, de manière précoce dans la vie de l'enfant, les cellules NK, ou en tout cas l'expression des gènes

des cellules NK, sont modifiés et pourraient participer au développement de la maladie asthmatique. Dans cet article, les fonctions des cellules NK et des cellules dendritiques n'ont pas été analysées (Altman et al., 2018).

Les cellules NK sont des cellules sensibles aux variations de leur environnement : leur activation est dépendante de signaux provenant des pathogènes mais également des autres cellules immunitaires et des cytokines produites par elles. Ainsi, les fonctions des cellules NK peuvent être modifiées par des cytokines pro-inflammatoires, notamment par l'IL-6 et le TGF- $\beta$ , deux cytokines retrouvées en grande quantité dans les poumons des patients asthmatiques sévères. La stimulation des cellules NK avec de l'IL-6 diminue leur cytotoxicité en diminuant l'expression de la perforine et du granzyme (Cifaldi et al., 2015). Le TGF- $\beta$  inhibe le développement et la différenciation des cellules NK. Il modifie également le phénotype des cellules NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> en CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>. Les cellules NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ont les mêmes capacités de prolifération que les CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> mais elles sont moins cytotoxiques (Allan et al., 2010). Les cytokines pro-inflammatoires sont également capables de modifier l'expression des récepteurs à la surface des cellules NK. La stimulation des cellules NK avec de l'IL-2, de l'IL-21 et de l'IL-15 inhibe l'expression du NKp44 et modifie le répertoire de récepteurs KIR exprimé par les cellules NK (de Rham et al., 2007). L'environnement inflammatoire pourrait donc modifier les cellules NK et être à l'origine des fonctions défectueuses que nous avons constatées chez les patients asthmatiques sévères.

L'une des perspectives de ce travail serait de déterminer si les cellules NK des patients asthmatiques sont défectueuses avant la survenue de la pathologie, ou si ce défaut apparaît lorsque la maladie s'installe et que l'inflammation pulmonaire devient chronique. Pour cela, il serait intéressant d'analyser les fonctions des cellules NK provenant d'enfants asthmatiques, avant même le développement de la maladie.

### **La modification des fonctions des cellules NK participant-elles au maintien de l'inflammation respiratoire dans les poumons ?**

Même si les cellules NK ne participent pas au développement de la maladie asthmatique, les modifications de leurs fonctions pourraient participer à l'inflammation chronique des voies respiratoires lors de l'asthme et de ses exacerbations. Ainsi, plusieurs études ont montré que dans certaines conditions, les cellules NK pouvaient produire des cytokines inflammatoires que l'on retrouve dans la pathologie asthmatique. L'IL-17, qui participe à l'inflammation neutrophilique dans les poumons, est exprimée et produite par les cellules NK humaines CD56<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> stimulées avec de l'IL-2 (Pandya et al., 2011). Dans d'autres pathologies, il a été montré que la présence

de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 qui est produite par les cellules épithéliales de patients asthmatiques, et de cellules accessoires (cellules dendritiques ou macrophages) sont nécessaires à la production d'IL-17 par les cellules NK (Passos et al., 2010). De plus dans un modèle murin d'exacerbation de la réaction asthmatique par poly(I :C), il a été montré que les cellules NK participaient à la réaction inflammatoire en produisant de l'IL-17A (Lunding et al., 2015). L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules épithéliales de patients asthmatiques sévères et nos analyses ont montré que les cellules NK purifiées provenant de patients asthmatiques sévères produisent de l'IL-8 lorsqu'elles sont mises en culture pendant 24 heures en milieu sans stimulation (data non montrées).

Nous avons montré que la cytotoxicité des cellules NK était diminuée chez les patients asthmatiques. Pour mesurer cette cytotoxicité, nous avons utilisé des cellules cibles standard, la lignée de cellules leucémiques K562. Toutefois, la cytotoxicité des cellules NK s'exerce sur une grande variété de cellules, dont des cellules immunitaires. Les cellules NK sont capables d'induire *in vitro* l'apoptose des éosinophiles autologues, ce qui nécessite un contact cellulaire direct (Awad et al., 2014). Les cellules NK de patients asthmatiques sévères induisent moins l'apoptose des éosinophiles comparativement aux cellules NK de donneurs sains ou de patients asthmatique légers (Barnig et al., 2013). Les cellules NK sont également capables d'induire l'apoptose des neutrophiles grâce à un contact cellulaire direct via NKp46 (Thorén et al., 2012). Cependant, un défaut des cellules NK dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles n'a pas été mis en évidence (Barnig et al., 2013). Les cellules NK engagent un dialogue avec les cellules dendritiques qui aboutit à leur maturation ou à leur lyse. Chez des patients souffrant d'allergies respiratoires (rhinite ou asthme), les cellules NK induisent moins la lyse des cellules dendritiques *in vitro* que les cellules NK de donneurs sains (Scordamaglia et al., 2008). Les cellules dendritiques utilisées dans cet article sont des cellules dendritiques dérivées de monocytes, la cytotoxicité des cellules NK sur les cellules dendritiques myéloïdes ou plasmacytoïdes n'ont pas été analysées. Les cellules NK pourraient participer à l'inflammation pulmonaire de manière indirecte, en lysant moins les cellules inflammatoires ou les cellules dendritiques.

Enfin, les cellules NK semblent jouer un rôle dans la résolution de l'inflammation. Les cellules NK murines expriment CMKLR1, qui est un récepteur pour la Resolvin E1. La resolvin E1 régule la migration des cellules NK *in vivo* et la cytotoxicité des cellules NK *in vitro*. La déplétion des cellules NK dans un modèle murin avec un anticorps anti-asialo GM1 diminue la résolution de l'inflammation médiée par la resolvin E1 (Haworth et al., 2011). Les cellules NK humaines expriment également un récepteur, AXL/FRP2, qui est spécifique d'un facteur prorésolution, la

lipoxin A4. La liaison de la lipoxin A4 à son récepteur AXL/FRP2 stimule l'induction de l'apoptose des éosinophiles par les cellules NK *in vitro*. La lipoxin A4 est produite entre autre par les cellules dendritiques et les macrophages, et sa concentration est diminuée dans le sérum des asthmatiques sévères. Cette diminution pourrait expliquer la diminution de la cytotoxicité des cellules NK sur les éosinophiles (Barnig et al., 2013).

En conclusion, de manière directe ou indirecte, les cellules NK pourraient participer au maintien de l'inflammation pulmonaire ou retarder sa résolution dans les poumons. Toutefois, les mécanismes impliqués restent à définir plus clairement.

## **Quels autres facteurs pourraient influencer la fonction des cellules NK ?**

### **A. La corticothérapie**

Les patients asthmatiques sévères ont des traitements lourds composés de corticoïdes inhalés à haute dose et, pour certains d'entre eux, de corticoïdes oraux. Parmi les patients recrutés dans notre étude, 45,2% recevaient une corticothérapie orale et 100% une corticothérapie inhalée. Nous n'avons pas relevé de différences de fonctions des cellules NK entre les patients recevant une corticothérapie orale et les patients qui n'en recevaient pas.

