Caractérisation immunologique et protéomique des cellules dendritiques tolérogènes humaines. Application à la recherche de biomarqueurs de l'immunothérapie spécifique allergénique

Aline Zimmer

▶ **To cite this version:**

Aline Zimmer. Caractérisation immunologique et protéomique des cellules dendritiques tolérogènes humaines. Application à la recherche de biomarqueurs de l'immunothérapie spécifique allergénique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114818 . tel-00736730

HAL Id: tel-00736730

https://theses.hal.science/tel-00736730

Submitted on 29 Sep 2012

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 PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : SIGNALISATION CELLULAIRE

DISCIPLINE : *PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE*

ANNÉE 2011 – 2012 SÉRIE DOCTORAT N° 1124

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 28/09/2011

par

Aline ZIMMER

Caractérisation immunologique et protéomique des cellules dendritiques tolérogènes humaines. Application à la recherche de biomarqueurs de l'immunothérapie spécifique allergénique

Composition du jury :

Rapporteurs :	Dr. Christophe Caux	Directeur de recherche, Centre Léon Bérard, Lyon
	Dr. Charles Pineau	Directeur de recherche, Biogenouest, Rennes
Examinateurs :	Pr. Sylvie Chollet-Martin	PU-PH, Université Paris XI
	Dr. Sandrine Henri	Chargée de recherche, INSERM, Marseille
Directeur de thèse :	Pr. Marc Pallardy	Professeur, Université Paris XI
Co-directeur de thèse :	Dr. Laurent Mascarell	Responsable immunologie mucosale, Stallergenes

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du service de recherche et développement de Stallergenes sous la direction de Philippe Moingeon et Laurent Mascarell. Je tiens à les remercier de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de passer ces trois années si riches chez Stallergenes.

Plus particulièrement, je tiens à exprimer ma reconnaissance à Philippe pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès internationaux et pour m'avoir permis de suivre la formation à l'expérimentation animale de niveau 1. Je le remercie également pour les nombreuses discussions scientifiques passionnées que nous avons pu avoir.

Je remercie Laurent pour son enthousiasme et son soutien inconditionnel à tous les projets auxquels j'ai participé, qu'il s'agisse du projet principal de protéomique sur les DCs ou des nombreux autres comme *Aspergillus* ou SLIG. Merci également de m'avoir donné les moyens d'effectuer toutes ces manips et de m'avoir laissé une grande autonomie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Marc Pallardy pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, et pour son aide précieuse sur le projet *Aspergillus*. J'en profite pour remercier Armelle Biola-Vidamment pour avoir pris le temps de faire quelques manips avec moi à la faculté et pour avoir partagé avec moi différentes idées très intéressantes.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse : Christophe Caux comme spécialiste de l'immunologie et Charles Pineau comme spécialiste de la protéomique. Merci également à Sylvie Chollet Martin et à Sandrine Henri pour avoir respectivement accepté de présider le jury et d'examiner mon travail.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans Julien Bouley avec qui j'ai eu la chance de travailler et que j'admire particulièrement. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris en DIGE, en spectrométrie de masse ou plus généralement en science. Nos discussions passionnées, qui ont pu agacer nos collègues par moments, me manqueront énormément. Enfin, comme tu le sais, tu es devenu mon ami et je te remercie pour tous les moments que nous avons passé ensemble.

J'en arrive à Emmanuel Nony, responsable de la plateforme de protéomique, qui est un exemple pour moi tant au point de vu scientifique qu'humain. Je tiens évidemment à te remercier pour m'avoir permis d'être le « parasite saprophyte » de la plateforme, mais surtout pour m'avoir montré comment manager une équipe. J'admire tes qualités d'orateur et surtout ta sérénité et ton calme légendaire. J'ai encore beaucoup d'efforts à réaliser pour arriver à ton niveau, mais j'essaye de suivre au mieux, tes nombreux conseils.

J'exprime également mes remerciements à Laurence Van Overtvelt pour avoir su manager différentes situations difficiles. Ta motivation et ta force de caractère sont exceptionnelles et m'ont beaucoup appris.

Je remercie également Véronique BODO pour ses avis critiques quant à mon travail tout au long de cette thèse, pour m'avoir permis d'analyser les échantillons cliniques de la VO56 et pour m'avoir intégré au groupe « biomarqueurs ». Cette thématique est devenue une passion pour moi et je te remercie de me l'avoir fait découvrir.

Ensuite, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont travaillé avec moi sur les projets. Tout d'abord Maxime, sur la partie protéomique. Merci de m'avoir montré le travail d'un « massiste » passionné, qui annote les spectres de masse avec une facilité déconcertante. Merci également pour tes conseils avisés de « directeur artistique » de ma thèse. Toutes les figures de ce manuscrit n'auraient pas pu exister sans toi.

Je remercie également les stagiaires qui se sont succédés pendant ces 3 ans, Sonia Luce, Fanny Gaignier, Elodie Pliquet et Mathilde Turfkruyer. Merci pour votre aide au quotidien ainsi que votre bonne humeur. Je remercie également Stéphane Horiot pour son aide pour pipeter les centaines de plaques de l'étude clinique. Même si je coule un Ficoll plus vite que toi, en vitesse de pipetage, je n'arriverai jamais à t'égaler !

J'en profite également pour remercier Sabi Airouche, pour son aide sur les sacrifices SLIG. Merci pour ta bonne humeur et ta motivation. Tu es maintenant devenu un expert de la souris et c'est toi qui me montre comment prélever du sang en intracardiaque…

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui ont tous contribué à la bonne ambiance du labo. Tout d'abord ma co-thésarde, Mélodie Bonvalet, jamais à court d'histoires… Ensuite, Hélène Moussu et Nathalie Berjont avec qui nous avons partagé de bons moments dans le bureau. Merci également à Michel, Karine, Laetitia, Marie, Aurélie, Marie-Noëlle, Christelle, Pierrick, Julie, Axelle, Kanako, Alexandra et Pierre. Merci également à Thierry, Maud, Véronique, Henri et Brigitte avec qui nous avons partagé des congrès exceptionnels. Je remercie également William et Jean-Claude de l'informatique pour les nombreuses fois où ils m'ont aidé.

Je tiens également à remercier tout particulièrement les personnes impliquées dans la gestion du laboratoire. Tout d'abord, Adjeley, merci pour ta patience, ta gentillesse et ton écoute. Merci à Marie Claude et à Fabrice pour votre aide. Je pense également à Pascale et Martine, les assistantes, qui m'ont toujours soutenu, aidé et conseillé au mieux.

Enfin, j'ai une petite pensée pour tous ceux qui sont passés par la R&D de Stallergenes : Emmanuel, Elodie, Sandra, Adrien, Joris, Marie-Amélie, Claire et Raphaël. Un merci particulier aux 3 thésards qui nous ont précédés et nous ont ouvert la voie, Nathalie Saint-Lu, Vincent Lombardi et Eric Wambre.

Un petit mot particulier pour mes collègues devenus des amis qui se reconnaîtront et avec qui nous avons partagé de nombreuses soirées. Nos matchs de Wii, de Time's Up, de kart, de volley ou encore nos karaokés resteront dans les annales.

Pour finir, je remercie mes parents, qui ont toujours cru en moi et m'ont toujours soutenu. Vous êtes géniaux !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 3

SOMMAIRE 5

INDEX DES FIGURES 9

INDEX DES TABLES 9

ABBREVIATIONS 10

INTRODUCTION 13

REVUE DE LA LITTERATURE 15

1. Les allergies 15
   1.1. Les différents types d'hypersensibilité 15
   1.2. L'hypersensibilité de type I 17
      1.2.1. Les manifestations cliniques 17
         1.2.1.1. La rhinite allergique 17
         1.2.1.2. L'asthme allergique 17
         1.2.1.3. La dermatite atopique 17
         1.2.1.4. Les allergies alimentaires 18
         1.2.1.5. L'anaphylaxie systémique 18
      1.2.2. Etiologie 18
   1.3. Les principaux allergènes 19
   1.4. Mécanismes de la réaction allergique de type 1 21
      1.4.1. Phase de sensibilisation 21
         1.4.1.1. Interaction allergènes et cellules présentatrices d'antigène 21
         1.4.1.2. Orientation des réponses humorales en faveur des IgE 23
      1.4.2. Phase effectrice 24
      1.4.3. Les réponses immunes aux allergènes chez les individus sains 26
   1.5. Diagnostic 26
   1.6. Traitements 27
      1.6.1. Eviction 27
      1.6.2. Traitements symptomatiques 27
         1.6.2.1. Antihistaminiques 27
         1.6.2.2. Glucocorticoïdes 27
         1.6.2.3. Agonistes des récepteurs beta-adrénergiques 29
         1.6.2.4. Inhibiteurs de phosphodiestérases 29

1.6.2.5. Thérapies basées sur les cytokines 29
1.6.2.6. Anti-IgE 30
1.6.3. Immunothérapie allergénique 31

2. Mécanismes d'induction de tolérance immunologique 33
2.1. La tolérance immunologique (ou tolérance) 33
2.1.1. Ignorance des lymphocytes T 33
2.1.2. Anergie des lymphocytes T 33
2.1.3. Délétion des lymphocytes T 34
2.1.4. Régulation immune 34
2.2. Mécanismes immunologiques impliqués dans l'immunothérapie allergénique 34
2.2.1. Effets précoces de l'immunothérapie 34
2.2.2. Effet de l'immunothérapie sur les Tregs et la tolérance périphérique 35
2.2.3. Effet de l'immunothérapie sur les taux d'IgG4, IgE et IgA spécifiques 37
2.2.4. Effet de l'immunothérapie sur les marqueurs inflammatoires sériques 38
2.2.5. Effet de l'immunothérapie sur les cellules dendritiques 38
2.2.6. Effet de l'immunothérapie sur l'inflammation mucosale locale 38
2.3. La muqueuse orale 39
2.3.1. Muqueuse orale chez la souris 39
2.3.2. Muqueuse orale humaine 40

3. Les cellules dendritiques 42
3.1. Différents types de cellules dendritiques chez l'homme 42
3.1.1. Cellules dendritiques du sang 42
3.1.1.1. Cellules dendritiques myéloïdes 42
3.1.1.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes 42
3.1.2. Cellules dendritiques des tissus 43
3.1.2.1. Cellules dendritiques des muqueuses 43
3.1.2.2. Cellules de Langerhans 43
3.1.2.3. Cellules dendritiques du derme 44
3.1.2.4. Cellules dendritiques folliculaires 44
3.2. Rôle des cellules dendritiques : lien entre l'immunité innée et adaptative 44
3.3. Cellules dendritiques tolérogènes / régulatrices 47
3.3.1. Caractéristiques générales des cellules dendritiques tolérogènes 47
3.3.2. Induction de cellules dendritiques tolérogènes in vitro 48
3.3.2.1. IL-10 48
3.3.2.1. TGF-β 50
3.3.2.2. Vitamine D3 50
3.3.2.3. Immunosuppresseurs 53

a. Dexamethasone 53
b. L'acide mycophénolique 55
c. Cyclosporine A/FK506 55
d. Rapamycine 56
3.3.2.4. Ingénierie génétique 58
3.3.2.5. Aspirine et acide niflumique 58
3.3.2.6. Blocage de NF-κB (Rosiglitazone) 58
3.3.2.7. Modulation *via* les récepteurs aux Fcγ 59
3.3.2.8. Cellules dendritiques tolérogènes induites par les Tregs 59
3.3.3. Cellules dendritiques tolérogènes *in vivo* 60
3.3.3.1. Cellules dendritiques tolérogènes dans les tumeurs 60
3.3.3.2. Cellules dendritiques tolérogènes dans les muqueuses 60
3.3.3.1. Cellules dendritiques tolérogènes dans le sang 61
3.3.4. Mécanismes d'induction de tolérance par les celules dendritiques tolérogènes 61
3.3.4.1. Absence des trois signaux 62
3.3.4.2. Sécrétion de facteurs tolérogènes 62
3.3.4.3. Molécules de surface 63
a. Interaction CD80/CD86 – CTLA-4 63
b. Immunoglobulin like transcript 63
c. Interaction PD-L1 / PD-L2 (DCs) avec PD-1 (LTs) 65
d. Interaction B7-H4 (DCs) avec son ligand sur les LTs. 65
e. Interaction ICOS-L (DCs) – ICOS (LTs) 66
3.3.4.4. Métabolisme 66
3.3.5. Utilisation clinique des cellules dendritiques tolérogènes 67

4. La protéomique, un puissant outil en recherche 69
4.1. Principe 69
4.2. La protéomique quantitative 69
4.2.1. Approche basée sur les gels 2D 69
4.2.2. Quantification basée sur la spectrométrie de masse 74
4.2.2.1. Marquage isotopique 74
a. SILAC 75
b. iTRAQ 77
4.2.2.2. Quantification sans marquage (label free) 77
a. Méthode basée sur le « spectral counting » 77
b. Méthode basée sur l'intensité des courants ioniques 79
4.2.3. Identification des protéines / bases de données 81
4.2.4. Méthode de validation protéomique 83

4.2.4.1. Méthodes classiques : ELISA, CBA, immunoempreinte, IHC 83
4.2.4.2. Spectrométrie de masse ciblée 83
4.3. Analyse protéomique des cellules dendritiques humaines 84
4.3.1. Processus de différenciation et/ou maturation des cellules dendritiques 84
4.3.2. Cellules dendritiques traitées par des agents pharmacologiques 87
4.3.3. Etude des cellules dendritiques dans des conditions pathologiques 88
4.3.3.1. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine 88
4.3.3.2. Echappement tumoral 88
4.3.3.3. Hypersensibilité de contact 88
4.3.3.4. Statut atopique 89

OBJECTIFS 91

RESULTATS 93

1. Article 1 : Identification d'un nouveau phénotype de cellules dendritiques tolérogènes induites par les protéases d'*Aspergillus oryzae*, Journal of immunology 93

2. Article 2 : Caractérisation moléculaire des cellules dendritiques tolérogènes, identification de marqueurs d'efficacité de l'immunothérapie allergénique sublinguale. 107

DISCUSSION / PERSPECTIVES 171

CONCLUSION 183

PUBLICATIONS / BREVETS / COMMUNICATIONS ORALES 185

3. Publications / Revues 185

4. Brevets 186

5. Communications orales 186

ANNEXES 187

BIBLIOGRAPHIE 259

ABSTRACT IN ENGLISH 287

RESUME EN FRANÇAIS 289

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes immunologiques des quatre réactions d'hypersensibilité. 16
Figure 2 : Phase de sensibilisation de la réaction allergique. 22
Figure 3 : Mécanismes immunologiques aboutissant à la synthèse des IgE. 23
Figure 4 : Phase effectrice de la réaction allergique. 25
Figure 5 : Mécanisme simplifié de l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes. 28
Figure 6 : Thérapies de l'asthme basées sur les cytokines. 30
Figure 7 : Mécanisme d'action des anticorps anti-IgE. 31
Figure 8 : Rôle des Tregs dans le contrôle de l'asthme allergique. 37
Figure 9 : Effet de l'ITA sur les paramètres immunologiques et cliniques. 39
Figure 10 : Les DCs, principaux acteurs de la polarisation de la réponse immunitaire. 46
Figure 11 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des IL-10 DCs. 49
Figure 12 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des 1,25$(OH)_2$D3 DCs. 52
Figure 13 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des DEX-DCs. 54
Figure 14 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des DCs traitées à la rapamycine. 57
Figure 15 : Induction de tolérance par ILT3 membranaire. 64
Figure 16 : Principe de la 2D-DIGE. 72
Figure 17 : Représentation schématique de la stratégie SILAC. 76
Figure 18 : Représentation schématique de la stratégie iTRAQ (exemple du 4 Plex). 78
Figure 19 : Représentation schématique de la stratégie « label free ». 80
Figure 20: Stratégie d'identification des protéines par « peptide fragment fingerprinting ». 82
Figure 21 : Electrophorèses 2D de monocytes ou de DCs immatures ou matures. 85
Figure 22: Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des ASP-DCs. 174
Figure 23: Mécanismes de l'ITSL établis et suggérés. 181

INDEX DES TABLES

Tableau 1 : Principaux allergènes. 20
Tableau 2 : Comparaison des méthodes de protéomique quantitative. 70
Tableau 3 : Protéines et familles de protéines communément identifiées en 2D. 73
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des analyses protéomiques étudiant les DCs humaines. 86

ABBREVIATIONS

De nombreux termes en anglais, couramment utilisés et difficiles à traduire sans en dénaturer le sens, seront écrits en italiques.

2D : Deux Dimensions

2D-DIGE : Electrophorèse différentielle à 2 dimensions

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AICD : *Activation-induced cell death*

AMP : Adénosine Monophosphate

AP-1 : *Activator protein 1*

ARN : Acides ribonucléiques

ARNm : Acides ribonucléiques messagers

ASP : *Aspergillus oryzae*

BDCA : *Blood dendritic cell antigen*

CBA : *Cytometric Bead Assay*

CCL : *Chemokine (C-C motif) ligand*

CCR : Récepteur aux chimiokines

CD : Cluster de différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes

CsA : Cyclosporine A

CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4*

DAMPs : *Damage associated molecular pattern molecules*

DC : Cellule Dendritique

DCreg : Cellule dendritique régulatrice

DC-SIGN : *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DEX : Dexaméthasone

DTH : D*elayed-type hypersensitivity*

EAE : Encéphalite auto-immune expérimentale

ECP : *Eosinophil Cationic Protein*

EIC : *Extracted Ion Chromatogram*

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fas : Fragment inducteur d'apoptose

FcεRI : Récepteur de haute affinité aux IgE

FcεRII : Récepteur de faible affinité aux IgE

FcγRIIB : Récepteur inhibiteur de faible affinité aux IgG

Foxo3 : *Forkhead box O3*

Fox p 3 : *Forkhead box p3*

GATA-3 : *GATA binding protein 3*

GCs : Glucocorticoïdes

GR : Récepteur aux glucocorticoïdes

GILZ : *Glucocorticoid-induced Leucine Zipper*

GITR : *Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*

GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

GRE : Elément de réponse aux glucocorticoïdes

HDM : *House dust mite*

HO-1 : Hème oxygénase 1

HRV : Rhinovirus humain

HSP : Protéines de choc thermique

ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule*

ICOS : *Inducible Co-Stimulatory molecule*

ICOS-L : *Inducible Co-Stimulatory molecule Ligand*

iDCs : Cellules dendritiques immatures

IDO : Indoléamine 2,3-Dioxygénase

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IHC : Immunohistochimie

IκB : Inhibiteur de NF-κB

IL : Interleukine

ILT : *Immunoglobulin-Like Transcript*

iTRAQ : *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*

ITA : Immunothérapie allergénique

ITSC : Immunothérapie spécifique de l'allergène par voie sous-cutanée

ITSL : Immunothérapie spécifique de l'allergène par voie sublinguale

ITAM : *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM : *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*

Klrg1 : *Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*

LASP-1 : *LIM and SH3 protein*

LPS : Lipopolysaccharide

LB : Lymphocyte B

LCs : Cellules de Langerhans

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LT : Lymphocyte T

m/z : Rapport masse sur charge

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MDC : *Macrophage-derived chemokine*

mDCs : Cellules dendritiques matures

MPA : Acide mycophénolique

MnSOD : *Manganese Superoxide Dismutase*

moDC : DC dérivée des Monocytes

METH : Méthamphetamine

MS : Spectrométrie de masse

mTOR : *Mammalian Target of Rapamycin*

NFAT : *Nuclear factor of activated T cells*

NF-κB : Facteur nucléaire κB

NK : Cellule Natural Killer

NKT : Cellule T Natural Killer

NOD : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*

nTregs : Lymphocytes T régulateurs naturels

OX40 : *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*

OX40L : *Ligand for the tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*

OxPAPC : 1-palmitoyl-2-arachidoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine

PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*

PGN : Peptidoglycane

OVA : Ovalbumine

PAI1 : *Plasminogen activator inhibitor 1*

PAR : *Protease-activated receptor*

PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique

PD-L1 *:* *Programmed cell death ligand*

pDC : Cellule Dendritique Plasmacytoïde

PD-1 : *Programmed Death-1*

PIRs : *Paired immunoglobulin-like receptors*

PP2A : *Protein phosphatase 2A*

PPARγ : *Peroxisome proliferator-activated receptor γ*

PRR : *Pathogen Recognition Receptor*

Prx1 : Péroxiredoxine mitochondriale

RARα : Récepteur nucléaire de l'acide rétinoique

RALDH : *Retinaldehyde dehydrogenase*

RANTES : *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*

RORC : *RAR-related orphan receptor C*

ROS : *Reactive oxygen species*

Runx1 : *Runt-related transcription factor 1*

SILAC : *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*

SOCS3 : *Suppressor of signaling 3*

SOD2 : Superoxide dismutase 2

SH2 : Tyrosine kinase Src avec une homologie 2

SHP : *Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*

SLAM : *Signaling lymphocytic activation molecule*

SLPI : *Secretory leukoprotease inhibitor*

STAB 1 : Stabiline 1

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

TARC : *Thymus and activation regulated chemokine*

TCR : Récepteur des lymphocytes T

Th1 : Lymphocyte T auxiliaire de type 1

Th17 : Lymphocyte T auxiliaire de type 17

Th2 : Lymphocyte T auxiliaire de type 2

TGF-β : *Transforming growth factor beta*

Treg : Lymphocyte T régulateur

TLR : Récepteur *Toll-like*

TNBS : *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*

TNF-α : *Tumor necrosis factor alpha*

TSLP : Lymphopoïetine stromale thymique

VCAM : *Vascular Cell Adhesion Molecule*

VitD3 : Vitamine D3 ou son métabolite 1,25 dihydroxyvitamine D3

VDR : Récepteur à la vitamine D

VDRE : Elément de réponse à la vitamine D

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VLA-4 : *Very Late Antigen-4*

INTRODUCTION

Stallergenes est un laboratoire pharmaceutique français spécialisé dans le traitement de la rhinite allergique sévère par ITA (immunothérapie allergénique). Ce traitement est actuellement le seul sur le marché qui permet de prévenir le développement de l'asthme et de traiter la maladie allergique. Ainsi, l'immunothérapie évite l'apparition de nouvelles sensibilisations (poly-sensibilisation) ou son aggravation en asthme. Son action consiste à réduire la sensibilité de l'organisme vis-à-vis de l'allergène en modulant progressivement la réponse immunitaire dirigée contre ce dernier.

Dans le cadre de l'amélioration continue de ses traitements et de la prise en charge de ses patients, Stallergenes a initié plusieurs projets de recherche visant à mettre au point des traitements de désensibilisation innovants, efficaces et d'action plus rapide et durable.

Le premier axe de recherche a pour objectif de mettre au point un traitement de seconde génération, basé sur une forme pharmaceutique en comprimé, qui disposera d'une efficacité optimisée dans des délais plus courts et à dose réduite. Pour cela, deux thématiques sont développées : la production d'allergènes recombinants grâce aux outils de biologie moléculaire ainsi que le développement de stratégies de formulation / adjuvantation qui permettent de mieux cibler le système immunitaire de la muqueuse sublinguale afin d'améliorer l'efficacité des traitements de désensibilisation.

Le second axe de recherche consiste à identifier des biomarqueurs utilisables comme mesure de l'efficacité clinique des traitements de désensibilisation. Plus particulièrement, l'identification de biomarqueurs devra à terme permettre i) de faciliter le développement clinique des traitements de désensibilisation, ii) d'améliorer les schémas d'immunisation et les posologies et iii) de cibler les patients « répondeurs cliniques » pour lesquels le traitement sera efficace et ainsi d'orienter les « non-répondeurs » vers d'autres solutions thérapeutiques.

Le travail de thèse présenté ici s'inscrit dans ce dernier axe puisqu'il a pour objectif d'identifier des biomarqueurs d'efficacité de l'ITA. L'effet principal de ce traitement étant d'induire une tolérance spécifique de l'allergène au niveau périphérique, l'hypothèse initiale consistait à dire que cette tolérance est induite *via* les DCs (cellules dendritiques). En effet, ces cellules sont à l'origine des réponses immunitaires et permettent le lien entre réponse immunitaire innée et adaptative. Elles prennent en charge l'antigène ou l'allergène en périphérie et interagissent avec les LTs (lymphocytes T) pour induire une réponse immunitaire adaptée, de nature tolérogène dans le cas de la désensibilisation. En particulier, le succès de l'immunothérapie pourrait être dû à une réorientation des DCs effectrices en DCs tolérogènes (ou régulatrices).

Afin de tester cette hypothèse, un modèle permettant de générer *in vitro* des DCs tolérogènes et des DCs effectrices a été développé. Pour cela, une étape de criblage de composants biologiques et pharmacologiques connus dans la littérature a conduit à l'identification de deux conditions induisant des DCs effectrices et de deux conditions permettant l'induction de DCs régulatrices. Au cours de cette étude, une condition tolérogène inconnue dans la littérature a été découverte puisque des protéases du champignon *Aspergillus oryzae* (ASP) se sont révélées efficaces pour induire des DCs tolérogènes. L'étude détaillée de ces cellules a montré qu'elles étaient phénotypiquement différentes des DCs régulatrices décrites jusqu'à présent et que la polarisation T induite était également spécifique (différenciation des LTs en sous populations T). L'étude des DCs et LTs générés ainsi que des mécanismes de signalisation induits dans la DC par le champignon, a constitué la première partie de ce travail et a abouti à la publication d'un article, paru en avril 2011 dans *Journal of Immunology*.

La deuxième partie de cette thèse a consisté à analyser, à l'échelle moléculaire, les différents types de DCs générées. Pour cela, deux techniques complémentaires de protéomique quantitatives ont été utilisées, la 2D-DIGE (électrophorèse différentielle à 2 dimensions) et l'analyse sans marquage par LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse). Ces deux techniques permettent la caractérisation de l'ensemble du protéome cellulaire. Cette étude a abouti à l'identification de plusieurs marqueurs de DCs effectrices et surtout de DCs régulatrices. Pour valider la pertinence de ces marqueurs dans la tolérance, leur expression a été étudiée dans d'autres modèles de DCs tolérogènes décrits dans la littérature. Une analyse bibliographique a également été effectuée pour évaluer leur pertinence *in vivo* chez l'homme.

La troisième partie de ce travail a été consacré à réellement tester notre hypothèse initiale qui consistait à dire que l'ITA entraîne une baisse des DCs effectrices tout en induisant de la tolérance en périphérie grâce aux DCs tolérogènes. L'expression des marqueurs de DCs les plus pertinents et spécifiques des CPAs (cellules présentatrices d'antigènes) a été testée dans des PBMCs (cellules mononucléées du sang périphérique) de patients inclus dans une étude clinique visant à tester l'efficacité de l'ITSL (immunothérapie spécifique de l'allergène par voie sublinguale) spécifique des graminées. L'analyse des 82 patients inclus dans l'étude présentant deux bras (actifs / placebos), a permis de mettre en évidence l'utilisation possible de deux protéines comme biomarqueur d'efficacité à court terme (4 mois) de l'ITA. L'utilisation de ces protéines pourrait s'avérer très intéressante pour le suivi du traitement d'immunothérapie, en particulier pour sélectionner les patients répondeurs mais aussi pour réorienter les non-répondeurs vers d'autres schémas thérapeutiques.

REVUE DE LA LITTERATURE

1. Les allergies

L'allergie ou hypersensibilité est une réponse inappropriée du système immunitaire contre un antigène inoffensif pour la plupart des individus. Cette réponse a des effets néfastes sur l'organisme et peut induire des irritations ou démangeaisons de la peau, une bronchoconstriction ou conduire à des lésions tissulaires ou même à un choc anaphylactique systémique **[1]**.

1.1. Les différents types d'hypersensibilité

Les réactions d'hypersensibilité ont été classées en 1963 par Gell et Coombs en quatre types, selon le mécanisme qui les induit (cf. Fig. 1). Les hypersensibilités immédiates sont des réactions déclenchées par des anticorps ou des complexes antigène-anticorps. Les symptômes se manifestent dans les minutes ou les heures qui suivent la rencontre avec l'antigène.

- L'hypersensibilité de type I est une hypersensibilité dépendante des IgE (immunoglobulines de type E) qui induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires par les mastocytes. Les manifestions cliniques sont l'anaphylaxie systémique (éventuellement mortelle) ou des réactions localisées : la rhinite allergique, l'asthme, les allergies alimentaires et la dermatite atopique **[1]**.

- L'hypersensibilité de type II est une hypersensibilité dépendante des IgG. La fixation de ces anticorps avec des antigènes exposés à la surface des cellules ou des antigènes médicamenteux induit la destruction des macrophages tissulaires par l'activation du complément ou l'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps). Les manifestations cliniques incluent les réactions transfusionnelles, l'erythroblastose foetale ou les allergies médicamenteuses **[1]**.

- L'hypersensibilité de type III est une hypersensibilité dépendante des complexes immuns. Ceux-ci induisent l'activation du complément puis une réponse inflammatoire conduisant à l'infiltration de neutrophiles et à la dégranulation des mastocytes. Les manifestations cliniques incluent la réaction d'Arthus localisée, la maladie sérique, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé **[1]**.

- L'hypersensibilité de type IV dite retardée est initiée par les LTs. Les CPAs interagissent avec les LTs_{DTH} (*delayed-type hypersensitivity*) induisant la libération de diverses cytokines, qui activent les macrophages aboutissant à une lésion cellulaire localisée. Les manifestations cliniques incluent la dermatite de contact causée par exemple suite à une exposition au formaldéhyde, au nickel ou à divers cosmétiques **[1]**.

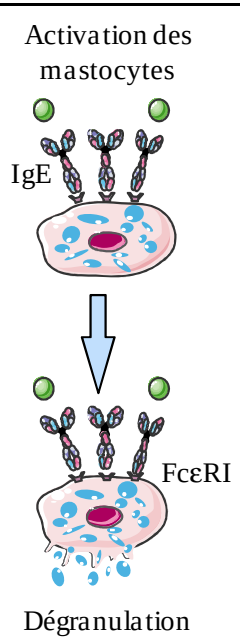
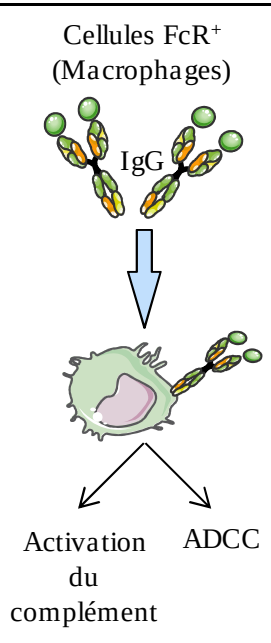
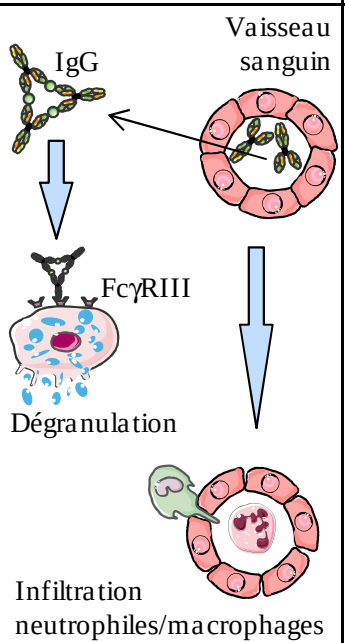
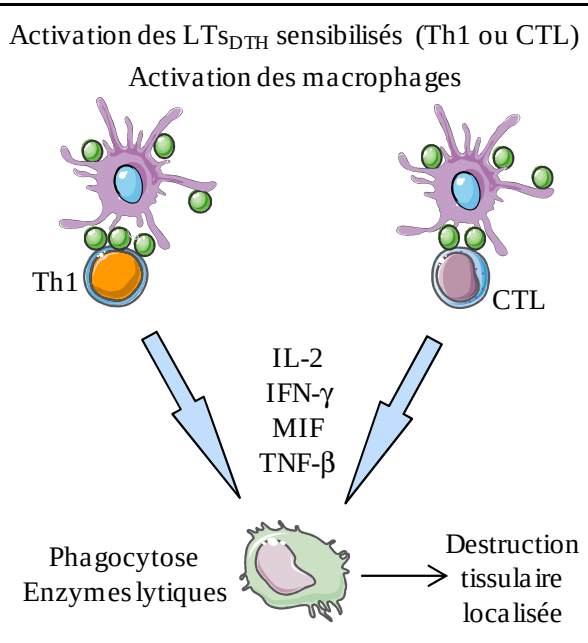
	Type I	Type II	Type III	Type IV
Facteur immunitaire en cause	IgE	IgG	IgG	Th1 / CTL
Type d'antigène	Soluble	Cellulaire	Soluble	Soluble / Cellulaire
Mécanisme effecteur				
Exemple de réaction d'hypersensibilité	Rhinite allergique, asthme, anaphylaxie systémique	Allergie à certains médicaments, réactions transfusionnelles	Maladie sérique, réaction d'Arthus	Dermatite de contact

Figure 1 : Mécanismes immunologiques des quatre réactions d'hypersensibilité.
Les hypersensibilités de type I, II et III dépendent des anticorps et se distinguent par les différents types d'antigènes reconnus ainsi que par les différentes classes d'anticorps impliqués. Les réponses de type I sont induites par les IgE et provoquent l'activation des mastocytes *via* leur récepteur FcεRI et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Les réponses de types II et III sont induites par les IgG qui peuvent se lier aux récepteurs Fc et activer les mécanismes effecteurs du complément ou de l'ADCC. Les réponses de type II sont dirigées contre des antigènes de la surface cellulaire ou des antigènes médicamenteux alors que les réponses de type III sont dirigées contre des complexes immuns. Les réactions de type III conduisent à la dégranulation des mastocytes *via* leur récepteur FcγRIII, à l'infiltration des neutrophiles et à l'inflammation tissulaire. Les réactions d'hypersensibilité de type IV sont induites par les LTs_{DTH} spécifiques de l'antigène (Th1 / CTL) qui sécrètent diverses cytokines permettant l'attraction et l'activation des macrophages provoquant ainsi une activité phagocytaire accrue et une libération d'enzymes lytiques. Ces dernières provoquent une destruction tissulaire retardée (après 48 à 72 h).

Cette thèse sera centrée sur les hypersensibilités de type I, cibles des traitements commercialisés par Stallergenes.

1.2. L'hypersensibilité de type I

Les maladies allergiques sont classées au quatrième rang mondial des affections par l'Organisation Mondiale de la Santé. Leur prévalence a considérablement augmenté dans les pays industrialisés au cours des 20-30 dernières années. La prévalence cumulée est estimée à plus de 25 % de la population **[2-4]**. Environ 90 millions d'européens et 65 millions d'américains souffrent de pathologies respiratoires allergiques (>15% de la population). En Asie et en Afrique, la proportion d'asthmatique est inférieure à 5% de la population **[5]**.

1.2.1. Les manifestations cliniques

1.2.1.1. La rhinite allergique

La rhinite allergique est une inflammation de la muqueuse nasale. Elle résulte de la réaction des allergènes aériens et des mastocytes sensibilisés de la conjonctive et des muqueuses nasales, conduisant à la libération des médiateurs inflammatoires. Ceux-ci sont des amines vasoactives (principalement l'histamine), des médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes), des chimiokines et cytokines. Ces médiateurs provoquent localement une vasodilatation et une perméabilité capillaire accrue. Les principaux symptômes sont des éternuements, une rhinorrhée, une obstruction nasale et des démangeaisons nasales et oculaires **[6]**.

1.2.1.2. L'asthme allergique

L'asthme est un syndrome complexe caractérisé par une inflammation des voies aériennes associée à une éosinophilie sanguine et bronchique, une hypersécrétion de mucus, et une hyperréactivité des voies respiratoires. L'asthme et la rhinite affectent tous deux l'appareil respiratoire (bas pour l'asthme, haut pour la rhinite). La rhinite allergique est par ailleurs un facteur de risque de l'asthme. Des études épidémiologiques ont ainsi montré qu'une rhinite allergique augmente le risque de développer un asthme d'un facteur 3.5, et inversement les asthmatiques ont presque tous une rhinite, plus ou moins aiguë, associée aux crises d'asthme **[7]**.

1.2.1.3. La dermatite atopique

La dermatite atopique, ou eczéma allergique, est une maladie inflammatoire chronique de la peau, caractérisée par des lésions sèches, squameuses, et très prurigineuses. Elle concerne un peu moins du tiers des enfants, et jusqu'à 10 % des adultes. Elle s'améliore spontanément avant l'adolescence dans près de 3 cas sur 4. Les lésions cutanées sont infiltrées par des LTs $CD4^+$ et

$CD8^+$, des macrophages, des mastocytes et des éosinophiles. Les Th2 (lymphocytes T auxiliaires de type 2) dominent dans la phase inflammatoire aiguë alors que la phase chronique se distingue par une prédominance de la réponse Th1 (lymphocytes T auxiliaires de type 1) avec une sécrétion augmentée d'IFN-γ (interféron) **[8]**.

1.2.1.4. Les allergies alimentaires

Dans le cas d'une allergie à un aliment, l'allergène se fixe à la surface des mastocytes le long du tractus gastro-intestinal. Ceci induit une contraction localisée des muscles lisses et une vasodilatation accompagnée de symptômes tels que vomissements ou diarrhées. La dégranulation des mastocytes le long de l'intestin augmente la perméabilité des muqueuses de telle façon que l'allergène pénètre dans la circulation sanguine et induit des réactions cutanées ou respiratoires **[9]**.

1.2.1.5. L'anaphylaxie systémique

Cette manifestation allergique est la plus grave, parfois mortelle. Elle débute souvent par des signes cutanés, puis progressivement apparaissent des signes généraux (malaise), respiratoires (dyspnée, bronchospasmes) et cardiovasculaires (hypotension, tachycardie). Les principales causes sont les allergies alimentaires, les piqûres d'hyménoptères et les médicaments. Le traitement d'urgence est l'adrénaline, qui s'oppose aux effets des médiateurs tels que l'histamine et les leucotriènes en assurant la relaxation des muscles lisses et en réduisant la perméabilité vasculaire **[10]**.

1.2.2. Etiologie

L'étiologie des hypersensibilités de type I est complexe et dépasse largement le cadre de cette thèse. On précisera toutefois que l'allergie est une maladie complexe et hétérogène qui résulte des effets et interactions de nombreux facteurs génétiques et environnementaux.

Les principaux gènes pour lesquels des polymorphismes particuliers ont été identifiés peuvent être répartis en quatre groupes : i) les gènes associés à l'immunité innée et l'immunorégulation, ii) les gènes intervenants dans la réponse Th2, iii) les gènes associés à la biologie de l'épithélium et des muqueuses et iv) les gènes associés à la fonction ventilatoire ou au remodelage bronchique. Pour plus de détails, d'excellentes revues sont disponibles **[11, 12]**.

Certains facteurs environnementaux ont également contribué à l'augmentation rapide de la prévalence des allergies durant les dernières décennies. En effet, certaines études ont démontré le rôle aggravateur que peuvent avoir les polluants atmosphériques, comme le dioxyde d'azote, le dioxyde de soufre, l'ozone, les particules d'échappement diesel, ou encore la fumée de tabac **[13]**. Par ailleurs, une diminution de la prévalence allergique a été observée chez les enfants issus de

familles nombreuses, ainsi que dans les populations rurales par comparaison aux populations urbaines **[14]**. Ces observations peuvent être expliquées par l'hypothèse hygiéniste, selon laquelle l'absence d'exposition à des agents infectieux lors de la petite enfance favoriserait l'augmentation des maladies allergiques **[15]**. En effet, la stimulation des TLRs (récepteurs *Toll-like*) qui reconnaissent des motifs moléculaires retrouvés chez les bactéries ou les virus, permet le développement d'une réponse immunitaire régulatrice. Ceci contrebalancerait les réponses pathologiques Th2 dirigées contre les allergènes.

1.3. Les principaux allergènes

Nous inhalons au quotidien beaucoup de protéines, mais seul un petit nombre d'entre elles induisent une réaction allergique. Au sens large, le terme allergène se confond avec la source allergénique composée de nombreux allergènes, certains dits majeurs d'autres mineurs. Sur le plan clinique, un allergène majeur est un allergène contre lequel au moins 50% des individus allergiques à une espèce donnée sont sensibilisés (cf. Tableau 1).

Les allergènes pénétrant dans l'organisme par les voies respiratoires sont appelés pneumallergènes. Les plus courants sont i) les acariens (les plus répandus en Europe étant *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae*), ii) les pollens d'arbres (comme le bouleau, l'olivier, le cyprès, le genévrier), de graminées (dactyle, phléole, flouve, ivraie, pâturin), et d'herbacées (ambroisie, pariétaire), iii) les phanères des animaux (par exemple chien, chat, rongeurs) ou iv) les moisissures (par exemple *Alternaria*, *Aspergillus*). Les trophallergènes sont, quant à eux, des allergènes alimentaires. Enfin, les venins d'hyménoptères (guêpes, abeilles) peuvent engendrer des réponses allergiques pouvant aboutir à un choc anaphylactique mortel.

Certaines caractéristiques communes ont été dégagées chez les allergènes. Ce sont le plus souvent de petites protéines (10 à 40 kDa) très solubles qui diffusent facilement au travers des muqueuses. Les allergènes présentent des glycosylations spécifiques et possèdent fréquemment des activités protéolytiques. Par exemple, Der p 1, un des allergènes majeurs de l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus* est une cystéine-protéase. Cette activité protéolytique favorise la pénétration de l'allergène au travers des muqueuses grâce au clivage des jonctions serrées reliant les cellules épithéliales **[16]**. Cette augmentation de la perméabilité de l'épithélium est essentielle aux mécanismes de sensibilisation puisqu'elle permet à l'allergène d'activer les cellules épithéliales, les cellules de l'immunité innée, les LTs et LBs (lymphocytes B) **[17, 18]**.

Chez certains patients, une réaction allergique peut se déclarer suite à un contact avec un allergène différent de celui auquel ils sont déjà sensibilisés, on parle alors d'allergie croisée. La proximité phylogénique entre deux espèces peut expliquer ce type de réaction. Un exemple d'allergie croisée est l'allergie au bouleau et à la pomme. En règle générale, l'allergie au pollen de bouleau est déjà connue lorsque des symptômes tels que des démangeaisons au niveau du palais et un gonflement

des lèvres apparaissent suite à l'ingestion d'une pomme. Certaines études montrent qu'une désensibilisation contre l'allergène initial permet de supprimer la réaction croisée **[19, 20]** mais ces résultats restent controversés **[21, 22]**.

Famille d'allergènes	Source d'allergènes	Espèce	Exemple d'allergènes majeurs
Pneumallergènes	Acariens (corps/fèces)	*Dematophogoides pteronyssinus*	**Der p 1 Der p 2**
		Dermatophagoides farinae	**Der f 1 Der f 2**
	Pollen de graminées	Fléole, Dactyle, Flouve, Ivraie, Pâturin	**Phl p 1, Dac g 1, Ant o 1, Lol p 1, Poa p 1**
	Pollen d'arbres	Bouleau, Cyprès, Olivier	**Bet v 1, Cup a 1, Ole e 1**
	Pollen d'herbacées	Ambroisie, Armoise, Pariétaire	**Amb a 1, Art v 1, Par j 1**
	Phanères de chien, chat	*Canis familiaris, Felis domesticus*	**Fel d 1, Can f 1**
	Insectes	*Blatella germanica*	**Bla g 1**
	Moisissures	*Alternaria alternata, Aspergillus Fumigatus*	**Alt a 1, Asp f 1**
Trophallergènes	Arachide	*Arachis hypogea*	**Ara h 1**
	Pomme	*Malus domestica*	**Mal d 1**
	Pêche	*Prunus persica*	**Pru p 1**
Venins	Guêpe	*Vespula vulgaris Polistes dominula*	**Ves v 1 Pol d 5**
	Abeille	*Apis mellifera*	**Api m 1**

Tableau 1 : Principaux allergènes.

1.4. Mécanismes de la réaction allergique de type 1

1.4.1. Phase de sensibilisation

Durant la phase de sensibilisation, les allergènes sont capturés par les CPAs dans la peau, le tube digestif ou les poumons. Chez les individus allergiques, ceci conduit à la polarisation des LTs $CD4^+$ en Th2 producteurs de cytokines responsables de la commutation isotypique permettant la production d'IgE par les LBs **[23]**. Les IgE se lient à leurs récepteurs de haute affinité du fragment Fc (FcεRI) à la surface des mastocytes tissulaires et des basophiles du sang induisant la sensibilisation du patient **[24]** (cf. Fig. 2).

1.4.1.1. Interaction allergènes et cellules présentatrices d'antigène

Dans le cas de l'asthme allergique, les allergènes de l'environnement, introduits dans les voies respiratoires à chaque respiration, sont capturés par les DCs localisées sous l'épithélium respiratoire. Celles-ci sondent l'environnement grâce au déploiement de leurs extensions entre les cellules épithéliales **[17]**. Certains antigènes comme Der p 1 ou Amb a 1 peuvent aussi atteindre les DCs en clivant les jonctions serrées des cellules épithéliales grâce à leur activité protéasique **[16]**. Enfin, la fumée de cigarette ou l'ozone peuvent également agir en synergie avec Der p 1 et altérer la fonction de barrière de l'épithélium **[25, 26]**.

Une étape d'activation des DCs est nécessaire à la génération d'une réponse Th2 contre les allergènes inhalés. Cette activation peut être induite i) par de faibles doses d'agonistes TLR associés à l'allergène (par exemple le LPS, lipopolysaccharide de la paroi des bactéries à Gram négatif), ii) par l'activité protéolytique de certains allergènes, ou iii) indirectement par l'activation des cellules de l'immunité innée voisines, dont les cellules épithéliales. En effet, les allergènes possédant une activité enzymatique peuvent activer les récepteurs PAR (*Protease-activated receptors*) exprimés par les cellules épithéliales. Ceci induit l'activation du facteur de transcription NF-κB et la production de chimiokines et cytokines par les cellules épithéliales, entraînant le recrutement et l'activation des DCs. Les principales cytokines impliquées sont le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), l'IL-1β (interleukine 1 beta), le TNF-α (*Tumor necrosis factor alpha*), l'ostéopontine et le TSLP (lymphopoïetine stromale thymique) **[18]**.

Les DCs suivent ensuite un processus de maturation et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants (processus dépendant des CCR7 (récepteur aux chimiokines)), où elles induisent la polarisation des LTs $CD4^+$ en Th2 produisant de l'IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 et probablement d'autres cytokines identifiées comme l'IL-25, l'IL-31 et l'IL-33 qui contribuent au développement des maladies allergiques **[27-30]**.

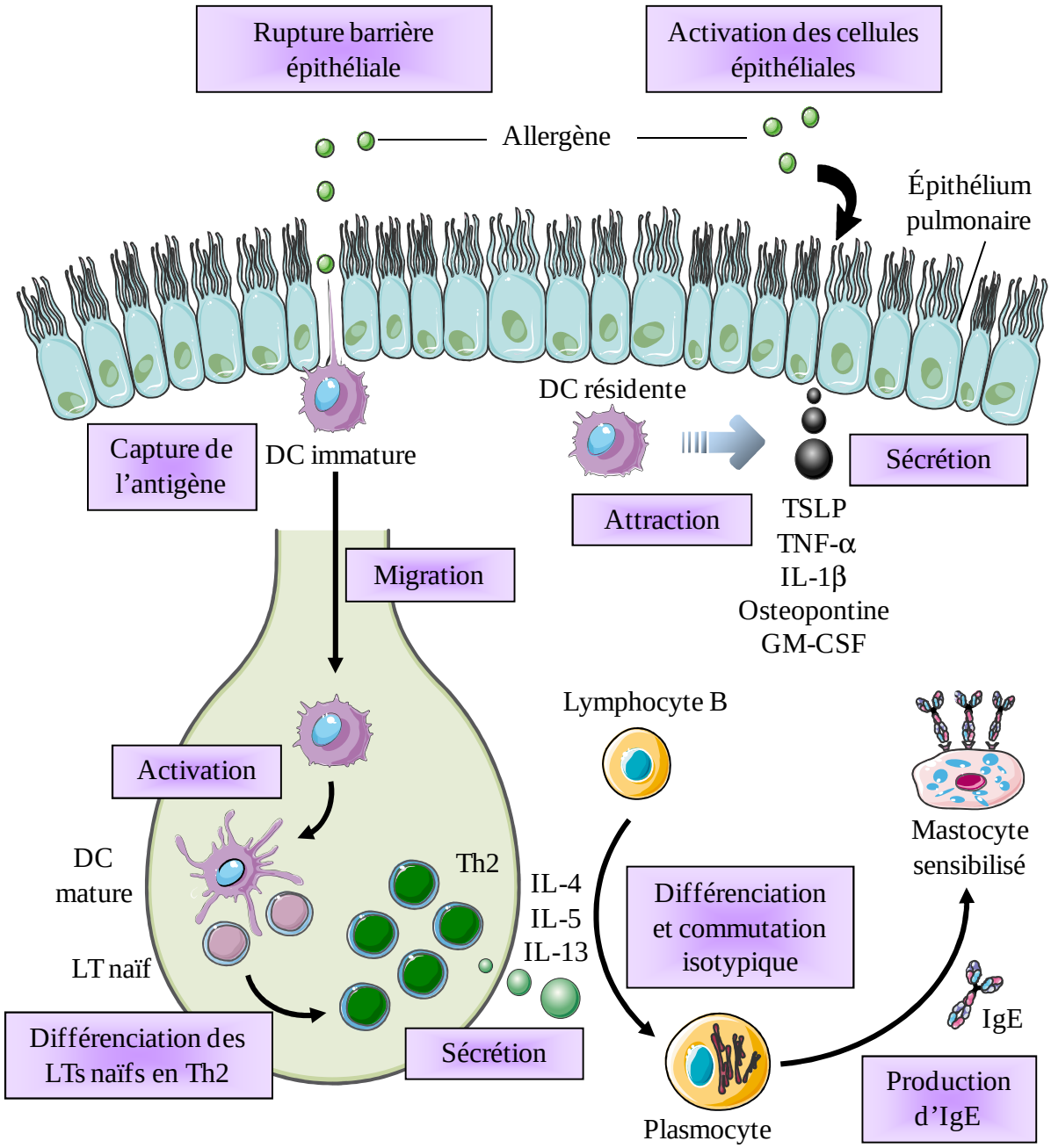


Figure 2 : Phase de sensibilisation de la réaction allergique.
L'allergène entre en contact avec l'épithélium pulmonaire et active les cellules épithéliales qui sécrètent des cytokines et chimiokines permettant l'attraction des DCs. Par ailleurs, les allergènes peuvent être pris en charge par les DCs immatures qui vont s'activer et migrer dans les ganglions lymphatiques pour présenter l'antigène aux LTs naïfs. Ces derniers vont se différencier en Th2 qui sécrètent de l'IL-4, IL-5 ou IL-13. Ces cytokines Th2 induisent la différenciation des LBs en plasmocytes sécréteurs d'IgE. Les IgE libérées peuvent se fixer sur les mastocytes, dits sensibilisés.

1.4.1.2. Orientation des réponses humorales en faveur des IgE

La commutation isotypique vers les IgE par les LBs requiert deux signaux (cf. Fig. 3). Le premier est délivré par les cytokines IL-4 et IL-13, qui se lient à leurs récepteurs à la surface des LBs. Ces interactions induisent des signaux intracellulaires aboutissant à l'activation de facteurs de transcription, comme STAT-6 (*Signal transducer and activator of transcription*) et NF-κB (facteur nucléaire κB), qui activent des promoteurs de la commutation **[31]**. Le deuxième signal est l'interaction entre la molécule CD40, à la surface des LBs, avec le CD40L exprimé par les LTs activés **[32]**.

Cette activation de la sécrétion d'IgE a lieu non seulement dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, mais également localement au niveau des muqueuses pulmonaires ou nasales. Cette synthèse locale d'IgE maintient la sensibilisation des mastocytes **[33]**.

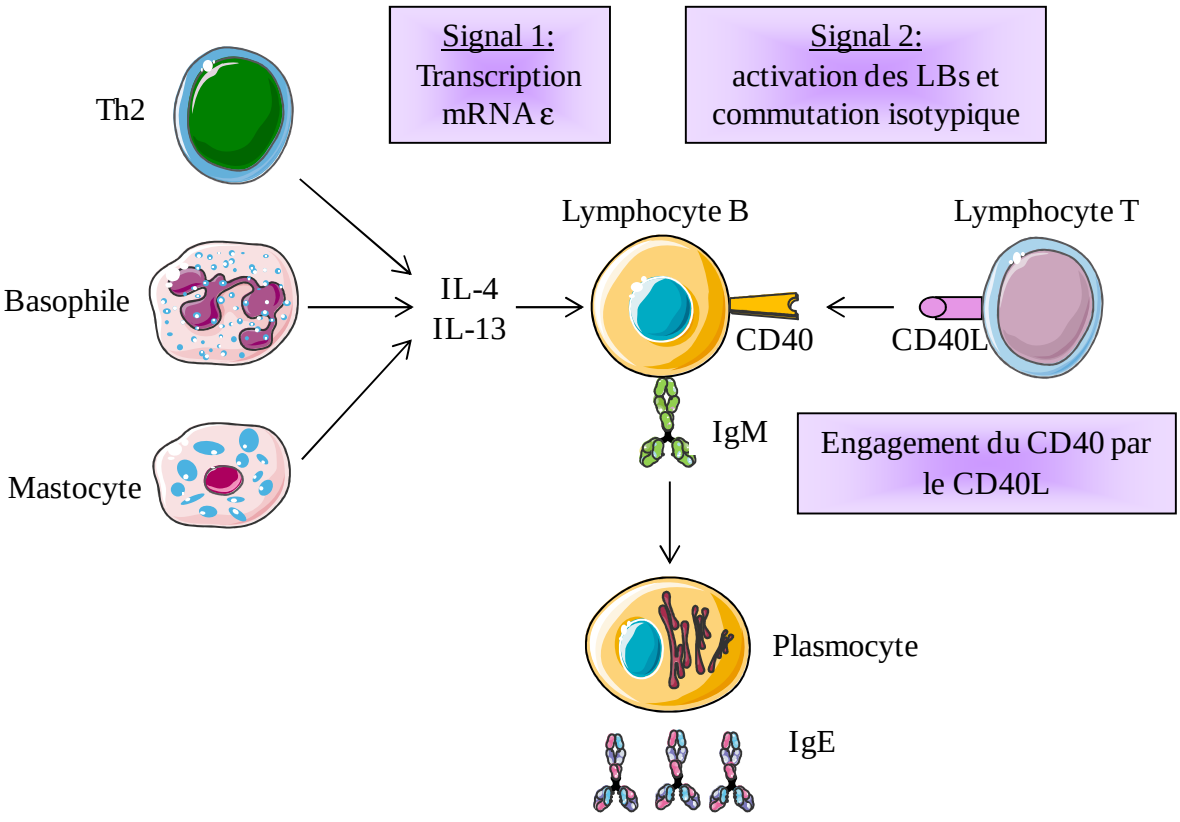


Figure 3 : Mécanismes immunologiques aboutissant à la synthèse des IgE.
Deux signaux sont nécessaires pour stimuler les LBs et induire la commutation isotypique des IgM vers les IgE. Le premier signal est apporté par l'IL-4 et l'IL-13 secrétés par les Th2, les basophiles et les mastocytes. Il induit la transcription de l'ARNm de la chaine lourde ε, permettant la synthèse d'IgE. Le second signal est produit par l'interaction entre CD40 et son ligand CD40L qui active le réarrangement génétique nécessaire au changement de classe (modifié à partir de **[34]**).

1.4.2. Phase effectrice

Lors d'une deuxième exposition à l'allergène, celui-ci induit l'agrégation des récepteurs aux IgE par pontage des IgE adjacentes, ce qui provoque la dégranulation des mastocytes ou basophiles. Les médiateurs libérés provoquent une contraction des muscles lisses, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une vasodilatation (cf. Fig. 4). Ces événements se produisent en quelques secondes à quelques minutes après l'exposition à l'allergène et induisent des symptômes immédiats comme des éruptions cutanées, des démangeaisons, des éternuements ou des bronchospasmes **[35]**.

Les Th2 ont un rôle prédominant dans la phase effectrice de la réaction allergique grâce à leur production de cytokines. Dans le cas de l'asthme, ils permettent la survie et l'activation des mastocytes, ils induisent l'hyperplasie des cellules caliciformes, et l'hyperréactivité bronchique (cf. Fig. 4). Les Th2 induisent également le recrutement des éosinophiles et d'autres cellules inflammatoires *via* l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM1 (*intercellular adhesion molecule*) et VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule*) interagissant avec les P-sélectines et E-sélectines présentes sur l'endothélium vasculaire. Les Th2 induisent également une augmentation de la production de mucus et diminuent le niveau de contraction des muscles squelettiques lisses. Le profil Th2 des patients atopiques résulte de l'augmentation de la différenciation et de l'expansion clonale de Th2 mais également de la mort des Th1 produisant de l'IFN-γ **[36]**.

Les Th17 (lymphocytes T auxiliaires de type 17) caractérisés par la sécrétion d'IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-8, TNF-α, IL-22 et d'IL-26 contribueraient également au développement de l'asthme allergique **[37, 38]**. Des études montrent que les patients asthmatiques présentent une augmentation de la sécrétion spécifique d'IL-17 par les LTs du sang périphérique, et une augmentation de l'IL-17 dans les poumons **[39, 40]**. L'IL-17 semble induire la survie et le recrutement des neutrophiles lors de l'inflammation bronchique, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 par les cellules musculaires lisses bronchiques **[41, 42]**.

La différenciation des LT $CD4^+$ en Th9 produisant de l'IL-9 et IL-10 **[43, 44]** semble également jouer un rôle dans les maladies allergiques *via* des mécanismes qu'il reste à élucider **[45]**. Une nouvelle population de LTs appelés Th22 et secrétant de l'IL-22 en présence de faibles concentrations d'IL-17 a également montré son rôle dans les maladies allergiques, en particulier la dermatite atopique **[46]**.

Les NKT (cellules T natural killer invariantes) et les lymphocytes T$\gamma\delta$ seraient également impliqués dans l'inflammation bronchique et l'hyperréactivité bronchique, notamment par la production d'IL-4 et d'IL-13, mais leurs rôles restent controversés **[47-49]**.

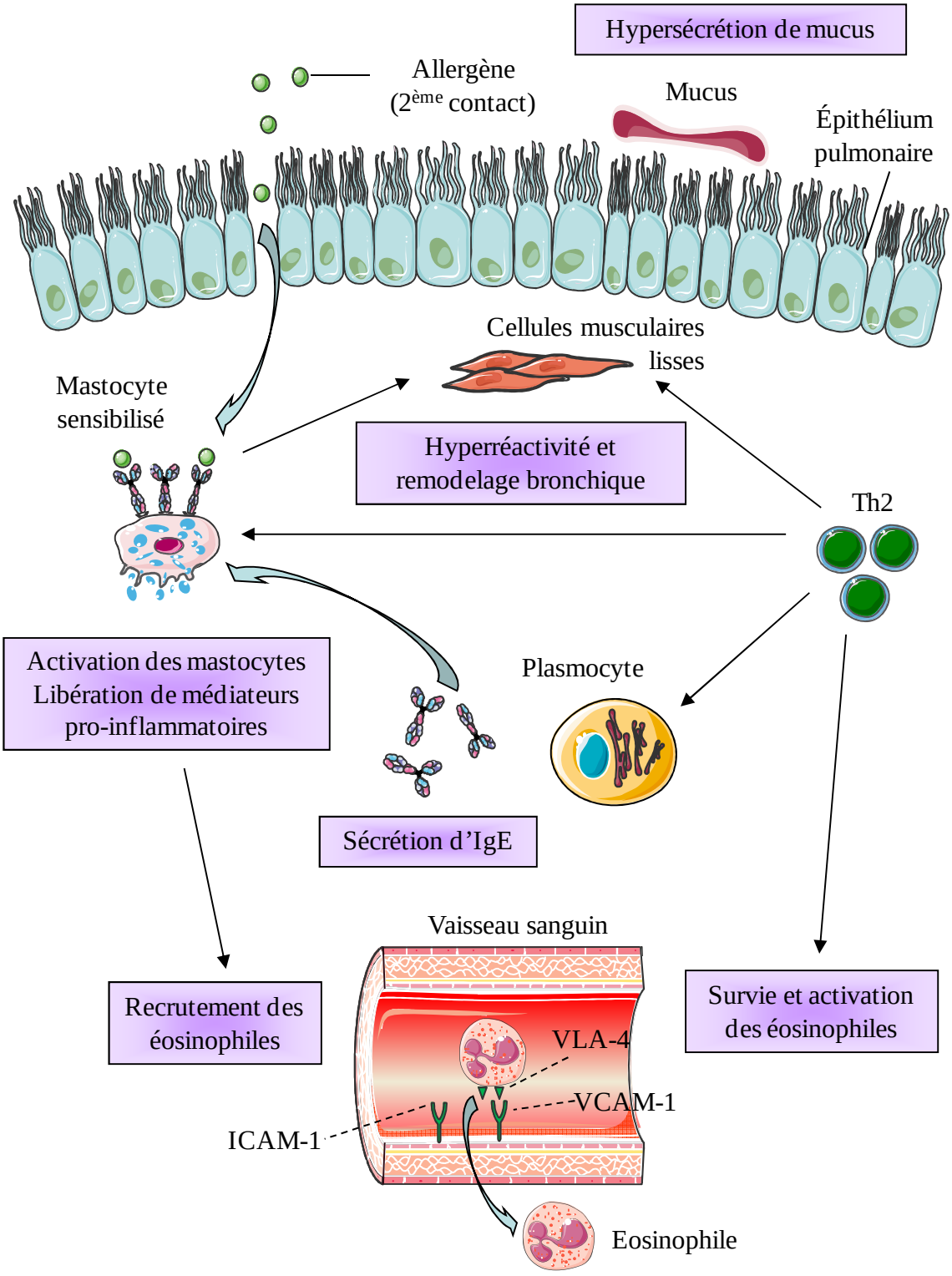


Figure 4 : Phase effectrice de la réaction allergique.
Après être entrés en contact avec l'allergène pour la deuxième fois, les mastocytes sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires comme l'histamine qui sont responsables des symptômes observés chez les patients. Les Th2 produisent des signaux permettant le recrutement d'éosinophiles dans le poumon *via* l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. Ces éosinophiles sécrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme les cysteinyl-leucotriènes, les protéines cationiques ou la protéine majeure basique. Enfin, les Th2 sont impliqués dans l'hyperréactivité et le remodelage bronchique et induisent indirectement l'hypersécrétion de mucus, caractéristique de la phase tardive de la réaction allergique.

L'épithélium a un rôle particulièrement important dans l'allergie. Dans les muqueuses et la peau, les cellules épithéliales sécrètent des cytokines et chimiokines cruciales dans la polarisation Th2 comme CCL17 (*Chemokine (C-C motif) ligand 17* ou TARC), CCL22 (MDC), l'IL-25, l'IL-33. Elles sécrètent également du TSLP qui interagit avec les DCs et les mastocytes pour augmenter la réponse Th2 **[50-52]**.

Enfin, une étude récente a étudié les sous-types de DCs dans le sang de patients allergiques et a montré une augmentation générale du nombre de DCs chez les asthmatiques par rapport aux patients sains. Ainsi, les DCs sont essentielles dans le développement mais également dans la maintenance de l'asthme **[53]**.

1.4.3. Les réponses immunes aux allergènes chez les individus sains

L'analyse des réponses immunes vis-à-vis des allergènes chez les individus sains a permis de mettre en évidence la présence d'IgA, IgG4 et IgG1 spécifiques des allergènes dans le sang ou les muqueuses en l'absence d'IgE **[54, 55]**. Des LTs spécifiques de l'allergène ont également été décrits et présentent différents phénotypes. Ils peuvent sécréter, soit uniquement de l'IL-10 (Tr1) **[56]**, soit de l'IFN-γ et de l'IL-10 en réponse aux allergènes saisonniers comme le bouleau **[57]** ou avoir un phénotype mixte pour lutter contre les allergènes perannuels comme les acariens **[58]**.

1.5. Diagnostic

Le diagnostic de l'allergie débute par des tests cutanés. Pour cela, une goutte d'extrait allergénique est déposée sur la peau du bras qui est ensuite piquée à travers la goutte. Le résultat est obtenu en vingt minutes. Si le patient est allergique, la liaison de l'allergène avec les IgE spécifiques à la surface des mastocytes entraîne une libération des médiateurs pro-inflammatoires, se traduisant par un œdème, un érythème et un prurit. Un test cutané induisant une papule de diamètre supérieur à 3 mm est considéré comme positif. Le témoin négatif est un tampon glycéro-salin qui ne doit pas entraîner de réaction. Si le patient réagit à ce contrôle, cela indique que sa peau est très sensible. L'interprétation des résultats doit alors être effectuée avec la plus grande prudence. Le contrôle positif contient de l'histamine contre laquelle tous les patients réagissent. L'absence de réponse est souvent révélatrice de la prise par le patient d'anti-histaminiques ou d'autres médicaments bloquant l'effet de l'histamine, rendant l'interprétation impossible. Pour éviter ces interactions, il est recommandé de stopper les traitements anti-histaminiques 6 semaines avant le prick test et tout autre médicament 5 à 6 jours avant le test **[59]**.

En cas de doute ou lorsque les tests cutanés ne sont pas réalisables, ces tests sont complétés par un dosage d'IgE. Les IgE spécifiques de l'allergène sont dosés directement dans le sérum, par un test de type ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) **[59]**.

1.6. Traitements

1.6.1. Eviction

L'éviction de l'allergène est recommandée comme stratégie de prévention des maladies allergiques. Dans le cas de l'asthme allergique aux acariens par exemple, plusieurs études démontrent un rôle bénéfique de l'éviction en montrant qu'un matelas protégé et nettoyé diminue les symptômes de l'asthme **[60, 61]**.

1.6.2. Traitements symptomatiques

1.6.2.1. Antihistaminiques

Les antihistaminiques H1 sont utilisés depuis plus de cinquante ans dans le traitement de diverses réactions allergiques cutanées (urticaire) ou des muqueuses (rhinite, rhume des foins, conjonctivite). Ces molécules, en se fixant sur les récepteurs H1, inhibent d'une manière compétitive les effets de l'histamine et plus particulièrement l'effet vasodilatateur et l'augmentation de la perméabilité capillaire à l'origine des réactions œdémateuses. Ils ne s'opposent pas à la libération d'histamine et sont insuffisants à eux seuls pour traiter un choc anaphylactique. Les antihistaminiques H1 d'ancienne génération ont des effets sédatifs et anti-cholinergiques importants. Ces effets sont toutefois réduits avec les molécules de nouvelle génération, dont la plus connue est la cétirizine **[1]**.

1.6.2.2. Glucocorticoïdes

Les GCs (glucocorticoïdes), puissants anti-inflammatoires, sont utilisés depuis les années quarante pour le traitement des maladies auto-immunes, des rejets de greffes et de l'allergie **[62-64]**. Leur activité thérapeutique est le reflet de l'effet physiologique des stéroïdes endogènes **[65, 66]**. Les GCs comme la prednisone sont susceptibles d'influencer les fonctions de nombreux types cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire de la réaction allergique *via* l'inhibition de l'expression de cytokines, de chimiokines et de molécules d'adhésion **[67]**. L'action est essentiellement médiée par la régulation transcriptionnelle des gènes cibles du GR (récepteur aux glucocorticoïdes) **[68-71]**. Le GR peut se lier à différentes séquences spécifiques de l'ADN (acide désoxyribonucléique) appelées les **GRE** (Eléments de réponse aux glucocorticoïdes), ce qui aboutit à la transactivation des gènes codant pour des molécules immunosuppressives comme l'annexine-1, les protéines kinases de la famille MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), IκBα (inhibiteur de NF-κB), l'IL-10 ou encore GILZ (*Glucocorticoid-induced Leucine Zipper*). Le GR peut également interférer avec la liaison de facteurs de transcription à l'ADN aboutissant à la transrépression de gènes codant pour des molécules inflammatoires comme l'IL-1 ou l'IL-12 **[72-75]** (cf. Fig. 5).

Le GR peut également médier l'action de GCs par interaction protéine-protéine avec des facteurs de transcription, cofacteurs, régulateurs ou protéines de signalisation. Par exemple, le GR a été co-purifié avec des transducteurs de signaux comme STAT, NF-κB ou AP-1 (*activator protein 1*). Toutes ces interactions aboutissent à l'inhibition de l'expression de gènes cibles pro-inflammatoires **[71, 76-78]**.

Malgré l'utilisation courante des immunosuppresseurs comme les GCs, les effets secondaires sont importants, notamment *via* des mécanismes d'immunosuppression systémiques et il est donc nécessaire de trouver des stratégies plus ciblées pour diminuer le rapport bénéfice/risque.

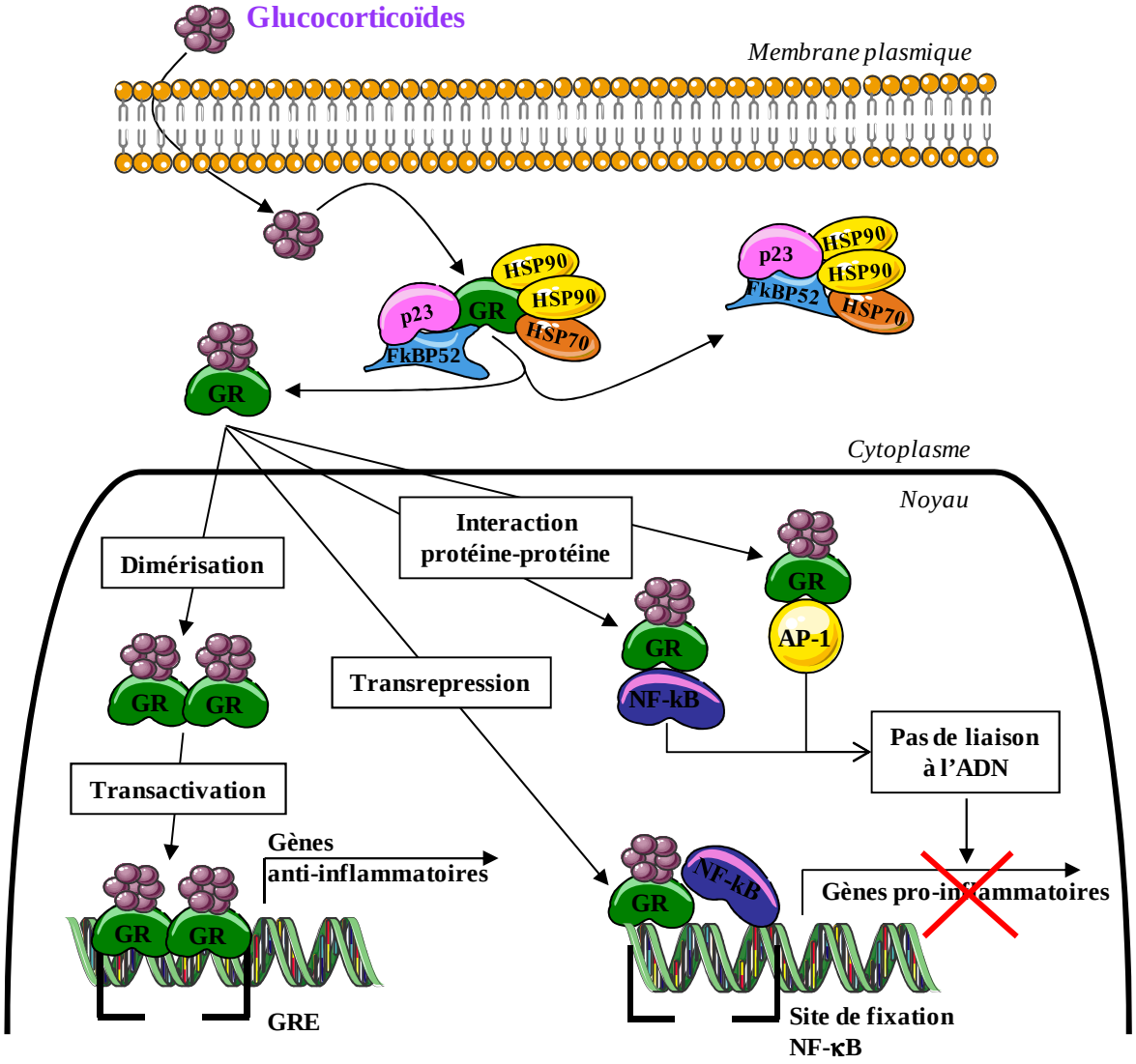


Figure 5 : Mécanisme simplifié de l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.
Les corticostéroïdes comme la DEX entrent dans la cellule et se lient au GR dans le cytoplasme. Cette liaison entraîne la séparation du GR des molécules adaptatrices formant le complexe (p23, FKBP52, HSP90 et HSP70). Le GR entre alors dans le noyau de la cellule où la transcription de gènes est initiée. L'ensemble des gènes contenant un GRE dans leur promoteur subissent une transactivation grâce à l'homodimère du GR. Différents gènes anti-inflammatoires sont transcrits comme GILZ, l'annexine-1, le SLPI (*Secretory leukoprotease inhibitor*), l'IL-10 ou IκBα. Le GR peut également réprimer la transcription de certains gènes en empêchant la fixation à l'ADN de facteurs de transcription pro-inflammatoires comme NF-κB. Le GR peut également intéragir directement avec NF-κB et AP-1 empêchant leur liaison à l'ADN. Ces deux mécanismes aboutissent au blocage de la transcription des gènes pro-inflammatoires codant par exemple pour des cytokines inflammatoires ou des molécules de costimulation.

1.6.2.3. Agonistes des récepteurs beta-adrénergiques

Les agonistes des récepteurs β2 adrénergiques comme le salbutamol sont utilisés pour leur effet bronchodilatateur dans le traitement préventif et curatif de l'asthme. Ce sont les bronchodilatateurs les plus efficaces permettant un soulagement rapide des symptômes de l'asthme. La liaison de ces agonistes au récepteur beta-adrénergique entraîne l'activation de l'adénylate cyclase et donc la génération d'AMP (adénosine monophosphate) cyclique. La protéine kinase A est alors activée, conduisant à l'ouverture des canaux calciques et donc à la relaxation des muscles lisses. Les agonistes beta-adrénergiques sont couramment utilisés en combinaison avec des corticostéroïdes inhalés afin d'augmenter leur efficacité **[1]**.

1.6.2.4. Inhibiteurs de phosphodiestérases

Les inhibiteurs des phosphodiestérases comme la theophylline bloquent l'action d'un ou plusieurs des sous-types de l'enzyme phosphodiestérase et ont un effet bronchodilatateur. Le mécanisme passe par une induction de messagers secondaires intracellulaires comme l'adénosine ou la guanosine monophosphate cyclique. Ces inhibiteurs sont utilisés dans le traitement de l'asthme et des broncho-pneumopathies chroniques obstructives mais sont associés à des effets secondaires sur le système cardiaque et le système nerveux central **[1]**.

1.6.2.5. Thérapies basées sur les cytokines

Du fait de la fonction essentielle des cytokines Th2 dans l'établissement et le maintien de la réaction allergique, différentes stratégies thérapeutiques ont été développées afin d'inhiber l'IL-4, l'IL-5 ou encore l'IL-13. Ces traitements consistent à administrer des récepteurs solubles des cytokines ou des anticorps monoclonaux spécifiques des cytokines afin de bloquer leur action (cf. Fig. 6). Ces molécules ne sont pas commercialisées à ce jour et leur efficacité est en cours d'évaluation dans différentes études cliniques. Les résultats semblent être contradictoires avec des effets variables allant de l'inefficacité à l'amélioration moyenne des symptômes **[67]**. Cette divergence au niveau des résultats est probablement due aux designs expérimentaux et au choix de la population à étudier **[79]**. D'autres stratégies sont actuellement en développement pour cibler et inhiber les cytokines sécrétées par d'autres cellules immunitaires (cellules épithéliales, mastocytes) comme l'IL-15, l'IL-17, l'IL-25, l'IL-33 ou le TSLP. Les résultats sont attendus très prochainement **[79]**. Une autre stratégie consiste à favoriser la réponse Th1 par administration d'IL-12 ou d'IFN-γ recombinant **[80-84]**.

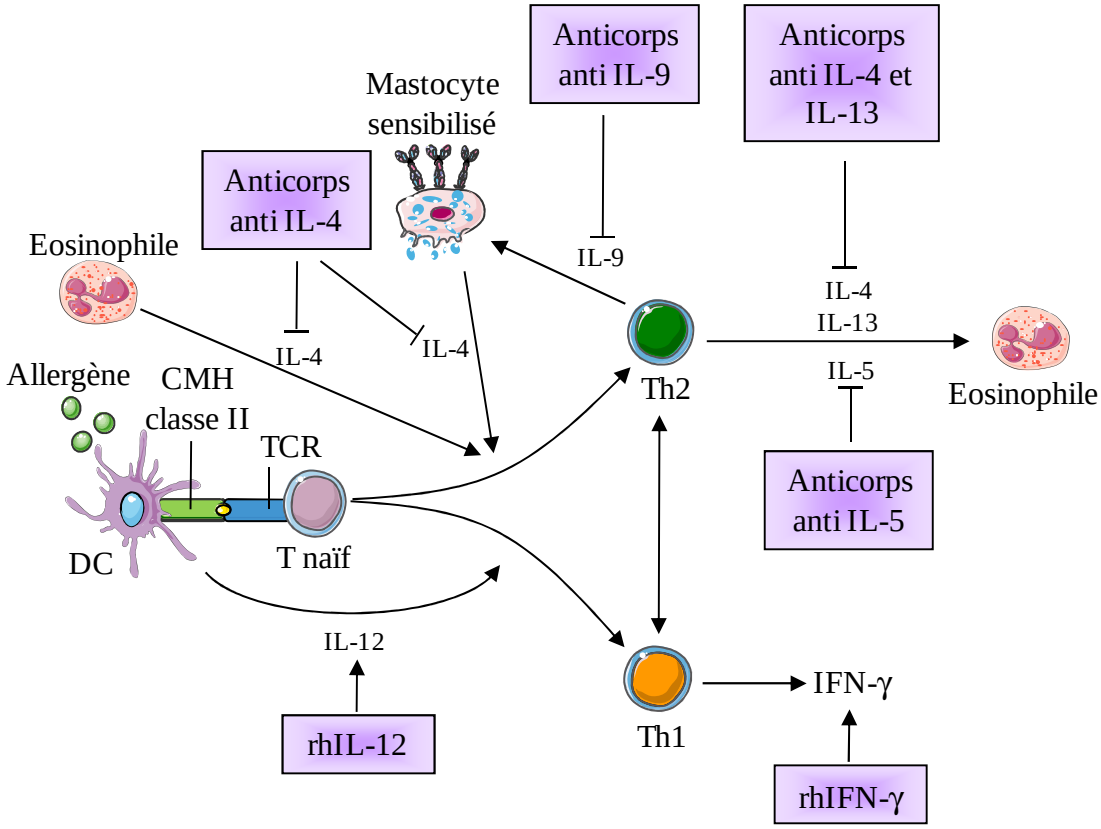


Figure 6 : Thérapies de l'asthme basées sur les cytokines.
L'inflammation allergique est caractérisée par une réponse Th2 exacerbée. Différentes stratégies ont été développées pour altérer la balance Th2-Th1 soit par l'inhibition des cytokines Th2, en particulier l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 grâce à des anticorps dirigés contre ces molécules soit par l'induction des réponses Th1 par l'ajout de cytokines recombinantes (rhIL-12 ou rhIFN-γ).

1.6.2.6. Anti-IgE

Les anti-IgE constituent les premiers médicaments efficaces, issus de la biotechnologie, dans le traitement de l'allergie. L'anti-IgE commercial (Omalizumab) est un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG1 dirigé contre le domaine C3 des IgE **[85]**. Il se lie aux IgE libres dans les sang et diminue la liaison de l'IgE aux récepteurs de haute et faible affinité (FcεRI, FcεRII) sur les mastocytes, basophiles, et éosinophiles ce qui a pour effet d'inhiber la réponse inflammatoire allergique (cf. Fig. 7) **[86]**. L'utilisation d'anti-IgE est indiquée dans l'asthme allergique modéré à sévère. Il s'agit d'un traitement permettant d'améliorer le contrôle de l'asthme persistant qui peut être utilisé en association avec des fortes doses de corticostéroïdes inhalés **[87]**.

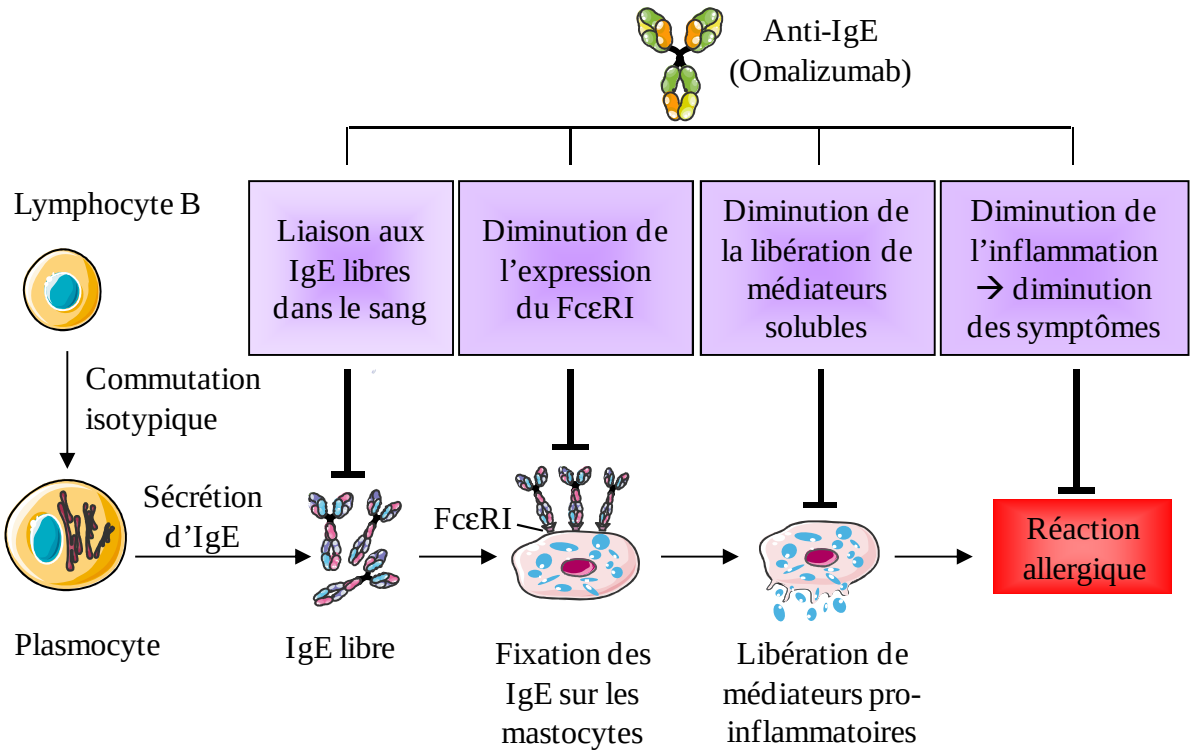


Figure 7 : Mécanisme d'action des anticorps anti-IgE.
Les anticorps anti-IgE peuvent diminuer la quantité d'IgE libre ainsi que leur liaison aux récepteurs de haute et faible affinité aux IgE (FcεRI et FcεRII) ce qui résulte en une atténuation de la réponse allergique. De plus, l'inhibition de la liaison des IgE aux mastocytes, éosinophiles et basophiles diminue l'expression du FcεRI par rétrocontrôle.

L'objectif de l'ensemble de ces traitements symptomatiques est de diminuer les symptômes allergiques. En revanche, les traitements d'ITA permettent véritablement de guérir l'allergie.

1.6.3. Immunothérapie allergénique

L'ITA existe depuis le début du siècle dernier et constitue un traitement cliniquement efficace, dont la durée d'action excède la période de traitement **[23]**. L'immunothérapie consiste à administrer l'allergène responsable de la maladie de façon répétée, afin d'induire une tolérance spécifique de cet allergène. Les traitements actuels sont des extraits allergéniques, préparés à partir de la matière première (pollens de graminées, d'arbres ou culture d'acariens). Différents protocoles d'immunothérapie, aux doses et schémas d'administration variables, ont été décrits. Les protocoles les plus courants consistent à administrer des doses croissantes d'extraits allergéniques pendant 4 à 6 semaines (phase initiale), puis la dose maximale tolérée pendant 3 à 5 ans, ou pendant plusieurs saisons polliniques (phase d'entretien). Il existe également des protocoles d'augmentation rapide des doses, pour les venins d'hyménoptères ou les acariens, appelés protocoles « ultrarush » **[88, 89]**. L'efficacité de la désensibilisation dépend de l'allergie traitée. Elle est proche de 100 % pour les venins d'hyménoptères, de l'ordre de 60 à 70 % pour les pollens de graminées et de 50 à 60 % pour les acariens.

L'ITSC (immunothérapie spécifique de l'allergène par voie sous-cutanée) est un traitement bien établi pour la rhinite allergique et l'asthme, mais requiert des injections répétées, parfois mal acceptées, en particulier par les enfants. De plus, elle peut être associée à des effets secondaires et à des réactions anaphylactiques dont l'incidence varie de 0,1 à 5% selon la sévérité **[67]**. D'autres voies d'administration non invasives ont alors été testées, comme la voie nasale, orale et sublinguale. Les traitements par voie nasale présentent une efficacité dans plusieurs essais cliniques, mais il est difficile de contrôler la dose exacte administrée, particulièrement dans le cas de rhinites **[90]**. L'efficacité de l'immunothérapie par voie orale, quant à elle, a été observée dans des modèles animaux mais n'a pas été démontrée chez l'homme. L'efficacité de l'ITSL a été démontrée par plusieurs études cliniques de phase III et par plusieurs méta-analyses pour la rhinite allergique et l'asthme, en utilisant de fortes doses d'allergènes, au moins 50 à 100 fois plus importantes que celles utilisées par voie sous-cutanée **[91-97]**. L'ITSL présente de nombreux avantages par rapport à l'ITSC puisque l'administration à domicile est jugée plus simple par les patients mais surtout cette voie d'administration présente un bon profil d'innocuité. En effet, aucun choc anaphylactique n'a été reporté à ce jour, avec plus de deux milliards de doses administrées. Les effets secondaires qui peuvent être observés avec l'ITSL sont de légères démangeaisons et gonflements au niveau local après administration, ainsi que des douleurs intestinales ou diarrhées **[98-100]**.

Les mécanismes permettant d'expliquer l'efficacité de ce traitement et de cette voie d'administration seront détaillés dans le chapitre suivant. Le principe consiste à administrer des allergènes jusqu'à parvenir à un état de tolérance vis-à-vis de l'antigène *via* une inhibition des réponses Th2 et une augmentation des réponses Th1/Tregs (lymphocytes T régulateurs).

L'allergie est une maladie plurifactorielle qui se traduit chez les patients par des rhinites, des dermatites ou encore de l'asthme. Elle est due à une réponse exagérée du système immunitaire contre des allergènes normalement inoffensifs comme les pollens d'arbres ou de graminées, les acariens ou les phanères d'animaux. Il existe différents traitements symptomatiques dont le but est de soulager les patients lorsque des symptômes apparaissent. Actuellement, seule l'immunothérapie spécifique de l'allergène permet de guérir de façon durable de l'allergie. Le but de ce traitement est d'éduquer le système immunitaire pour que les allergènes soient à nouveau tolérés. Ceci passe par une réorientation des réponses immunitaires Th2 vers des réponses Th1/Tregs selon des mécanismes décrits dans la partie suivante.

2. Mécanismes d'induction de tolérance immunologique

2.1. La tolérance immunologique (ou tolérance)

L'induction et le maintien de la tolérance périphérique est un objectif dans le domaine de la transplantation, de l'auto-immunité et de l'allergie. La tolérance, qui peut être induite de façon centrale ou en périphérie, implique tout un ensemble de cellules immunologiques et de voies de signalisation régulatrices qui préviennent la réactivité contre le soi et les antigènes inoffensifs pour l'organisme. La tolérance centrale permet au système immunitaire d'éliminer les LTs auto-réactifs (dirigés contre le soi) durant leur développement dans le thymus **[101, 102]**. Les LTs auto-réactifs qui échappent à cette tolérance centrale sont contrôlés par différents mécanismes de tolérance en périphérie, incluant l'ignorance, l'anergie, la délétion et la régulation immune **[103]**.

2.1.1. Ignorance des lymphocytes T

L'ignorance décrit la coexistence de LTs naïfs potentiellement auto-réactifs et de leur antigène cible dans les tissus périphériques. L'antigène pour lequel ils sont spécifiques est appelé « cryptique » indiquant que dans les conditions physiologiques normales, les LTs ne rencontrent pas cet antigène. Des problèmes peuvent apparaître si l'hôte acquiert un agent étranger avec des antigènes qui sont immunologiquement similaires aux antigènes de l'hôte mais qui diffèrent suffisamment pour induire une réponse immunitaire. Les LTs « ignorants » peuvent alors être activés par cross-réactivité ou mimétisme moléculaire **[104]**.

2.1.2. Anergie des lymphocytes T

L'anergie est un mécanisme de tolérance dans lequel les LTs sont inactivés fonctionnellement après rencontre de l'antigène. Ces cellules sont vivantes mais se trouvent pendant une période prolongée dans un état d'hypo-réponse **[105]**. Pour devenir activés, les LTs ont besoin de trois signaux : le premier est produit par l'engagement du TCR (récepteur des LTs) avec le complexe CMH-peptide (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), le second signal est donné par les molécules costimulatrices alors que le troisième met en jeu l'environnement cytokinique. L'engagement du TCR en l'absence de molécules de costimulation est connu pour induire de l'anergie **[106]**. Un autre mécanisme permettant d'induire des LTs anergiques *in vitro* et *in vivo* est la déplétion de l'environnement en tryptophane. Cette déplétion peut être due aux macrophages activés et aux DCs qui expriment IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase), enzyme limitante dans la voie de dégradation du tryptophane. La privation de cet acide aminé pour le LT entraîne l'arrêt de sa prolifération et de son activité **[107]**. Ce mécanisme s'est révélé crucial dans la survie fœtale chez la souris **[108, 109]**.

2.1.3. Délétion des lymphocytes T

La délétion résulte de l'induction de l'apoptose, il s'agit d'un des principaux mécanismes de la tolérance périphérique et centrale. L'apoptose des LTs peut être médiée par l'engagement de la voie Fas (fragment inducteur d'apoptose) (Fas sur les LTs et FasL sur les CPAs) ou par différents mécanismes aboutissant l'AICD (*Activation-induced cell death*) **[110]**. La stimulation chronique des LTs spécifiques peut également induire une délétion par épuisement, un phénomène visible dans les phases tardives des infections chroniques ou de la croissance tumorale **[111]**.

2.1.4. Régulation immune

Enfin, la tolérance peut être induite par des mécanismes adaptatifs impliquant plusieurs types cellulaires en particulier les Tregs. Par exemple, deux récepteurs inhibiteurs ont été décrits sur les LTs activés pour induire de la tolérance, le CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) et PD-1 (*Programmed Death-1*).

CTLA-4 est un récepteur sur les LTs qui se lie aux molécules de costimulation CD80 ou CD86 sur les CPAs avec une plus grande affinité que le CD28 activateur, permettant ainsi d'atténuer les fonctions effectrices LTs **[112]**. Les souris déficientes en CTLA-4 développent des maladies auto-immunes ce qui renforce le rôle de ce récepteur dans l'induction de tolérance **[113]**.

Le récepteur PD-1 sur les LTs possède également une fonction inhibitrice lorsqu'il interagit avec ces deux ligands PD-L1 (*Programmed cell death ligand)* et PD-L2 exprimés sur les CPAs comme les LBs ou les DCs. L'engagement de ce récepteur inhibiteur induit une inhibition de la prolifération cellulaire et de la sécrétion cytokinique des LTs **[114, 115]**.

2.2. Mécanismes immunologiques impliqués dans l'immunothérapie allergénique

Les effets de l'ITA sur les réponses immunes ont été documentés dans de nombreuses études indiquant une multitude de mécanismes d'action.

2.2.1. Effets précoces de l'immunothérapie

Lors du traitement de certains types d'allergies, en particulier les allergies aux venins d'hyménoptères, différents changements précoces ont été identifiés après ITA **[116, 117]**. Après la première injection, une diminution précoce de la dégranulation des mastocytes et des basophiles a pu être mise en évidence chez des patients protégés très rapidement après ITA. Chez ces patients, les niveaux d'IgE et de sensibilité cutanée médiée par les IgE ne sont pas modifiés. Toutefois, les symptômes sont réduits par un mécanisme encore inconnu qui fait vraisemblablement intervenir l'immunité innée et qui peut ressembler à la désensibilisation spécifique de l'antigène décrite chez la souris dans des modèles de désensibilisation orale aiguë **[118]**. En effet, lors de l'ITA, dans les

modèles murins, de petites quantités d'histamine et de leucotriènes sont libérées, diminuant le contenu des granules mais impactant également sur le niveau d'activation des mastocytes et des basophiles **[116, 117]**. Par ailleurs, une étude récente a décrit une augmentation de la dégradation en tryptophane ainsi qu'une augmentation des transcrits codant pour des récepteurs inhibiteurs aux immunoglobulines humaines sur les monocytes, seulement un jour après le début des injections. Ces deux molécules impliquées dans la tolérance périphérique peuvent être considérées comme des marqueurs très précoces de l'ITA **[119]**.

L'utilisation des voies transcutanées et épicutanées en ITA a permis de montrer que l'application d'allergènes pendant quelques semaines par l'intermédiaire de patchs est suffisante pour diminuer les symptômes des patients **[120, 121]**. Lors de ces études, des effets précoces importants ont pu être mis en évidence sur les CPAs, en particulier au niveau des LCs (cellules de Langerhans), retrouvées en nombre important dans l'épiderme **[122]**.

2.2.2. Effet de l'immunothérapie sur les Tregs et la tolérance périphérique

L'induction d'un état de tolérance des LTs périphériques représente une étape cruciale dans l'ITA. La tolérance périphérique est essentiellement caractérisée par la génération de Tregs spécifiques de l'antigène. Il existe différents types de Tregs, les nTregs (Lymphocytes T régulateurs naturels) sélectionnés dans le thymus et de phénotype $CD4^+$ $CD25^+$ ou encore les Tregs inductibles générés en périphérie (Tr1 et Th3).

Les nTregs expriment constitutivement le CD25 (chaine α du récepteur de l'IL-2), GITR (*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*), ICOS (*Inducible Co-Stimulatory molecule*), PD-L1 et le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box p3)* **[123]**. Leur développement et leur fonction sont dépendants du TGF-β (*Transforming growth factor beta*). Ils peuvent supprimer l'activation et la prolifération des LTs $CD4^+$ et $CD8^+$. Ils exercent leur fonction suppressive par la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 et le TGF-β, par contact cellulaire direct et par l'activité combinée du TGF-β membranaire et du CTLA-4 **[124, 125]**. Différentes études décrivent des rôles pour les deux types de Tregs dans l'ITA. Leurs différents effets sont présentés dans la Figure 8.

Le rôle protecteur des nTregs dans la réaction allergique a été démontré à l'aide de modèles murins d'asthme. Plusieurs études ont démontré que la déplétion des nTregs augmente plusieurs caractéristiques de l'asthme allergique, à savoir l'hyperréactivité bronchique, l'éosinophilie, le taux d'IgE, et la sécrétion de cytokines de type Th2 **[126, 127]**. De plus, un transfert adoptif de Tregs à des souris sensibilisées réduit les caractéristiques de l'asthme allergique **[127]**. Une autre étude décrit que l'injection d'un anticorps dirigé contre le CTLA-4 pendant la sensibilisation augmente l'inflammation pulmonaire, l'hyperréactivité bronchique, les taux d'IL-4 et d'IL-5 et la production d'IgE spécifiques **[128]**. Cette aggravation est accompagnée d'une importante réduction du taux de

TGF-β dans les poumons. Récemment, Kearley *et al.* **[129]** ont observé qu'un transfert de Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ permet non seulement d'inhiber l'inflammation pulmonaire (éosinophilie, infiltration de Th2, sécrétion d'IL-5 et IL-13), mais également de prévenir le développement du remodelage bronchique, et de réduire l'hypersécrétion de mucus et le dépôt péri-bronchique de collagène.

Chez l'homme, l'implication des Tregs dans les mécanismes de l'allergie a également été démontrée puisque les Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ des donneurs atopiques ont une capacité réduite à supprimer la prolifération des LTs $CD4^+$ $CD25^-$ par comparaison à des donneurs sains **[130]**. Par ailleurs, la présence de $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ dans la muqueuse nasale, l'augmentation de leur nombre après immunothérapie et leur association avec l'efficacité clinique et la suppression de l'inflammation allergique a renforcé le concept de tolérance allergénique induite par les Tregs chez l'homme **[131]**.

Les Tregs induits exercent leur fonction suppressive par contact cellulaire et par la production de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 et le TGF-β. Les Tr1 sécrètent principalement de l'IL-10 et du TGF-β **[132]**. Les lymphocytes Th3 produisent de grandes quantités de TGF-β, avec des quantités variables d'IL-10 **[133, 134]**. L'implication de ces cellules dans la suppression des réponses Th1 et Th2 spécifiques de l'allergène a été démontrée par le blocage partiel de leur activité par des anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-10 et le TGF-β, révélant les fonctions essentielles de ces molécules.

L'IL-10 a de nombreuses propriétés immunomodulatrices importantes dans le contexte de l'asthme allergique. L'IL-10 inhibe les réponses Th2 et Th1, diminue la capacité de présentation des antigènes des DCs (diminution de l'expression du CMH II), induit la commutation isotypique en faveur des IgG4, et diminue l'activation et la migration des mastocytes et éosinophiles **[135]**. Il a été observé que le taux d'IL-10 est plus faible dans les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques par rapport à des individus sains, tout comme le taux d'ARNm (acides ribonucléiques messagers) de l'IL-10 dans les LTs $CD4^+$ périphériques **[136]**. Par ailleurs, des études expérimentales dans des modèles murins d'asthme allergique décrivent une suppression de l'hyperréactivité bronchique et du recrutement cellulaire dans les poumons (neutrophiles, éosinophiles), après administration intra-nasale d'IL-10 recombinante **[137]**. Il a également été décrit que le transfert de cellules Tr1 pendant la phase de sensibilisation inhibe le développement de l'asthme allergique, *via* leur production d'IL-10 **[138]**.

Le TGF-β exerce également une activité suppressive sur les réponses Th1 et Th2, contribue à la génération des nTregs et promeut la commutation isotypique des LBs en faveur des IgA **[135]**.

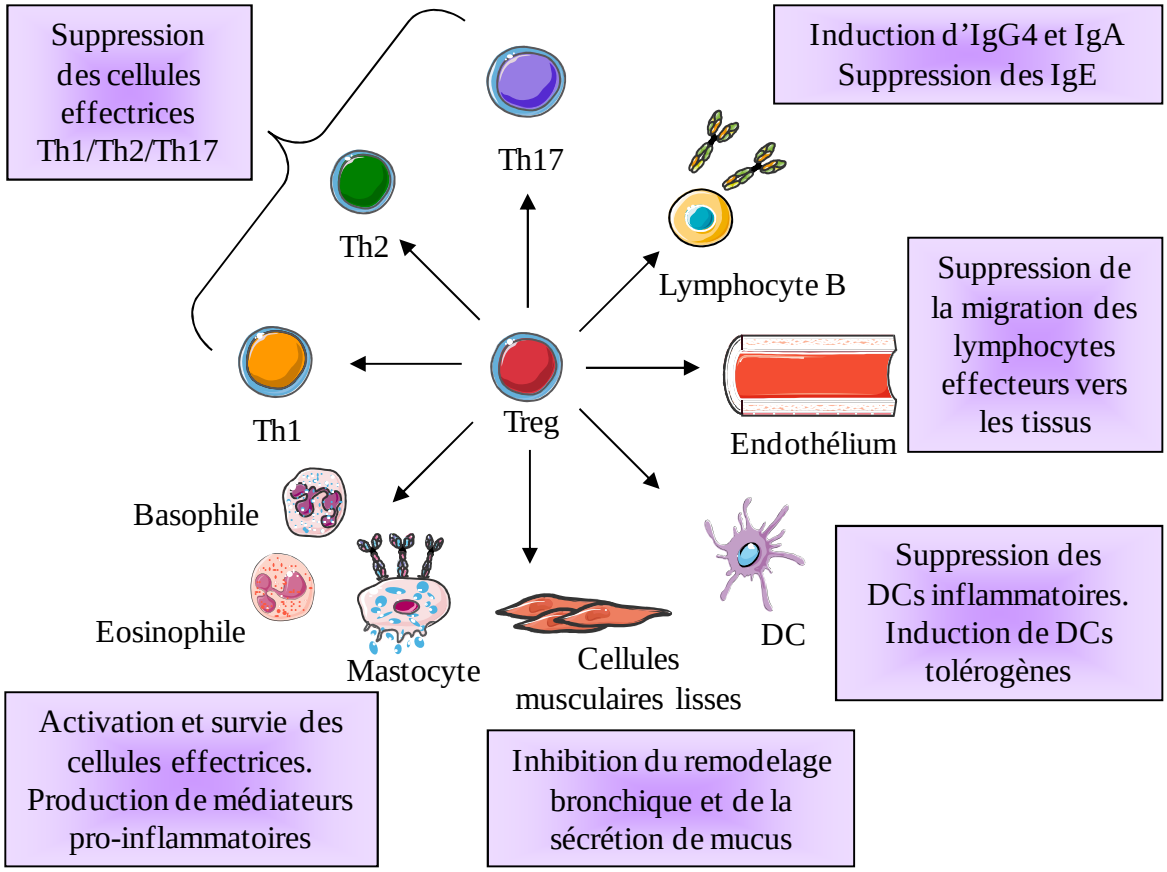


Figure 8 : Rôle des Tregs dans le contrôle de l'asthme allergique.
Les Tregs inhibent l'ensemble des acteurs de la réaction allergique, les LTs Th1, Th2 et Th17, les LBs ainsi que les cellules productrices de médiateurs pro-inflammatoires (basophiles, éosinophiles, mastocytes). Les Tregs peuvent induire des DCs tolérogènes et inhiber le recrutement des lymphocytes effecteurs vers les tissus. Enfin, les Tregs inhibent le remodelage bronchique et la sécrétion de mucus.

2.2.3. Effet de l'immunothérapie sur les taux d'IgG4, IgE et IgA spécifiques

Durant l'ITA, une diminution progressive des taux sériques d'IgE spécifiques est souvent observée, après une augmentation initiale transitoire **[139, 140]**. Plusieurs études ont également démontré une forte augmentation des IgG spécifiques, particulièrement les IgG4, ainsi que des IgA sériques **[139-141]**. Les IgG4 semblent capturer l'allergène avant que celui-ci n'atteigne les IgE liées aux cellules effectrices et ainsi inhiber l'activation des mastocytes et des basophiles, c'est l'hypothèse du facteur bloquant **[24]**. Des résultats récents ont montré que l'activité bloquante des IgG4 n'est pas seulement médiée par la quantité d'anticorps mais implique également un récepteur, le FcγRIIB (récepteur inhibiteur de faible affinité aux IgG). En effet, une IgG dirigée contre un épitope unique de l'allergène majeur de chat a permis de bloquer la dégranulation des basophiles chez des patients allergiques. Cependant, la relation entre l'efficacité de l'immunothérapie et l'induction d'IgG4 reste controversée **[142]**.

2.2.4. Effet de l'immunothérapie sur les marqueurs inflammatoires sériques

L'ITSL peut également s'accompagner d'une diminution dans le sang des taux de certains médiateurs inflammatoires, comme l'ECP (*Eosinophil Cationic Protein)*, qui est un marqueur de l'activation des éosinophiles **[143]**, ou de certaines hormones, comme la prolactine, produite par les LTs $CD4^+$ activés .

2.2.5. Effet de l'immunothérapie sur les cellules dendritiques

L'ITA modifie également les DCs (cf. Fig. 9). En effet, l'analyse de dix enfants allergiques aux acariens avant et après douze mois d'ITSL a permis de montrer qu'après immunothérapie, les DCs ne peuvent plus augmenter leur expression de CD86 mais augmentent leur sécrétion d'IL-10 tout en diminuant la sécrétion d'IL-12. Ces changements sur les DCs sont donc responsables de l'incapacité à induire une activation des LTs et à les orienter vers une fonction régulatrice, restaurant ainsi la tolérance vis-à-vis des allergènes **[144]**. Cette étude est la seule à ce jour démontrant un lien entre immunothérapie et induction de DCs régulatrices. Cependant, aucune relation n'a été décrite avec l'efficacité clinique.

2.2.6. Effet de l'immunothérapie sur l'inflammation mucosale locale

Des analyses de biopsies de peau et de muqueuses nasales ont révélé que l'ITSC induit une réduction du nombre de Th2, d'éosinophiles et de mastocytes aux sites d'exposition à l'allergène **[139, 145]**. Plewako *et al.* **[146]** ont également observé que l'ITSC prévient l'augmentation saisonnière du nombre de cellules exprimant les chimiokines éotaxine et RANTES (*Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*) dans la muqueuse nasale. L'ITSC est également associée à une augmentation de la proportion de Tregs $CD4^+$ $CD25^{high}$ $Foxp3^+$, de cellules productrices d'IL-10, et de cellules productrices de TGF-β dans la muqueuse **[131, 139]** .

De la même façon, l'ITSL a été associée à une réduction de l'inflammation et de l'expression de molécules d'adhésion aux sites de contact avec l'allergène. Par exemple, une étude a décrit une diminution de l'infiltration des éosinophiles et neutrophiles et de l'expression de ICAM-1 dans l'épithélium conjonctival, après stimulation locale **[147]**. D'autres études ont démontré une diminution de ces paramètres dans les cellules épithéliales nasales après exposition à l'allergène **[148]**. La diminution du nombre d'éosinophiles au site d'inflammation est probablement liée à l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 ayant un effet inhibiteur sur leur migration.

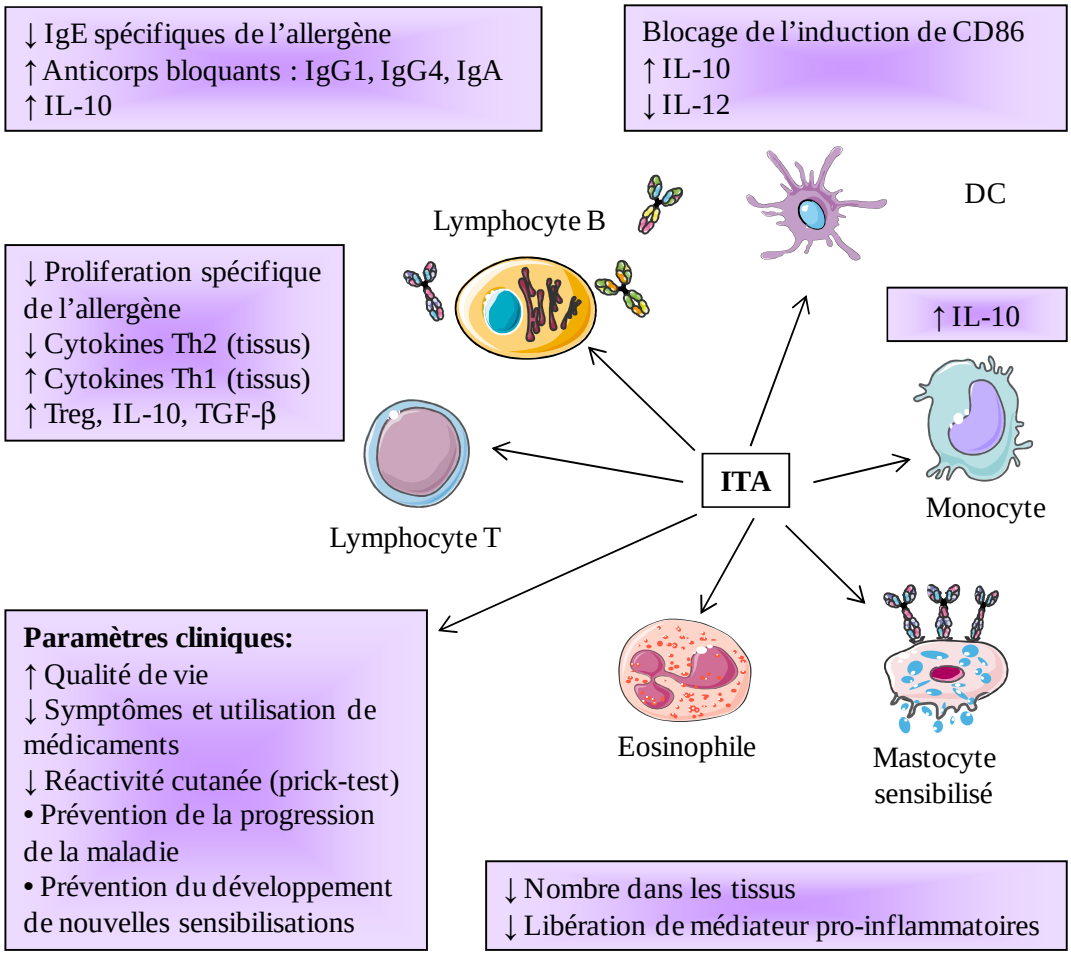


Figure 9 : Effet de l'ITA sur les paramètres immunologiques et cliniques.
L'ITA modifie les réponses cellulaires et humorales dirigées contre l'allergène. Le ratio de cytokines Th1 par rapport aux cytokines Th2 est augmenté et des Tregs fonctionnels sont induits. La production d'IL-10 par les monocytes, les DCs, les LTs et les LBs est augmentée. Le TGF-β contribue à la fonctionnalité des Tregs et à la commutation isotypique des LBs pour produire des IgA, des IgG1 et des IgG4. Ces anticorps bloquants entrent en compétition avec les IgE pour la liaison aux mastocytes et pour la capture de l'allergène. La libération de médiateurs inflammatoires par les mastocytes est diminuée tout comme le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles au site d'exposition de l'allergène.