Les corticoïdes ont un effet sur les cellules du système immunitaire, et sur les fonctions des cellules NK. Les cellules NK humaines traitées *in vitro* avec du méthylprednisolone ont des capacités cytotoxiques diminuées comparativement aux cellules NK non traitées (Pedersen and Beyer, 1986). Cette diminution des capacités cytotoxiques des cellules NK par les corticoïdes a été décrite chez les patients asthmatiques : après une injection intramusculaire de triamcinolone, les cellules NK provenant de lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques sévères produisent moins de granzyme B, comparativement aux cellules NK avant l'injection (Duvall et al., 2017). L'effet des corticoïdes sur les cellules NK n'a pas été mesuré pendant une infection avec un rhinovirus. Dans une autre pathologie virale, il a été montré que le traitement *in vitro* des cellules NK avec du méthylprednisolone diminue significativement leur prolifération et la lyse des cellules infectées avec le virus (Ohira et al., 2017). Les corticoïdes pourraient également stimuler l'expression de checkpoint molécules à la surface des cellules NK. Le traitement *in vitro* de cellules NK murines spléniques avec de la corticostérone conjointement avec de l'IL-15 et de l'IL-18 induit l'expression de PD-1, dépendamment de l'expression du récepteur aux corticoïdes. Dans ce modèle, la corticostérone conjointement avec de l'IL-15 et de l'IL-12 ne modifie pas l'expression de PD-1 par les cellules NK (Quatrini et al., 2018). Les corticostéroïdes pourraient entraîner

l'épuisement des cellules NK, en stimulant l'expression des checkpoint molecules, dépendamment du microenvironnement cytokinique. Même si les mécanismes et les récepteurs impliqués n'ont pas totalement été élucidés, l'effet des cytokines Th2 ou Th17, avec les glucocorticoïdes pourraient être étudié sur les cellules NK dans l'asthme. Une autre étude a montré que l'administration intratrachéale de poly(I :C) à des souris induisait l'expression du ligand de PD-1, PD-L1, dans les poumons ainsi que le recrutement de neutrophiles et l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les LBA. L'expression de PD-L1 est inhibée lorsque les souris reçoivent un  $\beta$ 2-agoniste de longue durée d'action conjointement avec un corticoïde, mais pas l'inflammation pulmonaire (Hamano et al., 2017). Une meilleure compréhension de l'effet des corticoïdes sur l'expression des checkpoint molecules et sur l'inflammation pulmonaire pendant l'exacerbation de la réaction asthmatique expérimental par un composé microbien ou par un virus pourrait permettre de moduler les traitements corticoïdes et de développer de nouvelles thérapies. Nous avons traité les cellules mononucléées provenant de patients sains avec des doses croissantes de dexaméthasone et nous avons analysé le phénotype d'épuisement des cellules NK : même à haute dose, la dexaméthasone ne modifie pas l'expression de Tim 3 à la surface des cellules NK, mais elle entraîne une mortalité plus importante des cellules NK (data non montrée).

Donc, même si nous n'avons pas relevé de modifications des fonctions des cellules NK entre les patients asthmatiques sévères traités avec des corticoïdes oraux et les patients non traités, il est possible que la corticothérapie, en inhibant les fonctions des cellules NK, facilite l'infection virale et participe à l'exacerbation viro-induite de la réaction asthmatique.

## B. L'obésité

47,2% de nos patients asthmatiques sévères présentaient un indice de masse corporelle supérieur à 30. Les fonctions des cellules NK de ces patients n'étaient pas modifiées comparativement aux patients asthmatiques sévères non-obèses. L'obésité peut être un facteur aggravant de l'asthme : les patients obèses ont plus de difficultés à contrôler leur asthme que les patients non-obèses, ils sont plus souvent hospitalisés et ont une fonction pulmonaire plus faible que les patients non-obèses (Baruwa and Sarmah, 2013). L'obésité est associée à une inflammation systémique chronique associée au dysfonctionnement de plusieurs cellules immunitaires, notamment les lymphocytes B, les lymphocytes T et les macrophages. Ces modifications peuvent participer à l'aggravation des symptômes de l'asthme. Dans un modèle murin d'asthme, l'administration d'un régime riche en graisse aux souris sensibilisées augmente

leur hyperréactivité bronchique, l'infiltrat d'éosinophiles dans les tissus pulmonaires, l'expression des cytokines Th2 et Th17 dans les poumons ainsi que le nombre d'ILC2 et d'ILC3 pulmonaires. Les souris obèses et non sensibilisées montrent également une augmentation du nombre d'ILCs pulmonaires comparativement aux souris soumis à un régime normal et non sensibilisées. Un régime riche en graisse modifie donc les cellules immunitaires innées, ici les ILCs, et participe à l'exacerbation de la réaction asthmatique expérimentale (Everaere et al., 2016). L'obésité modifie également les fonctions des cellules NK. Le pourcentage de cellules NK est diminué dans le sang circulant de patients obèses comparativement aux donneurs non-obèses. De plus, l'accumulation de dérivés lipidiques dans les cellules NK « paralyse » le métabolisme cellulaire, conduisant à une diminution de l'expression de granzyme B et une diminution de l'expression et de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK circulantes stimulées avec de l'IL-2 et de l'IL-12 (Michelet et al., 2018).

L'obésité peut donc avoir un effet sur la modification des fonctions des cellules NK et pourraient être un facteur aggravant les exacerbations de l'asthme. Pour comprendre les mécanismes par lesquels l'obésité peut avoir un effet sur les cellules NK, il serait intéressant de comparer les fonctions des cellules NK provenant de donneurs obèses non asthmatiques et non allergiques et des patients asthmatiques sévères obèses.

En conclusion, les cellules NK de patients asthmatiques sévères présentent un défaut dans leur réponse à des agents mimant des composés viraux ou en réponse à un virus. Les cellules NK provenant de souris sensibilisées présentent le même défaut lorsqu'elles sont stimulées *in vivo* par un agoniste de TLRs. Les fonctions défectueuses des cellules NK pourraient donc participer à l'exacerbation viro-induite de la réaction asthmatique. Les perspectives de ces travaux sont de continuer à caractériser le phénotype et les fonctions des cellules NK des patients asthmatiques sévères, de déterminer si le phénotype des cellules NK peut être modifié entre les différents phénotype de patients, et d'évaluer le rôle des cellules NK dans un modèle murin d'exacerbation viro-induite de la réaction asthmatique.