2.3. La muqueuse orale

L'étude des mécanismes de l'ITSL a conduit plusieurs équipes à caractériser le site d'administration de ces traitements : la muqueuse orale.

2.3.1. Muqueuse orale chez la souris

Dans la muqueuse buccale de la souris, des éosinophiles et des mastocytes ont pu être détectés dans les tissus submucosaux alors qu'il est difficile de détecter d'autres cellules pro-inflammatoires comme les NK (cellules natural killer), NKT, LTs $CD8^+$ ou LBs. Des LTs $CD4^+$ sécrétant différentes cytokines effectrices comme l'IL-4, l'IFN-γ ou l'IL-17 ont par ailleurs pu être détectées indiquant que des mécanismes effecteurs existent dans cette muqueuse. Différentes populations de CPAs ont également pu être identifiées et caractérisées par leur phénotype, leur

localisation, et leur capacité à polariser des réponses lymphocytaires T **[149, 150]**. Trois populations sont prédominantes : (i) les cellules myéloïdes $CD11b^+$ $CD11c^-$ et $CD11b^+$ $CD11c^+$, principalement localisées à l'interface épithélium/couche musculaire, (ii) les pDCs (cellules dendritiques plasmacytoïdes) $B220^+$ $120G8^+$, situées dans le tissu musculaire, et (iii) les LCs $CD207^+$, localisées uniquement dans l'épithélium. Cette répartition tissulaire peut être comparée à celle observée dans la peau, qui est également un épithélium stratifié. En effet, les LCs de la peau sont situées dans l'épiderme, les DCs dans le derme sous-jacent, et les pDCs dans le derme, proches de la membrane basale **[151, 152]**.

Dans la muqueuse buccale, les cellules myéloïdes et plasmacytoïdes, bien que de phénotype et de localisation différente, ont montré leur capacité à polariser la réponse immunitaire T vers une réponse immunorégulatrice **[149, 150]**. En effet, après isolement, elles peuvent capturer et apprêter l'OVA (ovalbumine) *in vitro*, stimuler la prolifération de LTs spécifiques et leur sécrétion d'IL-10 et d'IFN-γ. De plus, ces LTs possèdent une fonction suppressive (inhibition de la prolifération de LTs stimulés par l'OVA). Cet environnement immunorégulateur semble être favorable au succès des traitements d'ITSL mais souligne principalement le rôle essentiel des CPAs dans l'induction de tolérance.

D'autres études chez la souris ont démontré que le microenvironnement des ganglions cervicaux drainant les voies buccales et nasales, favorise l'induction de tolérance par une forte production d'IgG2b et une sécrétion d'IL-12 par les DCs **[153]**. Il est intéressant de noter que Samsom *et al.* **[154]** ont observé que, dans un modèle d'induction de tolérance à l'OVA par voie nasale, la présence des récepteurs aux IgG FcγRIIB dans les ganglions cervicaux est nécessaire à la génération de Tregs spécifiques.

2.3.2. Muqueuse orale humaine

Chez l'homme, une étude a décrit les populations cellulaires présentes au site d'administration grâce à des biopsies de la muqueuse sublinguale. Après traitement, la proportion de Tregs $Foxp3^+$ s'est révélée augmentée chez les patients traités par rapport aux placebos. De plus, le nombre de mastocytes subépithéliaux s'est révélé plus faible chez les patients traités indiquant un effet clair sur les populations cellulaires de la muqueuse. Un plus grand nombre de DCs myéloïdes subépithéliales a été retrouvé chez les placebos **[155]**. Malheureusement, cette étude ne permet pas de distinguer les différents types de DCs de la muqueuse, en particulier les DCs tolérogènes.

D'autres études se sont intéressées à différentes zones de la muqueuse buccale par opposition à la peau **[156]**. Allam *et al.* **[157]** ont démontré que les cellules de type Langerhans de la muqueuse buccale diffèrent des LCs de la peau, notamment par l'expression constitutive des récepteurs de faible et forte affinité aux IgE (FcεRII et FcεRI). Ceci pourrait faciliter la capture de

l'allergène chez les individus allergiques suivant un traitement d'ITSL **[158]**. De plus, après engagement de ces récepteurs, les LCs orales produisent de l'IL-10, du TGF-β et l'enzyme immunorégulatrice IDO, augmentant ainsi l'induction de tolérance **[159]**. Par ailleurs, l'engagement du TLR4 à la surface de ces cellules induit une augmentation des molécules inhibitrices PD-L1 et B7-H3, une augmentation de la libération d'IL-10, une diminution de l'expression de la molécule de costimulation CD86, ainsi que la différenciation de LTs $CD4^+$ en Tregs $Foxp3^+$ productrices de TGF-β, IFN-γ, IL-2 et IL-10 **[160]**. Toutes ces observations convergent vers l'hypothèse d'un rôle pro-tolérogène des CPAs mucosales.

Une deuxième étude confirme cette hypothèse et indique que la muqueuse buccale, en particulier les régions sublinguales et vestibulaires, correspondent à un micromilieu tolérogène caractérisé par la présence de LTs sécrétant du TGF-β, de l'IL-10 mais aussi de l'IFN-γ et de l'IL-17 et de DCs exprimant les TLR2 et TLR4 **[156]**. Toutefois, cette étude n'a pas permis de distinguer les individus atopiques des non atopiques.

Une troisième étude chez l'homme parue récemment, permet de mettre en exergue le rôle essentiel des DCs dans le succès de l'immunothérapie **[161]**. En effet, une relation entre efficacité clinique et présence de CPAs de phénotype PD-L1 et IL-10 a pu être déterminée après ITSL chez les patients allergiques à l'ambroisie. Ces résultats suggèrent même que PD-L1 pourrait être utilisé comme marqueur d'efficacité clinique.

L'objectif de l'ITA est d'induire une tolérance spécifique de l'antigène chez les patients allergiques. Les traitements d'ITSC et d'ITSL ont des mécanismes d'action similaires, à savoir une modification des réponses lymphocytaires B et T se traduisant par une augmentation de la sécrétion d'anticorps spécifiques de l'allergène, particulièrement les IgG4 et dans une moindre mesure les IgA, et une déviation des réponses lymphocytaires de type Th2 vers des réponses Th1/Tregs. L'ITSL présente des avantages comparée à l'ITSC puisqu'elle présente un meilleur profil d'innocuité et est plus simple à administrer.

Afin d'améliorer les traitements d'ITSL, la muqueuse orale a été caractérisée montrant que celle-ci favorise l'induction de tolérance même si des mécanismes effecteurs persistent. L'étude des propriétés immunorégulatrices des CPAs renforce l'importance des DCs dans l'efficacité des traitements d'ITSL ce qui rend leur étude cruciale afin d'optimiser le ciblage des traitements et pour le suivi clinique des patients traités.

3. Les cellules dendritiques

Les DCs sont des CPAs qui peuplent tous les organes lymphoïdes ou non lymphoïdes. Elles jouent un rôle central dans la régulation immune, allant de l'induction de tolérance et de la prévention de l'auto-immunité à l'induction d'une immunité anti-tumorale ou anti-infectieuse **[162]**. Ce chapitre nous permettra dans un premier temps de décrire brièvement les différents types de DCs ainsi que leur fonction chez l'homme. Nous nous concentrerons ensuite sur les principales DCs inductrices de tolérance, les DCs tolérogènes.

3.1. Différents types de cellules dendritiques chez l'homme

3.1.1. Cellules dendritiques du sang

3.1.1.1. Cellules dendritiques myéloïdes

Chez l'homme, les DCs myéloïdes sont dites « conventionnelles » et sont réparties en deux sous-populations dans le sang périphérique : les $CD4^+$ $CD1a^+$ $CD11c^{high}$ BDCA-1 (*Blood dendritic cell antigen*)/$CD1c^+$ (0,6% des PBMCs) et les $CD4^+$ $CD1a^-$ $CD11c^{low}$ BDCA-3/$CD141^+$ (<0,05% des PBMCs) **[163]**. Leur fonction n'est pas encore connue en détail, en partie du fait de leur faible fréquence dans le sang et de l'absence de modèles équivalents à ces types cellulaires *in vitro*. Toutefois, des études de génomique comparative (avec leur équivalent chez la souris, respectivement les DCs $CD11b^+$ et $CD8\alpha^+$) ont permis d'établir que les DCs BDCA-1^+ sont spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes extracellulaires et l'activation subséquente des LTs $CD4^+$ et des réponses humorales. Les DCs BDCA-3^+ semblent quant à elles être spécialisées dans l'induction de tolérance vis à vis du soi ou dans l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis des pathogènes intracellulaires **[164]**.

3.1.1.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDCs humaines représentent 0,4% des PBMCs et sont lignées$^-$ $CD11c^-$ $CD123^+$ $ILT7^+$ BDCA-2^+/$CD303^+$ BDCA-4^+/$CD304^+$ et CMH II^+ **[165]**. Contrairement aux DCs myéloïdes, à l'état basal, elles possèdent une faible capacité d'endocytose de l'antigène ainsi qu'une faible expression des cathepsines S et D (molécules lysosomales impliquées dans le processus de génération des peptides antigéniques). Après stimulation par des antigènes viraux (ARN ou ADN viraux se liant aux TLR7 et TLR9), les pDCs sécrètent une forte quantité d'IFN de type I (IFN-α, β, ω, λ) **[166]** permettant d'inhiber la réplication virale et d'activer la fonction cytolytique des NKs ainsi que d'autres cellules impliquées dans les réponses antivirales comme les LBs, les LTs ou les DCs myéloides. Les pDCs peuvent également avoir une cytotoxicité directe sur les cellules cibles via l'expression de granzyme B **[167]**. Par ailleurs, les pDCs contrôlent la différenciation des LBs en

plasmocytes secrétant principalement des IgGs. Enfin, elles sont capables d'induire des réponses immunitaires Th1 en réponse à des virus, des réponses Th2 en réponse à une restimulation par l'IL-3 ou des Tregs $CD4^+CD25^+$ en fonction de l'environnement et de leur stade de maturation **[168-170]**. En particulier, les pDCs semblent avoir un pouvoir tolérogène médié par IDO qui permet d'induire des Tr1 suppressifs chez des patients en rémission atteints d'arthrite rhumatoïde **[171]**. Par ailleurs, de nombreuses études décrivent ce rôle tolérogène des pDCs chez la souris, dans des modèles de transplantation, de maladies autoimmunes ou d'allergie **[172, 173]**. Enfin, une augmentation des pDCs induisant une tolérance immune a également été décrite dans des tumeurs ovariennes et a été associé à une réponse clinique aggravée **[174]**. Ainsi, les pDCs sont capables d'initier différents types de réponses immunes en fonction de leur environnement. Ces cellules pourraient être spécialisées dans la modulation de l'intensité, de la durée et de la qualité des réponses effectrices / tolérogènes via la présentation antigénique ou la libération de cytokines ou chimiokines particulières **[175]**.

3.1.2. Cellules dendritiques des tissus

3.1.2.1. Cellules dendritiques des muqueuses

Les DCs des muqueuses résident dans les Plaques de Peyer de l'intestin, les muqueuses du tractus respiratoires, la cavité orale ou encore l'appareil uro-génital. Elles participent au maintien de la tolérance orale mais aussi à la lutte contre les pathogènes. Les sous-populations de DCs des muqueuses sont peu caractérisées chez l'homme du fait de leur faible accessibilité. Elles sont principalement définies par une importante expression du CMH II et par leur capacité allo-stimulatrice **[176, 177]**.

3.1.2.2. Cellules de Langerhans

Les LCs sont présentes dans l'épiderme et expriment des molécules spécifiques telles que la Langerine (CD207), une lectine de type C qui joue un rôle dans la présentation des antigènes glycopeptidiques ou la E-cadhérine, molécule d'adhésion permettant leur rétention dans l'épiderme. Elles possèdent également des organelles intracellulaires appelées granules de Birbeck qui participent au processus de chargement de l'antigène. Les LCs expriment un profil TLR spécifique qui leur permet d'adapter leur réponse après stimulation par des virus ou des bactéries gram positives **[178]**. Après capture de l'antigène, les LCs migrent, comme les DCs, vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes aux LTs **[179, 180]**.

3.1.2.3. Cellules dendritiques du derme

Chez la souris, au moins cinq populations de DCs ont été décrites dans le derme **[164]**, cependant, chez l'homme, seules quelques études décrivent ces populations du fait de leur faible accessibilité. Au moins deux sous-populations de DCs résident dans le derme chez l'homme : la sous-population $CD1a^{high}$, $CD4^{+}$, $CD209^{+}$, $CD206^{+}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$ et la sous-population $CD1a^{low}$, $CD4^{+}$, $CD209^{+}$, $CD206^{+}$, $CD14^{+}$, $CD16^{-}$. Leur fonction consiste à transporter les antigènes dans les nœuds lymphatiques drainants et à les délivrer aux DCs résidentes **[181]**. Elles semblent également participer à la réponse humorale et à l'induction de réponses de tolérance **[182, 183]**. En particulier, les $CD14^{+}$ DCs semblent induire la polarisation des LTs $CD4^{+}$ naïfs en LTs helper folliculaires **[184]** permettant ainsi la différentiation des LBs naïfs en plasmocytes sécrétant des IgM **[185]** ou des IgA **[184]**. Des macrophages, exprimant le facteur de coagulation XIIIa et de phénotype $CD11c^{-}$ $CD163^{+}$ ont également été décrits dans le derme et semblent differer des deux sous populations de DCs ($CD11c^{+}$) décrites **[184]**.

3.1.2.4. Cellules dendritiques folliculaires

Les DCs folliculaires sont présentes principalement dans les centres germinatifs et dans les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires. Elles peuvent également être retrouvées dans les infiltrats lymphocytaires suite à une infection. Contrairement aux autres DCs, elles ont une origine stromale. Elles n'expriment pas le CMH II et présentent les antigènes par le CD21 et le CD35. Elles jouent un rôle prépondérant dans la sélection des LBs mémoires **[186]**.

3.2. Rôle des cellules dendritiques : lien entre l'immunité innée et adaptative

Au niveau fonctionnel, les DCs sont des sentinelles capables de détecter l'entrée de pathogènes potentiels dans l'organisme (immunité innée) et d'associer cette reconnaissance à une réponse protective (immunité adaptative).

Les pathogènes sont reconnus par les DCs *via* des récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptor*) comme les récepteurs TLRs, les récepteurs aux lectines de type C, ou les récepteurs NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). Ces récepteurs reconnaissent des motifs très conservés à la surface des pathogènes comme les lipopolysaccharides des bactéries Gram négatives, les peptidoglycanes de bactéries Gram positives, ou encore des ARN (acides ribonucléiques) double brin de virus. L'antigène détecté est alors phagocyté, apprêté et présenté aux LTs et LBs afin d'induire une réponse immunitaire adaptative. Cette présentation a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, vers lesquels les DCs ont migré après leur maturation. L'environnement de la DC lors de la rencontre avec l'antigène oriente la réponse T auxiliaire. Cette environnement est dépendant du tissu dans lequel les DCs résident, notamment via les cellules épithéliales qui sécrétent, en

réponse à une blessure, différentes molécules de dangers comme les DAMPs (*damage associated molecular pattern molecules*), capables d'interagir avec la DCs.

Suite à la reconnaissance de pathogènes intracellulaires bactériens ou viraux, la DC induit une réponse de type Th1. Pour cela, elle sécrète préférentiellement des cytokines appartenant à la famille de l'IL-12, de l'IL-18 et des interférons de type I (IFN-α, IFN-β). Dans ce contexte inflammatoire, les Th1 vont exprimer le facteur de transcription Tbet induisant ainsi une synthèse élevée d'IFN-γ. Les Th1 vont ensuite à leur tour activer les macrophages et les LTs $CD8^+$ cytotoxiques et détruire les cellules infectées **[187]** ou induire les symptômes de l'allergie comme vu précédemment (cf. Fig. 10).

En revanche, la reconnaissance par les DCs d'allergènes ou de parasites extracellulaires comme les helminthes, mène à la sécrétion d'IL-4 afin d'orienter la réponse vers une réponse Th2. De même, l'engagement d'OX40 (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4)* à son ligand OX40L semble favoriser cette orientation **[188, 189]**. Les Th2 vont exprimer le facteur de transcription GATA-3 *(GATA binding protein 3)* et secréter de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. La sécrétion de ces cytokines entraîne la production d'IgE activant ainsi les mastocytes et les éosinophiles afin d'éliminer les pathogènes extracellulaires **[187]** (cf. Fig. 10).

Chaque sous-population a la capacité de s'auto-amplifier, inhibant de ce fait l'orientation inverse. Ainsi, l'IL-2 produite par les Th1, stimule la prolifération des Th1 alors que l'IL-4, produite par les Th2, stimule la prolifération des Th2. De même, la sécrétion d'IFN-γ par les Th1 inhibe la génération des Th2 et la sécrétion d'IL-4 par les Th2 inhibe l'orientation Th1. Ce phénomène est appelé « balance Th1/Th2 » **[187]**.

Cependant, une autre population de LTs a été récemment décrite et appelée Th17. L'orientation Th17 semble avoir lieu en présence d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-23 et de TGF-β, facteurs sécrétés par les DC17 générées par exemple après engagement de la dectine-1 **[190, 191]**. Les Th17 expriment le facteur de transcription RORC *(RAR-related orphan receptor C)* et sécrètent de l'IL-17A **[192]**. Ils semblent intervenir aussi bien dans l'augmentation du développement des maladies auto-immunes et allergiques que dans la réponse immune contre des bactéries extracellulaires ou les champignons. De plus, ils semblent également être impliqués dans le rejet aiguë lors de transplantations **[193-195]** (cf. Fig. 10).

Outre leur capacité à induire une réponse immune effectrice, les DCs participent aussi au maintien de la tolérance immunitaire en différenciant des LTs naïfs en Tregs lors de la rencontre d'antigènes inoffensifs comme les allergènes ou les bactéries lactiques. Ces DCs sont appelées tolérogènes ou régulatrices et seront décrites dans le paragraphe suivant (cf. Fig. 10).

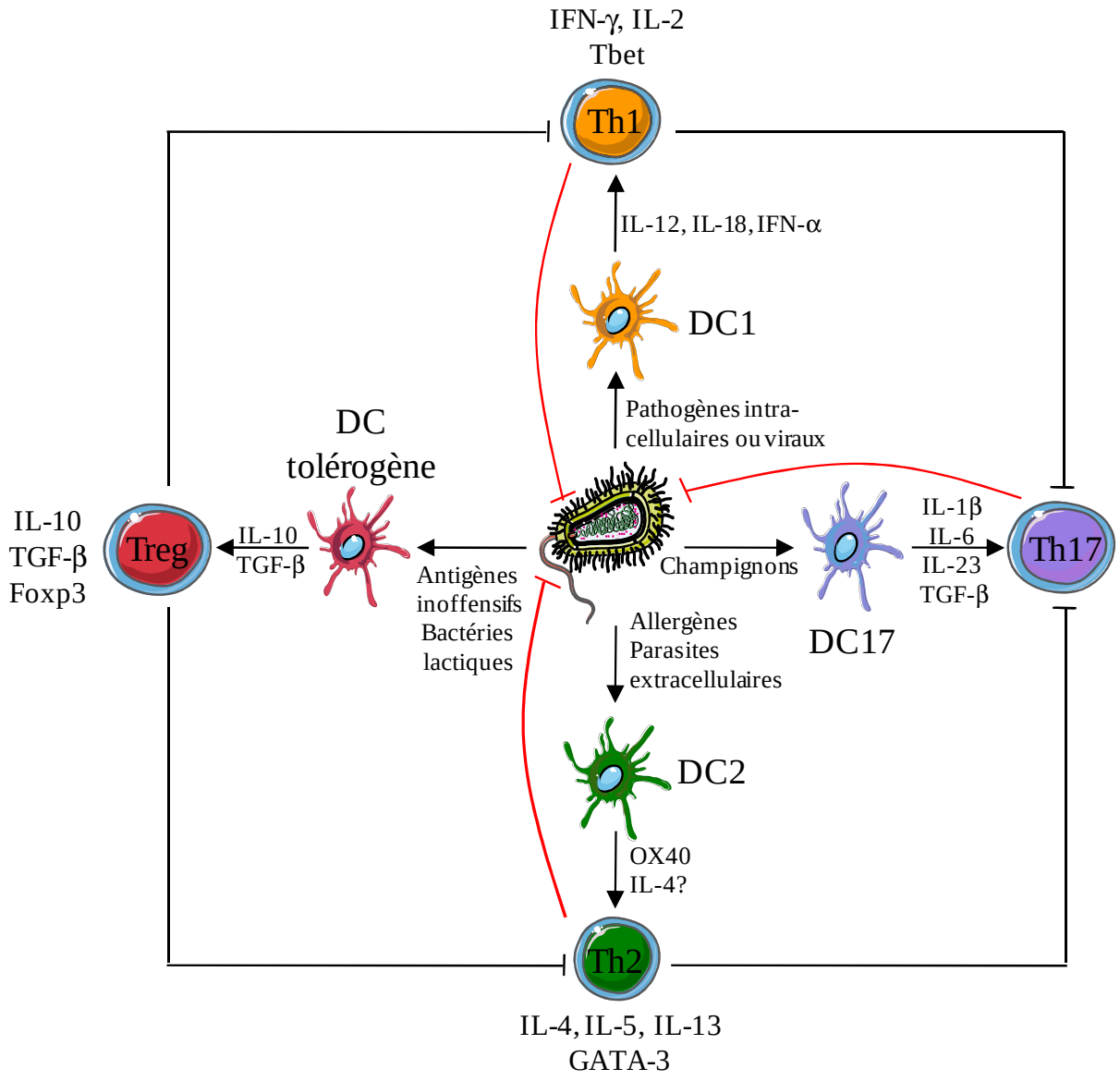


Figure 10 : Les DCs, principaux acteurs de la polarisation de la réponse immunitaire.
En fonction des pathogènes rencontrés par la DC, celle-ci fournit des signaux aux LTs afin d'induire une réponse immunitaire appropriée. Lors de la rencontre d'un antigène intracellulaire ou viral, les DC1 produisent des cytokines dont l'IL-12 induisant une polarisation Th1 caractérisée par la sécrétion d'IFN-γ et l'expression du facteur de transcription Tbet. Cette réponse aboutie à la destruction du pathogène. Lors de la rencontre avec un champignon, les DC17 sécrètent de IL-1β, IL-6, IL-23 et du TGF-β afin d'induire une réponse Th17 caractérisée par la sécrétion d'IL-17A nécessaire à l'élimination de l'infection. Les Th17 expriment le facteur de transcription RORC. Lors de l'interaction avec des parasites extracellulaires comme les helminthes, les DC2 induisent une réponse Th2 caractérisée par la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13 et par l'expression du facteur de transcription GATA-3. Enfin, lorsque l'antigène est inoffensif pour l'hôte, les DCs tolérogènes sécrètent de l'IL-10 et du TGF-β pour induire une réponse régulatrice médiée par les Tregs sécrétant de l'IL-10 et du TGF-β et exprimant le facteur de transcription Foxp3. Dans ce cas, les réponses Th1, Th2 et Th17 sont inhibées.

3.3. Cellules dendritiques tolérogènes / régulatrices

Différents types de DCs peuvent être considérées comme tolérogènes comme les DCs plasmacytoïdes ou myéloïdes. Pour des raisons de synthèse, on se restreindra ici aux DCs myéloïdes.

3.3.1. Caractéristiques générales des cellules dendritiques tolérogènes

Une DC tolérogène est tout d'abord définie par sa fonction puisqu'elle induit une réponse de tolérance vis-à-vis de l'antigène qu'elle a rencontré. Les mécanismes d'induction de cette tolérance sont nombreux, il peut s'agir d'une induction de Tregs, d'une induction de LTs anergiques ou apoptotiques ou encore d'une induction de délétion clonale des LTs. Si elles sont activées par un stimulus pro-inflammatoire comme du LPS, les DCs tolérogènes ne répondent pas de façon classique et restent dans un état d'hypo-réponse : elles n'augmentent pas l'expression des molécules de costimulation comme CD80, CD83 ou CD86 et ne sécrètent pas ou peu de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 ou le TNF-α.

Une hypothèse consistait à dire que la fonction des DCs tolérogènes était influencée par l'état de maturation de la cellule. Les DCs immatures exprimant par nature des niveaux faibles de molécules de costimulation et ne produisant pas de cytokines pro-inflammatoires étaient décrites pour induire une tolérance du fait de la capture de cellules apoptotiques et de la présentation aux LTs dans les tissus lymphoïdes secondaires **[196]**. Par ailleurs, les DCs dans leur état immature semblaient être responsables de l'induction de LTs anergiques ou de Tregs **[197]**. Par contre, les DCs matures activées par des cytokines pro-inflammatoires ou des PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*) semblaient être des inducteurs très puissants de réponses innées et/ou adaptives. Cette simple classification a été remise en question par des expériences montrant que les DCs possèdent une plasticité biologique extrême en terme de phénotype mais aussi de fonction générale. L'hypothèse initiale semble donc peu à peu s'infirmer. En effet, certaines expériences montrent que les DCs matures sont capables d'induire l'expansion de Tregs présentant une activité suppressive **[198, 199]**. Ces DCs, ayant des taux élevés de molécules de costimulation et de CMH II et des taux faibles de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, le TNF-α ou l'IL-12p70 ont été appelées « semi-matures » **[200]**.

Par ailleurs, lorsque les DCs sont exposées à certains facteurs immunosuppressifs dans leur environnement, elles deviennent résistantes à la maturation et acquièrent des caractéristiques essentielles à l'induction de tolérance comme une production accrue de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF-β ou l'expression de molécules inhibitrices/tolérogènes comme les ILT3 ou ILT4 (*Immunoglobulin-like transcripts*), PD-L1 ou HLA-G. C'est la nature du

microenvironnement immunosuppressif spécifique qui influence le développement des DCs et qui donne naissance à une large diversité de phénotypes ou de fonctions de DCs tolérogènes. Le paragraphe suivant décrit un certain nombre de stimuli permettant de générer des DCs tolérogènes.

3.3.2. Induction de cellules dendritiques tolérogènes in vitro

3.3.2.1. IL-10

En 1997, l'équipe de Steinbrink a démontré pour la première fois que les DCs immatures traitées avec de l'IL-10 diminuent l'expression des molécules de costimulation et du CMH II et induisent des LTs anergiques **[201]**. Par la suite, de nombreuses études ont décrit plus en détail le phénotype des IL-10 DCs et des LTs générés après cocultures. Ces DCs sont $CD14^+$ $CD16^+$ $CD11c^+$ $CD11b^+$ $CD1a^-$ $CD1c^-$ et sécrètent de faibles quantités d'IL-12 **[202, 203]**. Ces DCs sont des inducteurs de Tr1 *via* un mécanisme dépendant de l'IL-10 autocrine et de la présence de molécules tolérogènes à leur surface comme ILT3, ILT4 et ICOS-L (*Inducible Co-Stimulatory molecule ligand*) **[204]**. En particulier, l'interaction entre ILT4 et HLA-G semble jouer un rôle primordial dans l'induction de Tr1 **[203]**.

C'est la signalisation *via* l'IL-10R qui permet le maintien de la DC dans son état tolérogène (cf. Fig. 11) **[205]**. En effet, la ligation de l'IL-10R induit la phosphorylation de STAT3 qui est transloqué dans le noyau où il réprime les gènes associés à la maturation et à l'immunogénicité des DCs **[206]**. D'autres gènes sont spécifiquement induits par l'IL-10 comme SOCS3 (*Suppressor of signaling 3*) et SLAM (*Signaling lymphocytic activation molecule*). SOCS3 régule négativement la production de cytokines inflammatoires en particulier l'IL-6. SLAM active SHP1 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*) qui inactive les molécules de costimulation par déphosphorylation de leur queue cytoplasmique **[207]**.

In vivo, les IL-10 DCs ont montré leur efficacité dans la protection du développement de l'asthme induit par l'OVA dans des modèles prophylactiques **[208]** et leur capacité à reverser un phénotype asthmatique chez des souris sensibilisées à l'OVA ou HDM (*House dust mite*) **[209]**. En effet, les souris traitées avec les IL-10 DCs présentent une AhR diminuée en réponse à la méthacholine, une diminution des éosinophiles, des réponses Th2 ainsi que des concentrations d'IgE et d'IgG1 spécifiques de l'allergène. La tolérance médiée par les IL-10 DCs semble être spécifique de l'allergène et semble impliquer la génération de Tr1 sécrétant de l'IL-10 **[209, 210]**.

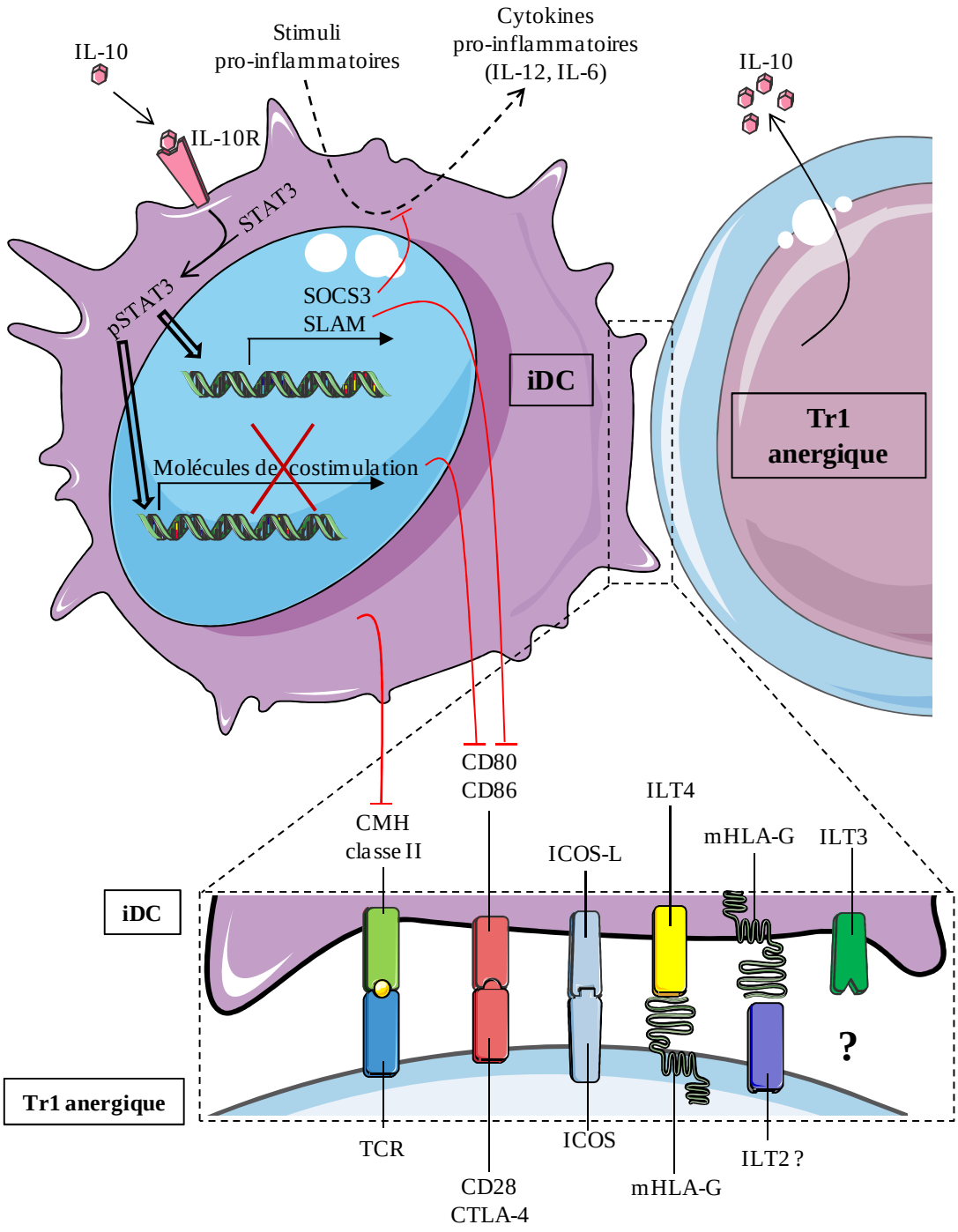


Figure 11 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des IL-10 DCs.
L'IL-10 est reconnu par son récepteur exprimé à la surface de la DC immature. La ligation de l'IL-10R induit la phosphorylation de STAT3, facteur de transcription qui migre dans le noyau pour réguler l'expression génique. L'expression des molécules de costimulation ou du CMH II est inhibée alors que la transcription de SOCS3 et SLAM est induite. SLAM inhibe les CD80 et CD86 alors que SOCS inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires induite par des stimuli pro-inflammatoires comme les ligands de TLR. Différents récepteurs membranaires sont induits comme ICOS-L, ILT3 et ILT4 ou encore HLA-G membranaire. Ces récepteurs permettent l'interaction avec les LTs naïfs leur fournissant des signaux tolérogènes nécessaires à leur conversion en Tregs. ICOS-L réagit avec ICOS, ILT4 avec HLA-G membranaire sur la LT. mHLA-G est supposé interagir avec ILT2 sur la LT alors que le récepteur spécifique d'ILT3 n'est pas connu. L'ensemble de ces signaux permet la génération de LTs de type Tr1 qui sécrètent de l'IL-10 et qui présentent un phénotype anergique (hyporépondeur).

3.3.2.1. TGF-β

Le TGF-β est une cytokine produite par les Tregs et d'autres cellules dans les tissus et à des effets profonds sur les DCs *in vitro* **[205]**. Par ailleurs, le TGF-β s'est révélé essentiel pour diminuer les symptômes de l'EAE (encéphalite auto-immune expérimentale) dans des souris surexprimant de façon spécifique de TGF-βR sur les DCs **[211]**. La ligation du TGF-βR entraîne une hétérodimérisation de Smad2 et Smad4 qui régulent l'expression génique dans le noyau. Les cascades en amont du TGF-β semblent être similaires à celles observées après traitement des DCs par l'IL-10 et incluent l'inhibition de la maturation des DCs par blocage de la signalisation NF-κB. Par ailleurs, contrairement à l'IL-10, le TGF-β induit l'expression d'un nombre plus important de gènes dans les DCs comme le TGF-β lui-même ou le TGF-βR, CXCL14, IL-18, PPARγ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*) ou PAI1 (*Plasminogen activator inhibitor 1*) **[212, 213]**. Le rôle spécifique de ces facteurs dans les DCs tolérogènes reste à être analysé.

3.3.2.2. Vitamine D3

La forme activée de la vitamine D3 ou $1,25(OH)_2D3$ est une hormone sécostéroïde qui a, non seulement une fonction centrale dans le métabolisme des os et du calcium, mais également des propriétés immunorégulatrices importantes **[214]**. Les effets biologiques de $1,25(OH)_2D3$ sont médiés par le VDR (récepteur à la Vitamine D), un membre de la superfamille des récepteurs aux hormones nucléaires **[215]**. Il fonctionne comme un facteur de transcription se liant à des séquences spécifiques d'ADN appelé VDRE (élément de réponse à la vitamine D) et qui influencent la transcription, médiée par l'ARN polymérase II, des gènes répondant à la VitD3 (Vitamine D3 ou son métabolite 1,25 dihydroxyvitamine D3) **[216]**.

Les CPAs et en particulier les DCs expriment le VDR et sont des cibles importantes des agonistes VDR à la fois *in vitro* et *in vivo*. Un certain nombre d'études ont pu montrer l'effet de $1,25(OH)_2D3$ et de ces analogues sur la modulation de la fonction et du phénotype des DCs **[217-219]**. Ces études ont montré que le traitement *in vitro* des DCs avec des agonistes VDR prévient la maturation des DCs en inhibant l'activité de NF-κB grâce à une liaison au promoteur en amont de relB **[220]**. La translocation de NF-κB est également inhibée par augmentation de la stabilité de IκB **[221]** ou par inhibition de la phosphorylation de p65 **[218]**. Les DCs ainsi traitées sont $CD14^+$ et expriment faiblement le CD1a, diminuent leur sécrétion d'IL-12 et augmentent leur production d'IL-10 aboutissant à une activation réduite des LTs (cf. Fig. 12). Les VitD3-DCs secrètent également de faible quantités d'IL-23 et expriment faiblement le miR-155 en réponse à l'exposition à un stimulus inflammatoire **[222]**. Par contre, ces DCs augmentent l'expression de PD-L1, ILT3

[223], CCL22 (chimiokine attirant les Tregs) **[224]** ainsi que de miR-378 **[222]**. Ces caractéristiques correspondent à des propriétés tolérogènes. Cependant, des données récentes de transcriptomique indiquent que la $1,25(OH)_2D3$ exogène ou endogène peut réguler un certain nombre de gènes tolérogènes de manière autonome plutôt que *via* l'inhibition de la différenciation et de la maturation. Ces expériences suggèrent que le programme tolérogénique induit dans les DCs est largement indépendant des effets inhibiteurs sur la maturation et la différenciation des DCs **[224]**.

Les DCs sont capables de synthétiser la $1,25(OH)_2D3$ *via* l'expression accrue de la 1α-hydroxylase leur conférant un pouvoir tolérogène intrinsèque **[225]**. Ce concept a été illustré récemment dans la peau par la capacité des DCs à hydroxyler, sous l'effet du soleil, la vitamine D3 en sa forme active. La $1,25(OH)_2D3$ induite agit alors sur les LTs activés en induisant l'expression du CCR10 (dont le gène est sous le contrôle d'un VDRE) leur permettant ainsi de migrer vers l'épithélium grâce à la sécrétion d'une chimiokine spécifique CCL27 **[226]**. Ainsi, la production autocrine de $1,25(OH)_2D3$ par les DCs peut induire une migration des LTs vers la peau aboutissant à la génération de Tregs capables de lutter contre les effets pro-inflammatoires induits dans la peau par l'exposition au soleil **[226]**.

L'activité immunomodulatrice des agonistes VDR est médiée non seulement par l'effet direct sur les DCs mais également *via* la capacité de ces DCs à induire des Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ capables de contrôler les réponses auto-immunes et les rejets de greffes. En effet, les capacités allo-stimulatrices des DCs sont profondément altérées par le traitement avec $1,25(OH)_2D3$. Après coculture entre DCs traitées et LTs naïfs, une inhibition de la prolifération et de la production de cytokines a pu être observée dans les LTs indépendamment de l'engagement d'ILT3 **[227]**.

In vivo, le traitement avec une combinaison de $1,25(OH)_2D3$ et le micophénolate mofetil induit des DCs tolérogènes capables d'augmenter la proportion de Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ présents dans les nœuds lymphatiques régionaux. Ces Tregs protègent du rejet de greffe chez les animaux traités et peuvent transférer la tolérance chez des animaux non traités **[228]**. Par ailleurs, une restauration du compartiment Tregs a pu être observée chez des souris atteintes d'un diabète auto-immun après un traitement avec la $1,25(OH)_2D3$ **[229]**.

Par ailleurs, des études chez la souris ont permis de montrer que la co-administration de $1,25(OH)_2D3$ avec un allergène permet d'augmenter l'efficacité de l'ITSC grâce à des mécanismes impliquant l'IL-10 et le TGF-β **[230]**. La coadministration avec la DEX (Dexaméthasone) a également permis de démontrer une induction de tolérance dans un modèle d'ITSL **[231]**.

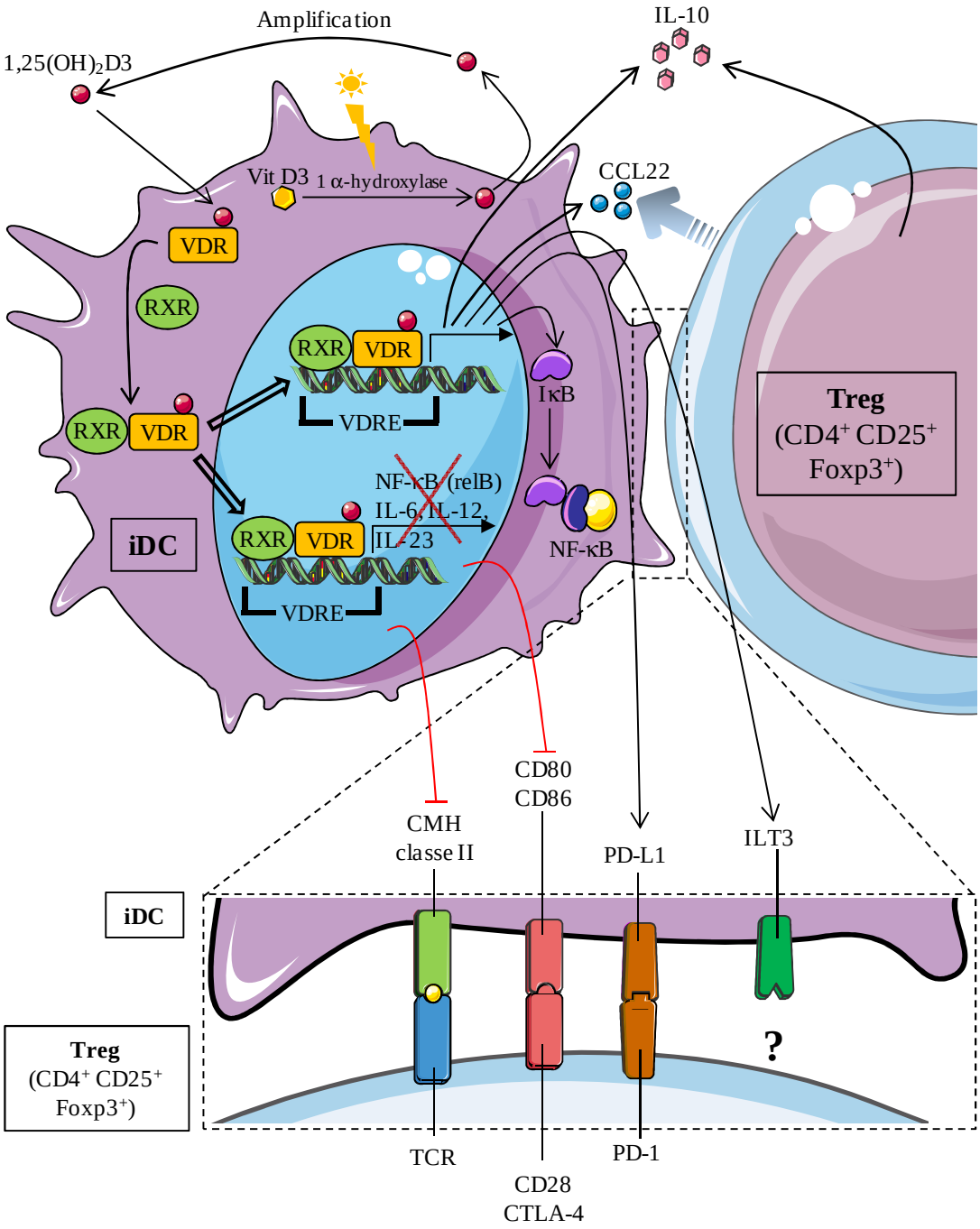


Figure 12 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des 1,25(OH)$_2$D3 DCs.
Lors du traitement pharmacologique, la 1,25(OH)$_2$D3 interagit avec le VDR qui forme un hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR (*retinoid X receptor*). Le complexe se fixe alors sur les éléments VDRE, placés dans les promoteurs en amont de plus de 200 gènes. Cette interaction inhibe par exemple la transcription des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-12 ou l'IL-23 et de RelB, un des composants de NF-κB. Les molécules de costimulation et le CMH II sont également inhibés. Par ailleurs, la transcription de différents gènes anti-inflammatoires est induite comme IκB, ILT3, PD-L1, l'IL-10 ou CCL22. La plus grande quantité d'IκB augmente la séquestration de NF-κB dans le cytoplasme alors qu'ILT3 et PD-L1 permettent l'interaction avec les Tregs CD4$^+$ CD25$^+$ Foxp3$^+$. La chimiokine CCL22 est également sécrétée permettant ainsi l'attraction des Tregs. Ces mécanismes de tolérance peuvent également être induits physiologiquement sous l'influence du soleil. En effet, l'activation de la 1α-hydroxylase permet la conversion de la VitD3 en son métabolite qui peut alors amplifier la réaction tolérogène.

3.3.2.3. Immunosuppresseurs

a. Dexamethasone

De nombreux immunosuppresseurs induisent des DCs tolérogènes en prévenant l'activation de NF-κB. L'exemple le plus connu est la DEX, un GC qui inhibe l'activité de NF-κB par augmentation de la transcription et de la synthèse de IκB **[72, 232]** (protéine qui se lie à NF-κB dans le cytoplasme prévenant la translocation dans le noyau) ou par association directe avec la sous unité p65 de NF-κB **[233]**.

La DEX altère la différenciation des DCs humaines en maintenant l'expression du CD14 et en diminuant celle du CD1a. De plus, l'expression d'autres marqueurs est augmentée comme le CD16, le CD32, le CD36, le CD54, le CD68, le CD11/18, le récepteur au mannose ou encore PD-L1 alors que l'expression du CD123 est diminuée **[234-238]**. La DEX augmente également la capacité des DCs à capter l'antigène par endocytose **[235]**. De même, elle affecte leur morphologie en induisant des granules cytoplasmiques plus denses ainsi que des extensions cytoplasmiques **[234]**. Certaines études révèlent que la DEX n'influe pas sur l'apoptose **[239, 240]**, toutefois, les travaux de *Kim et al.* démontrent une induction d'apoptose des DCs de manière dose-dépendante mais indépendamment des caspases **[241]**. En plus de l'effet répresseur sur la maturation des DCs, la DEX induit un certain nombre de gènes anti-inflammatoires ou de chimioattractants comme l'IL-10, GILZ, GITR-L, IDO, CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCR2, CCL9 ou CCL12 qui empêchent les DCs de migrer vers les nœuds lymphatiques et leur permet d'induire la différenciation de Tregs **[242, 243]**.

Les DEX-DCs sont résistantes à la maturation induite par des agonistes TLR4 comme le LPS ou CD40L **[244]**. Dans les DEX-DCs stimulées, l'expression des molécules de costimulation CD80, CD83 et CD86 et des molécules de présentation CMH I et II sont diminuées aboutissant à une faible capacité allo-stimulatrice. Après activation, les DEX-DCs inhibent la sécrétion d'IL-12, de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-2 sans affecter celle de l'IL-10 **[245-247]**. Seuls, Rea *et al.* ont détecté une augmentation de la production d'IL-10 **[248]**. La DEX induit également l'expression de GILZ, un régulateur transcriptionnel qui interfère avec NF-κB et les voies de signalisation MAPK/AP-1 prévenant ainsi la maturation des DCs tout en induisant l'augmentation de la production d'IL-10 et l'expression de la molécule inhibitrice PD-L1 **[249]**. Par ailleurs, la DEX bloque la capacité des DCs à migrer vers les ganglions lymphatiques *via* l'inhibition du CCR7 **[247]** (cf. Fig. 13).

Ainsi, la DEX induit des DCs ayant une faible capacité à activer des LTs par voie directe et indirecte **[234, 236-240, 246]**. Enfin, la DEX est capable d'induire des LTs mémoires hypo-

répondeurs suite à plusieurs restimulations par des DCs matures. Cette hypo-réponse n'est pas levée après l'addition d'IL-2 **[250]** (cf. Fig. 13).

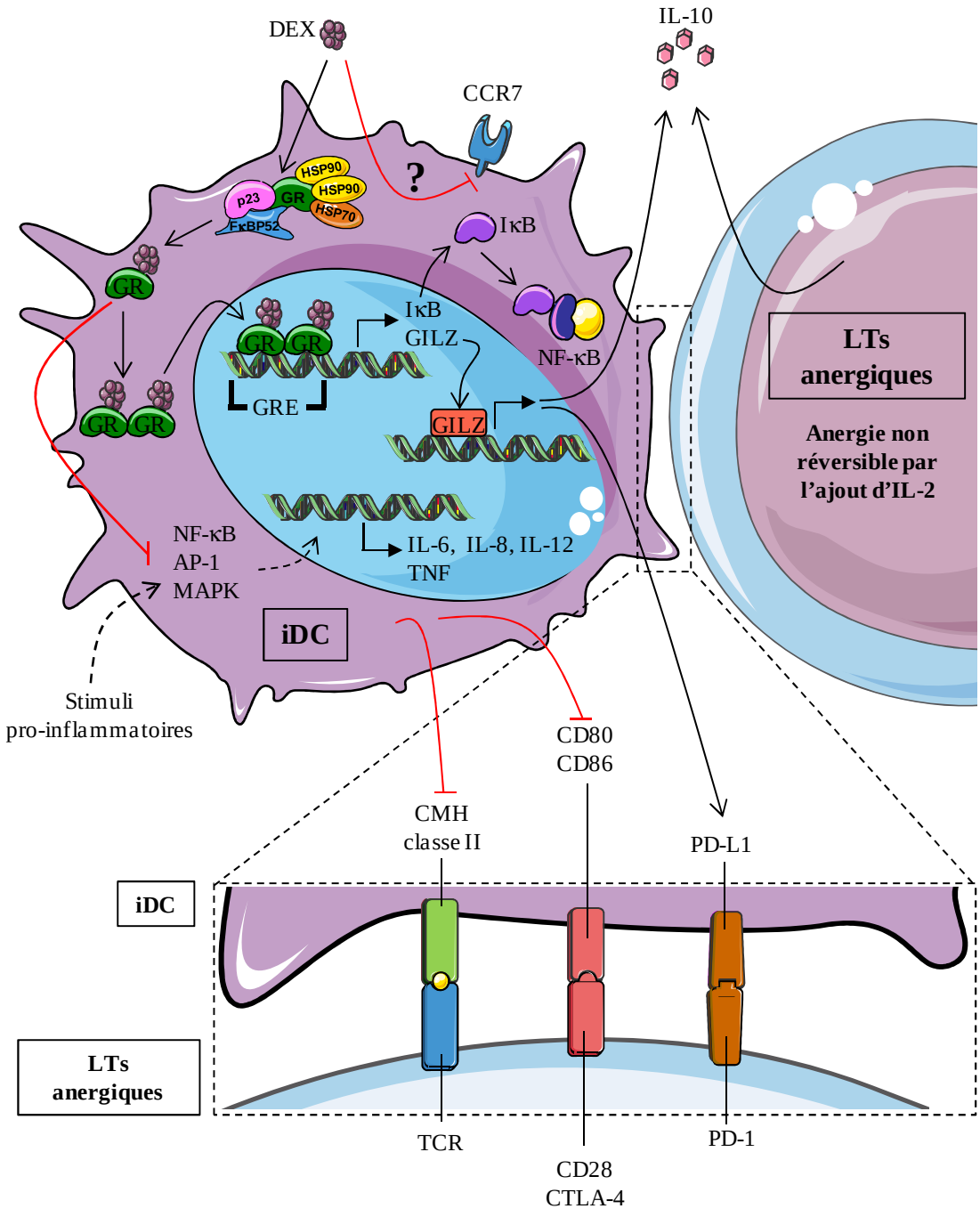


Figure 13 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des DEX-DCs.
La DEX se fixe sur le complexe du GR induisant la libération de ce dernier qui va former un homodimère capable de migrer dans le noyau et d'interagir avec les GRE placés en amont de gènes anti-inflammatoires comme GILZ ou IκB. GILZ va agir comme régulateur transcriptionnel et induire la sécrétion d'IL-10 et la production du récepteur inhibiteur PD-L1. L'augmentation de la synthèse d'IκB va promouvoir la séquestration de NF-κB dans le noyau, ce qui va inhiber les réponses inflammatoires médiées par la voie NF-κB. Le GR peut également interagir avec différents régulateurs transcriptionnels inhibant les voies AP-1 et MAPK aboutissant ainsi à un arrêt de la production de cytokines pro-inflammatoires. La présentation antigénique *via* le CMH II et les molécules de costimulation sont inhibées alors que l'interaction PD-L1/PD-1 est augmentée aboutissant à la génération de LTs anergiques. Cette anergie n'est pas réversible par ajout d'IL-2.

b. L'acide mycophénolique

L'effet immunosuppresseur du MPA (acide mycophénolique) a été décrit pour la première fois sur des DCs murines par l'équipe de Mehling. Ces travaux ont montré, dans un modèle d'hypersensibilité cutanée, que le MPA inhibe l'expression de certains marqueurs de maturation et de costimulation comme le CD40, le CD80, le CD86 et le CD54, la sécrétion d'IL-12 et induit des DCs ayant une faible capacité à stimuler des LTs allogéniques **[251]**. Par ailleurs, le MPA augmente l'expression de PD-L2, un régulateur négatif de la prolifération lymphocytaire **[252]**. Chez l'homme, l'équipe de Colic a mis en évidence que la présence de MPA lors de la différenciation des moDCs induisait leur apoptose et diminuait l'expression de certaines molécules de costimulation et d'adhésion comme le CD40, le CD54, le CD80 et le CD86 **[253]**. Suite à une maturation induite par le LPS ou le TNF-α, le MPA réduit l'expression des marqueurs de costimulation et de maturation tel que le CD83, le CD80 et le CD86 **[253, 254]**. Par ailleurs, cette molécule maintient l'endocytose dépendante au récepteur au mannose **[254]**. Néanmoins, ces cellules expriment des récepteurs aux chimiokines caractéristiques des DCs matures comme CCR7 ou CXCR4. Ainsi, le MPA inhibe la maturation des DCs qui conservent leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Le MPA réduit également la synthèse d'IL-12 mais augmente la sécrétion d'IL-10 après une stimulation par le TNF-α. Par contre, il réduit la production d'IL-12, d'IL-10, d'IL-18 ou de TNF-α suite à une activation par le LPS. En conséquence, le MPA induit des DCs ayant une faible capacité allostimulatrice ce qui entraîne une faible prolifération des LTs allogéniques **[253, 254]**. Enfin, la stimulation répétée de LTs en présence de DCs qui ont été préalablement stimulées par du TNF-α en présence de MPA induit la différenciation d'une population de Tregs spécifiques de l'antigène, exprimant le facteur de transcription Foxp3 et sécrétant de grandes quantités de TGF-β et d'IL-10 **[255]**.

c. Cyclosporine A/FK506

Le tacrolimus (FK506) et la CsA (cyclosporine A), un inhibiteur de la calcineurine initialement décrit pour bloquer la prolifération des LTs **[256]**, affectent également la fonction des DCs, essentiellement chez la souris. Alors que la CsA inhibe les capacités de prise en charge, de présentation de l'antigène et de costimulation **[238, 257]**, les 2 agents entrainent une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-10, le TNF-α ou l'IFN-α **[258-260]**.

d. Rapamycine

La rapamycine est un immunosuppresseur très utilisé qui empêche l'activation et la prolifération des LTs par inhibition de la cascade de signalisation en aval des protéines mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin)*. Des études ont montré que la rapamycine inhibe la différenciation et la maturation des DCs tout en augmentant leur apoptose **[261-264]**. En effet, une augmentation de l'expression du CD1a, CD1b, CD1c et une baisse de l'expression du CMH I, CMH II, des CD80, CD86, CD40 et des marqueurs impliqués dans la capture antigénique (CD32, CD91, CD46, récepteur au mannose) sont observées dans des DCs humaines traitées par la rapamycine **[264]**. *In vivo*, cette molécule inhibe la phagocytose et l'endocytose et induit l'apoptose des DCs **[262-264]**. Ainsi, dans les DCs humaines, l'induction de l'apoptose serait due à une inhibition de la voie GM-CSF/PI3K/mTOR qui entraînerait une augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique p27KIP1 et une réduction de l'expression de la protéine anti-apoptotique mcl-1 **[263]**. Elle serait également partiellement dépendante des caspases et impliquerait une interaction avec FKBP-12 puisque son action est contrée par le FK506 **[261]**.

La rapamycine augmente l'expression de CCR7 et favorise la migration des DCs en réponse à CCL19 *in vitro*, et vers les ganglions lymphatiques *in vivo* **[265]**.Une inhibition de la synthèse d'IL-12 et d'IL-10 est ainsi observée après une stimulation par le CD40L en présence de rapamycine mais cette inhibition de la sécrétion d'IL-12 n'est pas retrouvée suite à une activation par le LPS **[266]**. Ainsi, les DCs traitées par la rapamycine sont incapables d'activer efficacement les LTs allogéniques *in vitro* et *in vivo* et après plusieurs re-stimulations par voie directe ou indirecte, les LTs deviennent hypo-répondeurs **[267]**. Cette hypo-réponse est spécifique de l'antigène et peut être levée par l'addition d'IL-2 exogène **[267]** (cf. Fig. 14). La rapamycine semble aussi inhiber l'orientation Th1 en diminuant la sécrétion d'IFN-γ par les LTs. Enfin, l'injection de DCs traitées par la rapamycine pulsées avec des allo-antigènes avant la greffe, prolonge la survie d'allogreffes cardiaques de souris **[268]**.

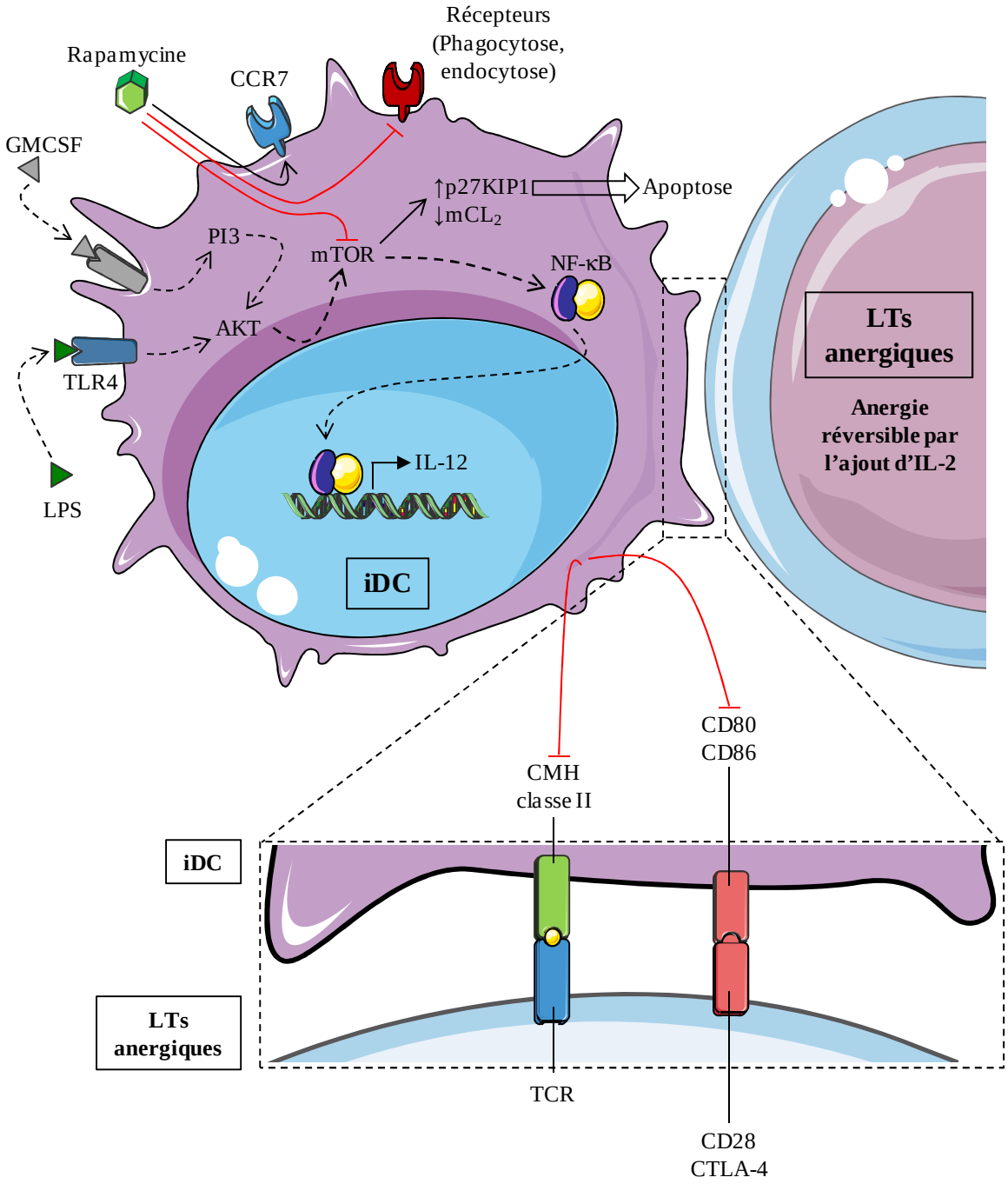


Figure 14 : Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des DCs traitées à la rapamycine.
La rapamycine agit sur la DC en inhibant mTOR, intermédiaire dans les voies de signalisation du TLR4 et du récepteur au GM-CSF. Cette inhibition aboutit à une augmentation de la synthèse de p27KIP1 et une diminution de mCL2 induisant l'apoptose de la DCs. L'inhibition de mTOR inactive également l'activité de la voie NF-κB aboutissant à un arrêt de la synthèse d'IL-12. La rapamycine inhibe également les récepteurs d'endocytose et de phagocytose. La présentation antigénique *via* le CMH II et les molécules de costimulation sont inhibées aboutissant à la génération de LTs anergiques. Cette anergie est réversible par ajout d'IL-2.

3.3.2.4. Ingénierie génétique

Différentes manipulations génétiques incluant l'invalidation génique (*knock-out*), l'insertion génique (*knock-in*) ou la surexpression de molécules impliquées dans la maturation des DCs ont été utilisées pour augmenter les capacités tolérogènes des DCs chez la souris **[205]**. Par exemple, les DCs déficientes en RelB induisent des Tregs qui suppriment l'hypersensibilité retardée et la myasthénie gravis expérimentale **[269]**. Une autre approche pour augmenter les propriétés tolérogènes des DCs consiste à éliminer l'expression des gènes cibles en aval de NF-κB. L'inhibition de l'IL-12, des CD80, CD86 et CD40 dans les DCs stimule la différenciation des Tregs et diminue les symptômes de l'arthrite induite par le collagène **[270]**. Une alternative à l'inhibition de molécules immunogéniques est de forcer l'expression de facteurs tolérogéniques. Par exemple, le traitement avec des DCs transfectées par l'IL-10 prévient le développement de l'asthme expérimental par stimulation des Tregs $Foxp3^+$ et de Tr1 qui transfèrent de façon efficace la tolérance à des animaux naïfs **[209]**. Par ailleurs, la transfection des DCs par Foxp3 permet également de générer des DCs tolérogènes capables de stimuler des Tregs $Foxp3^+$. Le mécanisme par lequel Foxp3 contrôle le potentiel tolérogénique des DCs est encore largement inconnu mais fait probablement intervenir les voies de signalisation connues dans les Tregs **[271]**.

3.3.2.5. Aspirine et acide niflumique

Les DCs traitées avec de l'aspirine inhibent la voie de signalisation NF-κB, modifient la production de cytokines, réduisent les molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86 et augmentent l'expression d'ILT3 **[272]**. Après traitement par l'aspirine, les DCs présentent des capacités allo-stimulatrices réduites qui induisent de l'anergie et des Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$.

L'acide niflumique induit une augmentation de l'expression d'ILT3 et d'ILT4 de manière dose dépendante **[273]**. Cet anti-inflammatoire non stéroïdien est actuellement utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde. Il agit en inhibant certaines isoformes de cyclo-oxygénase. Le phénotype tolérogène des DCs traitées à l'acide niflumique ($CD80^{low}$ $CD86^{med}$ $ILT4^+$ $ILT3^{high}$) pourrait expliquer l'effet bénéfique au niveau de l'inflammation des articulations **[274]**.

3.3.2.6. Blocage de NF-κB (Rosiglitazone)

L'inhibition de la voie NF-κB par la rosiglitazone s'est révélée efficace pour maintenir les DCs dans un état tolérogène. La rosiglitazone est un agoniste de PPARγ qui bloque l'activité de NF-κB et réduit la capacité des DCs à maturer en réponse au LPS ou à activer les LTs spécifiques de l'antigène. Les DCs traitées préviennent les réponses auto-immunes dans des modèles murins d'EAE **[275, 276]**.

3.3.2.7. Modulation *via* les récepteurs aux Fcγ

Les récepteurs Fcγ activateurs ou inhibiteurs ont un rôle fondamental dans la régulation des réponses immunes effectrices **[277]**. Chez la souris, quatre différents FcγR ont été décrits, les CD16, CD32, CD64 et CD16-2 (FcγRIII, FcγRIIB, FcγRI ou FcγRIV respectivement). Les CD16 et CD32 ont un domaine extracellulaire avec une importante identité de séquence (95%) et présentent une faible affinité pour les fragments Fc des IgG et ne peuvent donc se lier qu'à des IgG agrégés sous la forme de complexes immuns antigènes-anticorps. Le FcγRIII activateur contient un domaine ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) dans sa partie cytoplasmique qui recrute des kinases après phosphorylation des tyrosines. Au contraire, la queue intracellulaire du récepteur FcγRIIb inhibiteur contient un domaine ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) qui peut contrer la signalisation induite par le FcγRIII en recrutant des phosphatases **[277]**. Le ratio FcγRIII/FcγRIIb à la surface des DCs peut donc définir la nature de la réponse envers les complexes immuns **[278, 279]**. La stimulation des DCs *via* le FcγRIII augmente leur maturation et leur capacité à induire une réponse T spécifique de l'antigène alors que le blocage du FcγRIIb augmente leur réponse vis-à-vis des complexes immuns **[278, 280]**. Le rôle tolérogène du FcγRIIB sur les DCs a été démontré chez l'homme et la souris. En effet, chez l'homme, les DCs obtenues de patients souffrant de lupus ont montré une expression réduite du FcγRIIB alors que le FcγRIII était augmenté **[281]**. Chez les souris déficientes en FcγRIIb, les DCs ont un phénotype mature et une capacité accrue à activer les LTs. Au contraire, les DCs de souris déficientes en FcγRIII ont montré un phénotype tolérogène et une capacité réduite à activer les LTs. De même, les souris déficientes en FcγRIIB développent des signes cliniques et pathologiques d'EAE plus forte que les souris sauvages du fait du nombre important de LTs activés spécifiques de la myéline. Au contraire, les souris déficientes en FcγRIII semblent protégées de l'EAE et ne montrent pas d'expansion significative de LTs spécifiques de la myéline **[280]**. Toutes ces données suggèrent que la modulation de la signalisation FcγR peut être une approche efficace pour augmenter ou diminuer les réponses LTs. Par ailleurs, la détermination du ratio FcγRIII/FcγRIIb sur les DCs peut être considérée comme un indicateur du statut d'activation des DCs et un marqueur de la susceptibilité à développer des pathologies auto-immunes ou allergiques **[282]**.

3.3.2.8. Cellules dendritiques tolérogènes induites par les Tregs

Il existe des LTs suppresseurs capables d'induire des DCs tolérogènes présentant une faible expression des molécules de costimulation et étant capable d'inhiber la prolifération de LTs $CD4^+$ **[283]**. Les DCs tolérogènes induisent alors la génération de Tregs spécifiques de l'allo-antigène

avec un phénotype $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ et de nouveaux LTs suppresseurs. Ce phénomène initié par les LTs suppresseurs, permettant de générer des T suppresseurs et des Tregs *via* les CPAs tolérogènes a été appelé « cascade des LTs suppresseurs » **[284, 285]**. En effet, des LTs suppresseurs ont été retrouvés dans la circulation sanguine de patients dans les premiers mois de leur transplantation alors de les Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ n'ont pu être détectés que plus tard indiquant un mécanisme physiologiquement pertinent **[285]**. Cette tolérisation des DCs semble influencé par l'expression des membres de la famille ILT. En effet, lors du contact entre LTs suppresseurs et DCs, les DCs diminuent l'expression des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86 et augmentent celles des protéines ILT comme ILT2, ILT3 et ILT4 **[283, 286]**. De la même façon, la transfection d'ILT dans des cellules myélo-monocytiques semble les rendre tolérogènes **[283]**. Par ailleurs, dans un modèle souris, des DCs exprimant les PIRs (*Paired immunoglobulin-like receptors*, homologues des ILTs) semblent augmenter l'acceptance du greffon **[287]** alors que l'interaction entre PIR-B et HLA-G semble supprimer la présentation antigénique par les DCs **[288]**.

3.3.3. Cellules dendritiques tolérogènes *in vivo*

3.3.3.1. Cellules dendritiques tolérogènes dans les tumeurs

Les cellules cancéreuses et les cellules stromales associées aux tumeurs peuvent conférer des propriétés tolérogènes aux DCs aboutissant à la différenciation et à l'accumulation des Tregs dans la masse tumorale et les nœuds lymphatiques drainants **[289, 290]**. De façon intéressante, la présence de DCs est cruciale pour la vascularisation de certaines tumeurs et la déplétion des DCs peut augmenter l'élimination des cellules malignes dans des modèles animaux **[291, 292]**. Les mécanismes utilisés par les tumeurs pour rendre les DCs tolérogènes impliquent la production d'IL-10, de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), de prostaglandine E2 et de TGF-β **[293]**. Un marqueur des DCs tolérogènes tumorales a récemment été décrit dans le cancer de la prostate : Foxo3 (*Forkhead box O3*) **[294]**.

3.3.3.2. Cellules dendritiques tolérogènes dans les muqueuses

Des DCs tolérogènes résidentes ont pu être détectées dans la peau ou encore dans certaines muqueuses (intestin, décidue) **[170]**.

Dans la peau, les LCs sont connues pour induire des réactions de tolérance en fonction de la nature de l'antigène mais c'est les DCs dermales qui possèdent le phénotype tolérogène le plus marqué puisqu'elle ont été décrites comme exprimant des niveaux faibles de cytokines et de molécules de costimulation **[170, 295]**.

Dans les muqueuses, en fonction du microenvironnement du tissu, différents types de DCs peuvent être détectées et en particulier des DCs tolérogènes. Différentes études précliniques chez la souris montrent que la lamina propria de l'intestin grêle contient des DCs de phénotype $CD103^+$ qui ont des fonctions tolérogènes **[296]**. Chez l'homme, des DCs ont pu être isolées des nœuds mésentériques lymphoïdes et ont montré leur capacité à induire des Tregs $Foxp3^+$ en présence de facteurs immunomodulateurs comme le TGF-β, l'IL-10, l'acide rétinoïque ou le TSLP **[297]**. Ces signaux tolérogènes semblent être produits par les cellules épithéliales comme le démontrent des cocultures entre DCs et cellules épithéliales intestinales où une induction de tolérance a pu être détectée **[297, 298]**. Par ailleurs, l'expression de beta-caténine dans les DCs intestinales s'est révélée essentielle pour induire des médiateurs anti-inflammatoires tels que la RALDH (*Retinaldéhyde dehydrogenase*), l'IL-10 et le TGF-β et pour induire des Tregs capables d'inhiber les LTs inflammatoires **[299]**.

Dans la décidue, les DCs sont impliquées dans le succès de l'implantation et de l'acceptation du fœtus **[170]**. C'est l'environnement pro-tolérogène de la muqueuse enrichi en prostaglandine E2, en hormones comme la progestérone et en cytokines comme IL-10, le GM-CSF et le TGF-β qui permettent la formation de ces DCs tolérogènes. En particulier, ces dernières expriment HLA-G, connu pour sa fonction dans la régulation des réponses allo-immunes à l'interface entre le fœtus et la mère, en particulier dans la protection des cellules cibles de la cytotoxicité des LTs ou des NKs et l'inhibition de la prolifération des LTs allogéniques **[300]**.

Finalement, *in vivo*, toutes ces observations suggèrent que c'est l'environnement direct des DCs (tissu) qui les conditionne et leur permet, soit d'induire de la tolérance, soit d'induire une réponse immune.

3.3.3.1. Cellules dendritiques tolérogènes dans le sang

Une nouvelle sous-population de DCs tolérogènes circulantes a été identifiée dans le sang. Ces DCs appelées DC-10 expriment le CD11c, CD14, CD16, HLA-G et ILT4 mais pas de CD1a et représentent environ 0,2% des PBMCs humains. Ces DCs matures expriment les CD83, CD86 et HLA-DR et produisent spontanément de l'IL-10 tout en sécrétant peu d'IL-12 même après activation. Ces DC10 représentent un sous-type stable de DCs tolérogènes circulantes **[203]**.

3.3.4. Mécanismes d'induction de tolérance par les celules dendritiques tolérogènes

Les DCs tolérogènes peuvent induire des Tregs par différentes voies. Ceci peut impliquer la présentation de niveaux modérés d'antigènes en l'absence de costimulation et de cytokines ou la production de molécules anti-inflammatoires qui peuvent être sécrétées ou membranaires. Ces

signaux peuvent agir directement sur les LTs et/ou modifier les conditions environnementales comme le statut métabolique du tissu pour réguler de manière fine la différenciation des LTs.

3.3.4.1. Absence des trois signaux

Différentes études montrent que la présentation de faible niveau d'antigène (signal 1) en l'absence de costimulation (signal 2) et de stimuli cytokiniques (signal 3) induit la différenciation des Tregs *in vitro* et *in vivo* **[205]**. Pour induire une réponse immune, les signaux TCR en collaboration avec les molécules de costimulation induisent une cascade de signalisation induisant un flux de calcium intracellulaire et l'activation de facteurs de transcription comme NFAT (*Nuclear factor of activated T cells),* AP-1 ou NF-κB qui induisent l'expression de gènes dans les LTs effecteurs **[205]**. Alors que les LTs activés présentant une fonction effectrice expriment l'IL-2, IL-4, IL-7, Tbet, Edg3 et CD69, les Tregs présentent une signature transcriptionnelle différente caractérisée par NFAT, Foxp3 ou Runx1 *(Runt-related transcription factor 1)* **[301]**. En effet, le transcriptome des Tregs est enrichi en produits géniques impliqués dans les fonctions suppressives comme l'IL-10, le CD103, Klrg1 (*Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*), la neuropiline 1 (Nrp1), GITR, ICOS et CTLA-4. Toutefois, les mécanismes qui orientent la cascade de signalisation du TCR à induire la sélection des facteurs de transcription tolérogènes sont inconnus **[205]**. Par ailleurs, certaines DCs matures ou semi-matures expriment de fortes concentrations de molécules de costimulation pouvant également supprimer les réponses LTs **[200]**. L'intensité de la présentation antigénique et de la costimulation ou de l'activité cytokinique ne peut donc pas expliquer totalement la fonctionnalité des DCs tolérogènes.

3.3.4.2. Sécrétion de facteurs tolérogènes

La sécrétion d'IL-10 par les DCs tolérogènes est nécessaire pour induire de la tolérance dans de nombreux modèles de différenciation de Tregs. Cette cytokine induit un rétrocontrôle positif sur les LTs mais aussi sur les cellules structurales des tissus qui peuvent à leur tour sécréter de l'IL-10. Finalement, plusieurs types cellulaires sont stimulés par l'IL-10 aboutissant à l'établissement d'un environnement tolérogène **[201, 208, 302, 303]**.

Le TGF-β est une cytokine importante dans l'induction de tolérance. En effet, la présentation antigénique par les DCs en présence de TGF-β induit la différenciation de Tregs $Foxp3^+$ qui présentent une signature transcriptionnelle similaire mais toutefois différente de celle des nTregs **[301, 304]**. Une étude récente a d'ailleurs identifié l'activation de Foxo3a et Foxo1 par le TGF-β comme des étapes essentielles à l'induction de Foxp3 dans les Tregs **[305]**.

Certaines DCs peuvent synthétiser de l'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A généré par les enzymes RALDH. La plupart des DCs intestinales expriment au moins une des trois

isoformes de l'enzyme alors que la majorité des DCs des tissus lymphoïdes n'expriment pas ou peu de RALDH **[306, 307]**. Lorsque les LTs ou les LBs sont activés en présence d'acide rétinoïque dérivé des DCs, ces lymphocytes expriment des récepteurs de « homing » et se différencient en Tregs Foxp3^{+}. L'acide rétinoïque se lie à RARα (récepteur nucléaire α de l'acide rétinoïque) et régule l'expression de Foxp3 et de Smad 4 sur les LTs, mais l'implication de RARα dans la différenciation des Tregs *in vivo* n'est pas clair **[308]**. Par ailleurs, l'acide rétinoïque est particulièrement important dans les environnements mucosaux comme la muqueuse buccale ou la peau **[150, 164]**. En effet, des études récentes ont montré que les DCs de la peau expriment RALDH et produisent de l'acide rétinoïque nécessaire à la différenciation des Tregs du derme **[164]**. Malgré tout, d'autres études doivent être réalisées afin de comprendre le rôle des DCs sécrétant de l'acide rétinoïque *in vivo*.

3.3.4.3. Molécules de surface

Les DCs tolérogènes expriment des récepteurs membranaires qui peuvent instruire les Tregs pendant leur activation.

a. Interaction CD80/CD86 – CTLA-4

L'expression faible des molécules de costimulation (CD80 et CD86) dans les DCs tolérogènes a un rôle dans l'induction de tolérance puisque ces molécules se lient à CTLA-4 sur les LTs. CTLA-4 est un membre de la famille CD28 exprimé par les LT activés et dont l'engagement induit des fonctions inhibitrices **[309]**. En effet, la partie intra-cytoplasmique de CTLA-4 permet de lier deux protéases SHP2 (*Src homology 2 domain–containing protein tyrosine phosphatase*) et PP2A (*Protein phosphatase 2A*). Ces enzymes pourraient ainsi réguler l'activation des kinases cytosoliques induite lors de l'activation du complexe TCR/CD3. De plus, cette voie semble inhiber la formation des radeaux lipidiques et induire la production de TGF-β **[309]**. Ainsi, CTLA-4 joue un rôle majeur dans l'induction de l'anergie et participe au maintien de la tolérance périphérique.

b. Immunoglobulin like transcript

La famille de protéines ILT comprend des récepteurs de surface exprimés par les CPAs et capables de moduler les fonctions des cellules notamment en leur donnant un phénotype tolérogène. Les ILT aussi connus sous le nom de récepteurs « leucocytes Ig-Like » (LIR/LILR), sont des récepteurs inhibiteurs des monocytes ou macrophages et sont exprimés préférentiellement sur les DCs et les monocytes/macrophages **[310]**. Il existe différentes isoformes pouvant avoir des activités activatrices ou inhibitrices en fonction de différences dans les domaines transmembranaires et cytoplasmiques. Les récepteurs inhibiteurs (ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT8) possèdent une longue

queue cytoplasmique contenant un ITIM, qui inhibe l'activation cellulaire par recrutement de tyrosines phosphatases SHP1 **[311]**. Les récepteurs activateurs (ILT1, ILT7, ILT8, LIR6) s'associent à des molécules de signalisation adaptatrices comme DAP12 ou Fcγ **[311]**. Après liaison du ligand, la phosphorylation des résidus tyrosines de l'ITAM induit le recrutement des SH2 (tyrosines kinases Src avec une homologie 2) qui transduisent les signaux activateurs **[310]**.

Les ligands actuellement connus des récepteurs ILT sont les molécules de CMH I (HLA-A2, HLA-G, HLA-F) ainsi que des molécules *CMH I-like* comme CD1d ou les protéines UL18 **[312-316]**.

Le mécanisme d'induction de tolérance par les ILT a été éclaircit dans les études d'ILT2, d'ILT3 et d'ILT4. Les ILT3 solubles ou membranaires sont des protéines avec une activité immunosuppressive, pouvant inhiber la prolifération ou médier la cytotoxicité des LTs. ILT3 membranaire inhibe l'activation de NF-κB et la transcription de molécules de costimulation sur les CPAs grâce à la signalisation intracellulaire **[283, 317]** (cf. Fig. 15). ILT3 soluble se lie pour sa part aux LTs $CD4^+$ et induit leur anergie. Cette molécule induit également la différenciation des LTs $CD8^+$ suppresseurs et inhibe la différenciation des LTs cytotoxiques $CD8^+$ producteur d'IFN-γ **[318-320]**.

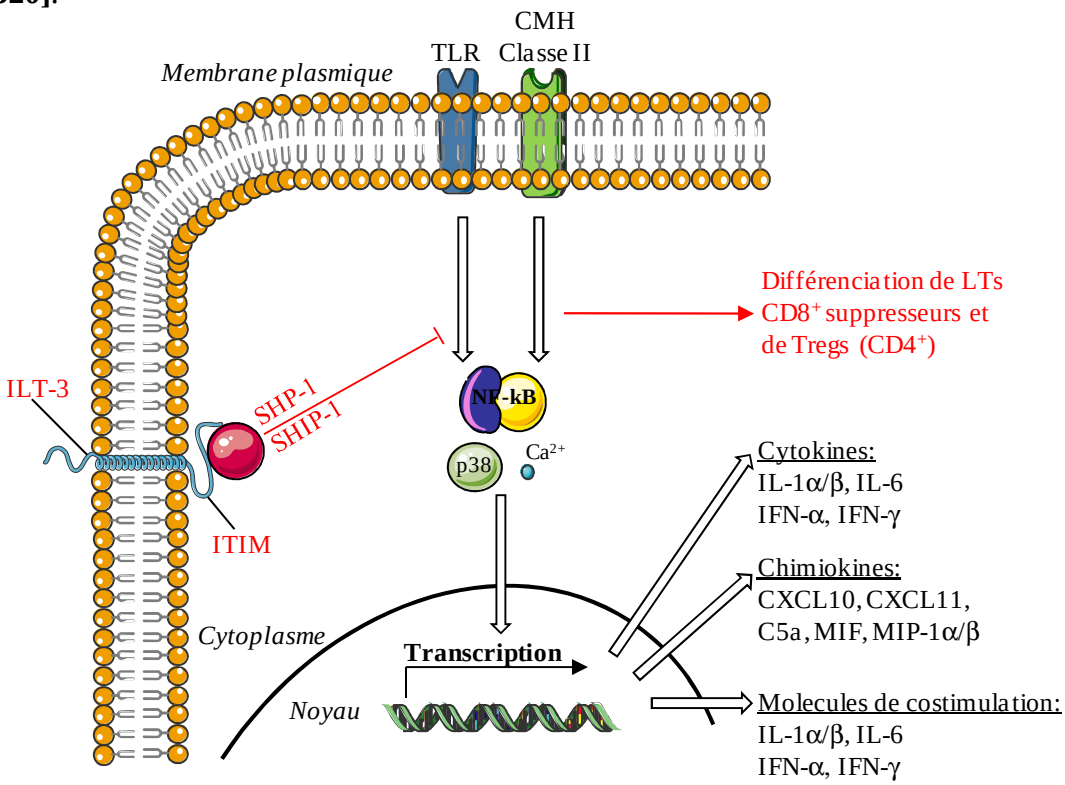


Figure 15 : Induction de tolérance par ILT3 membranaire.
ILT3 est induit sur les DCs en réponse à différents signaux comme l'IL-10, la 1,25 dihydroxyvitamine D3, des inhibiteurs de COX comme l'aspirine ou l'acide niflumique ou encore par interaction avec les LTs suppresseurs $CD8^+$ $CD28^-$. Le signal est transmis grâce au recrutement par le domaine ITIM de tyrosines phosphatases SHP1 et d'inositol phosphatase SHIP-1. Ces dernières inhibent la voie NF-κB, la MAPK p38 et diminuent l'influx de calcium dans le cytoplasme, aboutissant à un arrêt de la transcription d'un certains nombre de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, certaines chimiokines et les molécules de costimulation. Le phénotype des DCs obtenu est de type tolérogène. Les DCs ainsi induites entraînent la différenciation de LTs suppresseurs $CD8^+$ et de Tregs.

De manière similaire à ILT3, ILT2 a été décrit pour recruter une kinase Src qui phosphoryle son résidu tyrosine en C-terminal, supprimant ainsi son activité catalytique **[321]**. Ce récepteur mobilise également le calcium intracellulaire modulant ainsi les seuils d'activation des cellules immunocompétentes par régulation de l'influx de calcium, aboutissant à un contrôle de la réponse immune. Par exemple, ILT2 peut médier l'inhibition de la cytotoxicité des NKs et augmenter le seuil d'activation des LTs $CD8^+$ **[321]**. Par ailleurs, l'association ILT2 et ILT4 avec une molécule CMH I peut moduler la production de cytokines et de chimiokines induite par stimulation des monocytes *via* le CD40 **[322]**.

La fonction inhibitrice d'ILT4 repose quant à elle sur les motifs ITIMs présents dans la région cytoplasmique mais également sur l'interaction avec un de ses ligands HLA-G. L'importance de la liaison ILT4/HLA-G a été démontrée dans le domaine de la transplantation mais également dans celui de la tolérance fœto-maternelle **[323]**. HLA-G1 est spécifiquement exprimé sur le trophoblaste, un tissu d'origine fœtal dépourvu de CMH I qui sépare le fœtus de sa mère pendant la grossesse. Plusieurs études ont montré que l'interaction entre les DCs tolérogènes et les trophoblastes *via* ILT4/HLA-G est centrale dans l'établissement et la maintenance de la tolérance fœto-maternelle **[324, 325]**. Dans le domaine de la transplantation, il a été montré qu'HLA-G empêche la présentation des peptides aux LTs $CD4^+$, privilégiant ainsi la survie de greffons de peau **[286, 326]**. De même, l'augmentation des récepteurs ILTs sur les DCs d'un donneur corrèle avec une meilleure acceptation d'un transplant cardiaque **[284]**.

c. Interaction PD-L1 / PD-L2 (DCs) avec PD-1 (LTs)

PD-L1 (ou B7H1) et PD-L2 (B7DC) appartiennent à la famille B7 et sont exprimés par les DCs alors que PD-1 est exprimé par les LTs activés. L'engagement de cette voie induit une réponse inhibitrice sur la LT aboutissant à un arrêt de la prolifération lymphocytaire et de la sécrétion de cytokines. Cette propriété semble due aux motifs ITIM présents dans la queue cytoplasmique de ce récepteur **[114, 327-329]**. *In vitro*, le blocage de PD-L1 inhibe la capacité régulatrice des DCs induites par la $1,25(OH)_2D3$ alors qu'*in vivo*, le blocage de PD-L1 accélère le rejet de greffe en augmentant l'activation et la prolifération des LTs. Néanmoins, d'autres travaux soulignent que PD-1 n'est pas exprimé par les Tregs et que PD-L1 et PD-L2 peuvent aussi délivrer des signaux de costimulation positifs aux LTs remettant en cause l'activité tolérogène de cette voie **[309]**.

d. Interaction B7-H4 (DCs) avec son ligand sur les LTs.

B7-H4, membre récemment décrit de la famille B7, est un régulateur négatif de la réponse T. Il est exprimé par les DCs dans de nombreux tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes. Son

récepteur reste encore à identifier **[330]**. B7-H4 inhibe la prolifération des LTs $CD4^+$ et $CD8^+$ en arrêtant le cycle cellulaire en phase G0/G1. De plus, cette liaison réduit la synthèse d'IL-2 ainsi que l'activité cytotoxique des $CD8^+$ **[330, 331]**.

e. Interaction ICOS-L (DCs) – ICOS (LTs)

L'interaction entre ICOS-L sur les DCs et ICOS sur les LTs joue un rôle essentiel dans l'induction de Tregs par les DCs. En particulier, les DCs immatures qui expriment peu de molécules de costimulation mais de fortes quantités d'ICOS-L influent de façon importante la production de Tr1. Certains résultats montrent que les LTs $CD4^+$ déficients en ICOS sont insensibles aux signaux apportés par la DC tolérogène et ne peuvent pas devenir anergiques ou suppressifs **[332]**. ICOS agirait sur la LT en stabilisant le récepteur à l'IL-10, rendant ainsi la cellule plus sensible aux effets de cette cytokine **[332]**. Toutes ces expériences supportent donc l'hypothèse selon laquelle l'interaction ICOS / ICOS-L joue un rôle essentiel dans l'induction de tolérance par les DCs tolérogènes **[333]**.

3.3.4.4. Métabolisme

Différentes études montrent que les réponses immunes sont influencées par le métabolisme cellulaire. En particulier, les tissus donnent des signaux aux cellules *via* la modification de métabolites intracellulaires pour induire différents types de réponses. Par exemple, la différenciation de cellules inflammatoires et l'induction d'une réponse T mémoire *in vivo* peut être modifiée par l'abondance des acides aminés et des acides gras **[334, 335]**. Les DCs peuvent également moduler la différenciation T en modifiant des paramètres métaboliques comme IDO et HO-1 (hème oxygénase 1) qui contrôlent l'abondance du tryptophane et du monoxyde de carbone dans l'environnement **[336, 337]**.

Le catabolisme du tryptophane par l'intermédiaire d'IDO peut inhiber la prolifération des LTs et augmenter la tolérance **[338]**. En effet, les DCs humaines différenciées en présence de faibles concentrations de tryptophane acquièrent une capacité tolérogène *via* la génération de Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ possédant une activité suppressive. L'effet de la déplétion en tryptophane semble être lié à une voie de signalisation de réponse au stress médiée par la GCN2 kinase **[339]**. L'expression d'IDO par les DCs est induite par l'IFN-γ et le TGF-β suggérant que cette enzyme représente un mécanisme de rétrocontrôle qui permet aux DCs de moduler leur propre immunogénicité pendant l'inflammation **[340]**.

L'HO-1 dégrade l'hème induisant la production de monoxyde de carbone qui inhibe l'immunogénicité des DCs. En effet, HO-1 a un effet anti-inflammatoire potentiel médié par l'activité des Tregs mais les mécanismes impliqués restent globalement inconnus **[337]**.

Enfin, la serine/thréonine kinase mTOR joue un rôle essentiel dans l'immunogénicité des DCs et le contrôle de la différenciation des Tregs. L'activation de la voie de signalisation en aval des TLR stimule mTOR et induit des DCs inflammatoires alors que le blocage de l'activité mTOR par l'hypoxie, la déplétion en acides aminés ou la rapamycine induit la génération de Tregs **[341]**.

3.3.5. Utilisation clinique des cellules dendritiques tolérogènes

La preuve de concept démontrant que des DCs humaines pulsées par un antigène autologue *in vitro* peuvent induire une tolérance spécifique de l'antigène *in vivo* a été obtenue sur des volontaires sains. Dans cette étude, l'injection sous cutanée de DCs autologues pulsées par les peptides de la grippe ont induit une inhibition des fonctions effectrices des LTs $CD8^+$ spécifiques de l'antigène (diminution de la sécrétion d'IFN-γ et des fonctions cytolytiques). Cet effet a été associé à la détection de Treg $CD8^+$ sécrétant de l'IL-10. Cette étude a montré que les DCs immatures humaines administrées en l'absence de signaux inflammatoires induisent le développement de Tregs capables de réguler l'immunité de façon antigène spécifique **[342, 343]**.

Une première étude de phase I à l'université de Pittsburg a consisté à administrer des DCs tolérogènes ingénieurisées à des patients souffrants de diabète de type 1. Les DCs utilisées ont été traitées avec des siRNA dirigés contre les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 et ont été administrées par injection intradermique au niveau d'un site proximal par rapport au pancréas. Les DCs sont supposées migrer vers les nœuds lymphatiques les plus proches pour diminuer l'inflammation de l'ilot. L'abrogation de la réaction auto-immune se traduit par la survie de cellules beta produisant de l'insuline et par la production *de novo* de cellules productrices d'insuline. A ce jour, les résultats de cette étude ne sont pas connus.

Récemment, une méthode de génération de DCs tolérogènes dans des conditions GMP a été développée à partir de sang de patients atteints d'arthrite rhumatoïde **[344]**. Une étude clinique pour traiter les patients atteints de cette maladie a été initiée en utilisant des DCs tolérogènes générées après traitement *in vitro* par la vitamine D3 et la DEX puis administrées par injection intra-articulaire. A ce jour, les résultats de cette étude ne sont pas connus.

La thérapie cellulaire utilisant les DCs tolérogènes peut également être envisagée dans le domaine de la transplantation **[170]**. Le challenge est de générer des DCs tolérogènes avec un phénotype stable et qui seraient résistantes à la maturation médiée par différents facteurs pro-inflammatoires. Des essais d'immunothérapie avec les DCs ont été effectués chez des patients atteints de cancer et ont soulevé un certain nombre de points essentiels : le premier est qu'il faut définir le précurseur des DCs pour l'induction de DCs tolérogènes *in vitro* ($CD34^+$ de la moelle osseuse ou monocytes du sang). Ensuite, il faut déterminer la voie d'administration des DCs (systémique ou administration directe dans l'organe cible ou les nœuds lymphatiques).

L'inconvénient de l'administration systémique est que les DCs immatures ou semi-matures migrent moins que les DCs matures, rendant le ciblage de l'organe cible difficile. Enfin, le dernier point concerne la dose et la fréquence d'administration des DCs ainsi que la quantité d'antigènes présentée par la DC. En effet, la durée de vie des DCs *in vivo* étant de 2-3 semaines, il pourrait être envisagé de réaliser plusieurs injections, sauf si une injection unique était suffisante pour générer un microenvironnement capable de maintenir et d'induire la génération de DCs tolérogènes *de novo* et *in vivo* **[170]**.

Par ailleurs, les DCs peuvent également être utilisées pour l'expansion *ex vivo* de Tregs qui seraient utilisés en thérapie cellulaire dans les maladies auto-immunes, la transplantation ou les allergies. Un protocole de génération de Tr1 spécifiques d'un allo-antigène utilisant des DC-10 a été développé pour une utilisation clinique en transplantation (étude clinique ALT-TEN) **[345]**. Des Tr1 spécifiques de l'allergène peuvent également être générés *in vitro* par stimulation de LTs humains avec des DC-10 autologues pulsées par l'allergène dans l'optique d'une utilisation en thérapie cellulaire de l'allergie **[204]**.

Les DCs sont des sentinelles capables de reconnaître les pathogènes éventuels pour l'organisme et d'induire une réponse immunitaire adaptée pour les éliminer. L'induction d'une réaction de tolérance vis-à-vis d'antigènes inoffensifs comme les allergènes nécessite l'intervention des DCs tolérogènes. Ces DCs sont hyporépondeurs et induisent la génération de Tregs, acteurs de la tolérance. Ces DCs tolérogènes peuvent être générées *in vitro* par différents traitements avec des agents biologiques ou pharmacologiques et peuvent être caractérisées par différents marqueurs. Quelques études sont actuellement en cours pour tester leur effet *in vivo* dans des maladies auto-immunes ou dans des cas de transplantation.

La caractérisation des DCs tolérogènes est essentielle pour étudier l'impact de ces cellules dans différentes maladies dont l'allergie. Les méthodes de protéomique quantitative décrites dans le paragraphe suivant sont des outils de choix pour comparer différents types cellulaires et identifier des marqueurs spécifiques.

4. La protéomique, un puissant outil en recherche

4.1. Principe

Le terme « protéomique » a été créé par analogie avec génomique et se définit comme l'étude à grande échelle de l'ensemble des protéines présentes dans une cellule ou un tissu à un temps donné.

Il y a une quinzaine d'années, la protéomique était essentiellement considérée comme une discipline qualitative. Les expériences consistaient classiquement à analyser un tissu donné et à fournir une liste de protéines identifiées sans toutefois apporter d'informations quant à l'abondance, les distributions ou la stœchiométrie. Aujourd'hui, la protéomique quantitative est en développement rapide grâce notamment à de nouveaux instruments qui arrivent sur le marché tous les ans **[346]**.

4.2. La protéomique quantitative

Les stratégies les plus répandues consistent à comparer une condition traitée à un témoin. Durant les dix dernières années, plusieurs technologies se sont développées. Elles présentent toutes des avantages et des inconvénients et il est important de bien choisir sa méthode de quantification en fonction de la stratégie expérimentale (cf. Tableau 2). Par ailleurs, ce choix peut aussi être influencé par le coût de la méthode car la variation biologique inhérente à toute manipulation rend le nombre de réplicats biologiques à réaliser important **[347]**.

4.2.1. Approche basée sur les gels 2D

L'électrophorèse 2D (Deux Dimensions) a longtemps été considérée comme la méthode de choix pour visualiser les différences entre des échantillons protéiques dérivés de différentes conditions ou tissus. Cette technique consiste à séparer les protéines dans une première dimension en fonction de leur pI (point isoélectrique) puis dans une deuxième dimension en fonction de leur masse moléculaire. Des mélanges complexes de protéines ont pu être analysés de façon efficace avec cette technique et la détection des différences entre bandes ou entre intensités de spots paraissait intuitive. Aujourd'hui, il est possible de visualiser plus de 3000-5000 spots correspondant à plus de 500 protéines sur un gel 2D **[348]**. Cependant, dans cette technique, la séparation des protéines et l'analyse différentielle ne sont pas couplées à l'identification des protéines présentes dans le spot. Pour ce faire, les spots d'intérêt sont excisés et analysés par MS (spectrométrie de masse). Cette seconde étape permet d'identifier les protéines correspondantes.

Méthode	Gamme dynamique	Couverture du protéome	Précision de la quantification	Nature de la quantification	Niveau de quantification	Inconvénients
Gels 2D DIGE	3	Limitée par le choix du gradient de pH et la séparation en SDS-PAGE	Moyenne (10 <SD <30 %)	Relative	Analyse d'image	Fastidieux – faible couverture pour pH>8 et hauts poids moléculaires
Marquage métabolique (SILAC)	1-2	Bonne	Précise (SD <10%)	Relative	MS	Uniquement applicable pour les cellules en division ou temps de culture long
Marquage chimique (iTRAQ)	2	Moyenne	Moyenne (10 <SD <30 %)	Relative	MS/MS	Coût, efficacité de marquage, vitesse du spectromètre de masse, logiciels dédiés
Label free Intensité des ions	3	Bonne	Moyenne (10 <SD <30 %)	Relative	MS	Nécessité d'un système informatique puissant, logiciels dédiés, mise au point
Label free Spectral count	3	Moyenne	Faible (SD > 30%)	Relative	MS/MS	Vitesse du spectromètre de masse

Tableau 2 : Comparaison des méthodes de protéomique quantitative.
SD=déviation standard (Adapté à partir de **[347]**).

Dans les approches quantitatives, la reproductibilité entre les gels 2D est souvent une limitation importante. C'est pourquoi l'avancée majeure dans ce domaine a été le développement de la 2D-DIGE **[349]**.

Cette technologie consiste à marquer les protéines de deux ou plusieurs échantillons par différentes cyanines fluorescentes qui diffèrent dans leur longueur d'onde d'excitation et d'émission. Ainsi, dans le cas d'une comparaison entre traitement et contrôle, les deux échantillons protéiques sont mélangés avant focalisation isoélectrique et séparés sur le même gel 2D. La quantification est alors réalisée par comparaison des intensités de fluorescence après avoir scanné le gel aux deux longueurs d'onde spécifiques des fluorochromes. Du fait de la comigration des deux échantillons, les variations d'alignement des spots lors de l'analyse d'image sont réduites. Etant donné qu'il y a trois cyanines disponibles, l'expérience inclut un standard interne qui est utilisé dans tous les gels d'une même expérience. Ce standard correspond fréquemment à un mélange des différents échantillons de l'expérience et est utilisé pour normaliser les données entre les gels. Il permet ainsi de minimiser la variation expérimentale et d'augmenter la confiance dans la quantification de l'intensité des différents spots (cf. Fig. 16).

Lorsque les spots différentiels (protéines dont l'expression est augmentée ou diminuée dans la condition traitée par rapport au contrôle) sont détectés, des gels préparatifs contenant une grande quantité de protéines sont préparés et utilisés pour l'excision des spots. Cette excision peut être réalisée manuellement, mais en général, le gel préparatif est révélé avec un colorant fluorescent comme le SYPRO Ruby puis les spots protéiques sont prélevés grâce à un robot. Les protéines sont alors digérées dans le gel par la trypsine puis les peptides sont extraits et analysés par LC-MS/MS ou par MALDI TOF (ou TOF/TOF) afin d'identifier les protéines différentiellement exprimées.

La technique de protéomique 2D étant utilisée depuis quelques années, des études rétrospectives sur de nombreuses expériences ont pu être effectuées et ont permis de mettre en évidence une limite majeure de cette technique. En effet, les auteurs ont pu établir une liste de protéines généralement détectées comme différentiellement exprimées indépendamment de l'espèce, des conditions de test (*in vivo* ou *in vitro*) ou encore des organes ou tissus utilisés **[350, 351]** (cf. Tableau 3A). Ces protéines ont été classées par familles (cf. Tableau 3B).

Les quinze premières identifications comprennent des enzymes glycolytiques, des HSP (protéines de choc thermique), ou des composants du cytosquelette. L'expression différentielle de ces protéines a pu notamment être attribuée au stress cellulaire **[351]**. Si on considère des familles de protéines, les plus couramment identifiées sont les kératines ou les péroxirédoxines, une famille d'enzymes antioxydantes **[351]**.

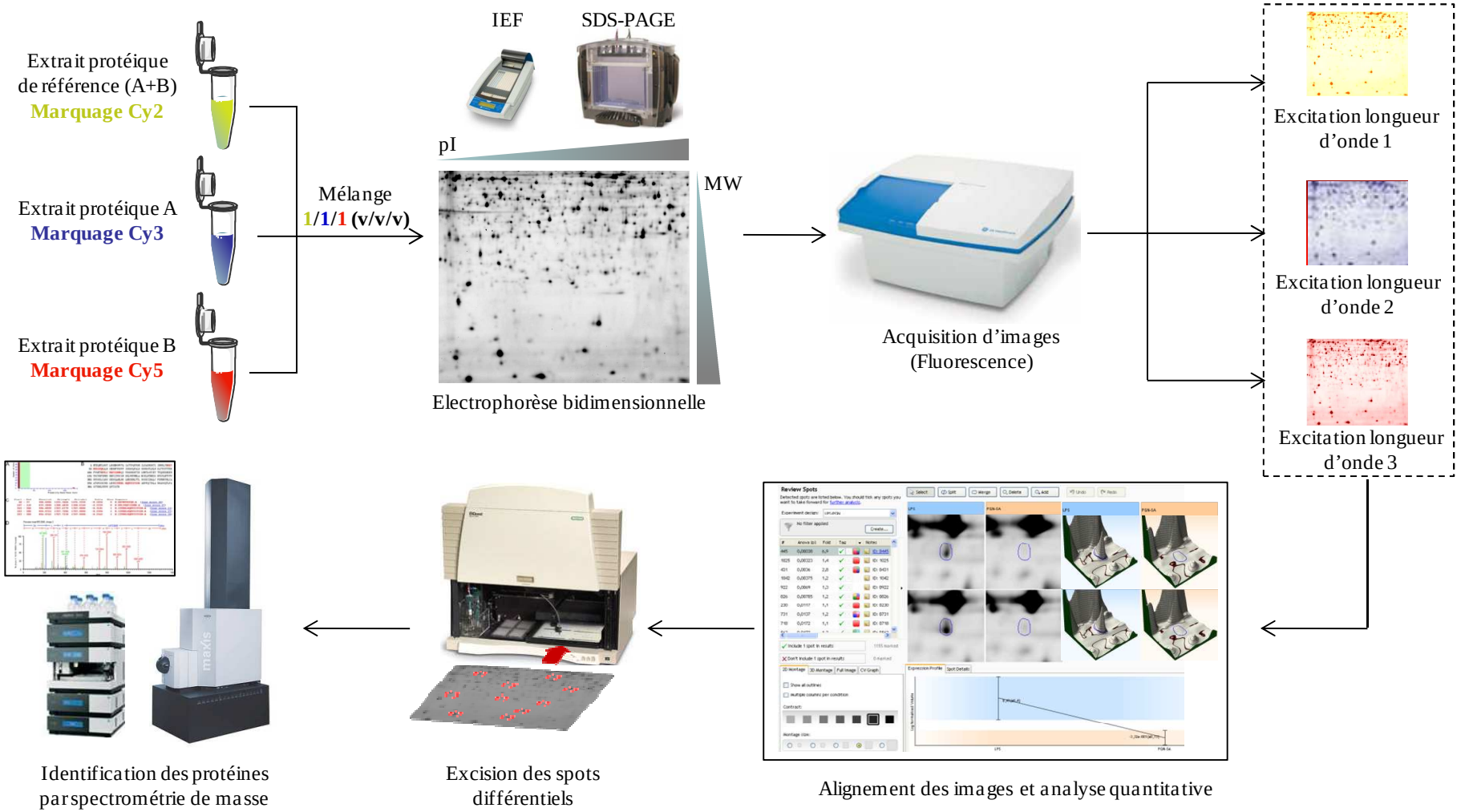


Figure 16 : Principe de la 2D-DIGE.
Pour comparer un extrait protéique A à un extrait B, les deux échantillons sont marqués avec des cyanines Cy3 et Cy5. Un mélange de l'ensemble des protéines (A+B) est marqué avec la Cy2 et est utilisé pour la normalisation entre gels. Les trois extraits sont mélangés et soumis à une électrophorèse 2D (séparation en fonction du point isoélectrique et de la masse moléculaire). Les gels sont ensuite scannés aux longueurs d'ondes spécifiques des fluorochromes et un logiciel permet d'aligner les images et de quantifier les différences d'intensités (ici Samespot, Non Linear Dynamics). Les spots différentiellement exprimés sont alors prélevés et analysés en MS afin de déterminer l'identité des protéines.

A.

Nom de la protéine	Identifications en pourcentage des expériences
HSP-27	31
Enolase 1	29
Triosephosphate isomérase	20
Pyruvate kinase M1/M2	19
Péridoxine 1	19
Péridoxine 2	19
Vimentine	19
Annexin A4	18
HSC-71	17
Peptidyl-prolyl isomerase A	16
Cytokératine 8	16
Cathepsine D	15
ATP synthase beta subunit	14
Grp78/Bip	13
RhoGDI 1	13

B.

Famille de protéines	Identifications en pourcentage des expériences
Kératines	41
Annexines	40
Péroxiredoxines	46
Actines	30
HSP-27	31
Tropomyosines	23
GSTs	29
Enolases	30
PDIs	26
Tubulines	21
Cathepsines	22
TCP-1	22
Triosephosphate isomérase	20
Pyruvate kinases	20
Vimentine	20

Tableau 3 : Protéines et familles de protéines communément identifiées en 2D.
A : 15 protéines fréquemment identifiées comme différentiellement exprimées lors d'expériences de 2D indépendamment du type cellulaire ou de l'espèce étudiée.
B : 15 familles de protéines identifiées par au moins une protéine dans des études de protéomique différentielle en 2D.
(HSP-27 : *heat shock protein* 27, HSC-71 : *heat shock cognate protein* 71kDa, Grp78/Bip : *glucose regulated protein* 78kDa, RhoGDI 1 : *Rho GDP-dissociation inhibitor 1*, GSTs : *glutathione-S-transferases*, PDIs : *protein disulfide isomerases*, TCP-1 : *chaperone containing TCP-1 family*) (adapté de **[350, 351]**).

Ces études suggèrent tout d'abord qu'il est important d'utiliser des gradients de pH restreints (une unité de pH) afin d'accéder aux protéines faiblement abondantes qui peuvent être masquées par les protéines très abondantes figurant dans le tableau 3.

Par ailleurs, cette étude souligne que l'interprétation des résultats d'expression différentielle doit être réalisée avec prudence et surtout que l'étape de validation des différences observées en protéomique *via* d'autres techniques (Western Blot, PCR) est essentielle pour s'assurer de la véracité des résultats.

4.2.2. Quantification basée sur la spectrométrie de masse

La MS permet de mesurer le rapport m/z (masse sur charge) d'un ion afin d'en déduire sa masse moléculaire. Cet outil permet ainsi, par simple mesure de masse, de déterminer des structures chimiques mais également d'identifier des protéines d'intérêt. Au fil des ans, cette technologie a énormément évolué et son utilisation s'est considérablement diversifiée. Ainsi, la MS permet d'étudier les structures tertiaires et quaternaires des protéines mais également de déterminer et de quantifier des différentiels d'expression protéiques entre plusieurs échantillons.

Par nature, la MS n'est pas quantitative du fait de propriétés physiques et chimiques différentes entre les peptides trypsiques. Des différences de charge et de composition en acides aminés entraînent des efficacités d'ionisation différentes et donc des intensités ioniques variables entre les peptides, même s'ils proviennent d'une même protéine. Pour quantifier les différences protéiques, l'intensité du courant ionique généré par un peptide de m/z donné est mesurée et comparée entre les différents échantillons. De ce fait, la plupart des méthodes de quantification à grande échelle par MS sont des méthodes de comparaison relative entre deux ou plusieurs échantillons. D'autres études ciblées permettent une quantification absolue grâce à l'utilisation de peptides standards isotopiquement marqués de concentration connue (MRM). Les méthodes de quantification relatives peuvent être classées en deux catégories : les méthodes basées sur le marquage isotopique et les approches sans marquage, dites « label free » **[352]**.