# **BIBLIOGRAPHIE**

Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9, 1869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>

Adib-Conquy, M., Scott-Algara, D., Cavaillon, J.-M., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., 2014. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol. Cell Biol.* 92, 256–262. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.99>

Agache, I., Akdis, C.A., 2016. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergol. Int.* 65, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.04.011>

Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>

Allakhverdi, Z., Comeau, M.R., Smith, D.E., Toy, D., Endam, L.M., Desrosiers, M., Liu, Y.-J., Howie, K.J., Denburg, J.A., Gauvreau, G.M., Delespesse, G., 2009. CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.022>

Allan, D.S.J., Rybalov, B., Awong, G., Zúñiga-Pflücker, J.C., Kopcow, H.D., Carlyle, J.R., Strominger, J.L., 2010. TGF- $\beta$  affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 40, 2289–2295. <https://doi.org/10.1002/eji.200939910>

Al-Muhsen, S., Johnson, J.R., Hamid, Q., 2011. Remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 451–462. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.047>

Al-Ramli, W., Préfontaine, D., Chouiali, F., Martin, J.G., Olivenstein, R., Lemièrre, C., Hamid, Q., 2009. TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1185–1187. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.024>

Altman, M.C., Whalen, E., Togias, A., O'Connor, G.T., Bacharier, L.B., Bloomberg, G.R., Kattan, M., Wood, R.A., Presnell, S., LeBeau, P., Jaffee, K., Visness, C.M., Busse, W.W., Gern, J.E., 2018. Allergen-induced activation of natural killer cells represents an early-life immune response in the development of allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 142, 1856–1866. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.019>

Amano, K., Hirayama, M., Azuma, E., Iwamoto, S., Keida, Y., Komada, Y., 2015. Neutrophils Induced Licensing of Natural Killer Cells. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/747680>

Amin, K., 2012. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir. Med.* 106, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.09.007>

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D.G., Mandelboim, O., 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6, 515–523. <https://doi.org/10.1038/ni1190>

Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., Mandelboim, O., 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* 31, 2680–2689. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200109\)31:9<2680::AID-IMMU2680gt;3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::AID-IMMU2680gt;3.0.CO;2-A)

Awad, A., Yassine, H., Barrier, M., Vorng, H., Marquillies, P., Tsicopoulos, A., Duez, C., 2014. Natural Killer Cells Induce Eosinophil Activation and Apoptosis. *PLoS ONE* 9, e94492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094492>

Barletta, K.E., Cagnina, R.E., Wallace, K.L., Ramos, S.I., Mehrad, B., Linden, J., 2012. Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J. Immunol. Methods* 375, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.09.013>

Barnig, C., Cernadas, M., Dutile, S., Liu, X., Perrella, M.A., Kazani, S., Wechsler, M.E., Israel, E., Levy, B.D., 2013. Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci. Transl. Med.* 5, 174ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004812>

Barnig, C., Frossard, N., Levy, B.D., 2018. Towards targeting resolution pathways of airway inflammation in asthma. *Pharmacol. Ther.* 186, 98–113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.004>

Baruwa, P., Sarmah, K.R., 2013. Obesity and asthma. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* 30, 38–46. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.106132>

Beldi-Ferchiou, A., Caillat-Zucman, S., 2017. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2129. <https://doi.org/10.3390/ijms18102129>

Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Pessino, A., Nencioni, A., Liggieri, G., Moretta, L., Mantovani, A., Moretta, A., Bottino, C., 2014. TLR activation of tumor-associated macrophages from ovarian cancer patients triggers cytolytic activity of NK cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 1814–1822. <https://doi.org/10.1002/eji.201344130>

Bellora, F., Castriconi, R., Doni, A., Cantoni, C., Moretta, L., Mantovani, A., Moretta, A., Bottino, C., 2012. M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur. J. Immunol.* 42, 1618–1626. <https://doi.org/10.1002/eji.201142173>

Bi, J., Tian, Z., 2017. NK Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00760>

Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., Guzmán, C.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116, 3853–3864. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281675>

Boivin, W.A., Cooper, D.M., Hiebert, P.R., Granville, D.J., 2009. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 89, 1195–1220. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.91>

Braido, F., Tiotiu, A., Kowal, K., Mihaicuta, S., Novakova, P., Oguzulgen, I.K., 2018. Phenotypes/endotypes-driven treatment in asthma: *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 1. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000440>

Britt, R.D., Thompson, M.A., Sasse, S.K., Pabelick, C.M., Gerber, A.N., Prakash, Y.S., 2018. Th1 Cytokines, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , Promote Corticosteroid Resistance in Developing Human Airway Smooth Muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajplung.00547.2017>

Buch, T., Heppner, F.L., Tertilt, C., Heinen, T.J.A.J., Kremer, M., Wunderlich, F.T., Jung, S., Waisman, A., 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat. Methods* 2, 419–426. <https://doi.org/10.1038/nmeth762>

Buckland, K.F., O'Connor, E., Murray, L.A., Hogaboam, C.M., 2008. Toll like receptor-2 modulates both innate and adaptive immune responses during chronic fungal asthma in mice. *Inflamm. Res.* 57, 379–387. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8004-y>

Bullens, D.M., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P.W., Dupont, L.J., Ceuppens, J.L., 2006. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* 7. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-135>

Busse, W.W., Lemanske, R.F., Gern, J.E., 2010. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *The Lancet* 376, 826–834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61380-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61380-3)

Carr, T.F., Kraft, M., 2018. Use of biomarkers to identify phenotypes and endotypes of severe asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 121, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.07.029>

Chaput, C., Sander, L.E., Suttorp, N., Opitz, B., 2013. NOD-Like Receptors in Lung Diseases. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00393>

Choy, D.F., Hart, K.M., Borthwick, L.A., Shikotra, A., Nagarkar, D.R., Siddiqui, S., Jia, G., Ohri, C.M., Doran, E., Vannella, K.M., Butler, C.A., Hargadon, B., Sciruba, J.C., Gieseck, R.L., Thompson, R.W., White, S., Abbas, A.R., Jackman, J., Wu, L.C., Egen, J.G., Heaney, L.G., Ramalingam, T.R., Arron, J.R., Wynn, T.A., Bradding, P., 2015. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci. Transl. Med.* 7, 301ra129. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab3142>

Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P.J., Adcock, I.M., Bateman, E.D., Bel, E.H., Bleecker, E.R., Boulet, L.-P., Brightling, C., Chané, P., Dahlen, S.-E., Djukanovic, R., Frey, U., Gaga, M., Gibson, P., Hamid, Q., Jajour, N.N., Mauad, T., Sorkness, R.L., Teague, W.G., 2014. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.* 43, 343–373. <https://doi.org/10.1183/09031936.00202013>

Cibrián, D., Sánchez-Madrid, F., 2017. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 47, 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>

Cifaldi, L., Prencipe, G., Caiello, I., Bracaglia, C., Locatelli, F., De Benedetti, F., Strippoli, R., 2015. Inhibition of Natural Killer Cell Cytotoxicity by Interleukin-6: Implications for the Pathogenesis of Macrophage Activation Syndrome: INHIBITION OF NK CELL CYTOTOXICITY BY IL-6. *Arthritis Rheumatol.* 67, 3037–3046. <https://doi.org/10.1002/art.39295>

Cisternas, M.G., Blanc, P.D., Yen, I.H., Katz, P.P., Earnest, G., Eisner, M.D., Shiboski, S., Yelin, E.H., 2003. A comprehensive study of the direct and indirect costs of adult asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 1212–1218. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1449>

Coma, G., Peña, R., Blanco, J., Rosell, A., Borrás, F.E., Esté, J.A., Clotet, B., Ruiz, L., Parkhouse, R.M.E., Bofill, M., 2006. Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL)8, CXCL9 and CXCL10. *Clin. Exp. Immunol.* 145, 535–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03145.x>