4.2.2.1. Marquage isotopique

Les approches utilisant le marquage isotopique sont basées sur le principe qu'un peptide marqué par un isotope stable, dit « lourd », diffère du peptide non marqué, dit « léger », uniquement en terme de masse et possède exactement les mêmes propriétés physico-chimiques. Le marqueur peut être introduit à différentes étapes de la préparation de l'échantillon. Dans les méthodes de marquage métabolique comme SILAC (*Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*), le marqueur est introduit dans la cellule ou l'organisme *via* le milieu de culture contrairement au marquage chimique comme iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation)* où le marqueur est ajouté aux peptides trypsiques *via* une réaction chimique. Les limitations de la quantification peptidique des échantillons complexes sont dues aux interférences causées par la co-élution d'espèces de masse similaire. De ce fait, les techniques d'optimisation au niveau peptidique consistent à réduire la complexité de l'échantillon en améliorant la séparation chromatographique ou en améliorant le fractionnement des échantillons en fonction des paramètres physico-chimiques comme le pI ou l'affinité pour les phosphopeptides. Des méthodes de fractionnement en amont de la digestion protéique sont également de plus en plus utilisées et permettent par exemple d'isoler des compartiments subcellulaires (nucléaires, membranaires, lysosomales, sécrétés).

a. SILAC

La technique SILAC est un outil important pour la protéomique différentielle quantitative. Le principe est schématisé à la Figure 17. La première phase de l'expérience, la phase d'adaptation, consiste à cultiver une population de cellules en présence d'acides aminés isotopiquement alourdis jusqu'à ce que toutes les protéines aient incorporé ces acides aminés lourds dans une proportion comprise entre 95 et 100 %. L'incorporation des acides aminés peut être suivie par MS. Au cours du marquage et après digestion, on détecte pour chaque peptide un doublet caractéristique correspondant à la forme lourde et légère. L'incorporation est considérée comme totale lorsque les pics correspondant aux peptides légers ne peuvent plus être détectés sur la trace MS. Au cours de la phase expérimentale, après avoir cultivé une population cellulaire dans un milieu normal et l'autre dans un milieu isotopiquement alourdi pendant le temps nécessaire au marquage, un stress ou stimulus est appliqué à l'une des populations. Les cellules issues des deux conditions de culture sont alors mélangées dans un rapport 1:1. Les protéines sont solubilisées, fractionnées, digérées et les peptides analysés en MS et MS/MS. L'information concernant l'origine de chaque protéine est conservée grâce à l'écart de masse introduit par le marquage isotopique. Chaque peptide est donc détecté par le spectromètre de masse sous la forme d'une paire constituée d'une forme lourde et d'une forme légère. L'analyse protéomique comparative consiste alors pour chaque paire, à calculer le rapport des intensités du signal des formes lourdes et légères qui traduit la différence de concentration de ces peptides dans le mélange analysé. En corrélant données MS et MS/MS, il est possible de remonter à l'identification des peptides et donc des protéines qui présentent des différences d'abondance entre les deux échantillons. La partie la plus délicate de la stratégie SILAC consiste à analyser les données avec des outils informatiques dédiés et performants qui i) détectent les espèces présentes sous forme de paires sur la trace MS, ii) calculent les ratios d'intensités pour chaque paire et iii) font correspondre à chaque paire une séquence peptidique obtenue grâce à l'analyse MS/MS.

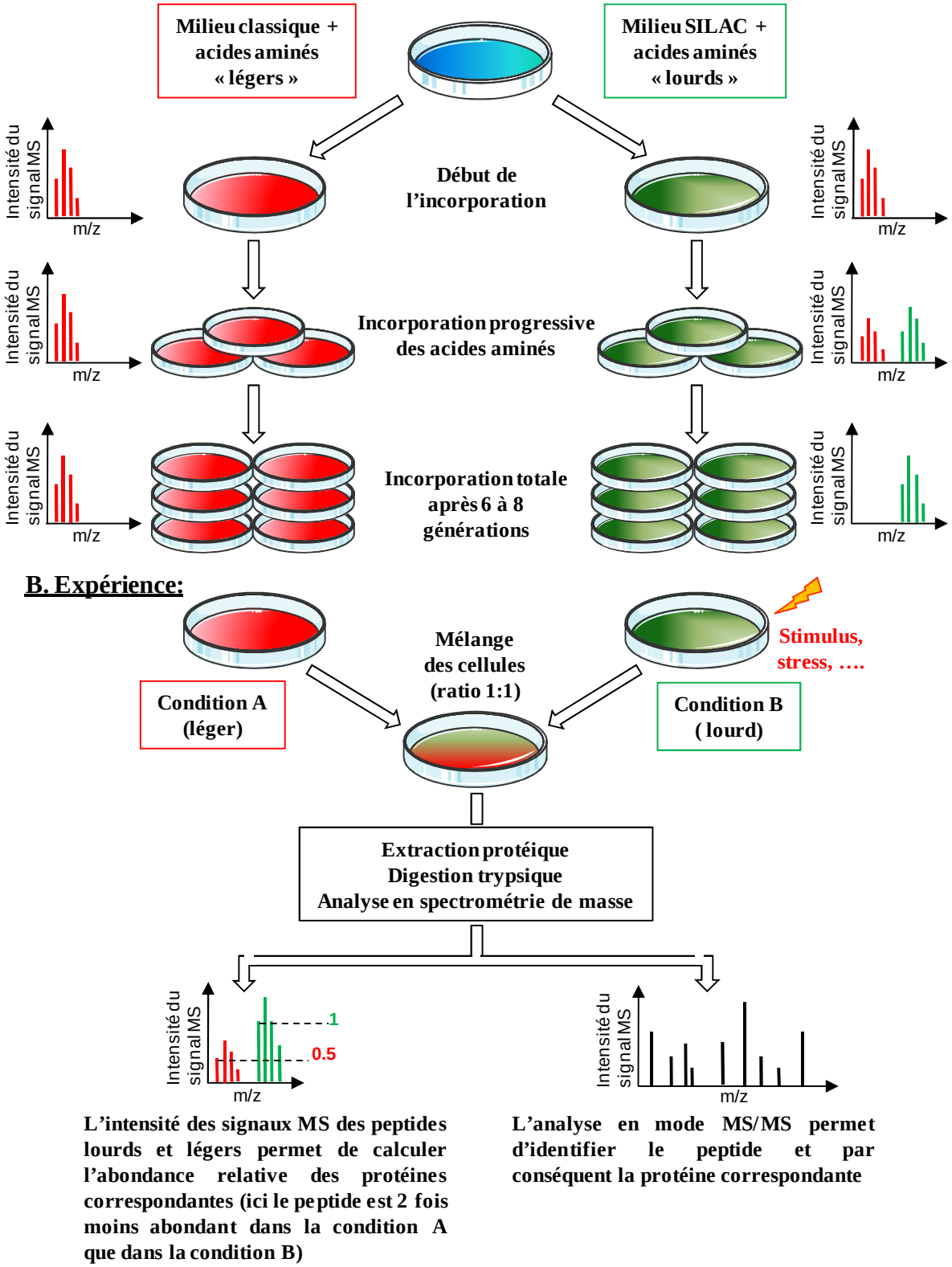


Figure 17 : Représentation schématique de la stratégie SILAC.
A : Dans la phase d'adaptation, les cellules sont cultivées dans un milieu où certains acides aminés ont été substitués par leurs isotopes « lourds » jusqu'à ce que les cellules aient complètement incorporé les acides aminés marqués.
B : Dans l'expérience, les cellules ayant incorporées les acides aminés lourds sont traitées, puis les deux lots de cellules à comparer sont mélangés. L'échantillon total ou un sous-protéome obtenu après fractionnement est analysé par MS. Les peptides lourds et légers, qui peuvent être distingués grâce au marquage isotopique différentiel sont quantifiés en mode MS et identifiés en mode MS/MS (adapté à partir de **[347]**).

b. iTRAQ

La quantification après marquage chimique peut être réalisée grâce à la méthode des marqueurs isobariques (commercialisés sous le nom d'iTRAQ, Fig. 18). Le marqueur est ajouté aux peptides trypsiques par réaction chimique avec les groupements amines. Dans le cas d'iTRAQ, on peut analyser simultanément 4 à 8 échantillons correspondant aux 4 et 8 « plex ». Ces marqueurs ont une masse identique (isobare) et les peptides marqués sont co-élués en chromatographie liquide. Durant la fragmentation des peptides, les groupements rapporteurs peuvent être discriminés suivant leur masse. Les fragments sont dans une fenêtre de rapport m/z faible qui n'est habituellement pas couverte par les ions des fragments peptidiques. Le ratio des intensités des différents ions rapporteurs est utilisé pour la quantification de chaque peptide et donc de chaque protéine.

4.2.2.2. Quantification sans marquage (label free)

Les études de protéomique différentielles utilisant la quantification sans marquage sont basées sur les intensités des courants d'ions de peptides ou sur les nombres de spectres MS/MS acquis pour chaque protéine **[353]**. Idéalement, les échantillons sont passés successivement sur un système LC-MS/MS pour limiter les variations d'intensité ionique dues à des différences de configuration du système (propriétés de la colonne, température) afin d'obtenir des temps de rétention les plus reproductibles possibles. L'avantage majeur de ces techniques est leur coût puisqu'aucun marquage n'est nécessaire. La couverture du protéome est grande puisque chaque protéine qui est identifiée avec un ou plusieurs peptides peut être quantifiée. Par ailleurs, la complexité de l'échantillon n'est pas augmentée par le mélange de différents protéomes comme c'est le cas dans les méthodes utilisant le marquage isotopique. Ces méthodes « label free » ont donc une profondeur d'analyse et une gamme dynamique importante.

a. Méthode basée sur le « spectral counting »

Le spectral counting permet la quantification relative des protéines entre un nombre théoriquement illimité d'échantillons. Cette méthode utilise le nombre de spectres MS/MS qui identifie chaque peptide associé à une protéine comme mesure quantitative **[354]**. Le rationnel dernière cette méthode est que plus une protéine est abondante, plus elle génère de peptides et donc de scans MS/MS et inversement. Le résultat du spectral counting dépend donc très fortement des paramètres d'acquisition du spectromètre de masse, en particulier des paramètres d'exclusion dynamiques **[355]**, les paramètres optimaux dépendant de la complexité de l'échantillon. Le principal inconvénient de cette technique est sa faible efficacité pour les protéines peu abondantes ou qui génèrent peu de spectres.

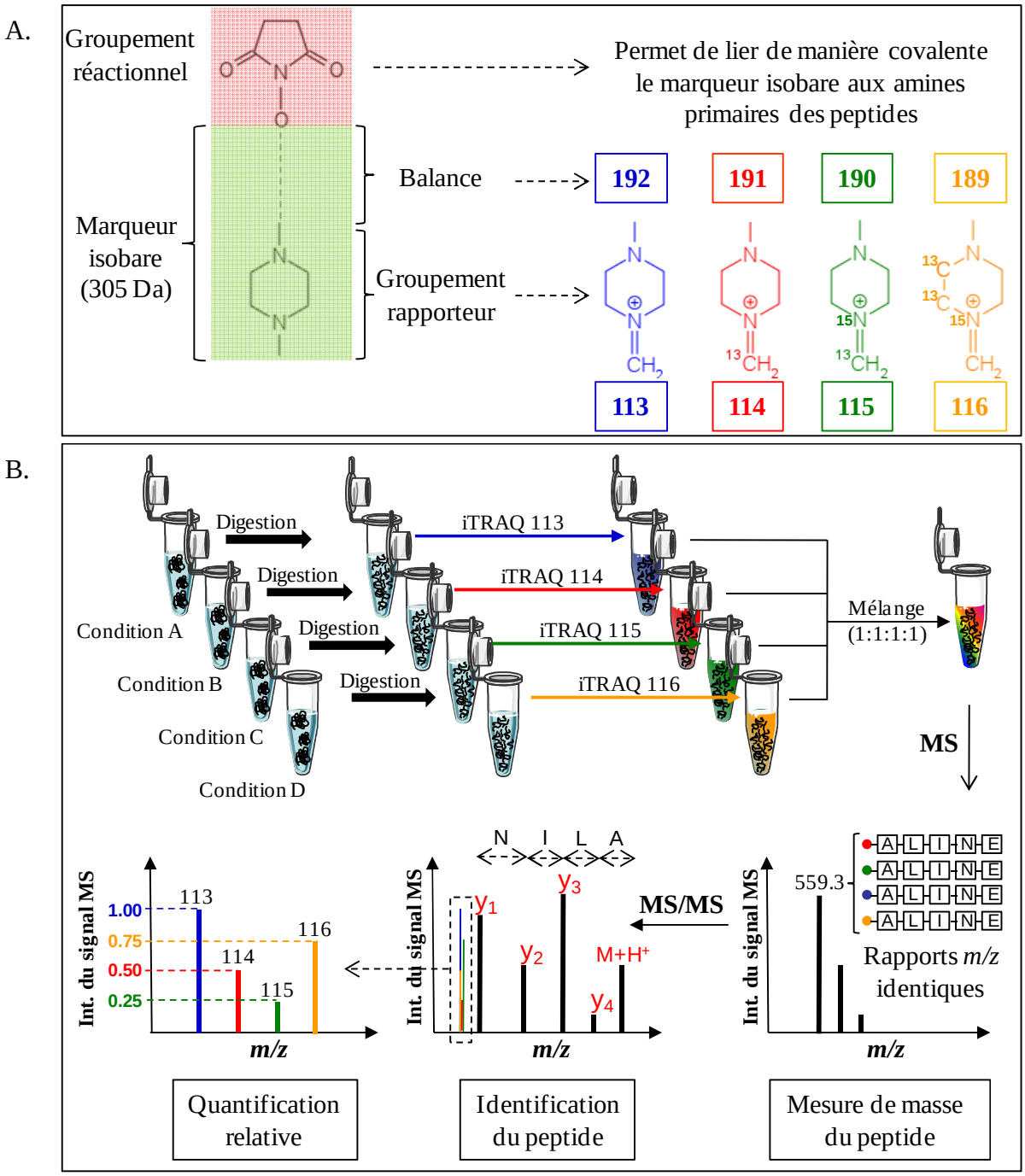


Figure 18 : Représentation schématique de la stratégie iTRAQ (exemple du 4 Plex).

A : Formule semi-développée des réactifs iTRAQ composés d'un groupement chimique permettant la liaison covalente aux peptides *via* leur groupement NH_2, et du marqueur isobare de 305 Da. En fonction de la molécule iTRAQ, la masse du groupement rapporteur varie selon la présence d'isotopes (de m/z compris entre 113 et 116). La masse de la balance varie de manière inverse (de m/z compris entre 192 et 189) afin de garder une masse globale rapporteur + balance constante.

B : Dans le cas d'une comparaison entre 4 échantillons, ces derniers sont digérés puis marqués avec les 4 molécules iTRAQ. Les 4 échantillons sont mélangés et analysés en LC-MS. Leur masse étant identique, leur m/z détecté en MS est identique. Après fragmentation, le signal MS/MS est utilisé pour l'identification mais également pour la quantification *via* l'intensité des signaux des ions rapporteurs de m/z égaux à 113, 114, 115 et 116.

b. Méthode basée sur l'intensité des courants ioniques

Cette approche utilise la moyenne normalisée des intensités des courants d'ions générés par chaque peptide (cf. Fig. 19). La hauteur ou le volume du pic pour un m/z donné est une mesure du nombre d'ions de cette masse particulière détectée durant un intervalle de temps donné. Ce processus de détermination des volumes de pics est appelé extraction ionique et le résultat est appelé EIC (*Extracted ion chromatogram*). Cet EIC peut être produit pour chaque m/z de chaque expérience LC-MS/MS et les volumes de pics résultants peuvent être comparés de façon quantitative.

Sachant que l'efficacité d'ionisation diffère suivant la nature des peptides, seuls les ions de m/z identiques peuvent être comparés entre les différents échantillons. Ce phénomène complique de façon significative l'effort de calcul nécessaire pour réaliser les mesures comparatives.

Avec le développement des spectromètres de masse haute résolution, la quantification sans marquage est devenue une méthode de plus en plus répandue et reconnue puisque la précision de masse permet à la fois d'améliorer l'alignement des peptides entre différents échantillons mais aussi d'augmenter la confiance dans leur identification. Toutefois, la reproductibilité de la séparation chromatographique est critique pour assurer une quantification précise à partir de leur courant d'ions respectif.

En général, les comparaisons entre les deux méthodes label free ont montré que ces techniques permettent de mettre en évidence des variations d'abondance de protéines d'approximativement deux fois. Le spectral counting permettrait de détecter plus de protéines qui présentent des changements d'abondance, alors que la quantification basée sur l'intensité des courants d'ions permettrait d'obtenir une meilleure précision sur l'estimation des ratios protéiques **[356]**. D'autres études ont montré que les deux méthodes sont complémentaires **[357]**.

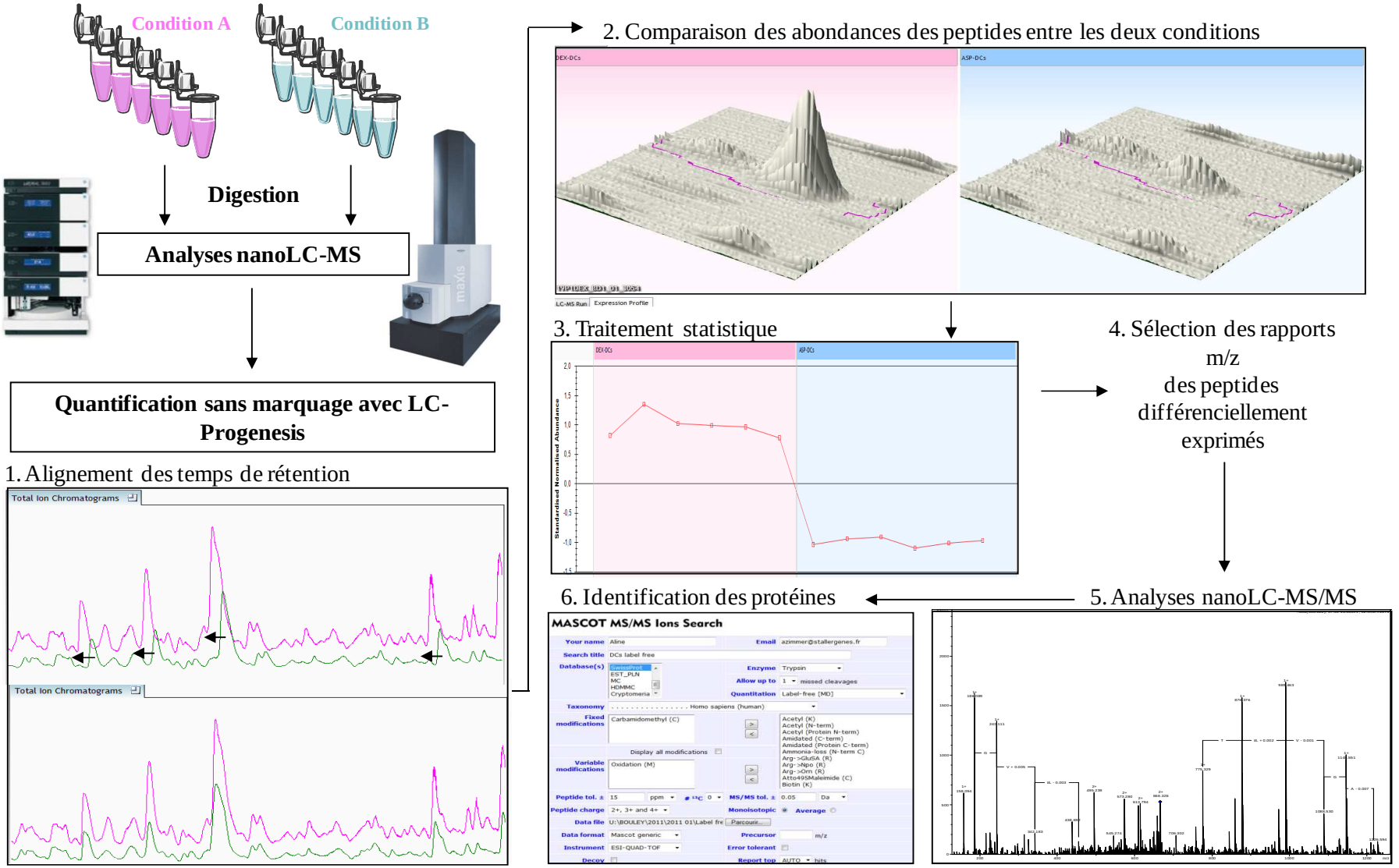


Figure 19 : Représentation schématique de la stratégie « label free ».
Pour comparer deux échantillons, ces derniers sont digérés puis analysés en LC-MS. Les données de MS sont alors alignées et les intensités des courants ioniques sont utilisées pour quantifier les différents peptides grâce à un logiciel (ici Progenesis LC-MS, Non Linear Dynamics). Après traitement statistique des données, les peptides différentiels sont sélectionnés et analysés en LC-MS/MS permettant ainsi l'identification des protéines.

4.2.3. Identification des protéines / bases de données

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse couplée aux méthodes de séparation des protéines et des peptides fournit un ensemble de spectres MS et MS/MS. L'interprétation de ces spectres est indispensable pour obtenir l'identification des protéines correspondantes. Celle-ci passe par la mise en relation des spectres de masse avec les séquences protéiques correspondantes qui est réalisée grâce à des outils bioinformatiques.

Une première stratégie appelée PMF (empreinte peptidique massique) consiste à comparer les masses expérimentales des peptides générés par digestion enzymatique d'une protéine aux masses théoriques des peptides obtenus par digestion *in silico* de l'ensemble des séquences d'une banque protéique. Cette stratégie est en général utilisée pour réaliser l'identification de protéines séparées par gel 2D puis digérées et analysées par MS avec un instrument de type MALDI.

Une seconde stratégie consiste à utiliser les données des spectres MS/MS pour obtenir des informations quant à la composition en acides aminés des peptides qui pourront ensuite permettre de remonter à l'identification des protéines dont ils sont issus. Ce type d'approche, parfois appelée « peptide fragment fingerprinting » par analogie au PMF, est la méthode d'identification la plus fréquemment utilisée dans les études protéomiques à grande échelle. Dans cette approche, les séquences des peptides sont identifiées en corrélant les spectres de fragmentation expérimentaux avec les spectres théoriques prédits pour chaque peptide issus de la digestion *in silico* de l'ensemble des protéines présentes dans une banque. L'ensemble des peptides identifiés par cette approche permet de remonter à l'identité des protéines présentes dans l'échantillon (cf. Fig. 20). Il existe un grand nombre de programmes permettant d'utiliser cette approche, le plus répandu étant Mascot (http://matrixsciences.com). Les corrélations entre spectres expérimentaux et théoriques sont réalisées en tenant compte de plusieurs paramètres réglés par l'utilisateur : i) la tolérance sur la masse de l'ion précurseur, ii) l'enzyme de digestion utilisée, iii) les modifications fixes ou variables sur les acides aminés iv) la tolérance sur la masse des ions fragments et v) les types de fragments recherchés. Après avoir traité les données, les programmes fournissent une liste de séquences peptidiques attribuées à des spectres MS/MS qui sont classées en fonction d'un score de corrélation. Ce score de corrélation mesure le degré de similarité entre le spectre expérimental et le spectre théorique et sert donc de premier critère discriminatoire entre les différentes séquences candidates pour le spectre MS/MS.

Tous ces outils nécessaires à l'évaluation des identifications assurent une certaine qualité et un contrôle évident des études protéomiques. Toutefois, en biologie, il est pertinent d'établir un faisceau d'évidence à partir de méthodes d'analyses différentes qui se confirment mutuellement. Les identifications protéomiques qui présentent le plus d'intérêt dans le contexte d'une étude

doivent donc être complétées par des méthodes d'analyses biochimiques comme l'ELISA ou l'immunoempreinte pour apporter une validation définitive de l'identification d'une protéine. Par ailleurs, les études protéomiques à large échelle restent complexes et difficilement applicables à un grand nombre d'échantillons rendant l'utilisation d'autres techniques nécessaires.

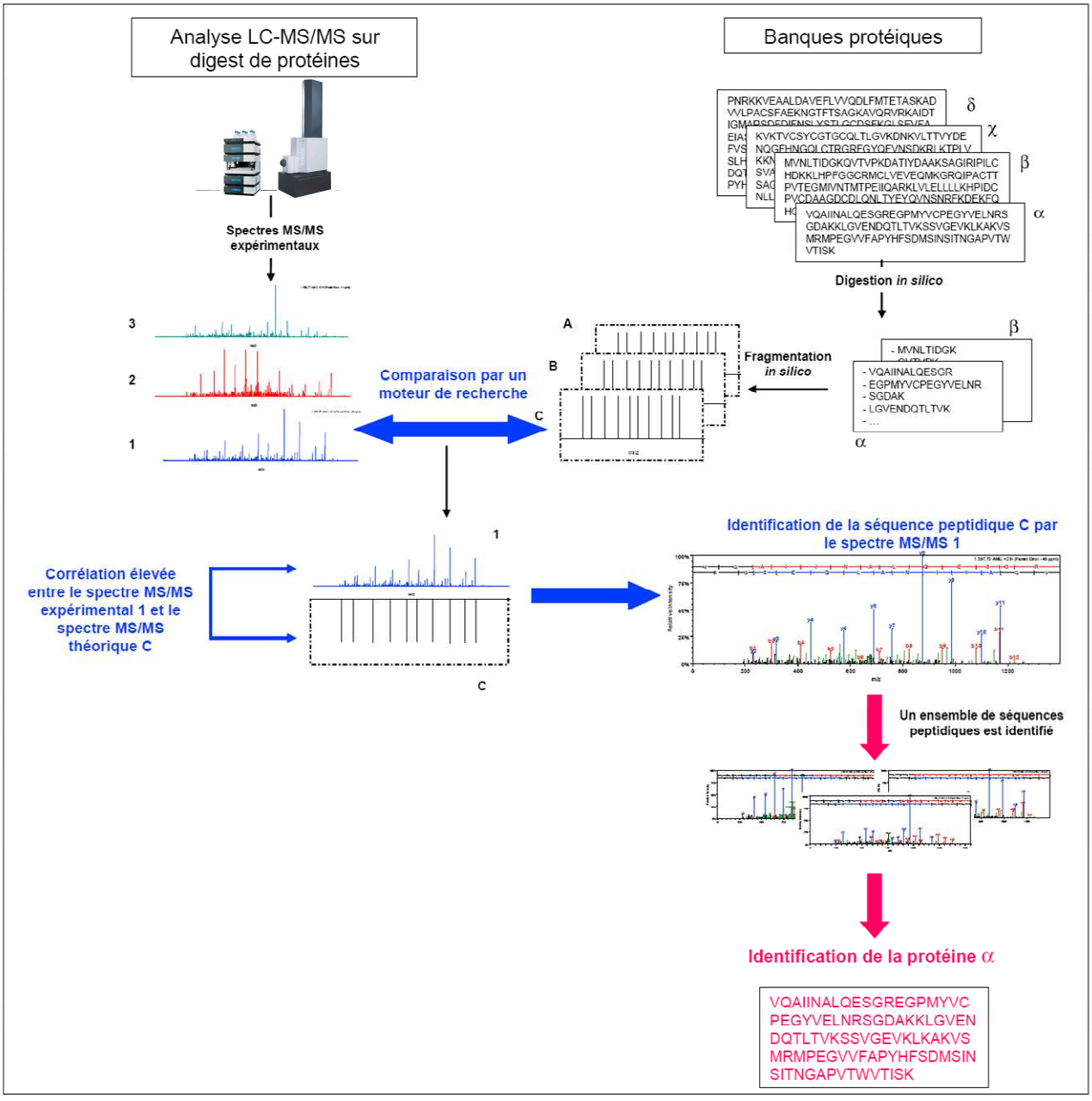


Figure 20: Stratégie d'identification des protéines par « peptide fragment fingerprinting ».
Identification des peptides et des protéines par l'approche MS/MS avec recherche dans les banques de données. Adapté de **[358]**.

4.2.4. Méthode de validation protéomique

4.2.4.1. Méthodes classiques : ELISA, CBA, immunoempreinte, IHC

Afin de valider les différences protéiques dans différents échantillons biologiques, des techniques immunologiques de dosage par ELISA, en multiplex (CBA, luminex) ou en immunoempreinte sont couramment utilisées. Elles permettent de doser un ou plusieurs analytes dans des échantillons complexes (milieux de culture, sérum…). Ces techniques sont cependant dépendantes de la disponibilité d'anticorps commerciaux spécifiques des cibles à étudier et l'analyse de variants post-traductionnels ou d'isoformes (épissage alternatif, substitutions d'acides aminés) se révèle beaucoup plus complexe. Enfin, l'IHC (immunohistochimie), malgré son aspect peu quantitatif, a l'avantage de permettre la visualisation *in situ* de l'expression de la protéine à partir de matériel biologique largement disponible en milieu hospitalier. Par ailleurs, cette technique permet d'effectuer des analyses rétrospectives à partir de bibliothèques d'échantillons biologiques.

4.2.4.2. Spectrométrie de masse ciblée

Les validations d'expression des protéines dans les échantillons complexes peuvent également être réalisées par des méthodes de spectrométrie de masse ciblée (dite MRM, pour "*Multiple Monitoring Reaction*"). Appliquée à l'analyse des protéines présentes dans les fluides biologiques, des études récentes montrent que cette technique couplée à une étape de chromatographie liquide en amont, permet de réaliser en une heure l'analyse quantitative simultanée de plusieurs centaines de peptides présents dans un fluide biologique **[359]**. En particulier, l'analyse *via* MRM de biomarqueurs dans le plasma permet la détection de protéines d'importance clinique dans des concentrations allant du picogramme/mL au nanogramme/mL. Cette technique est donc une méthode de choix pour l'analyse de protéines dans des gammes dynamiques importantes.

4.3. Analyse protéomique des cellules dendritiques humaines

Pour étudier la biologie des DCs, de nombreuses études utilisent des techniques basées sur les gels à deux dimensions alors que les études les plus récentes utilisent la LC-MS/MS (cf. tableau 4)

4.3.1. Processus de différenciation et/ou maturation des cellules dendritiques

Les premières études protéomiques sur les DCs se sont intéressées aux profils protéiques lors de la différenciation des monocytes en DCs immatures et pendant leur maturation.

Angenieux *et al.* **[360]** ont étudiés l'induction génique et les profils protéiques pendant la différenciation des iDCs (cellules dendritiques immatures) à partir de monocytes et ont identifié 10 protéines différentiellement exprimées. Alors que les gènes codant pour les protéines de présentation antigéniques (HLA-DR, CD1e) n'ont été détectés qu'au niveau des ARNm (probablement du fait de leur nature membranaire), des protéines impliquées dans la machinerie de processing des antigènes (chaperonne) ainsi que dans la fonction des mitochondries (glutamate déshydrogénase, MnSOD : *Manganese Superoxide Dismutase*) ont pu être mis en évidence durant la différenciation. Les changements les plus importants concernaient des protéines du cytosquelette ou de remodelage du cytosquelette comme la vimentine ou la gelsoline, qui sont impliquées lors des changements morphologiques observés pendant la différenciation monocytes-DCs.

Le groupe de Richards **[361]** a publié une étude similaire basée sur la détection des protéines par gel 2D avec coloration au nitrate d'argent. Parmi 900 spots détectés, 4% se sont révélés modifiés pendant la différenciation et la maturation des DCs avec un ratio supérieur à 2.5 fois. Les protéines identifiées étaient des chaperonnes comme les HSP-27 et 73, des protéines de liaison du calcium, des protéines de liaison des acides gras de la famille des FABP ou encore des protéines structurales comme la vimentine.

Alors que le groupe du Dr. Pereira publia une étude similaire identifiant 36 protéines différentiellement exprimées lors de la maturation **[362]**, c'est le développement des techniques de protéomique plus sensibles qui ont permis d'augmenter la liste des protéines identifiées. En 2008, Ferreira *et al*. **[363]** ont étudiés la différenciation et la maturation des DCs par 2D-DIGE avec identification des protéines par MALDI-TOF/TOF. 74 protéines différentiellement exprimées ont été identifiées et associées à des fonctions connues des DCs comme le remodelage du cytosquelette, le métabolisme, les interactions cellules-cellules, la mobilité cellulaire ou encore la prise en charge et la présentation antigénique. Seules quelques protéines communes ont été trouvées avec les études précédentes, probablement du fait de l'utilisation de techniques différentes (stimulus utilisé pour la maturation, gamme de pI utilisée). Dans cette même étude, une induction importante de la SOD2 (superoxide dismutase 2) a été mise en évidence, confirmant l'étude de Rivollier **[364]**. Cette

dernière étude s'est intéressée à la relation entre les profils d'expression des protéines du stress oxydatif et l'état de différenciation et de maturation des DCs. Grâce à l'utilisation de la 2D couplée à une identification en MALDI-TOF/TOF, ce groupe a mis en évidence une augmentation de la SOD2, de la Prx1 (Péroxirédoxine mitochondriale) et de la thiorédoxine 1 dans les iDCs et mDCs (cellules dendritiques matures) par rapport aux monocytes (cf. Fig. 21). Ces protéines ont pu être reliées à une condition pathologique puisque des niveaux élevés d'enzymes antioxydantes dans les DCs semblent leur permettre de survivre dans des environnements très oxydants comme les plaques d'athérosclérose et d'augmenter leur propre recrutement aggravant ainsi l'inflammation locale **[365, 366]**.

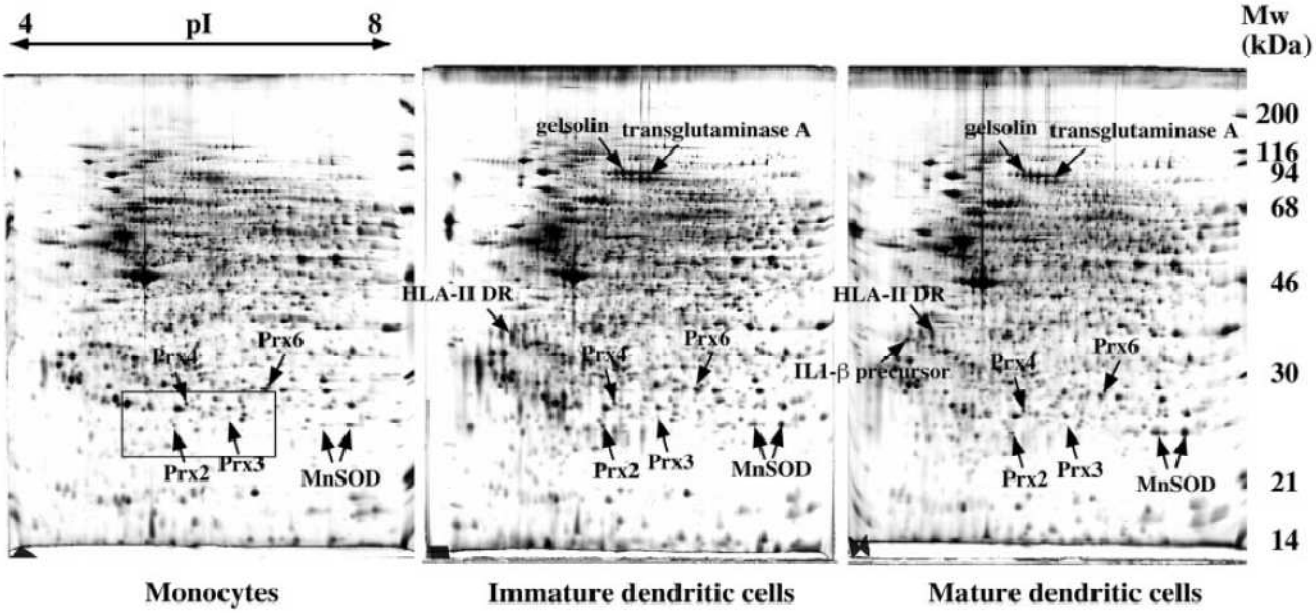


Figure 21 : Electrophorèses 2D de monocytes ou de DCs immatures ou matures.

Le gradient de pH en première dimension varie de 4 à 8 séparant ainsi les protéines neutres et acides. La séparation en deuxième dimension est réalisée avec un gel SDS-PAGE de 10%. Les protéines de réponse au stress oxydatif sont identifiées sur le gel par des flèches (extrait de **[364]**).

Auteur	Année	Type de comparaison	Fraction protéique	Type cellulaire	Technique	Détection	Référence
Angenieux *et al.*	2001	Différenciation	Totale	Monocytes / iDCs	2D, MALDI-TOF	Coloration au nitrate d'argent	**[360]**
Le Naour *et al.* **Richards *et al.***	2001 2002	Différenciation et maturation	Totale	Monocytes / iDCs / mDCs (TNF-α)	2D, MALDI-TOF	Coloration au nitrate d'argent / marquage radioactif	**[367]** **[361]**
Pereira *et al.*	2005	Différenciation et maturation	Totale	Monocytes / iDCs / mDCs (LPS)	2D, MALDI-TOF	Coloration bleu de Coomassie	**[362]**
Watarai *et al.*	2005	Maturation	Membranaire	CD11c-iDCs / CD11c-mDCs (LPS)	SDS-PAGE, 2D-LC-MS/MS	Coloration au nitrate d'argent / marquage métabolique	**[368]**
Rivollier *et al.*	2006	Maturation	Totale	iDCs / mDCs (CD40L)	2D, MALDI TOF-TOF	Coloration au nitrate d'argent	**[364]**
Horlock *et al.*	2007	Origine DCs	Totale	myDCs / moDCs / KG-1 cells (LPS)	2D, MALDI-TOF	Coloration au nitrate d'argent	**[369]**
Reynolds *et al.*	2007	Traitement METH	Totale	iDCs / iDCs + METH	2D-DIGE, LC-MS/MS	Fluorescence Cyanines	**[370]**
Ferreira *et al.*	2008	Maturation	Totale	iDCs / mDCs (LPS + IFN-γ)	2D-DIGE, MALDI-TOF/TOF	Fluorescence Cyanines	**[363]**
Gundacker *et al.*	2009	Maturation / traitements OxPAPC et HRV	Sécrétome + intracytoplasmique	iDCs / mDCs (LPS)	2D-LC/MS/MS	Coloration au nitrate d'argent / marquage métabolique	**[371]**
Horlock *et al.*	2009	Statut patient (atopie) / stimulation Derp1	Totale	iDCs / iDCs + Derp1	2D, MALDI-TOF	Coloration au nitrate d'argent	**[372]**
Ferreira *et al.*	2009	Maturation + traitement TX527	Totale	iDCs / mDCs (LPS / IFN-γ) / mDCs + TX527	2D-DIGE, MALDI TOF/TOF	Fluorescence Cyanines	**[373]**

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des analyses protéomiques étudiant les DCs humaines.

4.3.2. Cellules dendritiques traitées par des agents pharmacologiques

Une première approche protéomique globale qui analyse des changements protéiques sur les DCs humaines après traitement avec un agent pharmacologique a été réalisée par G. Ferreira et son équipe **[373]**. Ils ont étudié l'effet de TX527, un analogue de la vitamine D sur le protéome des DCs tolérogènes induites. Les 3 principaux groupes de protéines à avoir été détectés sont les protéines du cytosquelette, de la biosynthèse protéique et du métabolisme. Les protéines impliquées dans le renouvellement du cytosquelette, la migration cellulaire, ou la croissance cellulaire ont été diminuées ce qui reflète clairement de la morphologie des TX527-DCs. La plupart des protéines étaient incluses dans les voies de beta oxydation et du cycle de Krebs qui sont augmentées dans ces DCs. Les altérations induites par le traitement TX527 sont opposées par rapport au processus de maturation.

Une seconde étude **[371]** a consisté à fractionner et à comparer les protéines cytoplasmiques ou secrétées par les DCs après traitement avec du LPS (mDCs), des OxPAPC (phospholipides oxydés) (OxPAPC-DCs induisant une polarisation Th2) ou avec un HRV (rhinovirus humain) (HRV-DCs tolérogènes induisant des LTs anergiques). Une quantité importante de données a été générée grâce à l'électrophorèse à deux dimensions, en particulier des cartes de références pour l'ensemble des protéines cytoplasmiques ou sécrétées par les DCs. L'approche était basée sur une combinaison entre la détection de la fluorescence et le marquage métabolique permettant ainsi d'obtenir la fraction sécrétée réelle, par opposition au surnageant de culture cellulaire qui contient habituellement un mélange de protéines sécrétées, de protéines cytoplasmiques dérivées des cellules mortes et des protéines résiduelles du sérum ou du milieu de culture.

Les plus grandes différences d'expression de profil protéique cytoplasmique ont été observées chez les mDCs avec 22 protéines dont l'expression est augmentée telles que des protéines induites par l'IFN, des protéines de transduction du signal ainsi que des protéines sécrétées. Par contre, les HRV-DCs et OxPAPC-DCs n'ont montré que des altérations protéiques mineures avec 6 protéines augmentées dans chaque cas. L'augmentation majeure de l'hème oxygénase dans les OxPAPC-DCs a été proposée comme potentiel marqueur DC2. Par contre, le sécrétome s'est révélé profondément altéré dans les différentes DCs fonctionnelles, mettant en évidence de nouveaux biomarqueurs potentiels qu'il reste à valider.

En conclusion, ces analyses protéomiques sur les DCs ont permis d'accroître notre connaissance des molécules exprimées à la surface des DCs, ainsi que des molécules sécrétées. Cependant, malgré la richesse en information de ces études, le manque de données fonctionnelles empêche de conclure quant à la réelle implication des protéines différentiellement exprimées dans les fonctionnalités tolérogènes ou inductrices de réponses de type 1 ou 2 de ces DCs.

4.3.3. Etude des cellules dendritiques dans des conditions pathologiques

4.3.3.1. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine

Reynold *et al.* ont analysé l'effet de la METH (méthamphetamine) sur le profil d'expression protéique des iDCs. Cette drogue est associée à un risque élevé de contracter le VIH-1 **[370]**. L'utilisation de la 2D-DIGE en combinaison avec la LC-MS/MS ont permis d'identifier des protéines différentiellement exprimées reliées à la susceptibilité d'infection par le VIH et à la progression de la maladie. La METH augmente la réplication du virus dans les iDCs mais augmente l'expression d'un certain nombre de protéines permettant au virus d'adhérer et donc de mieux entrer et se répliquer dans la cellule. Par exemple, la galectine-1 est augmentée par le traitement METH et peut être liée à une progression de l'infection *via* une plus forte adhésion des particules virales à la cellule. Une diminution de la Prx1 après traitement a par ailleurs pu être reliée à une augmentation de la réplication virale. Ces deux protéines peuvent servir de biomarqueur de progression de la maladie et peuvent être ciblées dans des thérapies alternatives.

4.3.3.2. Echappement tumoral

Les mécanismes d'échappement tumoraux ont été étudiés sur des DCs traitées par des lysats cellulaires préparés à partir de cellules de carcinomes hépatocellulaires à différents stades tumoraux **[374]**. Les protéines totales de ces DCs ont été analysées par électrophorèse 2D couplée à la MS. Une diminution de la beta-centractine a pu être détectée et est associée à des diminutions de l'expression du CD86 et des capacités allo-stimulatrices des DCs. Ces modifications ont pu être corrélées aux déficits fonctionnels des DCs (qui deviennent hyporépondeurs) et au mécanisme d'échappement tumoral induit par les cellules de carcinomes hépatocellulaires **[374]**.

4.3.3.3. Hypersensibilité de contact

Je *et al.* ont étudié l'effet d'un allergène de contact, le TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) sur les DCs grâce à l'électrophorèse 2D couplée à la MS **[375]**. Ils ont identifié une augmentation des ROS (*Reactive oxygen species*) et des protéines myelopéroxidases après traitement. Cette augmentation des ROS induit la production d'IL-12 et favorise les modifications des protéines comme la carbonylation. En particulier, la carbonylation de l'ATP synthétase dans les DCs semble induire sa dégradation et donc un déficit de l'énergie métabolique puisqu'une quantité limitée d'ATP peut être produite. La fonction altérée de l'ATP synthétase contribue donc à la pathophysiologie de l'hypersensibilité de contact.

4.3.3.4. Statut atopique

Horlock et son équipe ont étudié les protéomes des moDCs stimulées ou non par Der p 1 et provenant d'individus atopiques ou non **[372]**. Leur but était double, il consistait i) à comparer les iDCs de patients non atopiques et atopiques afin de voir si ces derniers possèdent des DCs pré-programmées à induire une réponse allergique, ii) à comparer les DCs stimulées avec un allergène, soit utilisé dans sa forme native (*i.e*. présentant une activité protéasique) soit dans sa forme inactive **[372]**.

Grâce à une analyse en électrophorèse 2D et MALDI-TOF, cette étude a montré une similarité importante des protéomes entre atopiques et non atopiques puisqu'un coefficient de corrélation de 0.87 a été obtenu. 6 protéines ont pu être identifiées comme augmentées chez les individus non atopiques alors que 11 étaient augmentées chez les atopiques sans challenge allergénique. La glutathion-S-transférase et la HSP-27 ont été décrites pour leur importance significative quant à la réponse allergique. Cependant, seul le précurseur de la cathepsine X a pu être identifié comme augmenté d'un facteur supérieur à deux chez les individus non atopiques par rapport aux atopiques, alors que LASP-1 (*LIM and SH3 protein*) est augmentée d'un facteur similaire chez les atopiques. Aucune donnée fonctionnelle sur ces marqueurs n'a été présentée **[372]**.

Après stimulation avec l'allergène, le nombre de protéines différentiellement exprimées a augmenté et inclus les protéines Giα2 (*GTP binding regulatory protein Gi alpha-2 chain*), la cathepsine D, CCT (*Chaperonin containing TCP1 subunit 8*), le protéasome 26S, la tyrosine kinase c src, la prohibitine, la fascine, la sous-unité 2 activatrice du protéasome, la thiorédoxine, l'IL-1RA, HSP-70 et la frabine. En particulier, les auteurs proposent un rôle fonctionnel dans la polarisation Th2 pour la Giα2, l'IL-1RA et la frabine **[372]**.

A ce jour, ces travaux représentent la seule étude de protéomique s'intéressant aux DCs dans le cadre de l'allergie.

La protéomique est une méthode de choix pour analyser et comparer différentes populations cellulaires. Différentes stratégies ont été développées, les premières sont basées sur l'électrophorèse bidimensionnelle alors que les plus récentes utilisent la chromatographie liquide couplée à la MS. Pour chaque étude, une analyse détaillée est nécessaire afin de choisir au mieux la stratégie expérimentale à utiliser.

A ce jour, de nombreuses études ont décrit les changements du protéome lors de la différenciation ou de la maturation des DCs. Toutefois, peu d'études se sont intéressées à l'impact de traitements sur le protéome des DCs. Les études de DCs *ex vivo* à partir de patients atteints de diverses pathologies sont encore plus rares.

Ainsi, les techniques de protéomique quantitative représentent des outils pertinents qui permettront à l'avenir de mieux caractériser les populations cellulaires, de découvrir de nouvelles voies de signalisation mais surtout d'identifier des biomarqueurs dans diverses pathologies dont l'allergie.

OBJECTIFS

Afin d'améliorer l'efficacité des traitements d'ITA et le suivi clinique des patients, ce travail de thèse a été principalement consacré à la recherche de biomarqueurs de l'immunothérapie. Il peut s'agir de biomarqueurs prédictifs permettant au clinicien de choisir le traitement le plus adapté pour chaque patient (médecine personnalisée). Il peut également s'agir de biomarqueurs d'efficacité de l'ITA, facilitant le suivi clinique des patients. Ces biomarqueurs peuvent être exprimés par différents types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire comme les LBs, les LTs et les DCs. Nous nous sommes ici concentrés sur les DCs car ces cellules sont à la base de la polarisation des réponses immunitaires.

Le premier objectif a donc été de développer un modèle cellulaire permettant de cultiver des DCs polarisées *in vitro*. Cette étude a nécessité une étape de criblage de molécules biologiques ou pharmacologiques qui a abouti à la sélection de quatre composés induisant des DCs effectrices (LPS pour DC1, PGN ou peptidoglycane pour DC17) et régulatrices (DEX et ASP). La capacité des protéases d'A*spergillus oryzae* à induire de la tolérance a ainsi été décrite pour la première fois et une analyse détaillée du phénotype et de la polarisation T a été entreprise.

Le deuxième objectif a été d'étudier, à l'échelle moléculaire, ces DCs polarisantes *via* des approches de protéomique à haut débit. Deux techniques complémentaires ont été utilisées, la 2D-DIGE et la LC-MS/MS, et ont permis de définir des marqueurs représentatifs des DCs effectrices ou des DCs régulatrices. Ces marqueurs ont ensuite été validés au niveau protéique *via* des approches d'immunoblotting mais aussi au niveau du transcriptome par PCR quantitative. Afin d'étudier la spécificité des marqueurs tolérogènes mis en évidence, leur expression a ensuite été mesurée dans de nouveaux modèles de DCs régulatrices. Certains marqueurs ont montré une expression ubiquitaire dans l'ensemble des modèles indiquant qu'il s'agit de marqueurs quasi-universels de tolérance dans les DCs.

Le dernier objectif a consisté à valider l'expression de ces différents marqueurs dans des PBMCs de patients ayant été traités par ITA pendant 4 mois. Deux marqueurs se sont révélés augmentés après traitement, et ce en relation avec l'efficacité clinique. Ces marqueurs constituent ainsi des candidats sérieux pour détecter une réponse précoce au traitement chez les patients répondeurs cliniques.

RESULTATS

1. Article 1 : Identification d'un nouveau phénotype de cellules dendritiques tolérogènes induites par les protéases d'*Aspergillus oryzae*, Journal of immunology

Lors du criblage initial visant à évaluer le potentiel tolérogène ou inflammatoire de différents composés biologiques ou chimiques, un nouvel inducteur de tolérance sur les DCs a été mis en évidence. En effet, les protéases du champignon *Aspergillus oryzae* se sont révélées efficaces pour induire des DCs tolérogènes de phénotype nouveau (ASP-DCs). Ces DCs n'expriment pas de molécules de costimulation, augmentent leur expression d'ILT4 et ne sécrètent pas ou peu de cytokines ou chimiokines. Au niveau des transcrits, différents gènes tolérogènes sont induits, en particulier GILZ, un régulateur transcriptionnel bien connu pour médier l'activité des GCs. Deux isoformes des RALDH, enzymes connues pour induire la production d'acide rétinoïque, une molécule hautement tolérogène, sont également induites. Les propriétés anti-inflammatoires des ASP-DCs sont importantes puisqu'une restimulation avec un ligand de TLR comme le LPS n'a aucun effet inflammatoire sur ces DCs. Fonctionnellement, les ASP-DCs induisent une polarisation T particulière puisque les LTs obtenus après cocultures n'augmentent pas leur sécrétion des cytokines de polarisation communément étudiées (IFN-γ, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A). Une légère augmentation de la sécrétion de TGF-β a pu être observée indiquant qu'il y a probablement génération de LTs de type Th3. La restimulation des LTs générés avec un stimulus polyclonal n'induit pas leur prolifération indiquant que les LTs générés sont de type anergiques. Cette anergie semble réversible puisque l'ajout d'IL-2 restaure la prolifération. Par ailleurs, les LTs générés peuvent supprimer la prolifération de LTs naïfs d'un autre donneur indiquant un phénotype suppressif. Le mécanisme suppressif mis en jeu semble être dû à un contact cellulaire puisque le surnageant de culture seul ne permet pas d'observer cette activité suppressive. Ainsi, la première partie de cet article décrit un nouveau phénotype de DCs, que l'on peut qualifier « d'anergisant » puisqu'il permet la génération de LTs anergiques et suppressifs.

Dans la deuxième partie de l'article, nous avons cherché à savoir si l'effet tolérogène pouvait être attribué à un type précis de protéases et s'il était possible de comprendre le mécanisme d'induction de tolérance dans la DC. Pour cela, nous avons inhibé les protéases avec différents inhibiteurs spécifiques de diverses activités protéasiques. Nous avons pu constater qu'en l'absence des protéases à acide aspartique, les gènes régulateurs comme GILZ ou RALDH n'étaient plus induits. Cette inhibition démontre l'implication de ce type de protéases dans le mécanisme tolérogène.

L'étude des mécanismes d'induction de tolérance dans la DCs nous a conduit à étudier la voie de signalisation aboutissant à la synthèse de GILZ, un régulateur transcriptionnel connu pour son effet dans l'induction de tolérance. Nous avons pu constater que dans les ASP-DCs, GILZ est induit indépendamment de la voie de signalisation du GR, ce qui n'a jamais été décrit. Par ailleurs, nous avons détecté dans nos DCs une dégradation rapide de la p65, une des sous-unités de NF-κB. Cette dégradation pourrait également être un mécanisme expliquant l'inhibition totale de la production en cytokines et donc le phénotype tolérogène des DCs. Cette dégradation de la p65 semble être le résultat de l'action combinée entre différents types de protéases (cystéine-, métallo- et serine-protéases) indiquant finalement que la synergie observée entre les différents types de protéases est responsable de l'effet tolérogène.

En conclusion, cet article décrit une nouvelle voie d'induction et un nouveau phénotype de DCs tolérogènes. Ces résultats pourraient s'avérer utiles pour l'élaboration d'outils thérapeutiques destinés à traiter diverses pathologies comme l'allergie ou les maladies auto-immunes mais aussi pour limiter les rejets de greffes lors de la transplantation.

Identification of a New Phenotype of Tolerogenic Human Dendritic Cells Induced by Fungal Proteases from *Aspergillus oryzae*

Aline Zimmer,* Sonia Luce,* Fanny Gaignier,* Emmanuel Nony,* Marie Naveau,* Armelle Biola-Vidamment,† Marc Pallardy,† Laurence Van Overtvelt,* Laurent Mascarell,* and Philippe Moingeon*

We characterized a new pathway to induce tolerogenic dendritic cells (DCs) following treatment of human monocyte-derived DCs with proteases from the fungus *Aspergillus oryzae* (ASP). ASP-treated DCs (ASP-DCs) exhibit a $CD80^{-}CD83^{-}CD86^{-}$Ig-like transcript (ILT)$2^{-}ILT3^{-}ILT4^{+}$ phenotype, do not secrete cytokines or chemokines, and express tolerogenic markers such as glucocorticoid-induced leucine zipper, NO synthetase-2, retinaldehyde dehydrogenase-1 or retinaldehyde dehydrogenase-2. When cocultured with naive $CD4^{+}$ T cells, ASP-DCs induce an anergic state that can be reversed by IL-2. Generated T cells mediate a suppressive activity in third-party experiments that is not mediated by soluble factors. A comparison between dexamethasone-treated DCs used as a reference for regulatory T cell-inducing DCs and ASP-DCs reveals two distinct phenotypes. In contrast to dexamethasone, ASP treatment induces glucocorticoid-induced leucine zipper independently of glucocorticoid receptor engagement and leads to NF-κB p65 degradation. Abrogation of protease activities in ASP using specific inhibitors reveals that aspartic acid-containing proteases are key inducers of regulatory genes, whereas serine, cysteine, and metalloproteases contribute to NF-κB p65 degradation. Collectively, those features correspond to a previously unreported anergizing phenotype for human DCs. Such regulatory mechanisms may allow fungi to downregulate host immune responses and provide clues for new approaches to treat proinflammatory disorders. *The Journal of Immunology*, **2011, 186: 3966–3976.**

Dendritic cells (DCs) are specialized APCs playing a pivotal role in the induction of both immunity and tolerance (1). Depending upon the type of pathogen encountered and the profile of costimulatory and T cell-polarizing molecules engaged, DCs drive the development of Th1, Th2, Th17 effector, or suppressive/regulatory T cells (2–7). Regulatory T cell (Treg) generation is currently considered as a potential treatment for autoimmune diseases (8), graft-versus-host disease (9–11), or allergy (12, 13). Thus, the induction of tolerogenic DCs supporting suppressive T cell responses while downregulating effector responses can be considered as an approach to control a variety of inflammatory disorders.

Several studies have demonstrated that Treg-promoting DCs can be generated in vitro following treatment with biological (e.g., IL-10, TGF-β) or pharmacological agents (recently reviewed in Ref. 14). Most particularly, DCs conditioned with dexamethasone (DEX-DCs) present a semimature phenotype and prevent the upregulation of costimulatory molecules as well as the secretion of proinflammatory cytokines like IL-12 (15–17). Such DEX-DCs inhibit the proliferation of allospecific T cells (18, 19), prolong allograft survival in mice (20), and decrease the number of IFN-γ–producing $CD4^{+}$ T cells, but support the differentiation of IL-10–producing type 1 Tregs (Tr1) (15, 21, 22). Besides their capacity to elicit suppressive T cells, tolerogenic DCs are commonly defined based on the expression of various surface markers such as Ig-like transcript (ILT) molecules (4, 23–28), transcriptional regulators like glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) (29–31), or enzymes such as retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) (32–36) or NO synthetase-2 (NOS-2) (37), all contributing to their functional properties.

In this study, we describe a new pathway to induce tolerogenic DCs following treatment with proteases from the *Aspergillus oryzae* fungus. *A. oryzae* is used for the production of traditional fermented food such as soy products as well as enzymes, antibiotics, beverages, and volatile compounds (38). In this study, we demonstrate that protease from *A. oryzae* (ASP)-DCs exhibit a tolerogenic phenotype distinct from other conventional regulatory DCs such as DEX-DCs.

Materials and Methods

Reagents

ASP is a protease–peptidase complex produced by submerged fermentation of *A. oryzae*, which contains both endoprotease and exopeptidase activities (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). This product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes issued by the Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives and the Food Chemicals Codex. In selected

*Stallergènes, Antony Cedex 92183, France; and †Universud, INSERM Unité Mixte de Recherche 996, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11, 92296 Chatenay-Malabry, France

Received for publication September 24, 2010. Accepted for publication January 27, 2011.

This work was supported by Stallergenes. A.Z. was supported by a Convention Industrielle de Formation par la Recherche fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Mascarell Laurent, Stallergenes, 6 Rue Alexis de Tocqueville, Antony Cedex 92183, France. E-mail address: lmascarell@stallergenes.fr

Abbreviations used in this article: ASP, protease from *Aspergillus oryzae*; Ct, cycle threshold; DC, dendritic cell; DEX, dexamethasone; DNCB, dinitrochlorobenzene; EPNP, 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propane; GILZ, glucocorticoid-induced leucine zipper; GR, glucocorticoid receptor; ILT, Ig-like transcript; NOS-2, NO synthetase-2; p65, p65 subunit of NF-κB; PI, propidium iodide; RALDH, retinaldehyde dehydrogenase; Tr1, type 1 regulatory T cell; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1003184

experiments, culture supernatants were filtered through 10-kDa cutoff filters (Amicon; Millipore, Billerica, MA) to remove small molecules.

DC generation and in vitro stimulation

Human PBMCs were separated out of buffy coats obtained from healthy volunteers (Etablissement Français du Sang, Rungis, France) by centrifugation over a Ficoll-Paque plus gradient (PAA Laboratories, Les Mureaux, France). To generate monocyte-derived DCs, 5×10^8–8×10^8 cells were cultured at 37°C, 5% CO_2, in RPMI 1640 medium with stable glutamine supplemented with 10 μg/ml gentamicin, 50 μM 2-ME, 1% nonessential amino acids (all obtained from Invitrogen, Carlsbad, CA), and 10% FCS (Gentaur, Brussels, Belgium). After 1 h, nonadherent cells were removed, and adherent cells were further cultivated for 6 d in presence of human rGM-CSF and rIL-4 (Gentaur) using 100 and 50 ng/ml concentrations, respectively. After 6 d, a pure population of DCs was obtained, with >95% $CD14^-$ $CD1a^+$ cells detected by flow cytometry using a FC500 cytometer and the CXP analysis software (Beckman Coulter, Villepinte, France). Up to 10^6 DCs were plated in a 24-well plate in presence of medium, ASP (0.2–20 μg/ml), DEX (1 μg/ml [2.5 μM]; Sigma-Aldrich), or highly purified LPS from *Escherichia coli* (1 μg/ml; InvivoGen, Toulouse, France) for 24 h at 37°C and 5% CO_2. In some experiments, LPS and DEX or ASP were added together. For signaling experiments, RU-486 (kind gift of Michel Renoir) was added to the culture at a 1 μM concentration.

Analysis of cell-surface markers, cytokine, and chemokine production

For immunofluorescence staining, cells were harvested, washed in PBS, and incubated for 20 min at 4°C with the following mAbs: FITC anti-CD80, PE anti-CD86, PE–cyanin-5 anti-CD83 (Beckman Coulter), FITC anti-ILT2, PE anti-ILT4, and PE–cyanin-5 anti-ILT3 (R&D Systems, Lille, France). Cells were stained with corresponding isotype-matched control mAbs. Samples were analyzed by flow cytometry with results expressed as mean variations in percentages of positive cells.

Cytokine measurement was performed in supernatants using the cytometric bead array technology. IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, and TNF-α were measured using the Human Inflammatory CBA kit or CBA Flex sets (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's instructions using an FACSArray instrument and the FCAP Software (BD Biosciences). Chemokine release was measured in DCs

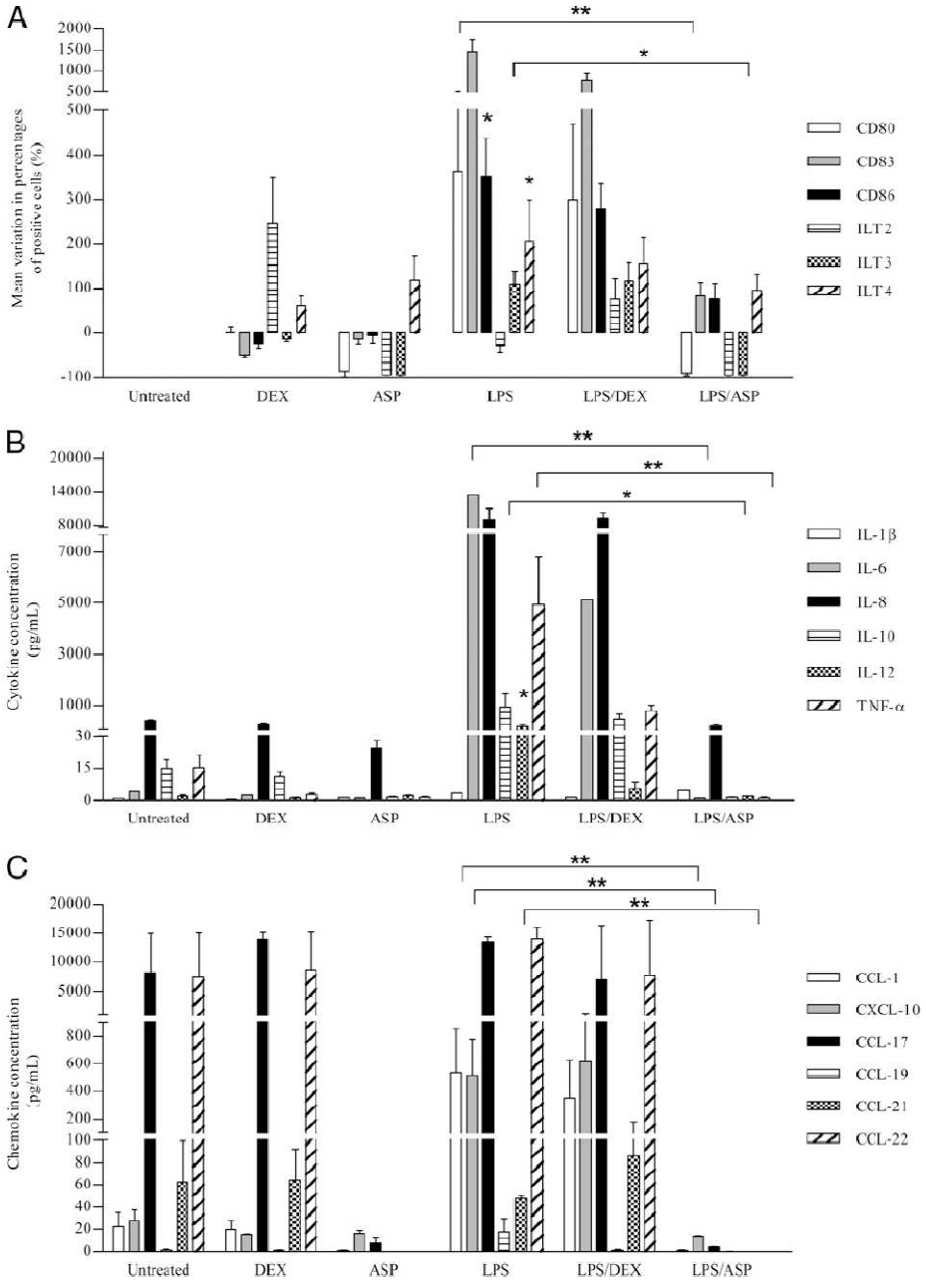


FIGURE 1. ASP-DCs exhibit a tolerogenic phenotype. Monocyte-derived immature DCs were obtained from PBMCs of healthy donors ($n = 4$). Cells were incubated with medium, DEX (1 μg/ml), ASP (20 μg/ml), LPS (1 μg/ml), or combinations for 24 h. Expression of various costimulatory (CD80, CD83, CD86) or inhibitory molecules (ILT2, ILT3, ILT4) was assessed using specific Abs and flow cytometry analysis (*A*). Results are expressed as the mean variation ± SEM in percentages of positive cells when compared with untreated DCs. Supernatants were tested for the presence of IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF-α by cytometric bead array (*B*) or CCL-1, CXCL-10, CCL-17, CCL-19, CCL-21, and CCL-22 by ELISA (*C*). Treatments were compared with controls (unless stated otherwise). $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ were considered significant (Kruskall–Wallis test).

supernatants using Duoset ELISA kits (R&D Systems) for CCL-1, CXCL-10, CXCL-12, CCL-17, CCL-19, CCL-20, CCL-21, and CCL-22 according to the manufacturer's instructions.

RNA isolation and quantitative real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from DCs after a 24-h treatment (unless otherwise specified) using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and cDNAs were synthesized using TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Les Ulis, France) as per the manufacturer's instructions. mRNA expression was evaluated by quantitative PCR on a 7900HT Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with predesigned TaqMan gene expression assays and reagents, according to the manufacturer's instructions. Expression of the following genes was assessed in DCs: GILZ (Hs00608272_m1), IDO (Hs00158032_m1), NOS-2 (Hs00167248_m1), RALDH-1 (Hs00167445_m1), and RALDH-2 (Hs00180254_m1). Data were interpreted for each target gene in comparison with endogenous β-actin (Hs99999903_m1) as a control. The relative amount of target genes in each sample was calculated in comparison with the calibrator sample using the ΔΔ cycle threshold (Ct) method. The magnitude of gene induction was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ for stimulated cells} - \Delta Ct \text{ for unstimulated cells})}$.

DC/T cocultures, anergy, and apoptosis assessment

For DC/T coculture experiments, treated DCs were washed twice with medium and cultured in a 24-well plate with allogeneic $CD4^+$ naive T cells at a 1:10 DC/T ratio for 5 d. Naive $CD4^+$ T cells were isolated from PBMCs by negative selection using the MACS naive CD4 isolation kit II (Miltenyi Biotec, Paris, France), according to the manufacturer's instructions. Such naive T cells were confirmed to be >95% pure based on CD3, CD4, and CD45RA expression evaluated by flow cytometry. Supernatants were analyzed for cytokine release as described earlier. FOXP3 expression was assessed on cocultured T cells after fixation, permeabilization, and staining using a FOXP3 staining kit (eBioscience, San Diego, CA). For measurement of anergy induced in cocultured T cells, $CD4^+$ T cells were isolated using a Dynal negative $CD4^+$ T cell isolation kit (Invitrogen) and cultured 2 d in medium (resting state). T cells were CFSE labeled (Invitrogen) and restimulated with medium, IL-2 (1000 U/ml; Roche Applied Science, Meylan, France), anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads (using one bead per two cells; Miltenyi Biotec), or both during 3 d. Percentages of CFSE-proliferating T cells were assessed by flow cytometry.

To assess potential apoptosis, DCs or T cells were stained with the Vybrant apoptosis kit (Invitrogen) using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) as per the manufacturer's recommendations. Dinitrochlorobenzene (DNCB; Sigma-Aldrich) at a 500 μM concentration was used as a positive control for apoptosis and necrosis induction as suggested by others (39, 40).

T cell suppressive assays

$CD4^+CD25^-$ responder cells were isolated using the MACS $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) through collection of the negative fraction. Cells were CFSE labeled and plated with anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads (ratio 1:1). Cocultured T cells were added at various ratios ranging from 1:2 to 8:1 responder/cocultured T cells and further incubated for 3 d. As negative controls, responder cells and cocultured cells were cultured alone with or without anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads. All dilution series were carried out in duplicate, and responder cell proliferation was assessed by flow cytometry.

Impact of soluble factors on T cell suppression was analyzed by incubating CFSE-labeled $CD4^+$ T cells stimulated with anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads with 4, 20, or 100 μl supernatant from treated DCs/T cells cocultures. Percentages of proliferating cells were determined after 5 d by flow cytometry.

Western blot analysis

Cultured DCs (2×10^6 cells/condition) were washed in cold PBS three times before lysis in 50 μl lysis buffer (20 mM Tris [pH 7.4], 137 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 7.4], 1% Triton, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 1 mM

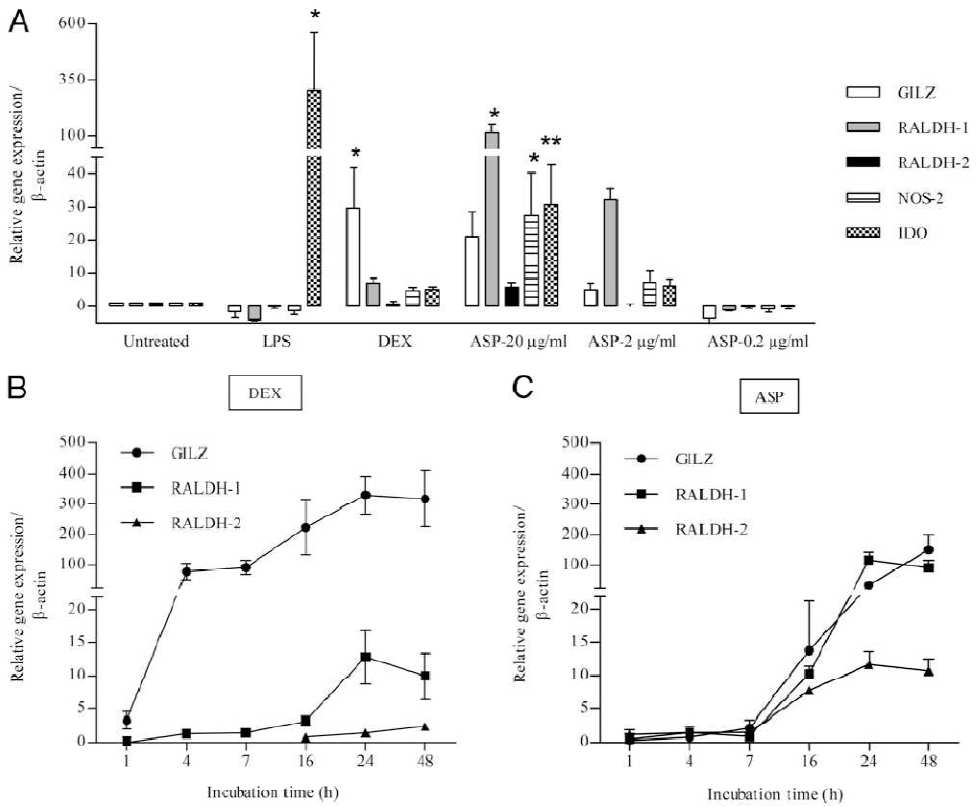


FIGURE 2. Distinct patterns of tolerogenic genes are expressed by ASP-DCs and DEX-DCs. Human DCs obtained from four healthy donors were cultured with medium, ultrapure LPS (1 μg/ml), DEX (1 μg/ml), or ASP at various concentrations (0.2–20 μg/ml) for 24 h (*A*) or at selected time points during 48 h kinetics experiments (ASP at 20 μg/ml) (*B*). Total RNA was isolated, and GILZ, IDO, NOS-2, RALDH-1, and RALDH-2 gene expression was evaluated by quantitative real-time PCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in treated DCs in comparison with DCs incubated in medium alone. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as mean ± SEM values. Treatments were compared with controls. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ were considered significant (Kruskall–Wallis test).

PMSF, 10 μg/ml aprotinin, and 10 μg/ml leupeptin, all purchased from Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged at 15,000 rpm for 20 min at 4°C and supernatants collected. Protein concentration was determined by the Bradford method (protein assay; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), and equal amounts of denatured proteins were loaded onto an SDS-PAGE gel and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Invitrogen). After a 1 h blocking step with TBS containing 3% BSA, membranes were incubated with either rabbit polyclonal Abs raised against GILZ (41) or a rabbit anti-p65 subunit of NF-κB mAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Using an HRP-conjugated anti-rabbit secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD), immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (SuperSignal West Pico; Fisher Scientific, Illkirch, France). Membranes were stripped (ReBlot Plus Mild Ab Stripping Solution; Millipore) and reprobed with an mAb against β-tubulin (Sigma-Aldrich) as loading control or stained with amidoblack (Sigma-Aldrich). Band intensity was determined using Bio1D software (Vilber Lourmat, Marnes-La-Vallée, France).

Protease-specific inhibition

ASP was incubated with protease inhibitors for 1 h prior to incubation with DCs or heat inactivated at 100°C for 15 min. Specific inhibitors used included a mix of metalloprotease inhibitors, the serine protease inhibitor Pefabloc SC (4 mM; Roche Applied Science), the cysteine protease inhibitor E64 (12 μM; Roche Applied Science), and the aspartic protease inhibitor 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propane (EPNP; 9 mM; Acros Organics, Gell, Belgium).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical differences between groups were assessed using the multiple comparison, nonparametric Kruskall–Wallis test. Treatments were compared with controls (unless stated otherwise), and $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered significant. Statistical and graphical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad, La Jolla, CA).

Results

ASP prevents DC maturation while inducing tolerogenic markers

We first investigated the effect of ASP on the expression of costimulatory (CD80, CD83, CD86) or inhibitory receptors (ILT2, ILT3, ILT4) in monocyte-derived DCs (Fig. 1*A*). DCs cultured with medium, LPS, or DEX were used as controls. Combinations of LPS and DEX or ASP were also tested to detect potential cross-inhibitory effects of those molecules. As expected, LPS increased surface expression of CD80, CD83, and CD86 molecules, whereas DEX had no significant effect on the basal expression of these molecules. ASP induced a complete inhibition of CD80 expression on DCs. Regarding inhibitory molecules, DEX-DCs upregulated ILT2, whereas ASP-DCs rather expressed ILT4 while losing surface expression of ILT2 and ILT3. When tested in combination with LPS, DEX did not induce any changes in surface expression of such molecules when compared with LPS alone. In contrast, LPS-ASP-DCs exhibited a phenotype similar to ASP-DCs (i.e., $CD80^{-}CD83^{low}CD86^{low}ILT2^{-}ILT3^{-}ILT4^{+}$), indicating a dramatic antimaturation effect.

We next monitored cytokine and chemokine secretion by treated DCs. LPS induced IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF-α, CCL-1, and CXCL-10 production by DCs, whereas DEX did not induce any of these molecules in comparison with untreated DCs (Fig. 1*B*, 1*C*). ASP-DCs did not secrete cytokines or chemokines (with the exception of 25 pg/ml IL-8) and even showed a reduced basal secretion of IL-10, TNF-α, CCL-17, CCL-21, and CCL-22. The inhibitory effect of ASP was also confirmed on cytokine and

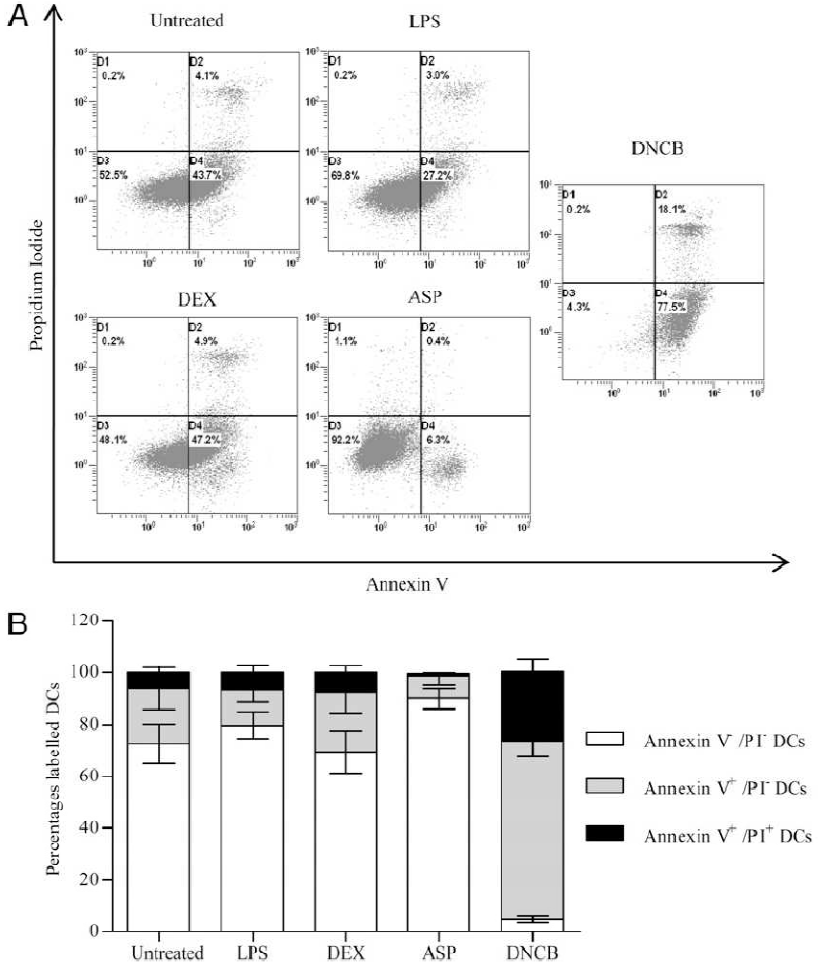


FIGURE 3. ASP does not induce apoptosis in DCs. Human DCs obtained from four healthy donors were cultured with medium, ultrapure LPS (1 μg/ml), DEX (1 μg/ml), ASP (20 μg/ml), or DNCB (500 μM) for 24 h and apoptosis/necrosis were followed after Annexin V/PI staining. A representative donor out of four is presented in *A*, whereas mean ± SEM values are presented in *B*. Differences were not statistically significant using the Kruskall–Wallis test.

chemokine expression because LPS-ASP-DCs secreted substantially less of those molecules when compared with LPS-DCs (Fig. 1*B*, 1*C*).

The expression of various genes involved in the induction of suppressive responses was quantified by real-time PCR after incubation of DCs with LPS, DEX, or ASP (Fig. 2*A*) for 24 h and compared with DCs incubated in medium alone. As expected, LPS did not induce GILZ, NOS-2, or RALDH-1/2 gene expression in DCs but significantly upregulated IDO. DEX slightly induced NOS-2, RALDH-1, and IDO but markedly increased GILZ gene expression. ASP increased GILZ, NOS-2, RALDH-1, RALDH-2, but also IDO gene expression in a dose-dependent manner, thus leading to a tolerogenic phenotype distinct from DEX-DCs.

We further compared the kinetics of gene expression within 1–48 h following treatment with either DEX or ASP (Fig. 2*B*, 2*C*). DEX treatment induced an early and rapid upregulation of GILZ, beginning 1 h after treatment, whereas GILZ was induced only 16 h after ASP treatment. RALDH-2 was also significantly upregulated following ASP treatment, and the latter also induced an earlier and much stronger expression of RALDH-1 when compared with DEX treatment. Collectively, those experiments indicate that ASP-DCs exhibit a tolerogenic phenotype distinct from regulatory DEX-DCs.

ASP treatment does not induce apoptosis of DCs

Because apoptotic DCs have been shown to induce tolerance (42, 43), we investigated whether ASP treatment induces DC apoptosis. DCs were treated with LPS, DEX, ASP, or DNCB (500 μM) as a positive control for 24 h. Annexin V/PI staining indicated that, in contrast to DEX, ASP rather reduces apoptosis and necrosis of DCs (Fig. 3*A*, 3*B*). Thus, tolerance induction by ASP-DCs is not due to apoptosis induction.

ASP-DCs induce FOXP3$^-$ anergic CD4$^+$ T cells with a suppressive activity

We next analyzed the polarization of naive allogeneic CD4$^+$ T cells after coculture with treated DCs. To this aim, DCs were first incubated for 24 h with LPS, DEX, or ASP, then washed and cocultured with CD4$^+$ T cells. Th cell polarization was monitored after 5 d by measuring cytokine levels in culture supernatants (Fig. 4*A*). As expected, LPS and DEX-DCs induced IFN-γ and IL-10 production by T cells, respectively. In contrast, ASP-DCs markedly decreased the secretion of most cytokines tested (i.e., IFN-γ, IL-9, IL-10, and IL-13) when compared with control CD4$^+$ T cells. TGF-β secretion was slightly increased in ASP-DC/T cell cocultures (Fig. 4*B*), but this variation was not statistically significant.

To analyze the impact of ASP-DCs on Treg generation, we monitored FOXP3 intracellular expression in CD4$^+$ T cells after 4 d of coculture. As shown in Fig. 4*C*, no FOXP3 was detected in T cells incubated with DCs treated with either DEX or ASP. Thus, ASP-DCs support the differentiation of CD4$^+$ T cells that do not express FOXP3, whereas T cells induced by DEX-DCs produce IL-10.

To investigate the functionality of CD4$^+$ T cells differentiated in presence of ASP-DCs, we quantified IL-2 secretion by cocultured T cells and restimulated them after a resting period of 2 d, with IL-2, a polyclonal stimulus (i.e., anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads), or both to assess whether T cells were anergic. T cells generated after control or LPS-DCs exposure secreted IL-2 (data not shown) and proliferated in response to all stimuli tested (Fig. 5). In contrast, T cells cocultured with DEX-DCs or ASP-DCs did not secrete IL-2 (not shown) and exhibited a lower proliferation following polyclonal stimulation. Interestingly, whereas DEX-DCs induced a nonreversible anergy, the anergic state of T cells cocultured with ASP-DCs could be reversed by IL-2 supplementation. The T cell unresponsiveness induced by ASP-DCs or DEX-DCs was not due to apoptosis because none of the treatments tested changed significantly the relative proportion of early apop-

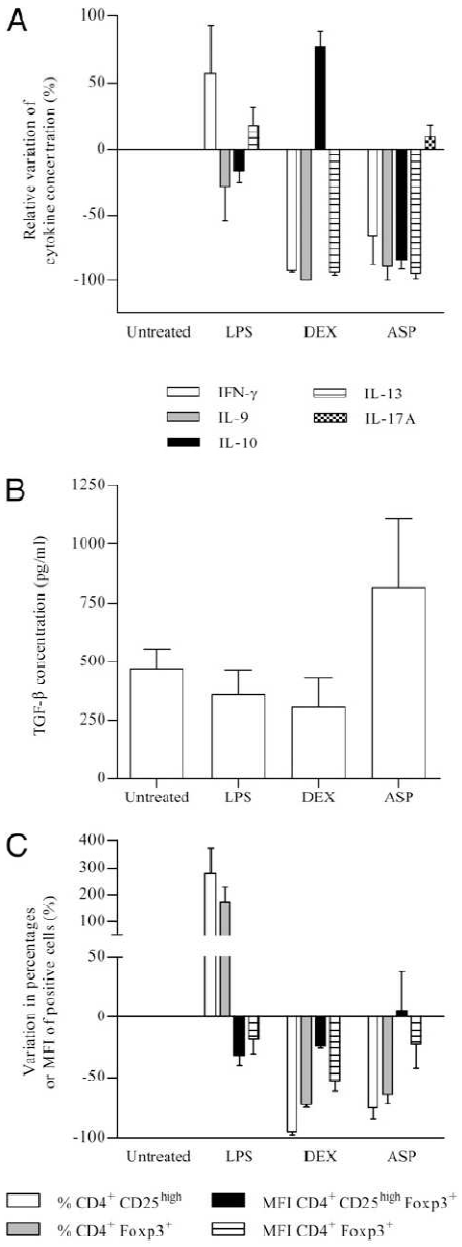


FIGURE 4. CD4$^+$ T cells cocultured with ASP-DCs downregulate cytokine production and do not express FOXP3. Control, LPS, DEX, or ASP-treated DCs were washed and incubated with purified allogeneic naive CD4$^+$ T cells during 5 d for T cell polarization assays (*A*, *B*) and 4 d for FOXP3 staining experiments (*C*). Cytokine expression was analyzed by cytometric bead array (*A*) and ELISA (*B*). FOXP3 expression was followed by flow cytometry after intracellular staining. Data were obtained from four independent experiments conducted with samples from distinct donors. Results in *A* are expressed as the relative variation of cytokine concentration ± SEM between T cells cocultured with either treated or untreated DCs. Results in *B* and *C* are expressed respectively as concentrations (pg/ml) and mean variations in percentages or mean fluorescence intensity of positive cells ± SEM between T cells generated with treated or untreated DCs.

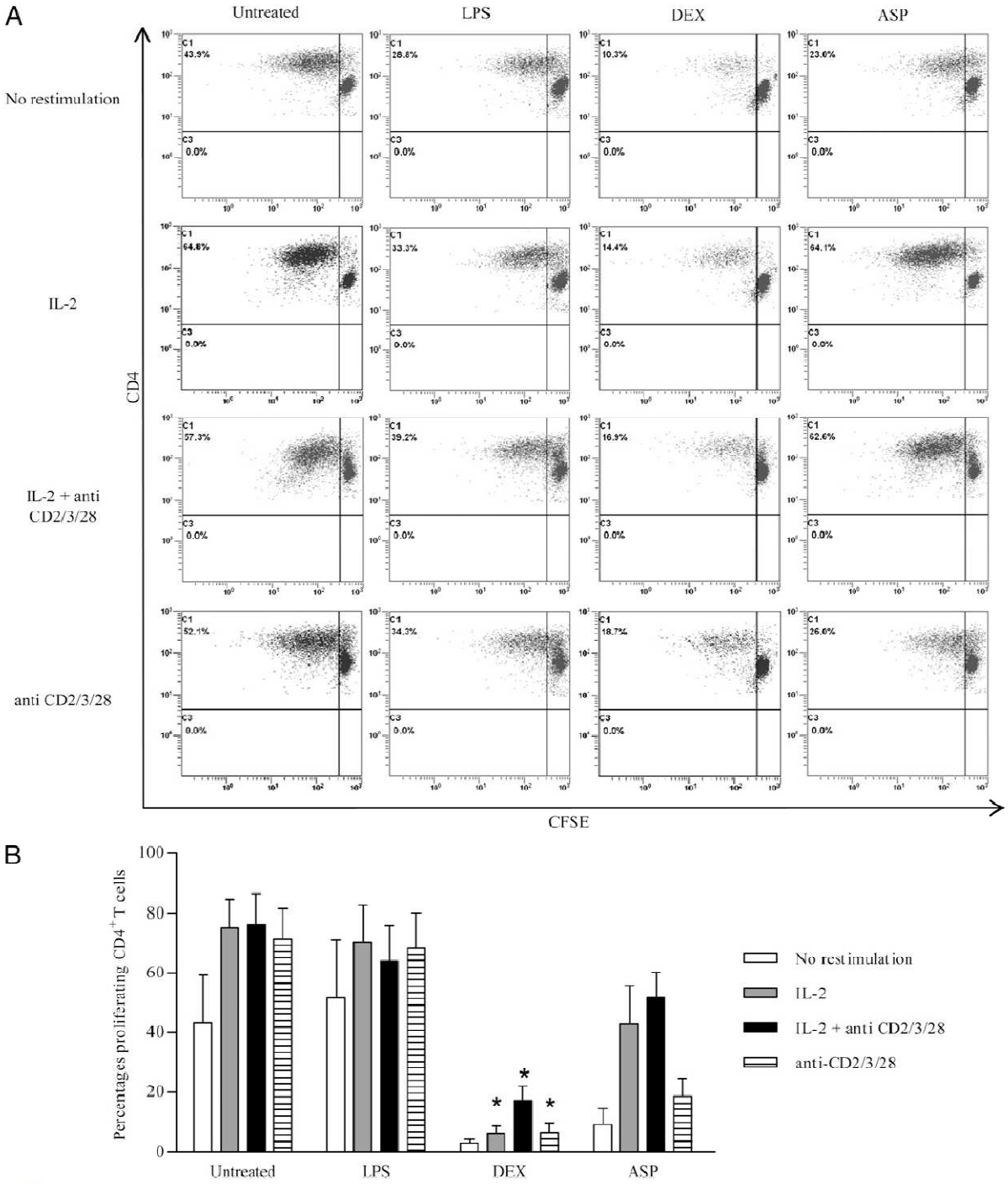


FIGURE 5. ASP-DCs induce a reversible state of anergy in T cells. Cocultured T cells were isolated with Dynal untouched T cell isolation kit after 5 d of coculture. Cells were rested in medium during 2 d, labeled with CFSE, and reactivated with medium, IL-2, anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads, or both during 3 d. T cell proliferation was followed by flow cytometry by quantifying cells with a decreased CFSE-associated fluorescence. Representative patterns of CFSE-associated fluorescence are presented in *A*. Results in *B* are compiled from four independent experiments with samples from distinct donors. $*p < 0.05$.

totic (Annexin V^+PI^-) and dead cells (Annexin V^+PI^+) when compared with T cells cocultured with untreated DCs (Fig. 6*A*).

To determine the suppressive capacity of T cells generated by ASP-DCs, the proliferation of responder $CD4^+CD25^-$ cells was assessed following polyclonal restimulation in the presence of varying ratios of purified cocultured T cells. As shown in Fig. 6*B*, ASP treatment induced T cells which inhibited responder T cell proliferation at a ratio of 2:1 responder/cocultured cells and below. In comparison, DEX-DCs induced suppressive T cells inhibiting responder T cell proliferation at every ratio tested. Thus, ASP-DCs induce suppressive T cells with a reversible anergic phenotype in contrast to DEX-DCs, which rather promote the differentiation of strongly suppressive T cells with an established anergic phenotype.

To further evaluate mechanisms involved in this suppressive effect, CFSE-labeled $CD4^+$ T cells stimulated with anti-CD2,

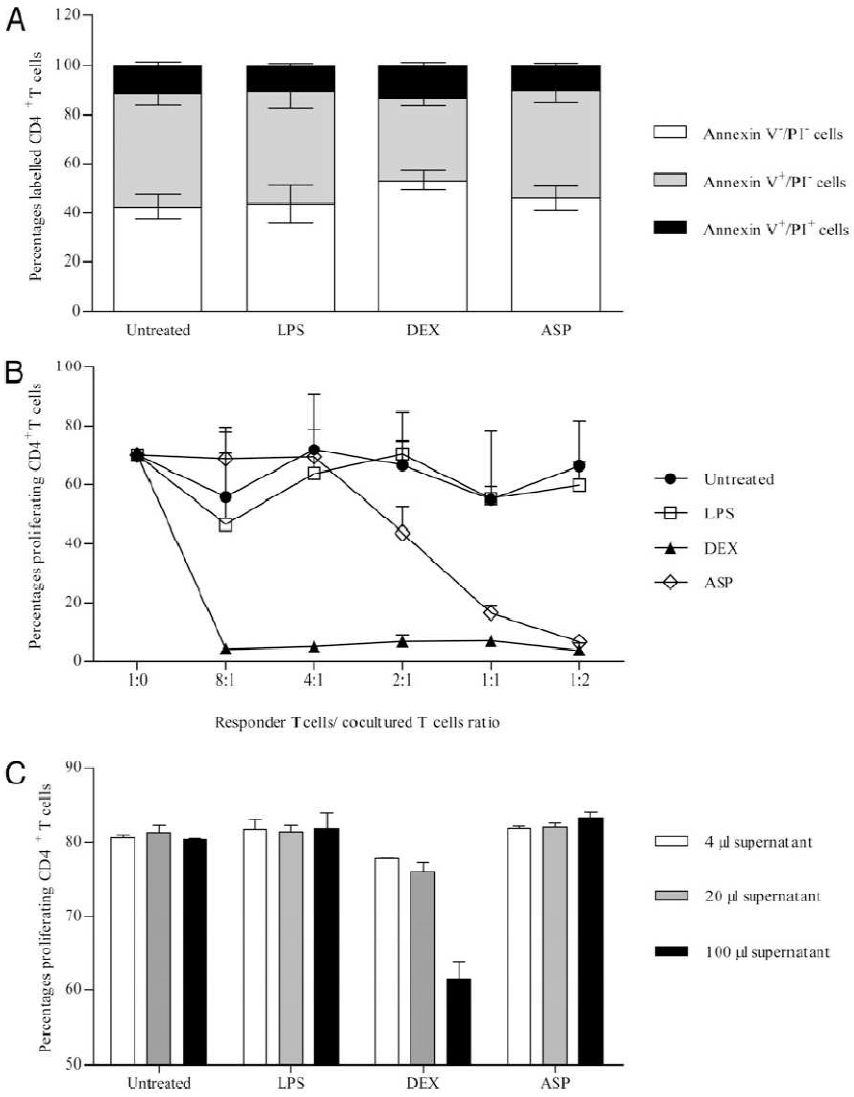


FIGURE 6. ASP-DCs induce nonapoptotic T cells with a suppressive capacity. *A*, For apoptosis assays, T cells were harvested at day 6 and labeled with Annexin V/PI. Percentages of PI^-/Annexin V^-, PI^-/Annexin V^+, and PI^+/Annexin V^+ cells were determined by flow cytometry (mean ± SEM using samples from four healthy donors). *B*, To measure T cell suppressive activity, $CD4^+CD25^-$ responder cells were isolated using the $CD4^+CD25^+$ regulatory T cell isolation kit through collection of the negative fraction. Cells were CFSE labeled and plated with anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads (ratio 1:1). Cocultured T cells were added at ratios ranging from 1:2 to 8:1 responder/cocultured T cells and incubated for 3 d. All determinations were carried out in duplicate, and responder cell proliferation was assessed by flow cytometry. *C*, The potential involvement of soluble factors on T cell suppression was analyzed by incubating CFSE-labeled $CD4^+$ T cells stimulated with anti-CD2, -CD3, and -CD28 beads, with 4, 20, or 100 µl supernatant from treated DC/T cell cocultures. Percentages of proliferating cells were determined after 5 d by flow cytometry. Treatments were compared with controls.

-CD3, and -CD28 beads were incubated with conditioned medium from various DC/T cocultures. As shown in Fig. 6*C*, supernatants from DEX-DC/T cell cocultures inhibit T cell proliferation, whereas ASP-DC/T cell coculture supernatants had no effect. These results confirm that in contrast to Tr1s induced by DEX-DCs, the suppressive effect of T cells generated by ASP-DCs is not mediated by soluble factors.

Aspartic acid-containing proteases are responsible for regulatory gene induction

We subsequently investigated which components of ASP were responsible for the observed tolerogenic effect in DCs. In a first set of experiments, we tested whether small molecules from ASP were potentially involved in the induction of regulatory genes. ASP samples were filtered through 10 kDa cutoff filters, and both the filtrate and retentate were incubated with DCs for 24 h prior to measuring GILZ, NOS-2, RALDH-1, and RALDH-2 gene expression. As shown in Fig. 7*A*, the filtrate did not induce any of the tested genes, whereas the retentate had a preserved capacity to induce GILZ, NOS-2, RALDH-1, and RALDH-2 genes, demonstrating that small molecules (<10 kDa) were not involved in the induction of regulatory genes. DCs were subsequently treated with ASP, for which protease activity had been inactivated by heat (100°C for 15 min) as a positive control or by specific protease inhibitors. Preincubation of ASP with metallo-, serine, or cysteine protease inhibitors did not prevent the induction of regulatory genes (Fig. 7*B*). In contrast, the aspartic acid protease inhibitor EPNP completely inhibited RALDH-2 and partially GILZ, NOS-2, and RALDH-1 gene expression. Together, these results demonstrate that aspartic acid-containing proteases from *A. oryzae* are critical for the induction of regulatory genes.

Tolerance induction by ASP is independent of the glucocorticoid receptor and involves p65 degradation

To further document that distinct molecular mechanisms underlie the induction of tolerogenic DCs following DEX or ASP treatment, we compared GILZ induction in ASP-DCs and DEX-DCs in presence or absence of RU-486, a known glucocorticoid receptor (GR) inhibitor. As shown in Fig. 8*A*, RU-486 significantly inhibited GILZ expression in DEX-DCs but had no impact on GILZ expression in ASP-DCs, indicating that GILZ was induced by a GR-independent pathway in ASP-DCs in contrast to DEX-DCs. These data also confirmed that GILZ was induced later, not only at a transcriptional but also at a protein level in ASP-DCs when compared with DEX-DCs. We subsequently investigated a potential involvement of the NF-κB pathway in ASP-mediated tolerance. Although we did not see any change in IκB expression in ASP-DCs, we could demonstrate that ASP inhibits LPS-

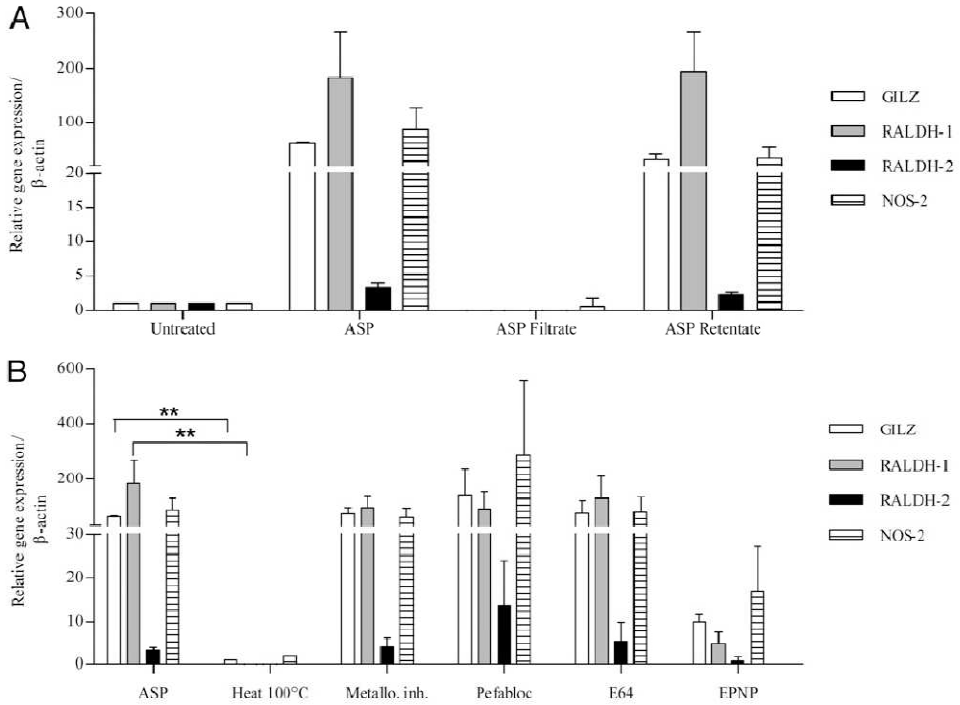


FIGURE 7. Upregulation of tolerogenic genes by ASP involves aspartic acid-containing proteases. *A*, ASP was filtered through 10 kDa cutoff filters, and both filtrates and retentates were incubated with DCs for 24 h. *B*, ASP was inactivated by heating 15 min at 100°C or by incubation with protease inhibitors for 1 h. Specific protease inhibitors used included a mix of metalloprotease inhibitors composed of 1,10-phenanthroline, phosphoramidon, and arphamenine B, the serine protease inhibitor Pefabloc SC, the cysteine protease inhibitor E64, and the aspartic protease inhibitor EPNP. DCs were cultured with medium or treated ASP (20 μg/ml) for 24 h. Gene expression of GILZ, NOS-2, RALDH-1, and RALDH-2 was analyzed by quantitative PCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in DCs treated with either ASP (20 μg/ml) or ASP plus inhibitors in comparison with DCs incubated in medium alone. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as the mean ± SEM obtained from four healthy donors. $^{**}p < 0.01$ (Kruskall–Wallis test).

induced NF-κB translocation (not shown). We also observed an early degradation of p65 (i.e., within 15 min) in ASP-DCs but not in DEX-DCs (Fig. 8*B*), suggesting that ASP treatment may inhibit the NF-κB pathway in a distinct manner. To investigate which proteases were potentially responsible for p65 degradation, we incubated ASP-DCs with specific protease inhibitors. Surprisingly, aspartic acid protease inhibitor did not prevent p65 degradation in contrast to serine, cysteine, and metalloprotease inhibitors, as shown in Fig. 8*C*. As a control, heat-inactivated ASP completely prevented p65 degradation in DCs. Collectively, these results indicate that proteases from ASP may synergize to induce tolerance, with aspartic acid-containing proteases inducing regulatory genes and serine, cysteine, and metalloproteases contributing to p65 degradation.

Discussion

Tolerogenic DCs are physiologically important because they can induce Tregs, preventing or controlling autoimmunity, allergy, and graft rejection (8–13). As of today, various conditioning strategies are being considered to generate tolerogenic DCs. This includes DC treatment with anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF-β) (4, 44, 45), neuropeptides (46, 47), immunosuppressive drugs (e.g., dexamethasone, mitomycin C, rapamycin) (16, 19, 48, 49), or vitamins (1,25-dihydroxy-vitamin D3, vitamin A) (16, 17, 35, 50, 51). Genetic engineering of DCs has also been used to enhance the expression of IL-10 (52), TGF-β (53), soluble TNFR (54), intracellular CTLA-4 (55), or FOXP3 molecules (56) or to prevent activation of the NF-κB pathway (57).

In this study, we identified a new pathway to induce tolerogenic DCs by treating monocyte derived-DCs with proteases from *A. oryzae*, a fungus commonly used to produce traditional fermented food, enzymes, antibiotics, beverages, and volatile compounds (16). Our results demonstrate that treatment with ASP induces DCs with a $CD80^{-}CD83^{-}CD86^{-}ILT2^{-}ILT3^{-}ILT4^{+}$ phenotype, which do not secrete cytokines or chemokines and upregulate well- known tolerogenic markers such as GILZ (29, 30), IDO (58–60), NOS-2 (61, 62), RALDH-1, or RALDH-2 (35, 51, 63, 64). ASP-DCs are clearly different from DEX-DCs because the latter promote the generation of anergic IL-10–producing Tr1s with a suppressive activity partially mediated by soluble factors, in agreement with the literature (15, 16). In contrast, ASP-DCs rather induce anergic suppressive $CD4^{+}$ T cells, which do not express FOXP3 or secrete IL-10, but secrete low amounts of TGF-β. Importantly, the suppressive effect of such T cells could not be correlated with the production of soluble factors. Inhibition studies further highlighted the involvement of various proteases within ASP in the induction of regulatory properties in DCs.

Our results are in agreement with other studies suggesting a potential tolerogenic role of *Aspergillus*-derived molecules. *Aspergillus* infection was reported to induce the generation of IDO^{+} tolerogenic DCs promoting the local recruitment of $CD4^{+}CD25^{+}$ Tregs (65). These cells suppressed Th2 responses to the fungus through the combined action of IL-10 and CTLA-4, suggesting that such regulatory mechanisms operating at the level of DCs may be used by fungi to dampen host immune responses and induce a state of immune tolerance (65). In support of this hypothesis, we observed that culture supernatants from other *Aspergillus* strains such as *A. fumigatus* or *A. niger* also induce a regulatory DC phenotype (not shown). Interestingly, various *A. fumigatus* components have been shown by others to exhibit dramatically different immunomodulatory properties. For example, secreted proteins induce Th2 cell activation, glycolipids Th17

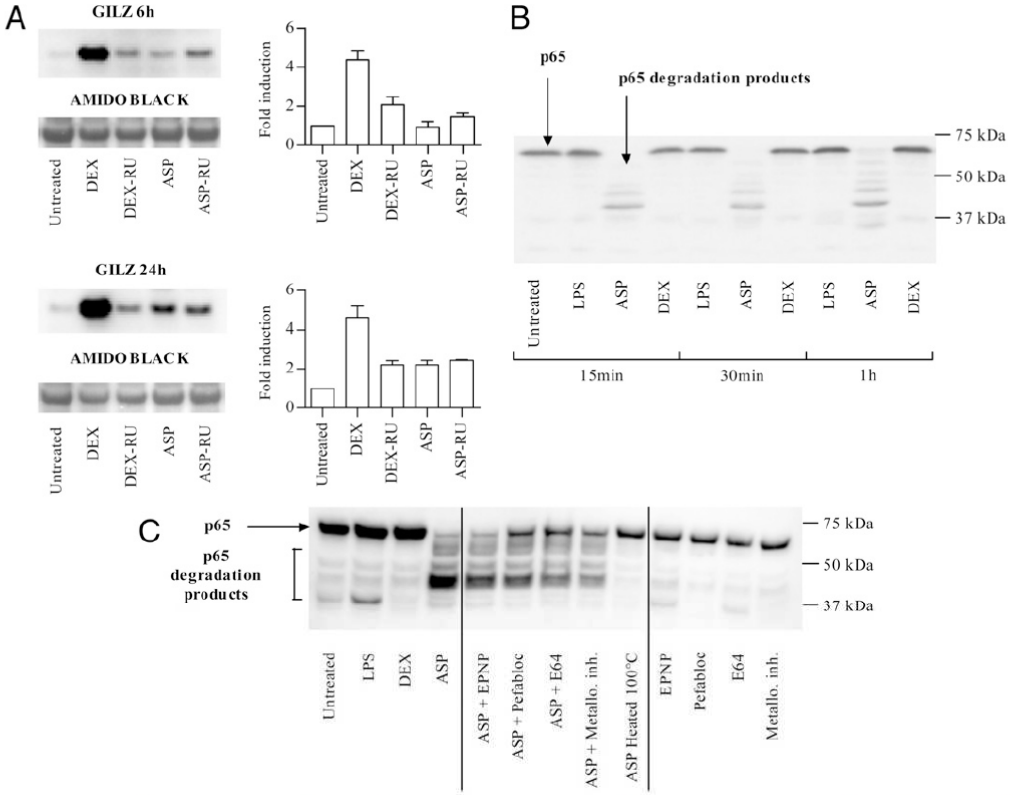


FIGURE 8. Tolerance induction by ASP is independent of the GR and involves p65 degradation. *A*, DCs were treated with DEX and ASP with or without RU-486 for 6 or 24 h. Cells were lysed and GILZ protein expression was assessed by Western blotting using a rabbit anti-GILZ pAb. Membranes were stained with amidoblack as a loading control. Results are expressed as fold increases in protein expression determined as a ratio between normalized intensities of treated cells and untreated cells. Results are representative of three independent experiments. *B*, p65 expression was analyzed by Western blotting in DCs incubated for 15, 30, or 60 min with either LPS, DEX, or ASP. *C*, p65 expression was analyzed by Western blotting in DCs incubated for 30 min with either LPS, DEX, ASP, ASP preincubated with specific protease inhibitors, or heat-inactivated ASP. DCs treated with proteases inhibitors alone were used as controls.

responses, membrane proteins mixed Th1/Treg responses, and polysaccharides mostly stimulate IL-10 production (66). Among those molecules, a protease has been shown to induce Th1/Treg responses in murine and human immune cells (66). Live *A. fumigatus* was also shown to downregulate the proinflammatory function of mouse airway DCs exposed to mite allergens (67). In contrast, other studies rather suggested that ASP treatment leads to partially matured DCs, driving a Th2 cell polarization with IL-4 and IL-5 production (68) and allergic lung inflammation in mice (69). Reasons for these discrepancies are presently unclear but could be due to fungal strain differences or to the impact of ASP on other cells beyond DCs, such as basophils or epithelial cells, which in those experimental systems could contribute to Th2 polarization (70–72).

Mechanisms involved in tolerogenic properties of both ASP-DCs and subsequently generated suppressive T cells support the novelty of the described phenotype. In comparison with DEX-DCs, ASP-DCs induce a similar upregulation of GILZ, but signaling pathways involved are distinct. Moreover, NF-κB inhibition is linked to p65 degradation in ASP-DCs only.

ASP-DCs also upregulate both RALDH-1 and RALDH-2, two enzymes responsible for the conversion of vitamin A to retinoic acid. This latter metabolite has been described as a crucial inducer of $FOXP3^+$ and IL-10–secreting Tregs (64, 73). Noteworthy, none of the latter molecules were found in $CD4^+$ T cells cocultured with ASP-DCs, indicating that other regulatory mechanisms are involved. ILT4 could contribute to the tolerogenic effect of ASP-DCs following interaction with HLA-G as reported for IL-10–DCs (4). Although both treatments induce anergic T cells (74, 75), generated cells are different because only IL-10 DCs induce bona fide Tr1s (4). ILT3 and CCL-22 are specifically downregulated in ASP-DCs but not DEX-DCs. Similarly, DCs treated with vitamin D receptor agonists are distinct, because they upregulate ILT3 and IL-10, induce $CD4^+$ $FOXP3^+$ suppressive T cells, and enhance the production of the CCL-22 chemokine recruiting Tregs (76).