Crinier, A., Viant, C., Girard-Madoux, M., Vivier, É., 2017. [Innate lymphoid cells]. *Med. Sci.* MS 33, 534–542. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>

Culley, F.J., Pollott, J., Openshaw, P.J.M., 2002. Age at First Viral Infection Determines the Pattern of T Cell-mediated Disease during Reinfection in Adulthood. *J. Exp. Med.* 196, 1381–1386. <https://doi.org/10.1084/jem.20020943>

De Maria, A., Moretta, L., 2011. Revisited function of human NK cell subsets. *Cell Cycle* 10, 1178–1179. <https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15227>

de Rham, C., Ferrari-Lacraz, S., Jendly, S., Schneiter, G., Dayer, J.-M., Villard, J., 2007. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res. Ther.* 9, R125. <https://doi.org/10.1186/ar2336>

Delmas, M.-C., Fuhrman, C., 2010. L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives. *Rev. Mal. Respir.* 27, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2009.09.001>

Di Santo, J.P., 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090700>

Duncan, C.J.A., Lawrie, A., Blaylock, M.G., Douglas, J.G., Walsh, G.M., 2003. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur. Respir. J.* 22, 484–490. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00109803a>

Durrani, S.R., Montville, D.J., Pratt, A.S., Sahu, S., DeVries, M.K., Rajamanickam, V., Gangnon, R.E., Gill, M.A., Gern, J.E., Lemanske, R.F., Jackson, D.J., 2012. Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.023>

Duvall, M.G., Barnig, C., Cernadas, M., Ricklefs, I., Krishnamoorthy, N., Grossman, N.L., Bhakta, N.R., Fahy, J.V., Bleeker, E.R., Castro, M., Erzurum, S.C., Gaston, B.M., Jarjour, N.N., Mauger, D.T., Wenzel, S.E., Comhair, S.A., Coverstone, A.M., Fajt, M.L., Hastie, A.T., Johansson, M.W., Peters, M.C., Phillips, B.R., Israel, E., Levy, B.D., National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program-3 Investigators, 2017. Natural killer cell-mediated

inflammation resolution is disabled in severe asthma. *Sci. Immunol.* 2, eaam5446. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam5446>

Edwards, M.R., Regamey, N., Vareille, M., Kieninger, E., Gupta, A., Shoemark, A., Saglani, S., Sykes, A., Macintyre, J., Davies, J., Bossley, C., Bush, A., Johnston, S.L., 2013. Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunol.* 6, 797–806. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.118>

Everaere, L., Ait-Yahia, S., Molendi-Coste, O., Vorng, H., Quemener, S., LeVu, P., Fleury, S., Bouchaert, E., Fan, Y., Duez, C., de Nadai, P., Staels, B., Dombrowicz, D., Tsicopoulos, A., 2016. Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1309-1318.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.019>

Farag, S.S., 2002. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100, 1935–1947. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0350>

Farhadi, N., Lambert, L., Triulzi, C., Openshaw, P.J.M., Guerra, N., Culley, F.J., 2014. Natural killer cell NKG2D and granzyme B are critical for allergic pulmonary inflammation\*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 827-835.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.048>

Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., Michaëlsson, J., 2010. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* 115, 1166–1174. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-245746>

Fehrenbach, H., Wagner, C., Wegmann, M., 2017. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res.* 367, 551–569. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2566-8>

Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., Münz, C., 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16606–16611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407522101>

Ferrini, M.E., Hong, S., Stierle, A., Stierle, D., Stella, N., Roberts, K., Jaffar, Z., 2017. CB2 receptors regulate natural killer cells that limit allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Allergy* 72, 937–947. <https://doi.org/10.1111/all.13107>

Fitzpatrick, A.M., Holguin, F., Teague, W.G., Brown, L.A.S., 2008. Alveolar macrophage phagocytosis is impaired in children with poorly controlled asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1372–1378, 1378.e1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.03.008>

Fleming, L., Tsartsali, L., Wilson, N., Regamey, N., Bush, A., 2012. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax* 67, 675–681. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201064>

Ford, J.G., Rennick, D., Donaldson, D.D., Venkayya, R., McArthur, C., Hansell, E., Kurup, V.P., Warnock, M., Grünig, G., 2001. IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 1769–1777.

Freud, A.G., Mundy-Bosse, B.L., Yu, J., Caligiuri, M.A., 2017. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* 47, 820–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.008>

Freud, A.G., Yu, J., Caligiuri, M.A., 2014. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.* 26, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.008>

Fuchs, B., Knothe, S., Rochlitzer, S., Nassimi, M., Greweling, M., Lauenstein, H.-D., Nassenstein, C., Müller, M., Ebensen, T., Dittrich, A.-M., Krug, N., Guzman, C.A., Braun, A., 2010. A Toll-Like Receptor 2/6 Agonist Reduces Allergic Airway Inflammation in Chronic Respiratory Sensitisation to Timothy Grass Pollen Antigens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152, 131–139. <https://doi.org/10.1159/000265534>

Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M., 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445–454. <https://doi.org/10.1038/nature07204>

Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., Trinchieri, G., 2005. The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions. *J. Immunol.* 174, 727–734. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.727>

Ghadially, H., Horani, A., Glasner, A., Elboim, M., Gazit, R., Shoseyov, D., Mandelboim, O., 2013. NKp46 regulates allergic responses. *Eur. J. Immunol.* 43, 3006–3016. <https://doi.org/10.1002/eji.201343388>

Gill, M.A., 2012. The role of dendritic cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 889–901. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.028>

GINA, 2017, 2017. 2017 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. *Glob. Initiat. Asthma - GINA*. URL <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/> (accessed 1.28.18).

Hadebe, S., Brombacher, F., Brown, G.D., 2018. C-Type Lectin Receptors in Asthma. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00733>

Haldar, P., Pavord, I.D., Shaw, D.E., Berry, M.A., Thomas, M., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J., Green, R.H., 2008. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 218–224. <https://doi.org/10.1164/rccm.200711-1754OC>

Hamano, S., Matsumoto, K., Tonai, K., Fukuyama, S., Kan-o, K., Seki, N., Inoue, H., Nakanishi, Y., 2017. Effects of corticosteroid plus long-acting beta2-agonist on the expression of PD-L1 in double-stranded RNA-induced lung inflammation in mice. *J. Inflamm.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12950-017-0149-4>

Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2006. Dendritic Cells in Asthma, in: Lutz, M.B., Romani, N., Steinkasserer, A. (Eds.), *Handbook of Dendritic Cells*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 1059–1079. <https://doi.org/10.1002/9783527619696.ch50>

Hart, O.M., Athie-Morales, V., O'Connor, G.M., Gardiner, C.M., 2005. TLR7/8-Mediated Activation of Human NK Cells Results in Accessory Cell-Dependent IFN- Production. *J. Immunol.* 175, 1636–1642. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1636>

Hartl, D., Koller, B., Mehlhorn, A.T., Reinhardt, D., Nicolai, T., Schendel, D.J., Griese, M., Krauss-Etschmann, S., 2007. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1258–1266. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.02.023>