Altogether, our work points to a new, potentially important, pathway to induce tolerogenic anergizing DCs. This pathway may be used in vivo by fungi for subverting the immune system and inducing a state of unresponsiveness. ASP treatment could also be of clinical interest to specifically downregulate unwanted immune responses and establish tolerance in transplantation, autoimmunity, or allergy.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
2. van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27: 660–669.
3. de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh, and M. L. Kapsenberg. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting

dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* 168: 1704–1709.
4. Gregori, S., D. Tomasoni, V. Pacciani, M. Scirpoli, M. Battaglia, C. F. Magnani, E. Hauben, and M. G. Roncarolo. 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116: 935–944.
5. Ilarregui, J. M., D. O. Croci, G. A. Bianco, M. A. Toscano, M. Salatino, M. E. Vermeulen, J. R. Geffner, and G. A. Rabinovich. 2009. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat. Immunol.* 10: 981–991.
6. Adorini, L., N. Giarratana, and G. Penna. 2004. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 16: 127–134.
7. Pulendran, B., H. Tang, and S. Manicassamy. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol.* 11: 647–655.
8. Boissier, M. C., E. Assier, J. Biton, A. Denys, G. Falgarone, and N. Bessis. 2009. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 76: 10–14.
9. Trenado, A., S. Fisson, E. Braunberger, D. Klatzmann, B. L. Salomon, and J. L. Cohen. 2004. Ex vivo selection of recipient-type alloantigen-specific CD4 (+)CD25(+) immunoregulatory T cells for the control of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 77 (1 Suppl): S32–S34.
10. Turnquist, H. R., R. T. Fischer, and A. W. Thomson. 2010. Pharmacological modification of dendritic cells to promote their tolerogenicity in transplantation. *Methods Mol. Biol.* 595: 135–148.
11. Trzonkowski, P., M. Bieniaszewska, J. Juścińska, A. Dobyszuk, A. Krzystyniak, N. Marek, J. Myśliwska, and A. Hellmann. 2009. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin. Immunol.* 133: 22–26.
12. Palomares, O., G. Yaman, A. K. Azkur, T. Akkoc, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.* 40: 1232–1240.
13. Bohle, B., T. Kinaciyan, M. Gerstmayr, A. Radakovics, B. Jahn-Schmid, and C. Ebner. 2007. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 707–713.
14. Rescigno, M. 2010. Dendritic cells in tolerance induction for the treatment of autoimmune diseases. *Eur. J. Immunol.* 40: 2119–2123.
15. Bosma, B. M., H. J. Metselaar, N. M. Nagtzaam, R. de Haan, S. Mancham, L. J. van der Laan, E. J. Kuipers, and J. Kwekkeboom. 2008. Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. *Immunology* 125: 91–100.
16. Unger, W. W., S. Laban, F. S. Kleijwegt, A. R. van der Slik, and B. O. Roep. 2009. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.* 39: 3147–3159.
17. Pedersen, A. W., K. Holmstrøm, S. S. Jensen, D. Fuchs, S. Rasmussen, P. Kvistborg, M. H. Claesson, and M. B. Zocca. 2009. Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 157: 48–59.
18. Woltman, A. M., J. W. de Fijter, S. W. Kamerling, L. C. Paul, M. R. Daha, and C. van Kooten. 2000. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 1807–1812.
19. Xia, C. Q., R. Peng, F. Beato, and M. J. Clare-Salzler. 2005. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand. J. Immunol.* 62: 45–54.
20. Emmer, P. M., J. van der Vlag, G. J. Adema, and L. B. Hilbrands. 2006. Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation* 81: 1451–1459.
21. Vizzardelli, C., N. Pavelka, A. Luchini, I. Zanoni, L. Bendickson, M. Pelizzola, O. Beretta, M. Foti, F. Granucci, M. Nilsen-Hamilton, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2006. Effects of dexamethazone on LPS-induced activationand migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *Eur. J. Immunol.* 36: 1504–1515.
22. Roelen, D. L., D. H. Schuurhuis, D. E. van den Boogaardt, K. Koekkoek, P. P. van Miert, J. J. van Schip, S. Laban, D. Rea, C. J. Melief, R. Offringa, et al. 2003. Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation* 76: 1608–1615.
23. Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini, and N. Suciu-Foca. 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl. Immunol.* 11: 245–258.
24. Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suciu-Foca. 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3: 237–243.
25. Svajger, U., A. Vidmar, and M. Jeras. 2008. Niflumic acid renders dendritic cells tolerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4. *Int. Immunopharmacol.* 8: 997–1005.
26. Gleissner, C. A., and T. J. Dengler. 2009. Induction of ILT expression on non-professional antigen presenting cells: Clinical applications. *Hum. Immunol.* 70: 357–359.
27. Vlad, G., C. C. Chang, A. I. Colovai, E. R. Vasilescu, R. Cortesini, and N. Suciu-Foca. 2010. Membrane and soluble ILT3 are critical to the generation of T suppressor cells and induction of immunological tolerance. *Int. Rev. Immunol.* 29: 119–132.
28. Brenk, M., M. Scheler, S. Koch, J. Neumann, O. Takikawa, G. Häcker, T. Bieber, and D. von Bubnoff. 2009. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 183: 145–154.
29. Cohen, N., E. Mouly, H. Hamdi, M. C. Maillot, M. Pallardy, V. Godot, F. Capel, A. Balian, S. Naveau, P. Galanaud, et al. 2006. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 107: 2037–2044.
30. Hamdi, H., V. Godot, M. C. Maillot, M. V. Prejean, N. Cohen, R. Krzysiek, F. M. Lemoine, W. Zou, and D. Emilie. 2007. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 110: 211–219.
31. Ayroldi, E., G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D'Adamio, and C. Riccardi. 2001. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98: 743–753.
32. Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204: 1775–1785.
33. Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Cárcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204: 1757–1764.
34. Geissmann, F., P. Revy, N. Brousse, Y. Lepelletier, C. Folli, A. Durandy, P. Chambon, and M. Dy. 2003. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 623–634.
35. Manicassamy, S., and B. Pulendran. 2009. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin. Immunol.* 21: 22–27.
36. Guilliams, M., K. Crozat, S. Henri, S. Tamoutounour, P. Grenot, E. Devilard, B. de Bovis, L. Alexopoulou, M. Dalod, and B. Malissen. 2010. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* 115: 1958–1968.
37. Chen, C., W. H. Lee, L. Zhong, and C. P. Liu. 2006. Regulatory T cells can mediate their function through the stimulation of APCs to produce immunosuppressive nitric oxide. *J. Immunol.* 176: 3449–3460.
38. Ogawa, A., A. Yasuhara, T. Tanaka, T. Sakiyama, and K. Nakanishi. 1995. Production of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus* oryzae IAM2704. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 35–40.
39. Manome, H., S. Aiba, and H. Tagami. 1999. Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology* 98: 481–490.
40. Ohtani, T., M. Mizuashi, S. Nakagawa, Y. Sasaki, T. Fujimura, R. Okuyama, and S. Aiba. 2009. TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* 126: 485–499.
41. Asselin-Labat, M. L., M. David, A. Biola-Vidamment, D. Lecoeuche, M. C. Zennaro, J. Bertoglio, and M. Pallardy. 2004. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104: 215–223.
42. Kushwah, R., J. Wu, J. R. Oliver, G. Jiang, J. Zhang, K. A. Siminovitch, and J. Hu. 2010. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC, which induce differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 40: 1022–1035.
43. Kushwah, R., and J. Hu. 2010. Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J. Immunol.* 185: 795–802.
44. Belladonna, M. L., C. Volpi, R. Bianchi, C. Vacca, C. Orabona, M. T. Pallotta, L. Boon, S. Gizzi, M. C. Fioretti, U. Grohmann, and P. Puccetti. 2008. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J. Immunol.* 181: 5194–5198.
45. Steinbrink, K., E. Graulich, S. Kubsch, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99: 2468–2476.
46. Delgado, M. 2009. Generating tolerogenic dendritic cells with neuropeptides. *Hum. Immunol.* 70: 300–307.
47. Pozo, D., P. Anderson, and E. Gonzalez-Rey. 2009. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *J. Immunol.* 183: 4346–4359.
48. Jiga, L. P., T. M. Bauer, J. J. Chuang, G. Opelz, and P. Terness. 2004. Generation of tolerogenic dendritic cells by treatment with mitomycin C: inhibition of allogeneic T-cell response is mediated by downregulation of ICAM-1, CD80, and CD86. *Transplantation* 77: 1761–1764.
49. Haidinger, M., M. Poglitsch, R. Geyeregger, S. Kasturi, M. Zeyda, G. J. Zlabinger, B. Pulendran, W. H. Hörl, M. D. Säemann, and T. Weichhart. 2010. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *J. Immunol.* 185: 3919–3931.
50. Széles, L., G. Keresztes, D. Töröcsik, Z. Balajthy, L. Krenács, S. Póliska, A. Steinmeyer, U. Zuegel, M. Pruenster, A. Rot, and L. Nagy. 2009. 1,25-dihydroxyvitamin D3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype. *J. Immunol.* 182: 2074–2083.
51. Manicassamy, S., R. Ravindran, J. Deng, H. Oluoch, T. L. Denning, S. P. Kasturi, K. M. Rosenthal, B. D. Evavold, and B. Pulendran. 2009. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat. Med.* 15: 401–409.
52. Henry, E., C. J. Desmet, V. Garzé, L. Fiévez, D. Bedoret, C. Heirman, P. Faisca, F. J. Jaspar, P. Gosset, A. P. Jacquet, et al. 2008. Dendritic cells genetically

engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *J. Immunol.* 181: 7230–7242.
53. Gorczynski, R. M., J. Bransom, M. Cattral, X. Huang, J. Lei, L. Xiaorong, W. P. Min, Y. Wan, and J. Gauldie. 2000. Synergy in induction of increased renal allograft survival after portal vein infusion of dendritic cells transduced to express TGFbeta and IL-10, along with administration of CHO cells expressing the regulatory molecule OX-2. *Clin. Immunol.* 95: 182–189.
54. Wang, Q., Y. Liu, J. Wang, G. Ding, W. Zhang, G. Chen, M. Zhang, S. Zheng, and X. Cao. 2006. Induction of allospecific tolerance by immature dendritic cells genetically modified to express soluble TNF receptor. *J. Immunol.* 177: 2175–2185.
55. Tan, P. H., J. B. Yates, S. A. Xue, C. Chan, W. J. Jordan, J. E. Harper, M. P. Watson, R. Dong, M. A. Ritter, R. I. Lechler, et al. 2005. Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. *Blood* 106: 2936–2943.
56. Lipscomb, M. W., J. L. Taylor, C. J. Goldbach, S. C. Watkins, A. K. Wesa, and W. J. Storkus. 2010. DC expressing transgene Foxp3 are regulatory APC. *Eur. J. Immunol.* 40: 480–493.
57. Tomasoni, S., S. Aiello, L. Cassis, M. Noris, L. Longaretti, R. A. Cavinato, N. Azzollini, A. Pezzotta, G. Remuzzi, and A. Benigni. 2005. Dendritic cells genetically engineered with adenoviral vector encoding dnIKK2 induce the formation of potent CD4+ T-regulatory cells. *Transplantation* 79: 1056–1061.
58. Orabona, C., P. Puccetti, C. Vacca, S. Bicciato, A. Luchini, F. Fallarino, R. Bianchi, E. Velardi, K. Perruccio, A. Velardi, et al. 2006. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107: 2846–2854.
59. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762–774.
60. Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, et al. 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297: 1867–1870.
61. Yanagawa, Y., K. Iwabuchi, and K. Onoé. 2009. Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. *Immunology* 127: 345–353.
62. Hill, M., R. Zagani, C. Voisine, C. Usal, and I. Anegon. 2007. Nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase mediate CTLA4Ig-induced survival in heart allografts in rats. *Transplantation* 84: 1060–1063.
63. Xiao, S., H. Jin, T. Korn, S. M. Liu, M. Oukka, B. Lim, and V. K. Kuchroo. 2008. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol.* 181: 2277–2284.
64. Kang, S. G., H. W. Lim, O. M. Andrisani, H. E. Broxmeyer, and C. H. Kim. 2007. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 179: 3724–3733.
65. Montagnoli, C., F. Fallarino, R. Gaziano, S. Bozza, S. Bellocchio, T. Zelante, W. P. Kurup, L. Pitzurra, P. Puccetti, and L. Romani. 2006. Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J. Immunol.* 176: 1712–1723.
66. Bozza, S., C. Clavaud, G. Giovannini, T. Fontaine, A. Beauvais, J. Sarfati, C. D'Angelo, K. Perruccio, P. Bonifazi, S. Zagarella, et al. 2009. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J. Immunol.* 183: 2407–2414.
67. Fukahori, S., H. Matsuse, T. Tsuchida, T. Kawano, S. Tomari, C. Fukushima, and S. Kohno. 2010. *Aspergillus fumigatus* regulates mite allergen-pulsed dendritic cells in the development of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 40: 1507–1515.
68. Lamhamedi-Cherradi, S. E., R. E. Martin, T. Ito, F. Kheradmand, D. B. Corry, Y. J. Liu, and M. Moyle. 2008. Fungal proteases induce Th2 polarization through limited dendritic cell maturation and reduced production of IL-12. *J. Immunol.* 180: 6000–6009.
69. Kheradmand, F., A. Kiss, J. Xu, S. H. Lee, P. E. Kolattukudy, and D. B. Corry. 2002. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. *J. Immunol.* 169: 5904–5911.
70. Phillips, C., W. R. Coward, D. I. Pritchard, and C. R. Hewitt. 2003. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *J. Leukoc. Biol.* 73: 165–171.
71. Sokol, C. L., G. M. Barton, A. G. Farr, and R. Medzhitov. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.* 9: 310–318.
72. Kouzaki, H., S. M. O'Grady, C. B. Lawrence, and H. Kita. 2009. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J. Immunol.* 183: 1427–1434.
73. Maynard, C. L., R. D. Hatton, W. S. Helms, J. R. Oliver, C. B. Stephensen, and C. T. Weaver. 2009. Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206: 343–357.
74. Ristich, V., W. Zhang, S. Liang, and A. Horuzsko. 2007. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. *Hum. Immunol.* 68: 264–271.
75. Ristich, V., S. Liang, W. Zhang, J. Wu, and A. Horuzsko. 2005. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur. J. Immunol.* 35: 1133–1142.
76. Adorini, L., and G. Penna. 2009. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum. Immunol.* 70: 345–352.

2. <u>Article 2 :</u> Caractérisation moléculaire des cellules dendritiques tolérogènes, identification de marqueurs d'efficacité de l'immunothérapie allergénique sublinguale.

Ce travail a tout d'abord consisté à développer un modèle cellulaire humain de DCs effectrices et régulatrices *in vitro*. Pour cela, des DCs dérivées de monocytes ont été traitées avec soit du LPS bactérien (DC1), soit du PGN de *Staphylococcus aureus* (DC17), soit de la DEX (DCreg (cellule dendritique régulatrice)). Les DCs obtenues ont été caractérisées *in vitro via* l'expression de molécules de costimulation (CD80, CD83, CD86) ou de molécules inhibitrices (ILT2, ILT3, ILT4) ainsi que de la sécrétion de cytokines. La polarisation T induite après coculture avec les DCs traitées a été caractérisée et correspond bien à une polarisation Th1 pour les DC1 (IFN-γ), Th17 pour les DC17 (IL-17A), et Treg pour les DCregs (IL-10, capacité suppressive).

Une première analyse de l'intégralité du protéome a été entreprise par 2D-DIGE avec des gradients permettant de se focaliser dans une zone de pH restreinte comprise entre 5.3 et 6.5. L'analyse différentielle a permis d'identifier huit marqueurs spécifiques des DCs régulatrices (ANXA1, CLIC2, FKBP5, F13A, GPX1, IMDH2, OSF1 et TPP1), un marqueur spécifique des DC1 (MX1) et différents marqueurs de DCs effectrices (FSCN1, IRF4). L'expression de ces marqueurs a été validée au niveau protéique mais é au niveau des transcrits.

Une deuxième analyse de l'ensemble du protéome a été entreprise par LC-MS/MS sans marquage. Cette méthode est complémentaire à la précédente puisqu'il n'y a pas de restriction au niveau des pIs des protéines étudiées. L'analyse différentielle a permis d'identifier huit marqueurs spécifiques des DCs régulatrices dont quatre qui étaient déjà mis en évidence en 2D-DIGE (marqueurs supplémentaires : C1Q, STAB1, MRC1, CATC). Un marqueur spécifique des DC17 a été identifié (PGRP1) ainsi que différents marqueurs de DCs effectrices (ICAM1, NMES1, TRAF1, TFR1/CD71). L'expression de ces marqueurs a été validée au niveau protéique mais également au niveau des transcrits.

Afin d'établir la spécificité ou non de ces marqueurs vis-à-vis des DEX-DCs utilisées dans l'étude, plusieurs autres modèles de DCs tolérogènes ont été développés à partir de la littérature. L'expression des potentiels marqueurs de tolérance a été suivie et a permis de regrouper les marqueurs en fonction de leur degré de spécificité pour un ou plusieurs modèles. Par ailleurs, une étude bibliographique de l'expression de ces protéines dans les autres cellules immunitaires (LTs, LBs…) a été entreprise afin de savoir si leur expression était restreinte aux CPAs.

Finalement, l'expression des marqueurs les plus pertinents (induction la plus importante, expression dans plusieurs modèles de DCs tolérogènes, expression restreinte aux DCs ou au moins aux CPAs) a été suivie dans des échantillons cliniques issus de patients ayant suivis une ITSL spécifique de 5 graminées (étude clinique VO56.07A). C1Q et STAB1 se sont révélés surexprimés dans les PBMCs après traitement et uniquement chez les patients répondeurs. Ces deux marqueurs représentent donc des biomarqueurs potentiels de l'efficacité à court terme de l'ITA. Ils pourront permettre de discriminer rapidement les patients répondeurs des non-répondeurs, améliorant ainsi significativement le suivi des patients au cours de l'immunothérapie. Ceci est une première étape vers la médecine personnalisée qui tend à se développer dans de nombreuses pathologies, y compris l'allergie respiratoire.

A regulatory dendritic cell signature correlates with clinical efficacy of allergen specific immunotherapy.

Aline Zimmer*, Julien Bouley*, Maxime Le Mignon*, Elodie Pliquet*, Stéphane Horiot*, Mathilde Turfkruyer*, Véronique Baron-Bodo*, Friedrich Horak¶, Emmanuel Nony*, Laurent Mascarell*, Philippe Moingeon*

* Stallergenes, 6 rue Alexis de Tocqueville, 92183 Antony cedex, France

¶ ENT department, Medical University Vienna, Vienna, Austria

Corresponding author: Moingeon Philippe, tel: 0033 1 55 59 25 35, fax: 0033 1 55 59 21 02, pmoingeon@stallergenes.fr

ABSTRACT

Surrogate markers of allergen-specific immunotherapy efficacy are critical to identify responder versus non-responder patients and to adapt treatment modalities. Herein, differential gel electrophoresis and label free mass spectrometry were used to define molecular signatures of both regulatory, as well as effector (*i.e.* DC1, DC17) dendritic cells. Most particularly, Stabilin 1 and the complement component C1Q were identified as molecular markers associated with various types of regulatory dendritic cells, induced by Dexamethasone, 1,25 dihydroxy-vitamin D3 or IL-10. The expression of such tolerogenic DC markers was increased in PBMCs from grass pollen allergic patients exhibiting clinical responses during sublingual immunotherapy, as opposed to non-responders or to patients treated with the placebo. We conclude that C1Q and Stabilin 1 can be used as biomarkers of early efficacy of allergen-specific immunotherapy.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) are specialized antigen presenting cells that integrate a variety of incoming signals to orchestrate adaptive immune responses. Bidirectional interactions between DCs and T cells initiate either effector or tolerogenic responses, which are crucial to establish appropriate defense mechanisms, while precluding uncontrolled inflammation [1]. Depending upon the type of pathogen encountered and the profile of co-stimulatory molecules engaged, DCs are at the inception of immune polarization, with a capacity to drive the development of either Th1, Th2, Th17 effector or suppressive/ regulatory $CD4^+$ T cells [2-6].

Nowadays, there is a great interest in characterizing molecular markers associated with polarized DCs (respectively termed DC1, DC2, DC17 and DCreg), with the assumption that i) they can be used as an early signature of the subsequent orientation of antigen-specific adaptive immune responses [7], and ii) as such may find obvious applications to monitor the efficacy of immunotherapy protocols. Those molecular patterns could potentially be used as surrogate markers of efficacy, to follow the immunological status of patients undergoing immunotherapy and potentially modulate treatment schemes accordingly [8]. For example, specific phenotypic variations of dendritic or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) have been described as predictive of long term adaptive responses induced after yellow fever or flu vaccination in humans [9].

Herein, we identified novel biomarkers specific for DC polarization which could be used in support of allergen-specific immunotherapy. Specifically, with evidence that monocyte-derived DCs accessible in the blood express functionally relevant markers associated with various differentiation patterns [10], we focused on those cells to investigate early orientations of adaptive immune responses. We developed various subtypes of effector and regulatory human DCs *in vitro* and compared their whole cell proteomes using two complementary quantitative proteomic strategies, *i.e.* differential gel electrophoresis (DIGE) and label-free mass spectrometry techniques. Among the various markers identified for DC1, DC17 and various DCreg subsets, we report that C1Q and

STAB1 are associated with tolerogenic DCs, and as such, are indicative of clinical responses induced by allergen-specific immunotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Monocyte-derived DC polarization

Human PBMCs were separated out of buffy coats obtained from healthy volunteers (Etablissement Français du Sang, Rungis, France) by centrifugation over a Ficoll-Paque plus gradient (PAA, Les Mureaux, France). Monocytes were purified through negative selection with the untouched human monocyte kit (Dynal, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). To generate monocyte-derived DCs, 5 to 8.10^7 cells were cultured at 37°C, 5% CO_2 in RPMI medium with stable glutamine supplemented with 10 µg/ml gentamycin, 50 µM 2-ME, 1% nonessential amino acids (all from Invitrogen) and 10% fetal calf serum (Gentaur, Brussels, Belgium) in presence of human rGM-CSF and rIL-4 (Gentaur), using 250 and 100 ng/ml concentrations, respectively. After 6 days, a pure population of DCs was obtained, with more than 95% of $CD14^-$ $CD11c^+$ cells detected by flow cytometry using a FC500 cytometer and the CXP analysis software (Beckman Coulter, Villepinte, France) or Flowjo software (TreeStar, Olten, Switzerland). Up to 10^7 DCs were plated in presence of either medium, dexamethasone, (DEX, 1 µg/ml [2.5 µM], Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), highly purified lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (1 µg/ml, InvivoGen, Toulouse, France), or peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* (PGN, 10 µg/ml, InvivoGen) for 24 h at 37°C and 5% CO_2 (Model A, **Fig. 1**). For tolerogenic DCs models (Model B, **Fig. 1**), cells were cultured for 24 h with either DEX or proteases from *Aspergillus oryzae* (ASP, 20 µg/ml, Sigma-Aldrich) as described elsewhere [11] or incubated during the differentiation step with either DEX, IL-10 (10 ng/ml, R&D Systems, Lille, France), TGFβ (20 ng/ml, R&D Systems), Rapamycin (10 nM, Sigma-Aldrich) or 1,25 dihydroxy-vitamin D3 (10 nM, Sigma-Aldrich). Drugs were added to cultures at day 1, with fresh medium provided every other day. To monitor a potential anti-inflammatory effect, treated DCs were stimulated with LPS (1 µg/ml) during 24 h.

Characterization of effector and regulatory DCs

For immuno-fluorescence staining, cells were harvested, washed in PBS and incubated for 20 min at 4°C with the following mAbs: FITC anti-CD14, FITC anti-CD80, PE anti-CD86, PC5 anti-CD83 (Beckman coulter), FITC anti-ILT2, PE anti-ILT4, PC5 anti-ILT3 (R&D systems) or PE-CD11c (Miltenyi Biotec, Paris, France). Cells were stained with corresponding isotype-matched control mAbs and analyzed by flow cytometry.

Cytokine measurement was performed in supernatants using the cytometric bead array technology or ELISA kits. IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-23, IL-17A and TNF-α were measured using the human inflammatory CBA kit or CBA flex sets (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's instructions using a FACS Array instrument and the FCAP Software (BD Biosciences). IL-23 concentration was measured with an ELISA kit (Ebiosciences, Paris, France) as per the manufacturer's instructions.

DC/T coculture experiments were performed as described elsewhere [11]. Briefly, treated DCs were cultured with allogeneic naive $CD4^+$ T cells at a 1:10 DCs/T ratio for 5 days. Naive $CD4^+$ T cells were isolated from PBMCs by negative selection using the MACS naïve CD4 isolation kit II (Miltenyi Biotec), following the manufacturer's instructions. Such naive T cells were confirmed to be >95% pure based upon CD3, CD4, and CD45RA expression evaluated by flow cytometry. Supernatants were analyzed for cytokine release as described above.

Differential gel electrophoresis analysis of DC subtypes

Polarized DCs were washed 3 times with cold PBS and cell pellets were lysed in buffer A containing 8.3 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT and 24 mM spermine (all obtained from Sigma-Aldrich). After centrifugation (16 000 g, 1 h, 20°C), supernatants were recovered and stored at -80°C. Proteins were then quantified using a Bradford assay (Biorad, Marnes La Coquette, France) and fractionated over a 4-12% gradient precast gel (NuPAGE, Invitrogen) to control protein quality.

For 2D-DIGE analysis, 100 µg of proteins were precipitated using the PerfectFocus kit from G-Biosciences, resuspended in DIGE labeling buffer containing 8.3 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS and 30 mM Tris pH 8.8, labeled with Cy2/3/5 dyes (CyDye DIGE Fluors, GE Healthcare, Velizy, France) and separated on 24 cm Immobiline pH 5.3-6.5 Drystrip gels by isoelectrofocusing (IEF) using the Ettan IPGphor system (GE Healthcare). For analytical and preparative experiments, IEF was done for a total of 132 and 145 kVh, respectively. Strips were then equilibrated in reduction and alkylation buffers (containing 6 M Urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS and either 1% DTT or 5% iodoacetamide) before loading onto 11% SDS-polyacrylamide gels for separation according to molecular mass using an Ettan DALT Six Electrophoresis System (GE Healthcare). DIGE gels were scanned using an Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Differentially expressed spots were determined by image analysis with SameSpots software (Non linear Dynamics, Newcastle, England) and selected for automatic spot picking (FDR p-value ≤ 0.05 and fold change ≥ 1.2). Principal component analysis (PCA) and dendrogram plots were also carried out using SameSpots software. The relative nearness of samples in the PCA plot indicates similarity, whereas large distances between samples indicate dissimilarity in protein abundance. The correlation analysis (dendrogram plot) was performed on log normalized protein abundance levels. Proteins were then clustered according to how closely correlated they were.

Preparative gels stained with SYPRO Ruby (Invitrogen) were used for automatic spot picking (using an EXQuest spot cutter, Biorad) of differentially expressed protein spots. Gel plugs were then washed with 200 µl of 100 mM NH_4HCO_3 /50% acetonitrile (ACN) for 45 min at 37°C and then dehydrated in ACN. Each spot was digested with trypsin (10 ng/µl of 40 mM NH_4HCO_3/10% ACN, Sigma-Aldrich) at 37°C overnight and subsequently 6 µl of ACN was added to the mixture prior to ultrasonication for 45 min at 30°C. NanoLC-MS/MS analysis was accomplished using the Ultimate 3000 RS nano LC system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) coupled to an ESI-Qq-TOF MS (Maxis 3G) from Bruker Daltonics (Wissembourg, France). H_2O/ ACN/ FA (100/ 0/ 0.1

volume ratios, respectively) was used as solvent A and H_2O/ ACN/ FA (20/ 80/ 0.1 volume ratios, respectively) as solvent B. Tryptic peptides diluted in 0.1% FA were injected and trapped on an Acclaim PepMap100 (100 µm x 2 cm, C_{18}, 5 µm, 100 Å, Dionex) with a flow rate of 12 µl/min (2% ACN, 0.1% FA). Separation was performed using an Acclaim PepMap RSLC (75 µm x 15cm, C_{18}, 2 µm, 100 Å, Dionex) with a flow rate of 450 nl/min and a linear gradient (5-45% B for 45 min, 45-95% B for 1 min and 95% B for 15 min). Database search was carried out using an in-house Mascot server (Matrix Science, version 2.3) against the Swiss-Prot and NCBInr databases. Data were searched against the *Homo sapiens* databases with precursor mass tolerance of 15 ppm and fragment mass deviation of 0.05 Da. The search included cysteine carbamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification. Up to two missed cleavages were allowed for protease digestion. All identifications were based on the sequencing of more than one peptide and only proteins with a Mascot score with $p \leq 0.05$ were considered for identification. Protein scores were derived from individual ions scores.

Label free MS analysis of DC subtypes

Label free MS of digested total protein lysates (solubilized in buffer A as described above), was conducted to compare proteomes of control, effector and regulatory DC subsets. Briefly, a common ultrafiltration device was used for detergent removal (CHAPS) to enable subsequent proteome analysis (Filter-aided sample preparation, FASP [12]). 100 µg of proteins were mixed with urea-containing buffers in the filter unit (Amicon Ultra-0.5 ml, Ultracel-10 kDa Membrane, Millipore, Molsheim, France), reduced with 20 mM DTT, alkylated with 50 mM iodoacetamide, digested with Lys-C (37°C, 5 h, ratio 1/50, Sigma-Aldrich) and then with trypsin (37°C, overnight, ratio 1/50). After digestion, peptides were desalted using RPC18 Dynal magnetic beads (Invitrogen), acidified with FA and 1.5 to 2 µg of tryptic peptides were analyzed by nanoLC-MS or nanoLC-MS/MS.

NanoLC-MS analysis was accomplished using the Ultimate 3000 RS nano LC system (Dionex) coupled to an ESI-Qq-TOF MS (Maxis 3G) from Bruker Daltonics. H_2O/ ACN/ FA (100/ 0/ 0.15

volume ratios respectively) was used as solvent A and H_2O/ ACN/ FA (20/ 80/ 0.15 volume ratios respectively) as solvent B. 1.5 to 2 µg of tryptic peptides were injected (36 µl ± 3 µl) and trapped for 10 min on an Acclaim PepMap100 (100 µm x 2 cm, C_{18}, 5 µm, 100 Å, Dionex) with a flow rate of 12 µl/min (2% ACN, 0.15% FA). Separation was then performed using an Acclaim PepMap RSLC (75 µm x 50cm, C_{18}, 2 µm, 100Å, Dionex) with a flow rate of 270 nl/min, two linear gradient segments (5-25% B for 180 min, 25-45% B for 50 min) and holding at 95 % B for a further 10 min before returning to 5 % B for 20 min. In MS mode, full scan MS spectra were acquired from m/z 280 to 1500 (1 MS spectrum of 0.8 s) during 270 min. Ion intensities recorded in LC-MS data were analyzed using Progenesis LC-MS v3.1 software (Non Linear Dynamics) to provide reliable measurements of peptide (feature) abundance across samples. Internal calibration was performed by enabling the lock mass option in MS mode (minimum intensity > 200 and mass ± 0.015 Da). Parameters used for peptide detection were peptide intensity > 300, peptide abundance > 2000 and $2^+ \leq$ peptide charge $\leq 6^+$. Data were then normalized by the "normalize to all features" method and comparison between the four groups (obtained from Ctrl-, LPS-, DEX- and PGN-DCs respectively) was performed to choose which peptides were statistically differentially represented (FDR p-value ≤ 0.01 and fold change ≥ 1.5). PCA and dendrogram plots were also carried out using Progenesis LC-MS software. Targeted nanoLC-MS/MS were accomplished by means of an inclusion mass list in the MS instrument method. Inclusion lists were generated from differentially expressed peptides and imported into MS acquisition software (mass ± 0.02 Da and retention time ± 3 min). LC-MS/MS data were analyzed using an in-house Mascot server (Matrix Science, version 2.3) against the Swiss-Prot database, taxonomy *Homo sapiens*, assuming tryptic or semi-tryptic digestion. Identification parameters were identical to those described for 2D-DIGE analysis. Peptide identifications were accepted if established with a greater than 95 % probability, as specified by Mascot software. For accurate mass measurements, the lock mass option was enabled in MS and MS/MS mode. Both m/z 299.2945 (methylstearate, Sigma-Aldrich) and m/z 1221.9906 ions (Chip

cube high mass reference, Agilent, Massy, France) generated in the electrospray process from ambient air were used for internal recalibration.

Western blot analysis

NuPAGE-Western blotting was carried out according to standard procedures (NuPAGE technical guide, Invitrogen). Samples were separated on 4 to 12% MES, 3 to 8% Tris acetate or 10 to 20% Tris glycine NuPAGE, depending upon the molecular mass of target proteins. The following primary antibodies were used for immunoblotting analyses: anti-ANXA1 (Cat. no. 3299, 1/1000), anti-GAPDH (Cat. no. 14C10, 1/1000), anti-GPX1 (Cat. no. 3286, 1/1000), anti-IRF4 (Cat. no. 4964, 1/1000) and anti-TRAF1 (45D3, 1/1000) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), anti-β-actin (Cat. no. MS-1295, 1/2000) and anti-Factor XIIIA (Cat. no. RB-1464, 1/1000) from Neomarkers (Labvision, Cheshire, England), anti-FKBP5 (Cat. no. H00002289-M02, 1/250) and anti-MX1 (Cat. no. H00004599-B01P, 1/500) from Abnova (Taipei, Taiwan), anti-CD71 (Cat. no. TA307375, 1/1000) from Origene (Rockville, MD), anti-CATC (Cat. no. sc-74590, 1/500), anti-NMES1 (Cat. no. sc-138479, 1/500) and anti-STAB1 (Cat. no. sc-98788, 1/500) from Santa Cruz (Santa Cruz, CA), anti-MRC1 (Cat. no. 18704-1-AP, 1/1000) from Proteintech group (Manchester, England), anti-C1Q (Cat. no. ab71089,1/1000) from Abcam (Paris, France). The rabbit polyclonal serum raised against GILZ was previously described [13]. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were both obtained from Jackson Immunoresearch Laboratories (Sufflok, England), and the chemiluminescence detection kit was from Pierce (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Fisher Scientific, Illkirch, France). Western blot **signals were acquired with a CCD camera (Fusion FX7, Vilber-Lourmat, Marnes La Vallée, France) and band** volume was **quantified** using the **Bio-1D** software (Vilber-Lourmat). β-actin or GAPDH were used as loading controls.

RNA isolation and quantitative real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from treated DCs or PBMCs using RNeasy mini kits (Qiagen, Courtaboeuf, France) and cDNAs were obtained using TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Les Ulis, France) as per the manufacturer's instructions. Messenger RNA expression was evaluated by quantitative PCR on a 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystems) with predesigned Taqman gene expression assays and reagents, according to the manufacturer's instructions. Expression of the following genes was assessed in DCs or PBMCs: GILZ (Hs00608272_m1), IDO (Hs00158032_m1), RALDH-1 (Hs00167445_m1), RALDH-2 (Hs00180254_m1), ANXA1 (Hs00167549_m1), CLIC2 (Hs01574555_m)1, FKBP5 (Hs01561001_m1), F13A (Hs00173388_m1), GPX1 (Hs00829989_gH), IMDH2 (Hs00168418_m1), OSF1 (Hs00273458_m1), TPP1 (Hs00166099_m1), C1QA (Hs00381122_m1), C1QB (Hs00608019_m1), C1QC (Hs00757779_m1), CATB (Hs00947433_m1), CATC (Hs00175188_m1), STAB1 (Hs01109068_m1), MRC1 (Hs00267207_m1), CD71 (Hs00951083_m1), FSCN1 (Hs00979631_g1), IRF4 (Hs01056533_m1), MX1 (Hs00895608_m1), NMES1 (Hs00260902_m1), TRAF1 (Hs01090170_m1). Expression of the following genes was assessed in T cells: IFNγ (Hs00989291_m1), IL-4 (Hs00174122_m1), IL-10 (Hs00961622_m1) and IL-17A (Hs00174383_m1). Data were interpreted for each target gene in comparison with endogenous β-actin (Hs99999903_m1) or GAPDH (Hs03929097_g1) as controls. The relative amount of target genes in each sample was calculated in comparison with the calibrator sample using the ΔΔCt method. The magnitude of gene induction was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ for stimulated cells} - \Delta Ct \text{ for unstimulated cells})}$.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical differences between groups were assessed using the Wilcoxon test. Treatments were compared to controls and p-values ≤ 0.05 or 0.01 were considered as significant. Statistical and graphical analyses were performed using the Prism 5 software

(GraphPad, La Jolla, CA). Significant differences in protein expression changes were determined in the 2D-DIGE analysis using an FDR (False Discovery Rate) adjusted p-value (or FDR p-value) threshold of 0.05 (http://www.nonlinear.com/support/progenesis/samespots/faq/pq-values.aspx#q-values). In label-free MS experiments, a FDR p-value with a threshold of 0.01 was used to determine significant changes in peptide abundance. A fold change filter of 1.2 (2D-DIGE) or 1.5 (label-free MS) was selected to target proteins with a level of differential expression readily detectable using Western blotting.

Clinical samples from VO56.07A pollen chamber study

The design and protocol of the allergen specific immunotherapy study were described in Horak F *et al.* [14]. This clinical trial assessed the efficacy and onset of action of grass-pollen tablets administered sublingually under controlled allergen exposure conditions provided in a challenge chamber. Briefly, eligible patients were men and women between 18 and 50 years old with a documented history of moderate-to-severe seasonal grass pollen–related allergic rhinoconjunctivitis for at least the previous two years. Patients were selected for inclusion based upon a positive specific skin prick test response (wheal diameter > 3 mm) to a 5-grass pollen extract (Stallergenes SA) as well as a specific serum IgE level of at least 0.70 kU/l for timothy grass (assessed with the UniCAP system, Phadia, Uppsala, Sweden). In addition, patients had a confirmed symptomatic reaction to an allergen challenge test at baseline (*i.e.* before the administration of any treatment), defined as a rhinoconjunctivitis total symptom score (RTSS) encompassing sneezing, runny nose, itchy nose, nasal congestion, watery eyes, and itchy eyes [14]. The study was a randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, single-center trial, conducted outside of the pollen season. After an initial screening visit, 82 eligible patients were randomized 1:1 to receive either a grass pollen or placebo tablet via the sublingual route. Challenges were performed after 1 week and 1, 2, and 4 months of treatment. The investigational product was a 5-grass-pollen SLIT tablet (orchard, meadow, perennial rye, sweet vernal, and timothy grasses; Stallergenes SA) taken once daily before eating or drinking and, preferably, at the same time of the day throughout the 4-months treatment

period [15]. Whole blood was collected before and after 4 months of treatment for serum measurements and cellular assays. PBMCs were purified from blood samples, maintained for 24 h in culture and subsequently restimulated or not with a grass-pollen allergen extract (300 IR, Stallergenes, SA) for further 24 h. Cultured PBMCs were washed and used for RNA isolation and PCR analysis as described above. All samples were coded and processed in a blind manner by the operators.

Since patients were challenged before treatment (at visit 2), it was possible to evaluate individual clinical responses by calculating the percentage improvement of Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score (ARTSS) between the baseline (challenge at V2) and after the challenge at the end of treatment (Visit 7 after 4 months): (ARTSS at V2 – ARTSS at V7) / ARTSS at V2 x100.

To analyze potential links between changes in immunological parameters and clinical responses, the median of percentages of improvement of ARTSS in the active group corresponding to at least a 43.9% decrease of ARTSS after treatment was considered as a threshold. Subjects with an ARTSS improvement greater than or equal to the threshold were considered as responders and those lower than the threshold as non-responders. Immunological results were described using summary statistics for 4 subgroups including active responders: AR, active non-responders: ANR, placebo responders: PR and placebo non-responders: PNR. Results were expressed as individual plots for patients from the 4 subgroups.

RESULTS

Establishment of effector (DC1 and DC17) and tolerogenic human DCs

After an initial screening of approximately 40 biological and pharmacological agents, we selected three molecules capable of inducing either effector or tolerogenic DCs from immature monocyte-derived DCs. The bacterial LPS was the most potent inducer of effector DC1 (*i.e.* DCs supporting the differentiation of $CD4^+$ Th1 cells) whereas the peptidoglycan (PGN) from the *Staphylococcus aureus* wall was the best inducer of DC17 (*i.e.* DCs capable to elicit $CD4^+$ Th17 cells). As shown in **Fig. 2A**, these treated DCs, termed LPS-DCs and PGN-DCs respectively, upregulated the expression of costimulatory (*i.e.* CD80, CD83, CD86) but not inhibitory molecules, with the exception of ILT4 which was induced by LPS treatment. Such treated-DCs upregulated IDO gene expression and secreted high amounts of IL-6 and IL-8 (**Fig. 2B and C**). LPS-DCs also secreted IL-12p70 and TNF-α, in contrast to PGN-DCs which rather produced IL-1β and IL-23 (**Fig. 2C**). Importantly, cocultures with naïve $CD4^+$ T cells confirmed a distinct DC1 and DC17 polarization respectively, in that incubation with LPS-DCs induced IFN-γ secretion in T cells at day 5 whereas IL-17A gene expression was enhanced in PGN-DCs / $CD4^+$ T cells cocultures (**Fig. 2D and E**). As we previously reported [11], treatment of DCs with DEX led to the generation of tolerogenic DCs, upregulating the expression of ILT2 and ILT4 and tolerogenic genes like GILZ, IDO or RALDH1 (**Fig. 2A and B**). $CD4^+$ T cells cocultured with DEX-DCs upregulated IL-10 (**Fig. 2D and E**). Although not shown, we confirmed that these cells are *bona fide* regulatory T cells (Tr1), since they are $Foxp3^-$ and exhibit a suppressive activity in third party experiments [11]. Altogether, these cellular assays performed on samples from 4 healthy donors unambiguously confirmed that effector DC1, DC17 and tolerogenic (*i.e.* regulatory) DCs can be obtained from human moDCs under such *in vitro* cell-culture conditions.

Identification of molecular markers for effector and tolerogenic human DCs by 2D-DIGE

We subsequently investigated potential differences in protein expression between control (Ctrl-DCs), LPS-, DEX- and PGN-DCs generated from 6 independent donors (**Fig. 1**). To this aim, we first relied upon 2D-DIGE for quantitative comparison of DC proteomes [16]. Whole cell extracts were fractionated by 2D gel electrophoresis using narrow range pH gradient gels (with pI ranging from 5.3 to 6.5, 1 pH unit / 24 cm) in the first dimension to increase the depth of the analysis in comparison with broad range gradients (data not shown). A pooled standard encompassing the 24 samples and labeled with the Cy2 fluorescent dye was used to normalize differences between gels and experiments. In those analyses, a total of 1250 protein spots could be precisely quantified in human DCs, using high resolution "ultra-zoom" 2D gels, as shown in a representative 2D pattern (**Fig. 3A)**. Out of these 1250 spots, 52 were differentially expressed under at least one condition, with a FDR p-value ≤ 0.05 and at least a 1.2-fold change in volume. As shown in **suppl. Table 1**, 48 spots (92.3%) were identified by mass spectrometry after in-gel trypsin digestion, corresponding to 40 non-redundant proteins. Seventeen proteins were found to be dysregulated in tolerogenic DCs, when compared with Ctrl-, LPS- or PGN-DCs (**suppl. Table 1A and B**). In contrast, the expression levels of 23 proteins were modified in LPS- and/or PGN-DCs in comparison to Ctrl- or DEX-DCs (**suppl. Table 1C-E**). Identified proteins were further clustered based upon similar expression profiles. Three proteins, including MX1, were specifically upregulated in LPS-DCs whereas 20 were upregulated in both DC1 and DC17 effector cells (*e.g.* FSCN1, HLA class II and IRF4). Six proteins were rather downregulated in LPS and PGN-DCs (*e.g.* ITAM/CD11b) whereas the FKBP5 protein was upregulated in all 3 effector and regulatory conditions. Remarkably, 8 proteins were specifically overexpressed in DEX-DCs (*i.e.* ANXA1, CLIC2, FKBP5, F13A, GPX1, IMDH2, OSF1, TPP1, **suppl. Table 1 and Fig. 3**). To further validate the previous findings, we selected some candidate markers for effector or tolerogenic DCs and directly assessed their expression levels by Western blotting using commercially available antibodies. Moreover, additional samples from treated DCs were collected from 8 donors to assess marker gene expression by qPCR.

Representative proteomic and gene expression data are shown in **suppl. Fig. 1** for selected candidate markers of effector DCs (*i.e.* FSCN1, IRF4 and MX1). Whereas FSCN1 and IRF4 genes showed higher levels of expression in both effector conditions, MX1 was only strongly overexpressed in LPS-DCs (*e.g.* with mRNA levels increased by 10-fold) when compared with Ctrl-, DEX- and PGN-DCs (**Suppl. Fig. 1B-D**). Downregulation of the expression of ITAM / CD11b in DC1 and DC17 conditions was also confirmed by Western blotting analysis and flow cytometry (data not shown). Among the 8 potential markers of regulatory DCs, 4 were confirmed at the protein level (*i.e.* ANXA1, FKBP5, F13A and GPX1). Specifically, Western blotting analyses indicated a significantly higher level of ANXA1, as well as an induction of FKBP5 in DEX-DCs (by 1.4- and 2.6-fold, respectively) when compared with Ctrl-DCs. F13A and GPX1 exhibited a slight increase in DEX-DCs in comparison to Ctrl-DCs (p-value ≤ 0.1, **Fig. 3B and C**). Due to the non-availability or poor affinity of antibodies to either CLIC2, IMDH2, OSF1 or TPP1, the latter proteins could not be assessed as markers by immunoblotting. Nonetheless, all such candidate markers were validated at the mRNA level (**Fig. 3D**). In this respect, up to a 15-fold increase in FKBP5 and F13A gene expression was observed in DEX-DCs relative to Ctrl-DCs with a concomitant decrease under effector conditions. The known function of each potential marker of regulatory DCs in immunity/tolerance is summarized in **Table 1**. Collectively, our data indicate that high expression levels of ANXA1, CLIC2, FKBP5, F13A, GPX1, IMDH2, OSF1 and TPP1 represent a valid molecular signature of tolerogenic DEX-DCs.

Identification of molecular markers for effector and tolerogenic human DCs by label-free MS

Whereas 2D-DIGE can resolve protein species with different pIs or molecular masses, this approach overlooks proteins with extreme pIs and molecular weights, as well as highly hydrophobic proteins. Thus, we initiated label free MS-based approaches to overcome these limitations and further compared protein expression profiles between Ctrl-, LPS-, DEX- and PGN-DCs (**Fig. 1 and 4**). Following enzymatic digestion, peptide analyses were performed using nano liquid chromatography

mass spectrometry (nanoLC-MS). A schematic of the workflow is provided in **Figure 4A-C**. For in-depth analysis of complex mixtures such as whole DC lysates, we used ultra high pressure LC with an extended column length of 50 cm to increase both chromatographic resolution, reproducibility and peptide quantitation. As shown in **Figure 4A**, we performed an analysis of DC peptides in 270 min gradient, resulting in the detection of 33500 isotope patterns (*i.e.* features characterized by a retention time and a mass over charge (m/z) ratio) which were further quantified using the Progenesis LC-MS software. The high LC reproducibility and very high mass accuracy achieved in the analysis of the high resolution MS data enabled a comparison of ion abundances between different runs. Up to 945 features were significantly detected as differentially expressed in at least one condition (with FDR p-value ≤ 0.01 and fold ≥ 1.5). **Figure 4B** shows a higher abundance of the m/z 865.70 molecular ion in DEX-DCs compared with Ctrl-, LPS- and PGN-DCs (with an abundance of 16300 *vs.* 8700, 5800 and 6095, respectively). Differentially regulated peptides were subsequently fragmented in MS/MS mode, leading to the identification of proteins further matched to sequence databases. Among the 945 differentially expressed features, 354 of them (37.5%) were identified representing a total of 190 non-redundant proteins (≥ 1 peptide, data not shown). The difficulty to interpret some of the MS/MS spectra was likely due to signal interference caused by co-eluting components, the presence of post-translationally modified peptides (*e.g.* glycopeptides), unknown peptide sequences and further, the relatively low-intensity of some ion precursors. A representative annotated MS/MS spectrum is shown in **Figure 4C** with fragment ions of the targeted m/z 865.70 precursor ion, which matched the CATC protein, one candidate marker of DEX-DCs, presented in **Figure 4B**. To increase the stringency and accuracy of protein quantitation, only proteins identified with two or more peptides were included in the final analysis, representing a total of 77 differentially expressed proteins. Sixty eight proteins were significantly dysregulated in effector DCs whereas 9 proteins were specifically upregulated in tolerogenic DCs. Such data are summarized in **suppl. Table 2** with specific details on peptide/protein identification. Included in this list were two proteins (ITAM / CD11b and MX1, 1

peptide) previously shown to be upregulated in effector DCs, as well as PGRP1 (1 peptide), also known as “peptidoglycan recognition protein”, exhibiting a >90-fold increase in the PGN condition. Proteins were clustered based on abundance within each DC conditions. One cluster comprising 50 proteins was shown to be specifically up or downregulated in PGN-DCs (**Suppl. Table 2C and F**) whereas four proteins were highly expressed in LPS-DCs (*i.e.* ANXA6, EF1A1, MX1 and PSA7, **suppl. Table 2E**). MX1 overexpresssion in LPS-DCs was also confirmed by proteomic DIGE analysis. Upregulation of 14 proteins (*e.g.* FSCN1, ICAM1, NMES1, TRAF1 and TFR1/CD71) and downregulation of 3 other proteins (CYTC, GELS and ITAM) were observed in both DC1 and DC17 cells (**Suppl. Table 2B).** Interestingly, the two proteomics approaches confirmed the upregulation of FSCN1 and downregulation of ITAM / CD11b in effector DCs. Some proteins previously shown by others to be elevated in effector DCs [16, 17] were confirmed in our study (*e.g.* ICAM1 and TRAF1). Furthermore, label free MS experiments revealed 9 proteins consistently increased in tolerogenic DEX-DCs when compared with Ctrl-, LPS- and PGN-DCs (**Suppl. Table 2A**). In this regard, 4 of those proteins (ANXA1, CLIC2, F13A and FKBP5) had been identified in the DIGE analysis described above whereas the other 5 proteins (C1QB, C1QC, CATC, MRC1 and STAB1) were only detected and shown to be upregulated in DEX-DCs when using the LC-MS approach. Among those, the analysis of C1QC specific peptides revealed up to a 5-fold increase in tolerogenic DEX-DCs (m/z 964.46 molecular ion, **suppl. Table 2**). We next performed validation experiments for candidate markers identified by label-free MS using both Western blotting and qPCR. Based on those analyses, we selected three markers for effector DCs (CD71, NMES 1 and TRAF1) with confirmed upregulation in both LPS- and PGN-DCs when compared with either Ctrl- or DEX-DCs (**Suppl. Fig. 1**). Importantly, Western blotting analyses confirmed significantly higher levels of C1Q, CATC, MRC1 and STAB1 in regulatory DEX-DCs (by 12-, 1.5-, 1.4- and 2.2-fold, respectively, **Fig. 4D and E**). Moreover, as shown in **Figure 5F**, C1Q (including subunits A, B and C), CATC, MRC1 and STAB1 mRNA levels were significantly elevated in DEX-DCs, with up to a 12-fold increase in C1QA, C1QB and STAB1 gene expression when compared with Ctrl-DCs. The

function of each of these potential markers of tolerogenic DEX-DCs in effector immunity/tolerance is summarized in **Table 1**. Altogether, these data demonstrate that C1QA, C1QB, C1QC, CATC, MRC1 and STAB1 are valid candidate markers of regulatory DCs induced by DEX.

Assessment of candidate marker expression in distinct subtypes of tolerogenic DCs.

We further investigated the expression of the most promising candidate markers in various types of regulatory DCs obtained from moDCs under distinct cell culture conditions. To generate tolerogenic DCs, we either treated monocyte-derived iDCs with proteases from *Aspergillus oryzae* during 24 h [11] or cultured monocytes during the differentiation step with either DEX, IL-10, Rapamycin, 1,25 dihydrovitamin D3 or TGFβ during 7 days, as reported by others [18-22]. Staining with CD11c, CD14, ILT2, ILT3 and ILT4 antibodies allowed us to discriminate those various tolerogenic DCs based on surface phenotype (**Fig 5A**). More specifically, ASP-DCs exhibit a $CD11c^{low}$ phenotype in contrast to all other DC types, which are rather $CD11c^{high}$. CD14 expression clusters DCs in 3 groups since DEX_{24h} (24 h treatment) and TGFβ–DCs are $CD14^{neg}$ cells, whereas VitD3 and Rapa-DCs are $CD14^{med}$ and DEX_{diff} (treatment during the differentiation step) and IL-10-DCs are $CD14^{high}$. TGF-β and DEX-DCs can be further distinguished as $ILT2^{low}$ and $ILT2^{med}$ cells, respectively. Rapa-DCs and VitD3-DCs differ in that they are $ILT3^{low}$ and $ILT3^{high}$, respectively. Lastly, DEX_{diff}-DCs are $ILT4^{med}$ whereas IL-10-DCs are $ILT4^{high}$. To confirm the anti-inflammatory profile of such generated DCs, we stimulated them with LPS during 24 h and assessed the expression of costimulatory molecules and cytokine secretion. As shown in **Fig.5B**, all tolerogenic DC subtypes had a blunted LPS-induced upregulation of costimulatory molecules. LPS-induced IL-12p70 secretion was also inhibited in all regulatory DC types. Only in VitD3-DCs was IL-6, IL-8 and TNF-α secretion left uninhibited after LPS stimulation (**Fig. 5C**).

The expression of candidate markers identified through our quantitative proteomic studies (listed in **Table 1 and suppl. Tables 1 and 2**) and from the literature (GILZ, IDO, RALDH1 and RALDH2) was assessed in the six types of tolerogenic DCs, by qPCR as well as Western blotting based on the

availability of antibodies. Representative data are shown in **Fig. 6.** Specifically, we defined 5 subgroups of candidate markers for regulatory DCs. ANXA1, CATC and GILZ were expressed in all models and thus can be considered as pan-regulatory DC markers. CATC protein overexpression was for instance detected in all conditions except in Rapa-DCs, whereas CATC gene induction was detected in both $DEX_{24h/diff}$, IL-10 and Rapa-DCs. Surprisingly, the upregulation of ANXA1, C1Q, CATC and GPX1 in Rapa-DCs was more easily seen at the mRNA level, possibly due to differences in terms of kinetics of gene induction for such markers. ANXA1, CATC and GILZ were the only proteins upregulated in TGFβ-DCs, highlighting the phenotypic heterogeneity of tolerogenic DCs. A second group of markers encompass C1Q and TPP1, associated with most tolerogenic DCs, with the exception of ASP- and TGFβ-DCs. Our experiments indicated that DEX_{24h}-DCs are quite similar to DEX_{diff}-DCs, with the latter exhibiting higher amounts of tolerogenic markers. A third group comprising CLIC2, FKBP5, GPX1 and IMDH2 proteins were upregulated in $DEX_{24h/diff}$ and Rapa-DCs. These markers may represent a family of immunosuppressant-induced proteins. Furthermore, F13A, MRC1 and STAB1 proteins were consistently and jointly upregulated in IL-10-DCs and $DEX_{24h/diff}$-DCs. Lastly, the overexpression of IDO, RALDH1 and RALDH2 proteins were restricted to ASP_{24h}- and $DEX_{24h/diff}$-DCs in agreement with our previous report [11]. Collectively, our data i) establish unambiguously a substantial phenotypic heterogeneity among known tolerogenic DCs, ii) highlight the broad relevance of ANXA1, C1Q, CATC, GILZ, STAB1 and TPP1 molecules as shared regulatory DC markers.

Assessment of markers for effector/tolerogenic DCs in PBMCs from patients undergoing allergen-specific immunotherapy.

We hypothesized that markers of effector and regulatory DCs might be useful to investigate immune changes induced in allergic patients during allergen-specific immunotherapy (such as a Th2 to Th1/Treg transition) with thus, a potential shift from effector to tolerogenic DCs. In this

context, we relied upon blood samples collected during a placebo-controlled clinical study conducted in an allergen challenge chamber to evaluate a candidate allergy vaccine. Specifically, we assessed the mRNA expression of our candidate markers in PBMCs from grass pollen allergic patients undergoing sublingual immunotherapy with grass-pollen tablets as described in "Materials and Methods". To this aim, since PBMCs contain less than 0,5-1% DCs, we first selected our candidate markers based on our previous patterns of expression in distinct regulatory DC models (**Fig. 6**), but also on gene expression data reported in the literature in various blood cell populations (BioGPS website, data not shown). The latter step was critical in order to eliminate genes significantly expressed by either T, B, NK, endothelial or polynuclear cells. As a result, we selected 15 candidate marker genes for further studies. ANXA1, CATC, GILZ were selected because they represent pan-regulatory DC markers, even if they are ubiquitously expressed among different blood cell populations. For instance, CATC is expressed in both B cells, DCs, myeloid and NK cells and monocytes. In contrast, C1QC, CLIC2, F13A, IDO, MRC1 and RALDH1 expression was only slightly observed in PBMCs and STAB1 expression levels were significant only in DCs, myeloid cells and monocytes. With the same rationale, five markers (CD71, FSCN1, MX1, NMES1 and TRAF1) were chosen to monitor changes in effector DCs populations. These markers were assessed in 80 PBMC samples (*i.e.* PBMCs cultured *ex vivo* before and after treatment, with or without restimulation with grass-pollen allergen) from 20 clinical patients belonging to each of the following group: active responders (AR, n=6), active non-responders (ANR, n=6), placebo responders (PR, n=4) and placebo non responders (PNR, n=4).