Haspeslagh, E., van Helden, M.J., Deswarte, K., De Prijck, S., van Moorleghe, J., Boon, L., Hammad, H., Vivier, E., Lambrecht, B.N., 2018. Role of NKp46<sup>+</sup> natural killer cells in house dust mite-driven asthma. *EMBO Mol. Med.* e8657. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708657>

Haworth, O., Cernadas, M., Levy, B.D., 2011. NK Cells Are Effectors for Resolvin E1 in the Timely Resolution of Allergic Airway Inflammation. *J. Immunol.* 186, 6129–6135. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004007>

Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L., Smyth, M.J., 2006. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214, 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00454.x>

He, Y., Cao, J., Zhao, C., Li, X., Zhou, C., Hirsch, F., 2018. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *OncoTargets Ther.* Volume 11, 7005–7009. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170385>

Hofstra, C.L., Van Ark, I., Hofman, G., Kool, M., Nijkamp, F.P., Van Oosterhout, A.J., 1998. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with

inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 5054–5060.

Hosoki, K., Ying, S., Corrigan, C., Qi, H., Kurosky, A., Jennings, K., Sun, Q., Boldogh, I., Sur, S., 2015. Analysis of a Panel of 48 Cytokines in BAL Fluids Specifically Identifies IL-8 Levels as the Only Cytokine that Distinguishes Controlled Asthma from Uncontrolled Asthma, and Correlates Inversely with FEV1. *PLOS ONE* 10, e0126035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126035>

Huang, T.J., MacAry, P.A., Eynott, P., Moussavi, A., Daniel, K.C., Askenase, P.W., Kemeny, D.M., Chung, K.F., 2001. Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 166, 207–217.

Huang, Y.J., Boushey, H.A., 2015. The microbiome in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.011>

Irvin, C., Zafar, I., Good, J., Rollins, D., Christianson, C., Gorska, M.M., Martin, R.J., Alam, R., 2014. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1175–1186.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.038>

Janeway, C.J., Travers, P., Walport, M., 2001. *The production of IgE - Immunobiology - NCBI Bookshelf.* Garland Science.

Jarahian, M., Fiedler, M., Cohnen, A., Djandji, D., Hämmerling, G.J., Gati, C., Cerwenka, A., Turner, P.C., Moyer, R.W., Watzl, C., Hengel, H., Momburg, F., 2011. Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS Pathog.* 7, e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002195>

Jayaraman, A., Jackson, D.J., Message, S.D., Pearson, R.M., Aniscenko, J., Caramori, G., Mallia, P., Papi, A., Shamji, B., Edwards, M., Westwick, J., Hansel, T., Stanciu, L.A., Johnston, S.L., Bartlett, N.W., 2014. IL-15 complexes induce NK- and T-cell responses independent of type I IFN signaling during rhinovirus infection. *Mucosal Immunol.* 7, 1151–1164. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.2>

Jira, M., Antosova, E., Vondra, V., Strejcek, J., Mazakova, H., Prazakova, J., 1988. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics.: I. Effect of acute antigen-specific challenge. *Allergy* 43, 294–298. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1988.tb00903.x>

Jirmo, A.C., Daluege, K., Happle, C., Albrecht, M., Dittrich, A.-M., Busse, M., Habener, A., Skuljec, J., Hansen, G., 2016. IL-27 Is Essential for Suppression of Experimental Allergic Asthma by the TLR7/8 Agonist R848 (Resiquimod). *J. Immunol.* 197, 4219–4227. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601094>

Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34, 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>

Kennedy, J.L., Shaker, M., McMeen, V., Gern, J., Carper, H., Murphy, D., Lee, W.-M., Bochkov, Y.A., Vrtis, R.F., Platts-Mills, T., Patrie, J., Borish, L., Steinke, J.W., Woods, W.A., Heymann, P.W., 2014. Comparison of Viral Load in Individuals with and without Asthma during Infections with Rhinovirus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 532–539. <https://doi.org/10.1164/rccm.201310-1767OC>

Kennedy, J.L., Turner, R.B., Braciale, T., Heymann, P.W., Borish, L., 2012. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr. Opin. Virol.* 2, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.008>

Kim, M., Osborne, N.R., Zeng, W., Donaghy, H., McKinnon, K., Jackson, D.C., Cunningham, A.L., 2012. Herpes Simplex Virus Antigens Directly Activate NK Cells via TLR2, Thus Facilitating Their Presentation to CD4 T Lymphocytes. *J. Immunol.* 188, 4158–4170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103450>

Kim, Y.K., Shin, J.S., Nahm, M.H., 2016. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med. J.* 57, 5–14. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>

Kormann, M.S.D., Depner, M., Hartl, D., Klopp, N., Illig, T., Adamski, J., Vogelberg, C., Weiland, S.K., von Mutius, E., Kabesch, M., 2008. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 86-92.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.039>

Korsgren, M., Persson, C.G.A., Sundler, F., Bjerke, T., Hansson, T., Chambers, B.J., Hong, S., Kaer, L.V., Ljunggren, H.-G., Korsgren, O., 1999. Natural Killer Cells Determine Development of Allergen-induced Eosinophilic Airway Inflammation in Mice. *J. Exp. Med.* 189, 553–562. <https://doi.org/10.1084/jem.189.3.553>

Krishnamoorthy, N., Burkett, P.R., Dalli, J., Abdulnour, R.-E.E., Colas, R., Ramon, S., Phipps, R.P., Petasis, N.A., Kuchroo, V.K., Serhan, C.N., Levy, B.D., 2015. Cutting Edge: Maresin-1 Engages Regulatory T Cells To Limit Type 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Promote

Resolution of Lung Inflammation. *J. Immunol.* 194, 863–867.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402534>

Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., Vivier, E., 2014. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* 92, 221–229. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.98>

Kumar, R.K., Webb, D.C., Herbert, C., Foster, P.S., 2006. Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 5, 253–256.

Kuruvilla, M.E., Lee, F.E.-H., Lee, G.B., 2018. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>

Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2017. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat. Immunol.* 18, 1076–1083. <https://doi.org/10.1038/ni.3829>

Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2014. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* 16, 45–56. <https://doi.org/10.1038/ni.3049>

Lanier, L.L., 2015. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol. Res.* 3, 575–582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>

Lazarus, R., Raby, B.A., Lange, C., Silverman, E.K., Kwiatkowski, D.J., Vercelli, D., Klimecki, W.J., Martinez, F.D., Weiss, S.T., 2004. TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 594–600. <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-491OC>

Li, N.L., Davidson, C.L., Humar, A., Burshtyn, D.N., 2011. Modulation of the inhibitory receptor leukocyte Ig-like receptor 1 on human natural killer cells. *Front. Immunol.* 2, 46. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00046>

Lima, J.F., Oliveira, L.M.S., Pereira, N.Z., Duarte, A.J.S., Sato, M.N., 2017. Polyfunctional natural killer cells with a low activation profile in response to Toll-like receptor 3 activation in HIV-1-exposed seronegative subjects. *Sci. Rep.* 7, 524. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00637-3>

Lin, S.-J., Chang, L.-Y., Yan, D.-C., Huang, Y.-J., Lin, T.-J., Lin, T.-Y., 2003. Decreased intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and L-selectin (CD62L) expression on peripheral blood natural killer cells in asthmatic children with acute exacerbation. *Allergy* 58, 67–71.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., AlMazroa, M.A., Alvarado, M., Anderson, H.R., Anderson, L.M., Andrews, K.G., Atkinson, C., Baddour, L.M., Barker-Collo, S., Bartels, D.H., Bell, M.L., Benjamin, E.J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Abdulhak, A.B., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S.S., Coffeng, L.E., Colan, S.D., Colquhoun, S., Colson, K.E., Condon, J., Connor, M.D., Cooper, L.T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K.C., Couser, W., Cowie, B.C., Criqui, M.H., Cross, M., Dabhadkar, K.C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D.C., Dharmaratne, S.D., Dorsey, E.R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P.J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A.D., Forouzanfar, M.H., Fowkes, F.G.R., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M.K., Gabriel, S.E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R.F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y.A., Haring, D., Harrison, J.E., Havmoeller, R., Hay, R.J., Hoen, B., Hotez, P.J., Hoy, D., Jacobsen, K.H., James, S.L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J.-P., Knowlton, L.M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S.E., Ohno, S.L., Mabweijano, J., MacIntyre, M.F., Mallinger, L., March, L., Marks, G.B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B.M., McAnulty, J.H., McDermott, M.M., McGrath, J., Memish, Z.A., Mensah, G.A., Merriman, T.R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T.R., Mock, C., Mocumbi, A.O., Mokdad, A.A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M.N., Naldi, L., Narayan, K.M.V., Nasseri, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S.B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J.D., Rivero, A.P., Padilla, R.P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C.A., Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J.T., Rein, D.B., Remuzzi, G., Rivara, F.P., Roberts, T., De León, F.R., Rosenfeld, L.C., Rushton, L., Sacco, R.L., Salomon, J.A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D.C., Segui-Gomez, M., Shepard, D.S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J.A., Thomas, B., Tleyjeh, I.M., Towbin, J.A., Truelsen, T., Undurraga, E.A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G.R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M.A., Weintraub, R., Wilkinson, J.D., Woolf, A.D., Wulf, S., Yeh, P.-H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z.-J., Lopez, A.D., Murray, C.J., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380, 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)

Luci, C., Gaudy-Marqueste, C., Rouzair, P., Audonnet, S., Cognet, C., Hennino, A., Nicolas, J.-F., Grob, J.-J., Tomasello, E., 2012. Peripheral natural killer cells exhibit qualitative and

quantitative changes in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 166, 789–796. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10814.x>

Lunding, L.P., Webering, S., Vock, C., Behrends, J., Wagner, C., Holscher, C., Fehrenbach, H., Wegmann, M., 2015. Poly(inosinic-cytidylic) Acid-Triggered Exacerbation of Experimental Asthma Depends on IL-17A Produced by NK Cells. *J. Immunol.* 194, 5615–5625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402529>

Lysakova-Devine, T., O'Farrelly, C., 2014. Tissue-specific NK cell populations and their origin. *J. Leukoc. Biol.* 96, 981–990. <https://doi.org/10.1189/jlb.1RU0514-241R>

Manners, S., Alam, R., Schwartz, D.A., Gorska, M.M., 2014. A mouse model links asthma susceptibility to prenatal exposure to diesel exhaust. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 63-72.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.047>

Mathias, C.B., Guernsey, L.A., Zammit, D., Brammer, C., Wu, C.A., Thrall, R.S., Aguila, H.L., 2014. Pro-inflammatory role of natural killer cells in the development of allergic airway disease. *Clin. Exp. Allergy* 44, 589–601. <https://doi.org/10.1111/cea.12271>

Mathur, S.K., Fichtinger, P.S., Kelly, J.T., Lee, W.-M., Gern, J.E., Jarjour, N.N., 2013. Interaction between allergy and innate immunity: model for eosinophil regulation of epithelial cell interferon expression. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 111, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.05.010>

Michelet, X., Dyck, L., Hogan, A., Loftus, R.M., Duquette, D., Wei, K., Beyaz, S., Tavakkoli, A., Foley, C., Donnelly, R., O'Farrelly, C., Raverdeau, M., Vernon, A., Pettee, W., O'Shea, D., Nikolajczyk, B.S., Mills, K.H.G., Brenner, M.B., Finlay, D., Lynch, L., 2018. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat. Immunol.* 19, 1330–1340. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0251-7>

Mitchell, P.D., O'Byrne, P.M., 2017. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest* 151, 1338–1344. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.042>

Moore, W.C., Meyers, D.A., Wenzel, S.E., Teague, W.G., Li, H., Li, X., D'Agostino, R., Castro, M., Curran-Everett, D., Fitzpatrick, A.M., Gaston, B., Jarjour, N.N., Sorkness, R., Calhoun, W.J., Chung, K.F., Comhair, S.A.A., Dweik, R.A., Israel, E., Peters, S.P., Busse, W.W., Erzurum, S.C., Bleecker, E.R., 2010. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 315–323. <https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0896OC>

Moreno-Valencia, Y., Hernandez-Hernandez, V.A., Romero-Espinoza, J.A.I., Coronel-Tellez, R.H., Castillejos-Lopez, M., Hernandez, A., Perez-Padilla, R., Alejandre-Garcia, A., de la Rosa-Zamboni, D., Ormsby, C.E., Vazquez-Perez, J.A., 2015. Detection and characterization of respiratory viruses causing acute respiratory illness and asthma exacerbation in children during three different seasons (2011-2014) in Mexico City. *Influenza Other Respir. Viruses* 9, 287–292. <https://doi.org/10.1111/irv.12346>

Mosser, A.G., Vrtis, R., Burchell, L., Lee, W.-M., Dick, C.R., Weisshaar, E., Bock, D., Swenson, C.A., Cornwell, R.D., Meyer, K.C., Jarjour, N.N., Busse, W.W., Gern, J.E., 2005. Quantitative and Qualitative Analysis of Rhinovirus Infection in Bronchial Tissues. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 645–651. <https://doi.org/10.1164/rccm.200407-970OC>

Müller, T.F., Gicklhorn, D., Jungraithmayr, T., Eickmann, M., Lange, H., Radsak, K., Reschke, M., 2002. Pattern and persistence of the epitope-specific IgM response against human cytomegalovirus in renal transplant patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 24, 45–56.

Nanzer, A.M., Chambers, E.S., Ryanna, K., Richards, D.F., Black, C., Timms, P.M., Martineau, A.R., Griffiths, C.J., Corrigan, C.J., Hawrylowicz, C.M., 2013. Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in a glucocorticoid-independent fashion. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 297-304.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.03.037>

Narni-Mancinelli, E., Chaix, J., Fenis, A., Kerdiles, Y.M., Yessaad, N., Reynders, A., Gregoire, C., Luche, H., Ugolini, S., Tomasello, E., Walzer, T., Vivier, E., 2011. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18324–18329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112064108>

Narni-Mancinelli, E., Gauthier, L., Baratin, M., Guia, S., Fenis, A., Deghmane, A.-E., Rossi, B., Fourquet, P., Escalière, B., Kerdiles, Y.M., Ugolini, S., Taha, M.-K., Vivier, E., 2017. Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. *Sci. Immunol.* 2. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9628>

Ohira, M., Nishida, S., Tryphonopoulos, P., Ruiz, P., Ohdan, H., Tzakis, A.G., 2017. Impact of Steroids on Natural Killer Cells Against Cytotoxicity and Hepatitis C Virus Replication. *Transplant. Proc.* 49, 1160–1164. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.03.018>

Oliver, B.G.G., Robinson, P., Peters, M., Black, J., 2014. Viral infections and asthma: an inflammatory interface? *Eur. Respir. J.* 44, 1666–1681. <https://doi.org/10.1183/09031936.00047714>

Omachi, T.A., Iribarren, C., Sarkar, U., Tolstykh, I., Yelin, E.H., Katz, P.P., Blanc, P.D., Eisner, M.D., 2008. Risk factors for death in adults with severe asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 101, 130–136. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60200-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60200-1)

O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., Bowie, A.G., 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460. <https://doi.org/10.1038/nri3446>

Ordonez, C., Shaughnessy, T., Matthay, M., Fahy, J., 2000. Increased Neutrophil Numbers and IL-8 Levels in Airway Secretions in Acute Severe Asthma: Clinical and Biologic Significance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1185–1190. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9812061>

Pallmer, K., Oxenius, A., 2016. Recognition and Regulation of T Cells by NK Cells. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00251>

Pandya, A.D., Al-Jaderi, Z., Høglund, R.A., Holmøy, T., Harbo, H.F., Norgauer, J., Maghazachi, A.A., 2011. Identification of human NK17/NK1 cells. *PloS One* 6, e26780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026780>

Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S.E., Reddel, H.K., 2018. Asthma. *The Lancet* 391, 783–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33311-1)

Parsons, K.S., Hsu, A.C., Wark, P. a. B., 2014. TLR3 and MDA5 signalling, although not expression, is impaired in asthmatic epithelial cells in response to rhinovirus infection. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 44, 91–101. <https://doi.org/10.1111/cea.12218>

Passos, S.T., Silver, J.S., O'Hara, A.C., Sehy, D., Stumhofer, J.S., Hunter, C.A., 2010. IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. *J. Immunol.* 184, 1776–1783. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901843>

Pease, J.E., 2006. Asthma, allergy and chemokines. *Curr. Drug Targets* 7, 3–12.

Pedersen, B.K., Beyer, J.M., 1986. Characterization of the in vitro effects of glucocorticosteroids on NK cell activity. *Allergy* 41, 220–224.

Pesce, S., Thoren, F.B., Cantoni, C., Prato, C., Moretta, L., Moretta, A., Marcenaro, E., 2017. The Innate Immune Cross Talk between NK Cells and Eosinophils Is Regulated by the Interaction of Natural Cytotoxicity Receptors with Eosinophil Surface Ligands. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00510>

Ple, C., Barrier, M., Amniai, L., Marquillies, P., Bertout, J., Tsicopoulos, A., Walzer, T., Lassalle, P., Duez, C., 2010. Natural Killer Cells Accumulate in Lung-Draining Lymph Nodes and Regulate Airway Eosinophilia in a Murine Model of Asthma: NK Cells in a Murine Model of Asthma. *Scand. J. Immunol.* 72, 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02419.x>

Quatrini, L., Wieduwild, E., Escaliere, B., Filtjens, J., Chasson, L., Laprie, C., Vivier, E., Ugolini, S., 2018. Endogenous glucocorticoids control host resistance to viral infection through the tissue-specific regulation of PD-1 expression on NK cells. *Nat. Immunol.* 19, 954–962. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0185-0>

Rahim, M.M.A., Tu, M.M., Mahmoud, A.B., Wight, A., Abou-Samra, E., Lima, P.D.A., Makrigiannis, A.P., 2014. Ly49 Receptors: Innate and Adaptive Immune Paradigms. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00145>

Rajalingam, R., 2018. Diversity of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and Disease. *Clin. Lab. Med.* 38, 637–653. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.08.001>

Ray, A., Raundhal, M., Oriss, T.B., Ray, P., Wenzel, S.E., 2016. Current concepts of severe asthma. *J. Clin. Invest.* 126, 2394–2403. <https://doi.org/10.1172/JCI84144>

Redecke, V., Hacker, H., Datta, S.K., Fermin, A., Pitha, P.M., Broide, D.H., Raz, E., 2004. Cutting Edge: Activation of Toll-Like Receptor 2 Induces a Th2 Immune Response and Promotes Experimental Asthma. *J. Immunol.* 172, 2739–2743. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2739>

Reuter, S., Dehzad, N., Martin, H., Bohm, L., Becker, M., Buhl, R., Stassen, M., Taube, C., 2012. TLR3 but Not TLR7/8 Ligand Induces Allergic Sensitization to Inhaled Allergen. *J. Immunol.* 188, 5123–5131. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101618>

Reuter, S., Stassen, M., Taube, C., 2010. Mast Cells in Allergic Asthma and Beyond. *Yonsei Med. J.* 51, 797. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.6.797>

Saglani, S., Lloyd, C.M., 2015. Novel concepts in airway inflammation and remodelling in asthma. *Eur. Respir. J.* 46, 1796–1804. <https://doi.org/10.1183/13993003.01196-2014>

Saikh, K.U., Lee, J.S., Kissner, T.L., Dyas, B., Ulrich, R.G., 2003. Toll-like receptor and cytokine expression patterns of CD56+ T cells are similar to natural killer cells in response to infection with Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J. Infect. Dis.* 188, 1562–1570. <https://doi.org/10.1086/379196>

Samitas, K., Zervas, E., Gaga, M., 2017. T2-low asthma: current approach to diagnosis and therapy. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 23, 48–55. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000342>

Schafer, J.L., Müller-Trutwin, M.C., Reeves, R.K., 2015. NK cell exhaustion: bad news for chronic disease? *Oncotarget* 6, 21797–21798. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5490>

Schett, G., Neurath, M.F., 2018. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05800-6>

Scordamaglia, F., Balsamo, M., Scordamaglia, A., Moretta, A., Mingari, M.C., Canonica, G.W., Moretta, L., Vitale, M., 2008. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.09.047>

Seillet, C., Belz, G.T., 2016. Differentiation and diversity of subsets in group 1 innate lymphoid cells. *Int. Immunol.* 28, 3–11. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv051>

Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., Cicora, L., Ludwig, M., Hamid, Q., Martin, J.G., 2008. Differences in Airway Cytokine Profile in Severe Asthma Compared to Moderate Asthma. *Chest* 133, 420–426. <https://doi.org/10.1378/chest.07-1881>

Simons, B., Ferrini, M.E., Carvalho, S., Bassett, D.J.P., Jaffar, Z., Roberts, K., 2017. PGI<sub>2</sub> Controls Pulmonary NK Cells That Prevent Airway Sensitization to House Dust Mite Allergen. *J. Immunol.* 198, 461–471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600275>

Siroux, V., Basagana, X., Boudier, A., Pin, I., Garcia-Aymerich, J., Vesin, A., Slama, R., Jarvis, D., Anto, J.M., Kauffmann, F., Sunyer, J., 2011. Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *Eur. Respir. J.* 38, 310–317. <https://doi.org/10.1183/09031936.00120810>

Stein, M.M., Hrusch, C.L., Gozdz, J., Igartua, C., Pivniouk, V., Murray, S.E., Ledford, J.G., Marques Dos Santos, M., Anderson, R.L., Metwali, N., Neilson, J.W., Maier, R.M., Gilbert, J.A., Holbreich, M., Thorne, P.S., Martinez, F.D., von Mutius, E., Vercelli, D., Ober, C., Sperling, A.I., 2016. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N. Engl. J. Med.* 375, 411–421. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508749>

Stewart, C.A., Walzer, T., Robbins, S.H., Malissen, B., Vivier, E., Prinz, I., 2007. Germ-line and rearranged Tcrd transcription distinguish bona fide NK cells and NK-like gammadelta T cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 1442–1452. <https://doi.org/10.1002/eji.200737354>

Stokes, J.R., Casale, T.B., 2016. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 117, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.05.016>

Stone, C.A., Miller, E.K., 2016. Understanding the Association of Human Rhinovirus with Asthma. *Clin. Vaccine Immunol.* 23, 6–10. <https://doi.org/10.1128/CVI.00414-15>

Sun, C., Xu, J., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Zhang, C., Wang, J., Song, J., Zheng, M., Sun, H., Wei, H., Xiao, W., Sun, R., Tian, Z., 2017. High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology* 6, e1264562. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1264562>

Tan, K.S., Ong, H.H., Yan, Y., Liu, J., Li, C., Ong, Y.K., Thong, K.T., Choi, H.W., Wang, D.-Y., Chow, V.T., 2018. In Vitro Model of Fully Differentiated Human Nasal Epithelial Cells Infected With Rhinovirus Reveals Epithelium-Initiated Immune Responses. *J. Infect. Dis.* 217, 906–915. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix640>

Thorén, F.B., Riise, R.E., Ousbäck, J., Della Chiesa, M., Alsterholm, M., Marcenaro, E., Pesce, S., Prato, C., Cantoni, C., Bylund, J., Moretta, L., Moretta, A., 2012. Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1668–1674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102002>

Timonen, T., Stenius-Aarniala, B., 1985. Natural killer cell activity in asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 59, 85–90.

Van Buul, A.R., Taube, C., 2015. Treatment of severe asthma: entering the era of targeted therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 1713–1725. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1084283>

van Tilburg Bernardes, E., Arrieta, M.-C., 2017. Hygiene Hypothesis in Asthma Development: Is Hygiene to Blame? *Arch. Med. Res.* 48, 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.009>

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H., 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>

Voehringer, D., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2008. Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced “memory-like” T cells in constitutively T cell-depleted mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 4742–4753.

Walzer, T., 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>

Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., Chemin, K., Morel, Y., Dalod, M., Imbert, J., Pierres, M., Moretta, A., Romagne, F., Vivier, E., 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via Nkp46. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3384–3389. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609692104>

Wang, J., Li, F., Zheng, M., Sun, R., Wei, H., Tian, Z., 2012. Lung natural killer cells in mice: phenotype and response to respiratory infection. *Immunology* 137, 37–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03607.x>

Wang, Y.-H., Voo, K.S., Liu, B., Chen, C.-Y., Uygungil, B., Spoede, W., Bernstein, J.A., Huston, D.P., Liu, Y.-J., 2010. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J. Exp. Med.* 207, 2479–2491. <https://doi.org/10.1084/jem.20101376>

Wark, P.A.B., 2005. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J. Exp. Med.* 201, 937–947. <https://doi.org/10.1084/jem.20041901>

Wehner, R., Dietze, K., Bachmann, M., Schmitz, M., 2011. The Bidirectional Crosstalk between Human Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *J. Innate Immun.* 3, 258–263. <https://doi.org/10.1159/000323923>

Wehner, R., Löbel, B., Bornhäuser, M., Schäkel, K., Cartellieri, M., Bachmann, M., Rieber, E.P., Schmitz, M., 2009. Reciprocal activating interaction between 6-sulfo LacNAc<sup>+</sup> dendritic cells and NK cells. *Int. J. Cancer* 124, 358–366. <https://doi.org/10.1002/ijc.23962>

Wei, H., Zhang, J., Xiao, W., Feng, J., Sun, R., Tian, Z., 2005. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: Natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 841–847. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.11.026>

- Weigt, H., Nassenstein, C., Tschernig, T., Mühlrad, P.F., Krug, N., Braun, A., 2005. Efficacy of Macrophage-activating Lipopeptide-2 Combined with Interferon- $\gamma$  in a Murine Asthma Model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 566–572. <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1490OC>
- Wenzel, S.E., 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 18, 716–725. <https://doi.org/10.1038/nm.2678>
- Wherry, E.J., 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>
- Xiao, C., Puddicombe, S.M., Field, S., Haywood, J., Broughton-Head, V., Puxeddu, I., Haitchi, H.M., Vernon-Wilson, E., Sammut, D., Bedke, N., Cremin, C., Sones, J., Djukanović, R., Howarth, P.H., Collins, J.E., Holgate, S.T., Monk, P., Davies, D.E., 2011. Defective epithelial barrier function in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 549-556.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.05.038>
- Yu, J., Mitsui, T., Wei, M., Mao, H., Butchar, J.P., Shah, M.V., Zhang, J., Mishra, A., Alvarez-Breckenridge, C., Liu, X., Liu, S., Yokohama, A., Trotta, R., Marcucci, G., Benson, D.M., Loughran, T.P., Tridandapani, S., Caligiuri, M.A., 2011. NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J. Clin. Invest.* 121, 1456–1470. <https://doi.org/10.1172/JCI43242>
- Yu, M., Levine, S.J., 2011. Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.02.001>
- Yuan, D., 2013. The Role of CD2 Family Members in NK-Cell Regulation of B-Cell Antibody Production. *Antibodies* 3, 1–15. <https://doi.org/10.3390/antib3010001>
- Zhao, J., Shang, H., Cao, X., Huang, Y., Fang, X., Zhang, S., Xie, M., Xie, J., Liu, X., 2017. Association of polymorphisms in TLR2 and TLR4 with asthma risk: An update meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96, e7909. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007909>
- Ziegler, S., Weiss, E., Schmitt, A.-L., Schlegel, J., Burgert, A., Terpitz, U., Sauer, M., Moretta, L., Sivori, S., Leonhardt, I., Kurzai, O., Einsele, H., Loeffler, J., 2017. CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06238-4>
- Zingoni, A., Molfetta, R., Fionda, C., Soriani, A., Paolini, R., Cippitelli, M., Cerboni, C., Santoni, A., 2018. NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One.” *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00476>