ANXA1, CATC, F13A, GILZ, IDO, MRC1, RALDH1 and CLIC2, identified as markers of tolerogenic DCs, did not exhibit any significant variations in their patterns of expression in PBMCs, when comparing patients in placebo or active groups, or clinical responders and non responders, respectively (**Suppl. Fig. 2** for unrestimulated PBMCs and **Suppl. Fig. 3** for restimulated PBMCs). Likewise, no significant changes in effector DCs markers were detected at a group level in either unrestimulated or restimulated PBMCs, although some individual patients showed a concomitant

upregulation of all effector genes (**Suppl. Fig. 4** and **5**). A considerable increase in the expression of C1Q (subunits A, B and C) and STAB1, two markers of regulatory DCs, was detected in PBMCs restimulated or not with the grass-pollen extract in the active group in comparison to the placebo group. To confirm those findings, mRNA levels were assessed for these 4 genes in the entire cohort of the clinical study (*i.e.* 62 additional patients corresponding to 248 PBMCs samples). 4 effector genes (CD71 – FSCN1 – MX1 - TRAF1) were also assessed in these patients, as controls.

These experiments confirmed a statistically significant upregulation of C1Q and STAB1 in the active group when compared to the placebo group in either unrestimulated PBMCs (**Fig. 7A**) or restimulated PBMCs (**Suppl. Fig. 6**). Even more interestingly, C1QA, C1QB and C1QC were specifically upregulated in the group of patients with a confirmed clinical response to the treatment in contrast to non responders where these genes were rather downregulated. STAB1 was also confirmed as induced in AR in comparison to other groups where it was rather downregulated (**Fig. 7A** and **Suppl. Fig. 6A**). C1Q and STAB1 mRNA expression was plotted against the clinical efficacy score (% ARTSS) and a significant correlation between the two variables could be established for C1Q subunits and STAB1 (Pearson correlation of 0.41, p=0.009 for C1QA and 0.32, p=0.037 for STAB1) (**Fig. 7B** and **Suppl. Fig. 6B**). No differences were detected in mRNA expression of effectors genes between groups (**Suppl. Fig. 7A** and **Suppl. Fig. 8A**) and no correlation could be established with clinical efficacy (**Suppl. Fig. 7B** and **Suppl. Fig 8B**) for these genes indicating that the clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy does not correlate with significant changes in effector DCs markers.

Collectively, these data describe two potential markers of tolerance associated with short-term efficacy of allergen-specific immunotherapy, namely C1Q and STAB1.

DISCUSSION

Currently, a broadly accepted paradigm to explain the clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy is a modulation of $CD4^+$ T cell functions characterized by a shift from Th2 toward Th1/Treg responses. In this regard, the capacity of DCs to initiate and orient such effector or regulatory T cell responses suggests that those cells may contribute to both allergic inflammation and its resolution. For example, there is a growing body of evidence that DCs play a role in allergic sensitization through their capacity to induce and maintain allergen-specific Th2 responses [6]. In contrast, tolerogenic DCs have been detected in the oral mucosa, and as such, appear to be essential in contributing to tolerance induction following sublingual immunotherapy. Specifically, these oral DCs are capable to capture and present allergens to T cells with a subsequent induction of Th1 and Treg responses in draining cervical lymph nodes, thought to be critical in the desensitization process [23, 24]. These observations led to the postulate that DCs could be a valid source to identify early markers of the polarization of adaptive immune responses. Indeed, molecular changes in innate cells such as DCs were recently confirmed to be predictive of long-term adaptive immune responses after vaccination in humans [9]. In this context, we inquired whether the balance between effector and tolerogenic DCs where impacted during allergen-specific immunotherapy, and whether markers of regulatory DCs could be used as surrogate biomarkers of clinical efficacy.

As a first step, we used two quantitative proteomic strategies (*i.e.* 2D-DIGE and a quantitative label free approach) to compare whole proteomes of effector/ inflammatory versus tolerogenic DCs. Tolerogenic DCs as well as DC1 and DC17 were induced after treatment of monocyte-derived DCs with either DEX, LPS or PGN, respectively. As a result, we identified NMES-1 as a new marker of effector DCs whereas known inflammatory markers like FSCN-1, IRF-4 or TRAF-1 were also confirmed. Most importantly, specific markers of DC1 and DC17 were identified (*i.e.* MX1 and PGRP-1, respectively). In addition, twelve new markers of regulatory DCs, including ANXA1, C1Q (subunits B and C), CATC, CLIC2, FKBP5, F13A, GPX1, IMDH2, MRC1, OSF1, STAB1 and TPP1 were also validated in our models of tolerogenic DCs. Some of the markers identified in

this study had never been described in the context of tolerance (*e.g.* CLIC2, GPX1, OSF1 and TPP1). Importantly, the use of those markers revealed an important phenotypic heterogeneity of tolerogenic DCs, with only 3 markers (*i.e.* CATC, GILZ, ANXA1) induced in all DCreg subtypes, which thus can be considered as pan-regulatory DC markers. The expression of other proteins was previously described on APCs found in tolerogenic environments. For example, FXIII positive APCs, characterized by CD11b, MRC1 and STAB1 expression, were reported in the skin and classified as dermal dendrocytes [25, 26]. These cells constitutively produce retinoic acid and are capable to induce $Foxp3^+$ Tregs [27] indicating a clear involvement in tolerance mechanisms. Our results are also consistent with the phenotype reported by others for tolerogenic DCs / macrophages in the human decidua, thought to contribute to a favorable environment to allow fetal implantation. The latter cells where shown to coexpress MRC-1, F13A and STAB1 as well as other know tolerogenic markers like ILT2, ILT4 and IL-10 [28, 29]. Interestingly, several recent studies also highlight the importance of C1Q, CATC and FXIIIA in feto-maternal tolerance, suggesting that our results have relevance in human physiology and physiopathology [30-32].

To investigate the value of those markers of effector or tolerogenic DCs in the context of allergen-specific immunotherapy, we took advantage of a successful randomized double blind placebo-controlled SLIT study conducted in an allergen chamber in a cohort of 82 grass pollen allergic patients to test whether markers of effector or tolerogenic DCs were impacted during treatment, in link with clinical efficacy. C1Q and STAB1 expression increased significantly in PBMCs from grass pollen allergic patients receiving the active tablet in comparison to the ones receiving the placebo tablet in which the expression rather declined. Such differences between groups could not be detected for effector markers. Furthermore, a correlation between C1Q and STAB1 expression and clinical efficacy could be established, pointing out to those molecules as potential biological markers associated with short term efficacy.

One limit of our study was the lack of *bona fide* markers for DC2 (*i.e.* DCs supporting the differentiation of Th2 cells), which are held responsible for the development of allergy and which

are predicted to decrease during successful immunotherapy. Nonetheless, our study suggests that immunotherapy induces tolerance through the generation of cells bearing tolerogenic markers detectable in peripheral blood of clinical responders, but not in placebos or in non-responders. Whereas our data confirm a link between clinical tolerance and induction of suppressive/ regulatory immune responses, we failed to establish such a link with the induction of $CD4^+$ regulatory T cells in peripheral blood (manuscript in preparation) in contrast to previous studies [33, 34]. This apparent discrepancy could possibly be explained by the fact that allergen-specific regulatory $CD4^+$ T cells induced during immunotherapy may only be transiently found in peripheral blood, whereas regulatory DCs may persist for a longer time period and thus be used as a smoking gun.

Noteworthy, few studies had before examined the possible impact of immunotherapy on APCs. One study reported an increased IFNα production following TLR9 stimulation in patients receiving allergen-specific subcutaneous immunotherapy, implicating indirectly pDCs in the success of the treatment [35]. Other studies reported changes in the phenotype of monocytes after venom immunotherapy, with an early induction, 5 days after the first injection, of tolerogenic molecules such as ILT3, ILT4, as well as the secretion of IL-10 [36, 37]. Lastly, other studies reported specific changes in the expression of function-associated surface molecules on DCs during immunotherapy in patients with allergies to hymenoptera venom or house dust mites [38]. However, none of those studies could clearly establish a link with clinical responses.

Altogether, our work describes novel markers specific of polarized effector or regulatory DCs, some of which can be easily detected in human PBMCs. Importantly, the induction of C1Q and STAB1, two markers expressed by various types of regulatory DCs, correlates with clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy. Such an identification of candidate biomarkers for short-term efficacy provides new avenues for the clinical follow-up of patients and the development of new vaccine candidates based on allergenic extracts.

REFERENCES

1. Gregori, S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens* **77**, 89-99 (2011).

2. Van Beelen, A.J. *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **27**, 660-669 (2007).

3. De Jong, E.C. *et al.* Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* **168**, 1704-1709 (2002).

4. Gregori, S. *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory (Tr1) cells by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* **116**, 935-944 (2010).

5. Ilarregui, J.M. *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat. Immunol.* **10**, 981-991 (2009).

6. Pulendran, B., Tang, H. & Manicassamy, S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol.* **11**, 647-655 (2010).

7. Kasturi, S.P. *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* **470**, 543-547 (2011).

8. Group, B.D.W. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89-95 (2001).

9. Querec, T.D. *et al.* Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* **10**, 116-125 (2009).

10. Cheong, C. *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* **143**, 416-429 (2010).

11. Zimmer, A. *et al.* Identification of a new phenotype of tolerogenic human dendritic cells induced by fungal proteases from Aspergillus oryzae. *J. Immunol.* **186**, 3966-3976 (2011).

12. Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**, 359-362 (2009).

13. Asselin-Labat, M.L. *et al.* GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* **104**, 215-223 (2004).

14. Horak, F. *et al.* Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 471-477 (2009).

15. Moingeon, P. *et al.* Specific immunotherapy for common grass pollen allergies: pertinence of a five grass pollen vaccine. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **146**, 338-342 (2008).

16. Ferreira, G.B. *et al.* Protein-induced changes during the maturation process of human dendritic cells: A 2-D DIGE approach. *Proteomics Clin. Appl.* **2**, 1349-1360 (2008).

17. Watarai, H. *et al.* Plasma membrane-focused proteomics: dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells. *Proteomics* **5**, 4001-4011 (2005).

18. Monti, P. *et al.* Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation* **75**, 137-145 (2003).

19. Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. & Enk, A.H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468-2476 (2002).

20. Van Kooten, C. & Gelderman, K.A. In vitro-generated DC with tolerogenic functions: perspectives for in vivo cellular therapy. *Methods Mol. Biol.* **677**, 149-159 (2011).

21. Penna, G. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **178**, 145-153 (2007).

22. Ohtani, T. *et al.* TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* **126**, 485-499 (2009).

23. Allam, J.P. *et al.* Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* **ahead of print** (2010).

24. Mascarell, L. *et al.* Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 603-609 e605 (2008).

25. Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Steinman, R.M., Krueger, J.G. & Lowes, M.A. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIA+ macrophages. *J. Clin. Invest.* **117**, 2517-2525 (2007).

26. Walsh, L.J., Goerdt, S., Pober, J.S., Sueki, H. & Murphy, G.F. MS-1 sinusoidal endothelial antigen is expressed by factor XIIIa+, HLA-DR+ dermal perivascular dendritic cells. *Lab. Invest.* **65**, 732-741 (1991).

27. Guilliams, M. *et al.* Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* **115**, 1958-1968 (2010).

28. Palani, S. *et al.* Stabilin-1/CLEVER-1, a type 2 macrophage marker, is an adhesion and scavenging molecule on human placental macrophages. *Eur. J. Immunol.* **Ahead of print** (2011).

29. Cupurdija, K. *et al.* Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation. *Am. J. Reprod. Immunol.* **51**, 117-122 (2004).

30. Bulla, R. *et al.* Decidual endothelial cells express surface-bound C1q as a molecular bridge between endovascular trophoblast and decidual endothelium. *Mol. Immunol.* **45**, 2629-2640 (2008).

31. Asahina, T., Kobayashi, T., Okada, Y., Goto, J. & Terao, T. Maternal blood coagulation factor XIII is associated with the development of cytotrophoblastic shell. *Placenta* **21**, 388-393 (2000).

32. Rao, N.V., Rao, G.V. & Hoidal, J.R. Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 10260-10265 (1997).

33. Bohle, B. *et al.* Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 707-713 (2007).

34. Scadding, G.W. *et al.* Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 598-606 (2010).

35. Tversky, J.R., Bieneman, A.P., Chichester, K.L., Hamilton, R.G. & Schroeder, J.T. Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 94-102 (2010).

36. Magnan, A. *et al.* Venom immunotherapy induces monocyte activation. *Clin. Exp. Allergy* **31**, 1303-1309 (2001).

37. Bussmann, C. *et al.* Early markers for protective mechanisms during rush venom immunotherapy. *Allergy* **65**, 1558-1565 (2010).

38. Angelini, F. *et al.* Dendritic cells modification during sublingual immunotherapy in children with allergic symptoms to house dust mites. *World J Pediatr* **7**, 24-30 (2011).

39. Esworthy, R.S. *et al.* Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, G848-855 (2001).

40. Rees-Unwin, K.S. *et al.* Proteomic evaluation of pathways associated with dexamethasone-mediated apoptosis and resistance in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **139**, 559-567 (2007).

41. Sanquer, S. *et al.* Expression of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II after mycophenolate mofetil treatment: a 2-year follow-up in kidney transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 328-335 (2008).

42. Tsukamoto, T., Iida, J., Dobashi, Y., Furukawa, T. & Konishi, F. Overexpression in colorectal carcinoma of two lysosomal enzymes, CLN2 and CLN1, involved in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Cancer* **106**, 1489-1497 (2006).

43. Gerke, V. & Moss, S.E. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* **82**, 331-371 (2002).

44. Bostanci, N. *et al.* Application of label free-absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MSE (Gingival exudatome). *J. Proteome Res.* **9**, 2191-2199 (2010).

45. Yang, Y.H. *et al.* Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 976-984 (2004).

46. Grassi, F. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells have a phenotype comparable to that of dermal dendritic cells and display ultrastructural granules distinct from Birbeck granules. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 484-493 (1998).

47. Quatresooz, P., Paquet, P., Hermanns-Le, T. & Pierard, G.E. Molecular mapping of Factor XIIIa-enriched dendrocytes in the skin (Review). *Int. J. Mol. Med.* **22**, 403-409 (2008).

48. Inbal, A. & Dardik, R. Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **35**, 162-165 (2006).

49. Lu, J.H. *et al.* The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **5**, 9-21 (2008).

50. Teh, B.K., Yeo, J.G., Chern, L.M. & Lu, J. C1q regulation of dendritic cell development from monocytes with distinct cytokine production and T cell stimulation. *Mol. Immunol.* **48**, 1128-1138 (2011).

51. Botto, M. & Walport, M.J. C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology* **205**, 395-406 (2002).

52. Nayak, A., Ferluga, J., Tsolaki, A.G. & Kishore, U. The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol. Lett.* **131**, 139-150 (2010).

53. Altorjay, A. *et al.* Significance and prognostic value of lysosomal enzyme activities measured in surgically operated adenocarcinomas of the gastroesophageal junction and squamous cell carcinomas of the lower third of esophagus. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5751-5756 (2005).

54. Dickinson, D.P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**, 238-275 (2002).

55. Royer, P.J. *et al.* The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J. Immunol.* **185**, 1522-1531 (2010).

56. Allavena, P. *et al.* Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, 547179 (2010).

57. Chieppa, M. *et al.* Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J. Immunol.* **171**, 4552-4560 (2003).

58. Kzhyshkowska, J. *et al.* Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* **107**, 3221-3228 (2006).

59. Goerdt, S., Walsh, L.J., Murphy, G.F. & Pober, J.S. Identification of a novel high molecular weight protein preferentially expressed by sinusoidal endothelial cells in normal human tissues. *J. Cell Biol.* **113**, 1425-1437 (1991).

60. Goerdt, S., Bhardwaj, R. & Sorg, C. Inducible expression of MS-1 high-molecular-weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* **142**, 1409-1422 (1993).

61. Schledzewski, K. *et al.* Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J. Pathol.* **209**, 67-77 (2006).

Acknowledgments

We thank Pr. Marc Pallardy for his helpful comments and suggestions regarding this study.

Grant support

Aline Zimmer was supported by a CIFRE fellowship from ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). This work was financed by Stallergenes.

Abbreviations used in this paper

2D: Two dimensional

Ab: Antibody

ACN: Acetonitrile

CBA: Cytometric Bead Array

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

Ct: Cycle threshold

DEX: Dexamethasone

DIGE: Differential Gel Electrophoresis

DTT: Dithiothreitol

ESI-Qq-TOF: Electrospray Ionization Quadrupole-quadrupole-Time of Flight

FA: Formic acid

Foxp3: Forkhead box P3

GILZ: Glucocorticoid-induced leucine zipper

iDCs: immature DCs

ILT: Immunoglobulin like transcripts

LC: Liquid Chromatography

MS: Mass Spectrometry

NOS-2: NO synthetase 2

PC5: Phycoerythrin-Cyanin-5

PCA: Principal component analysis

PGN: Peptidoglycan

pI: Isoelectric Point

RALDH: Retinaldehyde dehydrogenase

RAPA: Rapamycin

RSLC: Rapid Separation Liquid Chromatography

SLIT: Sublingual Immunotherapy

Treg: Regulatory T cells

Tr1: Type 1 regulatory T cells

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematic outline of the study methodology. Total proteins were extracted from treated DCs (Ctrl- , LPS-, DEX- and PGN-DCs) and subjected to either 2D-DIGE or label-free MS quantitation (FASP [12], Filter Aided Sample Preparation). Differentially expressed protein spots or peptides were then identified after MS/MS analysis. Candidate markers of tolerogenic DCs were validated by Western blotting (WB) and/or qPCR in Ctrl-, LPS-, DEX- and PGN-DCs (model A), in 6 distinct tolerogenic DC types (model B) and in clinical samples (PBMCs) obtained from allergic patients undergoing allergen-specific immunotherapy. In model A, WB were performed from whole cell lysates used in proteomics experiments and additional treated DC samples were collected from 8 donors for qPCR validation. In model B, DC samples were used for both WB and qPCR validations. In clinical study, PBMCs (n=328) were collected from 82 patients before and after immunotherapy and restimulated or not *ex vivo* by grass-pollen allergen extract.

Figure 2: *In vitro* treatment of DCs with LPS, PGN or DEX induced pro-inflammatory (DC1, DC17) and tolerogenic DCs. Monocytes were isolated from PBMCs by negative selection and cultured 6 days in presence of IL-4 and GM-CSF to generated moDCs. Cells were treated with either LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml) or DEX (1 µg/ml) for 24 h. **(A)** Cell surface phenotype was assessed by flow cytometry after staining with Abs against CD80, CD83, CD86, ILT2, ILT3 and ILT4 (dashed line: isotype control, plain line: Ctrl-DCs, filled in grey: treated-DCs). **(B)** Tolerogenic genes expression (GILZ, IDO, RALDH1 and RALDH2) was assessed by qPCR analysis. **(C)** Cytokine production was analyzed by ELISA or CBA (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-**23** and TNF-α) **(D/E)** DCs were cocultured with naïve $CD4^+$ T cells during 5 days and polarization cytokines were analyzed by qPCR or CBA (IFN-γ, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A). A representative donor out of four is presented in A, whereas mean ± SEM values of 4 independent donors are presented in B to E.

Figure 3: Markers of tolerogenic DCs identified by 2D-DIGE. Proteins were considered significantly differentially expressed in DEX-DCs with a FDR p-value ≤ 0.05 and at least a 1.2-fold change in volume (see also **suppl. Table 1**) **(A)** Representative Cy2 image obtained from a 2D-DIGE gel with localization of differentially overexpressed protein spots. Whole cell extracts were fractionated using narrow range pH gradient gels (pI range of 5.3 to 6.5, 1 pH unit / 24 cm) in the first dimension and a 11% SDS PAGE in the second dimension. Protein spots marked with an arrow are upregulated in DEX-DCs and described in **suppl. Table 1**. **(B/C)** Western blot analyses of target proteins in Ctrl-, LPS-, DEX- and PGN-DCs. Two representative donors are presented in B whereas mean ± SEM of 6 independent experiments are presented in C. *p-value ≤ 0.05, **p-value ≤ 0.01 were considered significant (Wilcoxon test). β-actin was used as loading control. **(D)** Validation of tolerogenic genes at the mRNA level by qPCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in treated DCs in comparison with Ctrl-DCs. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as mean ± SEM.

Figure 4: Markers of regulatory DCs identified by label-free MS. (A) Dendritic cell peptides are separated using a 270 min gradient on a 50 cm column packed with C_{18} beads. Uniform peptide separation was obtained along the retention time. The Retention time (RT) region of m/z 865.704 ion presented in panel B is indicated by an arrow. **(B)** NanoLC-MS quantitation of molecular ion at m/z 865.704 (RT=147 min). Ion abundances (*i.e.* sum of the intensities of each peptide isotope) are represented for each run. **(C)** MS/MS spectrum of ion at m/z 865.70 shown in B. Fragment annotation leads to the characterization of the tryptic peptide sequence resulting in CATC protein identification. Peptide fragment ions are indicated by “a” or “b” if the charge is retained on the N-terminus side and by “y” if the charge is maintained on the C-terminus side. **(D/E)** Western blot analysis of upregulated proteins in DEX-DCs with a FDR p-value ≤ 0.01 and at least a 1.5-fold change in abundance (see also **suppl. Table 2**). Two representative donors are presented in D whereas mean ± SEM of 6 independent experiments are presented in E. *p-value ≤ 0.05, **p-value

≤ 0.01 were considered significant (Wilcoxon test). β-actin was used as loading control. **(F)** Validation of tolerogenic genes at the mRNA level by qPCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in treated DCs in comparison with Ctrl-DCs. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as mean ± SEM.

Figure 5: Characterization of new *in vitro* models of tolerogenic DCs. DEX-DCs were used as a control and compared to ASP-DCs (24 h treatment), DEX, IL-10, RAPA, VitD3 or TGFβ-DCs generated after treatment with pharmacological or biological agents during the differentiation step [IL-10 (10 ng/ml), TGFβ (20 ng/ml), Rapamycin (10 nM), 1,25 dihydroxy-vitamin D3 (10 nM)]. **(A)** Cell surface phenotype was assessed by flow cytometry after staining with Abs against CD11c, CD14, ILT2, ILT3 and ILT4 **(B)** Percentage of inhibition of LPS-induced expression of costimulatory molecules in differentially treated DCs **(C)** Inhibition of LPS-induced cytokine secretion in differentially treated DCs. 100% represents a complete inhibition of the expression/secretion of the molecule. A representative donor out of four is presented in A, whereas mean ± SEM values of 6 independent donors are presented in B and C.

Figure 6: Validation of candidate markers in different models of tolerogenic DCs. (A/B) Western blot analysis of target proteins in treated DCs. Two representative donors are presented in A whereas mean ± SEM of 6 independent experiments are presented in B. *p-value ≤ 0.05, **p-value ≤ 0.01 were considered significant (Wilcoxon test). GAPDH was used as loading control. **(C)** Validation of tolerogenic genes at the mRNA level by qPCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in treated DCs in comparison with Ctrl-DCs. Data are normalized to amounts of GAPDH and shown as mean ± SEM (n=6).

Figure 7: mRNA expression of C1QA, C1QB, C1QC and STAB1 in PBMCs from 82 patients correlates with the clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy.

A. mRNA expression of C1QA, C1QB, C1QC and STAB1 in unrestimulated PBMCs from 82 patients in the active group in comparison to the placebo group or in responders (% ARTSS ≥ 43.9) versus non responders (% ARTSS < 43.9) (Mann-Whitney test). Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as a mean ± SEM for each group.

B. Correlation of mRNA expression of each individual patient with clinical improvement (% ARTSS) in the active and placebo group. R represents the Spearman correlation coefficient. 1 represents a perfect correlation, whereas a score between 0 and 1 indicates that the two variables increase or decrease together. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 1: Selected differentially-expressed inflammatory proteins identified by proteomic approaches. Proteins significantly upregulated in effector DCs detected with 2D-DIGE (FDR p-value ≤ 0.05 and at least a 1.2 fold change, see also **suppl. Table 1**) and label-free MS (FDR p-value ≤ 0.01 and at least a 1.5 fold change, **suppl. Table 2**). **(A)** Cy2 image obtained from a 2D-DIGE gel, with localization of differentially expressed protein spots. Whole cell extracts were fractionated using narrow range pH gradient gels (pI range of 5.3 to 6.5, 1 pH unit / 24 cm) in the first dimension and a 11% SDS PAGE in the second dimension. Protein spots marked with an arrow are upregulated in LPS- and/or PGN-DCs and described in **suppl. Table 1**. **(B/C)** Western blot analysis of target proteins in Ctrl-, LPS-, DEX- and PGN-DCs. Two representative donors are presented in B whereas mean ± SEM of 6 independent experiments are presented in C. *p-value ≤ 0.05, **p-value ≤ 0.01 were considered significant (Wilcoxon test). β-actin was used as loading control. **(D)** Validation of pro-inflammatory genes at the mRNA level by qPCR. Data are expressed

as relative amounts of mRNA in treated DCs in comparison with Ctrl-DCs. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as mean ± SEM.

Suppl. Figure 2: mRNA expression of markers of regulatory DCs in PBMCs from 20 patients undergoing allergen-specific immunotherapy (without restimulation)

Markers of tolerogenic DCs that did not exhibit significant changes between placebo or active groups or between responder and non responder groups. Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown for each patient and as a mean ± SEM for each group. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 3: mRNA expression of markers of regulatory DCs in PBMCs from 20 patients undergoing allergen-specific immunotherapy (restimulation with a 5 grass allergen pollen extract – 300 IR/ml)

Markers of tolerogenic DCs that did not exhibit significant changes between placebo or active groups or between responder and non responder groups. Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown for each patient and as a mean ± SEM for each group. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 4: mRNA expression of markers of effector DCs in PBMCs from 20 patients undergoing allergen-specific immunotherapy (without restimulation)

No significant change in markers of effector DCs could be detected at the group level although some patients showed an isolated upregulation of all effector genes. Data are expressed as relative

amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown for each patient and as a mean ± SEM for each group. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 5: mRNA expression of markers of effector DCs in PBMCs from 20 patients undergoing allergen-specific immunotherapy (restimulations with a 5 grass allergen pollen extract – 300 IR/ml)

No significant change in markers of effector DCs could be detected at the group level although some patients showed an isolated upregulation of all effector genes. Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown for each patient and as a mean ± SEM for each group. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 6: mRNA expression of markers of regulatory DCs in PBMCs from 82 patients undergoing allergen-specific immunotherapy.

A. mRNA expression of C1QA, C1QB, C1QC and STAB1 in PBMCs restimulated with a 5 grass allergen pollen extract (300 IR/ml) from 82 patients in the active group in comparison to the placebo group or in responders (% ARTSS ≥ 43.9) versus non responders (% ARTSS < 43.9) (Mann-Whitney test). Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as a mean ± SEM for each group.

B. Correlation of mRNA expression of each individual patient with clinical improvement (% ARTSS) in the active and placebo group. R represents the Spearman correlation coefficient. 1 represents a perfect correlation, whereas a score between 0 and 1 indicates that the two variables

increase or decrease together. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 7: mRNA expression of markers of effector DCs in PBMCs from 82 patients undergoing allergen-specific immunotherapy (without restimulation)

A. mRNA expression of C1QA, C1QB, C1QC and STAB1 in PBMCs from 82 patients in the active group in comparison to the placebo group or in responders (% ARTSS ≥ 43.9) versus non responders (% ARTSS < 43.9) (Mann-Whitney test). Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as a mean ± SEM for each group.

B. Correlation of mRNA expression of each individual patient with clinical improvement (% ARTSS) in the active and placebo group. R represents the Spearman correlation coefficient. 1 represents a perfect correlation, whereas a score between 0 and 1 indicates that the two variables increase or decrease together. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

Suppl. Figure 8: mRNA expression of markers of effector DCs in PBMCs from 82 patients undergoing allergen-specific immunotherapy (restimulation with a 5 grass allergen pollen extract – 300 IR/ml)

A. mRNA expression of C1QA, C1QB, C1QC and STAB1 in PBMCs from 82 patients in the active group in comparison to the placebo group or in responders (% ARTSS ≥ 43.9) versus non responders (% ARTSS < 43.9) (Mann-Whitney test). Data are expressed as relative amounts of mRNA in PBMCs after treatment in comparison with PBMCs before immunotherapy. Data are normalized to amounts of β-actin and shown as a mean ± SEM for each group.

B. Correlation of mRNA expression of each individual patient with clinical improvement (% ARTSS) in the active and placebo group. R represents the Spearman correlation coefficient. 1

represents a perfect correlation, whereas a score between 0 and 1 indicates that the two variables increase or decrease together. (AR: active responders, ANR: active non responders, PR: placebo responders, PNR: placebo non responders).

TABLES

Table 1. Summary of surrogate markers of regulatory DCs identified through proteomic approaches.

The function of markers of tolerogenic DCs was here documented.

Suppl. Table 1: Proteins identified through the 2D-DIGE approach with a FDR p-value < 0.05. Proteins identified with a FDR p-value ≤ 0.05 and at least a 1.2-fold change in volume are included in this list, resulting in a total of 40 differentially-expressed proteins. Max. fold represents the ratio of the average volumes of the highest vs. lowest conditions.

Suppl. Table 2: Proteins identified through the label-free MS approach with a FDR p-value < 0.01. Proteins identified with two or more peptides are included in this list, resulting in a total of 77 differentially-expressed proteins. Included in the list are also three proteins (ITAM, MX1 and PGRP1) identified with only 1 peptide. ITAM and MX1 have been identified in effector DCs by 2D-DIGE and PGRP1 showed a >90-fold increase in the PGN condition. Max. fold represents the ratio of the average abundance of the highest vs. lowest conditions.

Figure 1

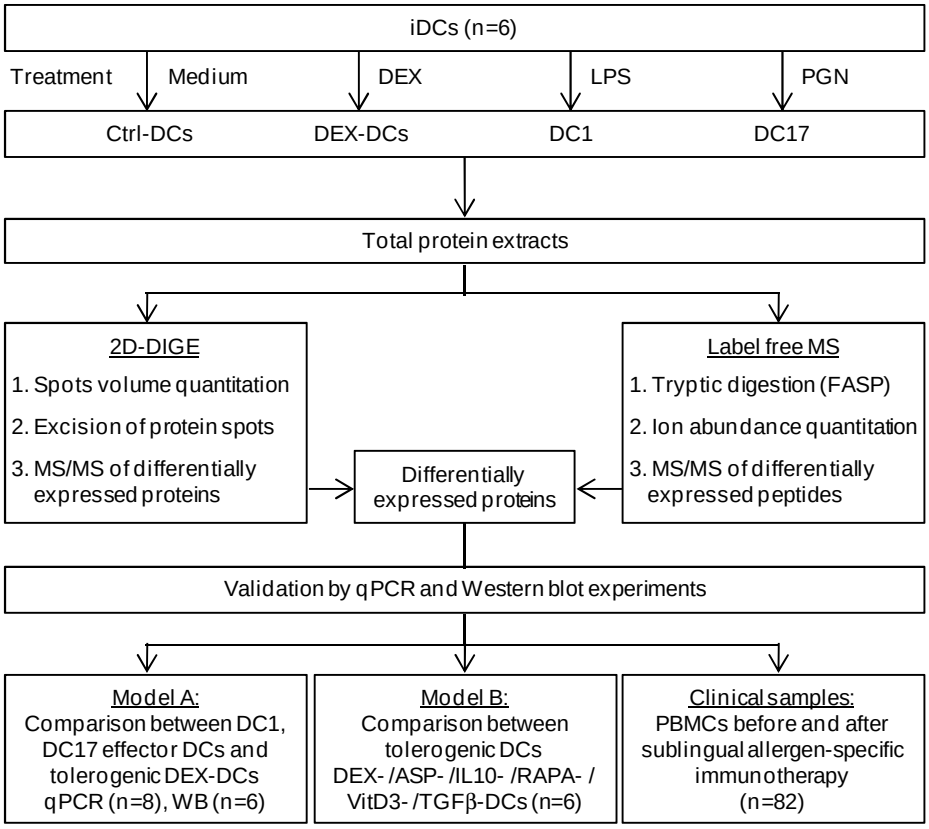
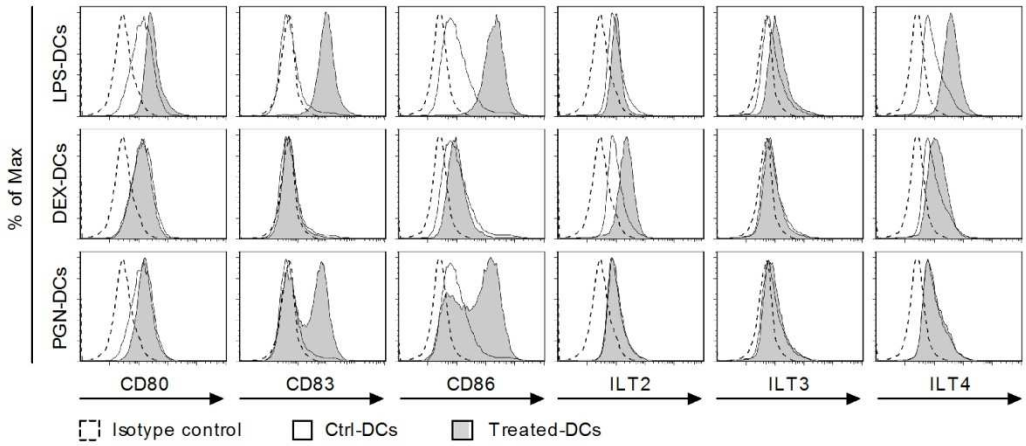

iDCs (n=6)
Treatment
Medium
DEX
LPS
PGN
Ctrl-DCs
DEX-DCs
DC1
DC17
Total protein extracts
2D-DIGE
1. Spots volume quantitation
2. Excision of protein spots
3. MS/MS of differentially expressed proteins
Label free MS
1. Tryptic digestion (FASP)
2. Ion abundance quantitation
3. MS/MS of differentially expressed peptides
Differentially expressed proteins
Validation by qPCR and Western blot experiments
Model A:
Comparison between DC1, DC17 effector DCs and tolerogenic DEX-DCs
qPCR (n=8), WB (n=6)
Model B:
Comparison between tolerogenic DCs
DEX- /ASP- /IL10- /RAPA- / VitD3- /TGFβ-DCs (n=6)
Clinical samples:
PBMCs before and after sublingual allergen-specific immunotherapy
(n=82)

Figure 2

A



B

DCs gene expression				
Relative gene expression/ β-actin	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
GILZ	1	-1,8 ± 1,7	**30 ± 11**	-2,4 ± 1,4
IDO	1	**304 ± 257**	**4,9 ± 0,8**	**14 ± 5**
RALDH1	1	-4 ± 0,2	**6,8 ± 1,6**	-5 ± 3,3
RALDH2	1	-0,05 ± 0,8	0,7 ± 0,8	0,8 ± 0,6

C

DCs cytokine secretion				
Cytokine concentration (pg/ml)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
IL-1β	N.D	12 ± 4	N.D	**143 ± 17**
IL-6	27 ± 10	**6233 ± 3034**	4,5 ± 1,2	**2259 ± 903**
IL-8	936 ± 380	**18730 ± 3375**	109 ± 37	**16856 ± 6145**
IL-10	**14 ± 5**	61 ± 25	24 ± 5	85 ± 37
IL-12p70	N.D	**267 ± 51**	N.D	1,4 ± 0,8
IL-23	18 ± 5	29 ± 8	N.D	**108 ± 6**
TNF-α	5 ± 1	**701 ± 484**	N.D	187 ± 110

D

DCs/ LTs cocultures: gene expression at day 5				
Relative gene expression/ β-actin	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
IFN-γ	1	-0,2 ± 0,7	-3,7 ± 0,8	6,4 ± 5,7
IL-4	1	-0,3 ± 0,8	-0,1 ± 1,7	-3,6 ± 0,8
IL-10	1	-0,8 ± 0,8	**15 ± 5**	0,3 ±1,2
IL-17A	1	-0,7 ± 1,4	1,6 ±0,6	**17 ± 6**

E

DCs/ LTs cocultures: cytokine secretion at day 5				
Cytokine concentration (pg/ml)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
IFN-γ	1901 ± 285	**7633 ± 1266**	1512 ±29	2848 ± 415
IL-9	50 ±19	31 ±12	N.D	70 ±23
IL-10	205 ± 13	175 ±28	**423 ±31**	159 ± 21
IL-13	457 ±146	495 ± 163	37 ±16	634 ±142
IL-17A	N.D	N.D	N.D	**138 ±9**

Figure 3

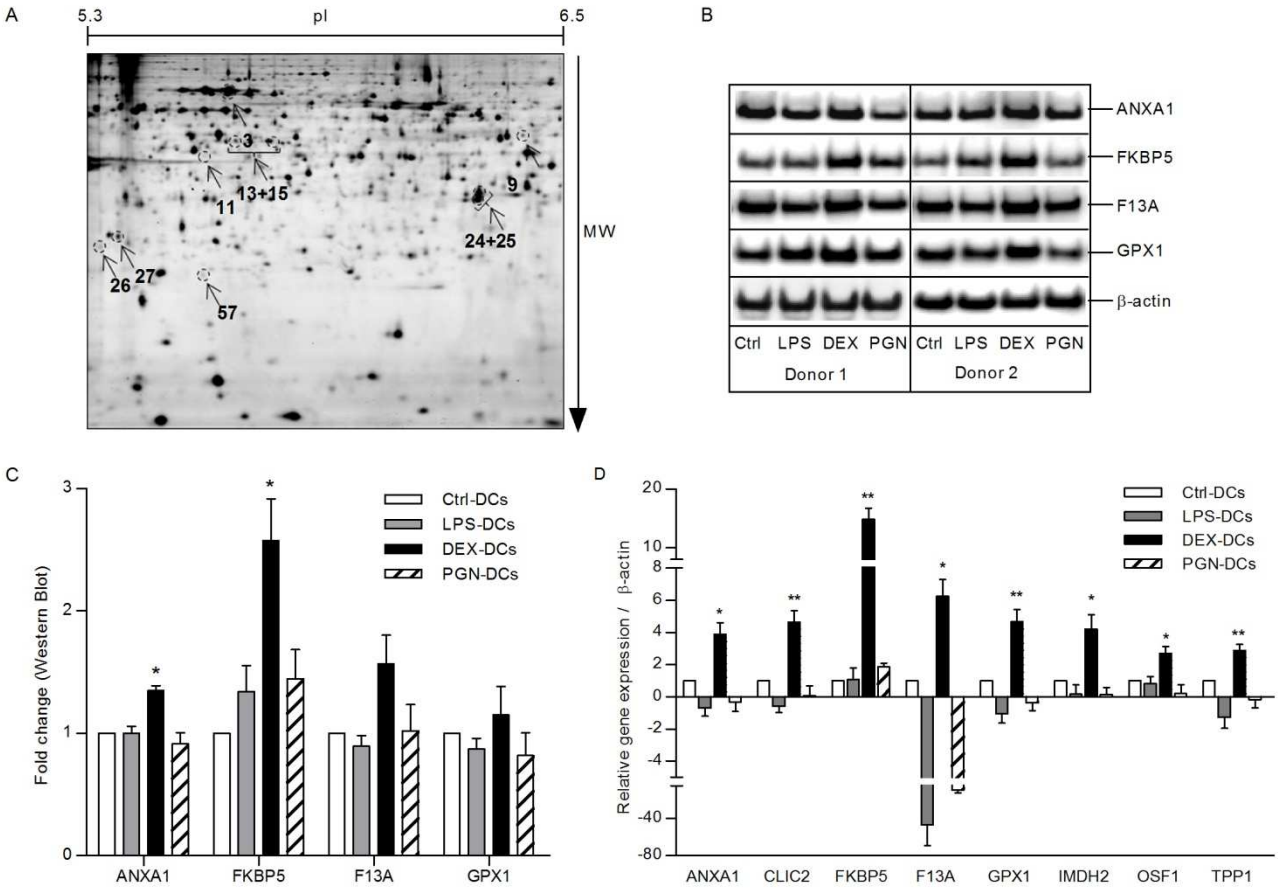

A
5.3
pI
6.5
MW
3
11
13+15
9
24+25
26
27
57
B
ANXA1
FKBP5
F13A
GPX1
β-actin
Ctrl LPS DEX PGN Ctrl LPS DEX PGN
Donor 1
Donor 2
C
Fold change (Western Blot)
Ctrl-DCs
LPS-DCs
DEX-DCs
PGN-DCs
ANXA1
FKBP5
F13A
GPX1
D
Relative gene expression / β-actin
Ctrl-DCs
LPS-DCs
DEX-DCs
PGN-DCs
ANXA1
CLIC2
FKBP5
F13A
GPX1
IMDH2
OSF1
TPP1

Figure 4

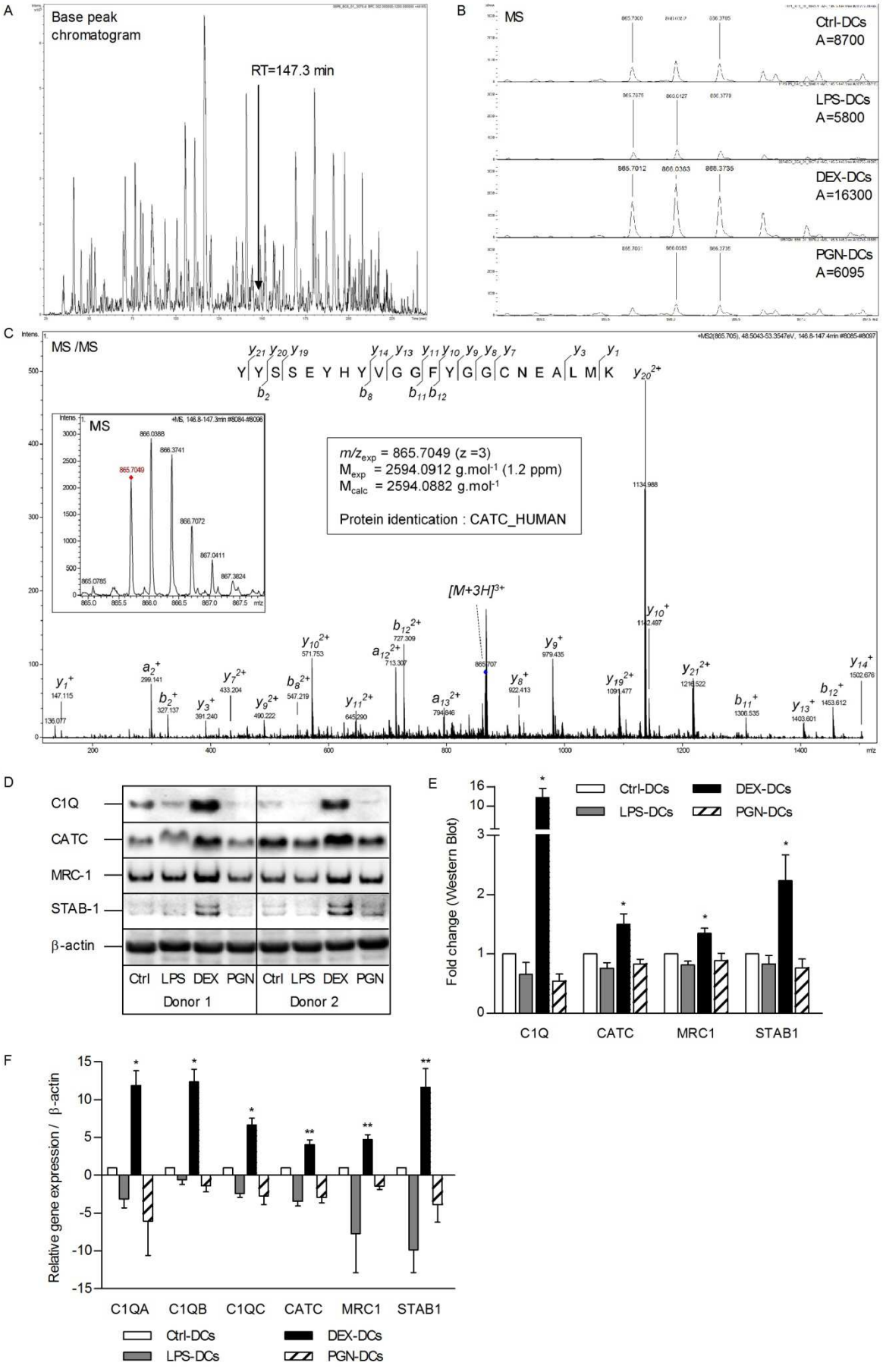

A
Base peak chromatogram
RT=147.3 min
B
MS
Ctrl-DCs A=8700
LPS-DCs A=5800
DEX-DCs A=16300
PGN-DCs A=6095
C
MS /MS
Y Y S S E Y H Y V G G F Y G G C N E A L M K
m/z exp = 865.7049 (z =3)
M exp = 2594.0912 g.mol-1 (1.2 ppm)
M calc = 2594.0882 g.mol-1
Protein identication : CATC_HUMAN
[M+3H]3+
D
C1Q
CATC
MRC-1
STAB-1
β-actin
Ctrl LPS DEX PGN Ctrl LPS DEX PGN
Donor 1
Donor 2
E
Ctrl-DCs
LPS-DCs
DEX-DCs
PGN-DCs
Fold change (Western Blot)
C1Q
CATC
MRC1
STAB1
F
Relative gene expression / β-actin
C1QA
C1QB
C1QC
CATC
MRC1
STAB1
Ctrl-DCs
LPS-DCs
DEX-DCs
PGN-DCs

Figure 5

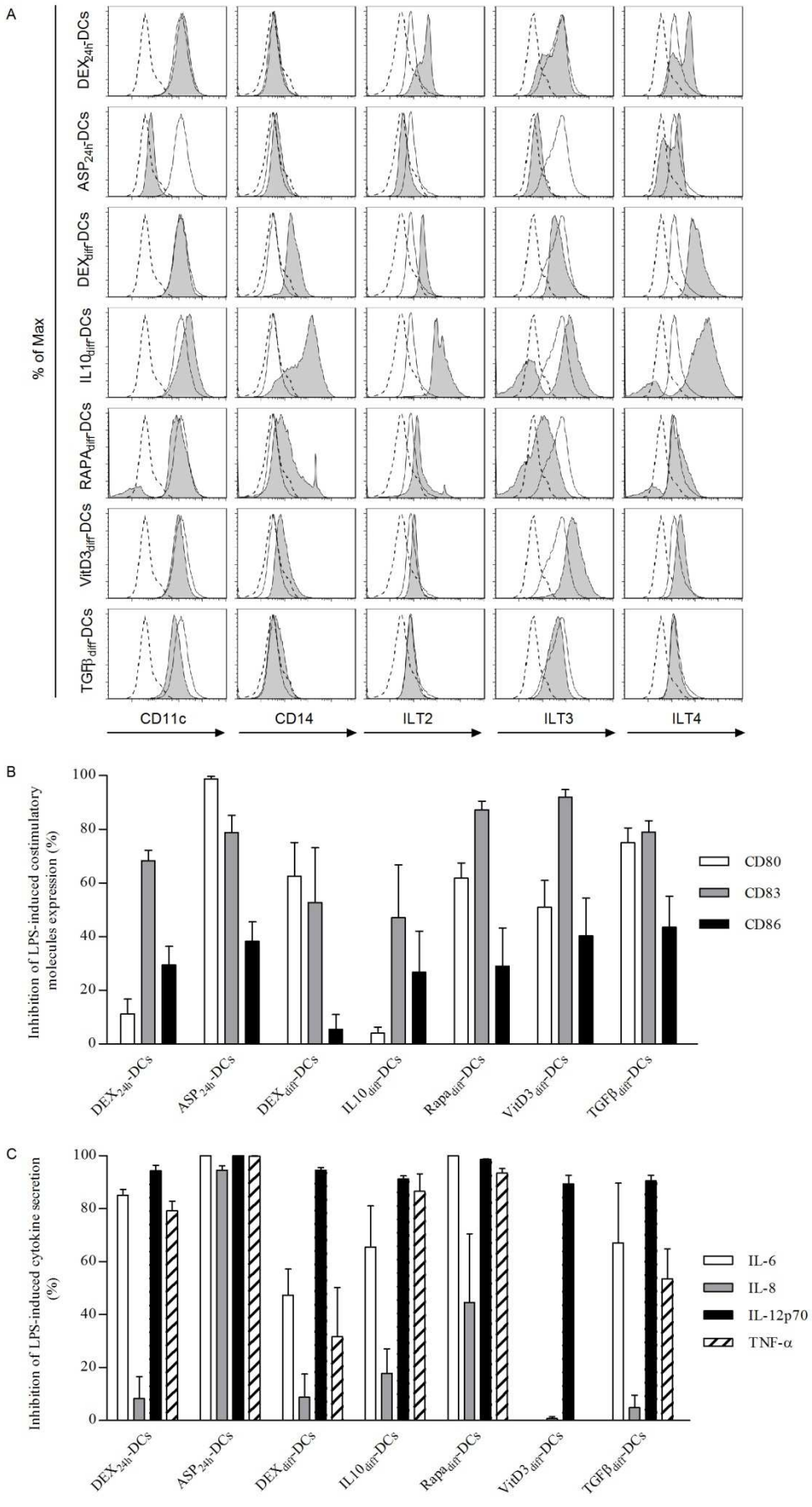

A
% of Max
DEX24hr-DCs
ASP24hr-DCs
DEXdiff-DCs
IL10diff-DCs
RAPAdiff-DCs
VitD3diff-DCs
TGFβdiff-DCs
CD11c
CD14
ILT2
ILT3
ILT4
B
Inhibition of LPS-induced costimulatory molecules expression (%)
CD80
CD83
CD86
DEX24h-DCs
ASP24h-DCs
DEXdiff-DCs
IL10diff-DCs
Rapadiff-DCs
VitD3diff-DCs
TGFβdiff-DCs
C
Inhibition of LPS-induced cytokine secretion (%)
IL-6
IL-8
IL-12p70
TNF-α

Figure 6

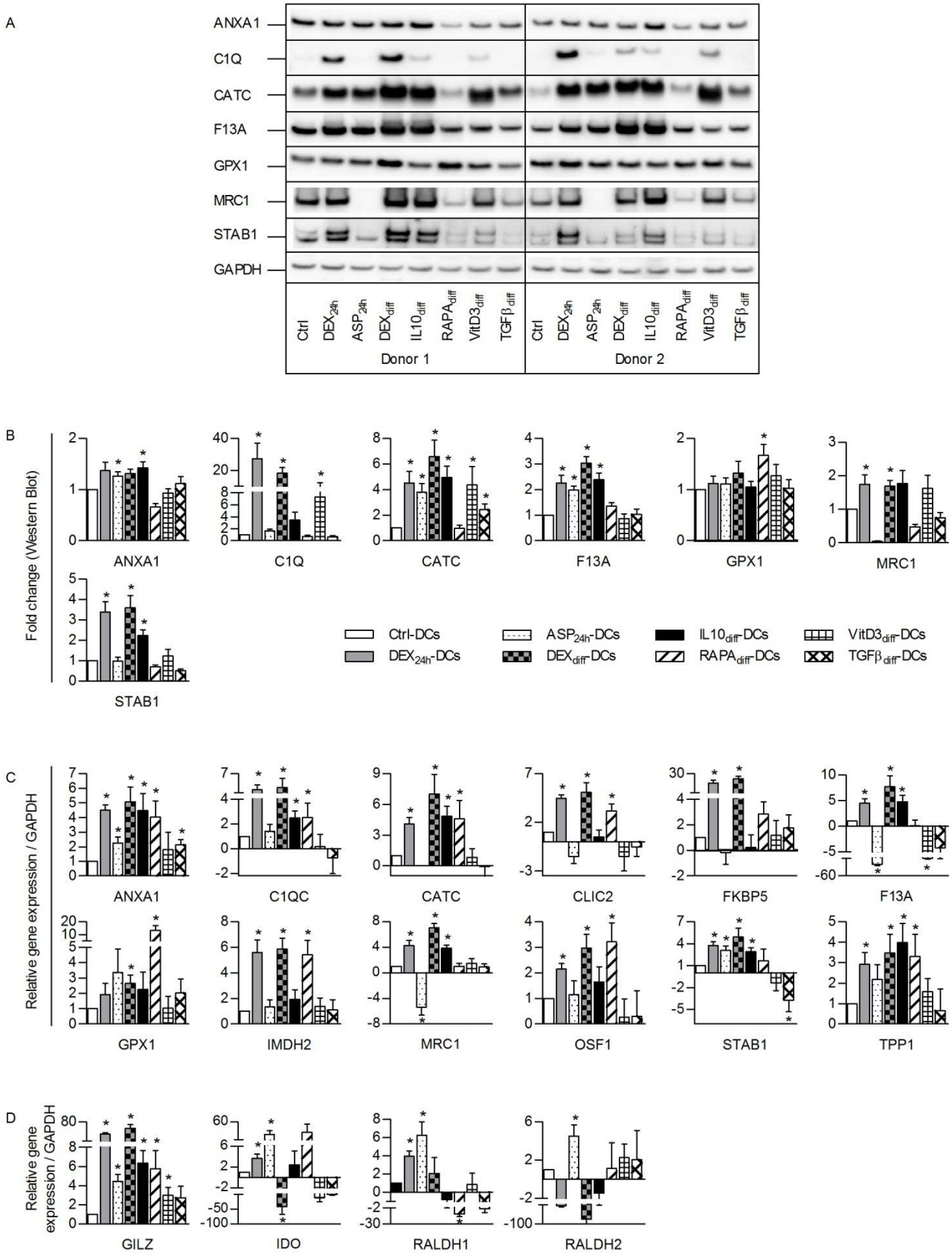

A
ANXA1
C1Q
CATC
F13A
GPX1
MRC1
STAB1
GAPDH
Ctrl
DEX24h
ASP24h
DEXdiff
IL10diff
RAPAdiff
VitD3diff
TGFβdiff
Donor 1
Donor 2
B
Fold change (Western Blot)
ANXA1
C1Q
CATC
F13A
GPX1
MRC1
STAB1
Ctrl-DCs
DEX24h-DCs
ASP24h-DCs
DEXdiff-DCs
IL10diff-DCs
RAPAdiff-DCs
VitD3diff-DCs
TGFβdiff-DCs
C
Relative gene expression / GAPDH
ANXA1
C1QC
CATC
CLIC2
FKBP5
F13A
GPX1
IMDH2
MRC1
OSF1
STAB1
TPP1
D
Relative gene expression / GAPDH
GILZ
IDO
RALDH1
RALDH2

Figure 7

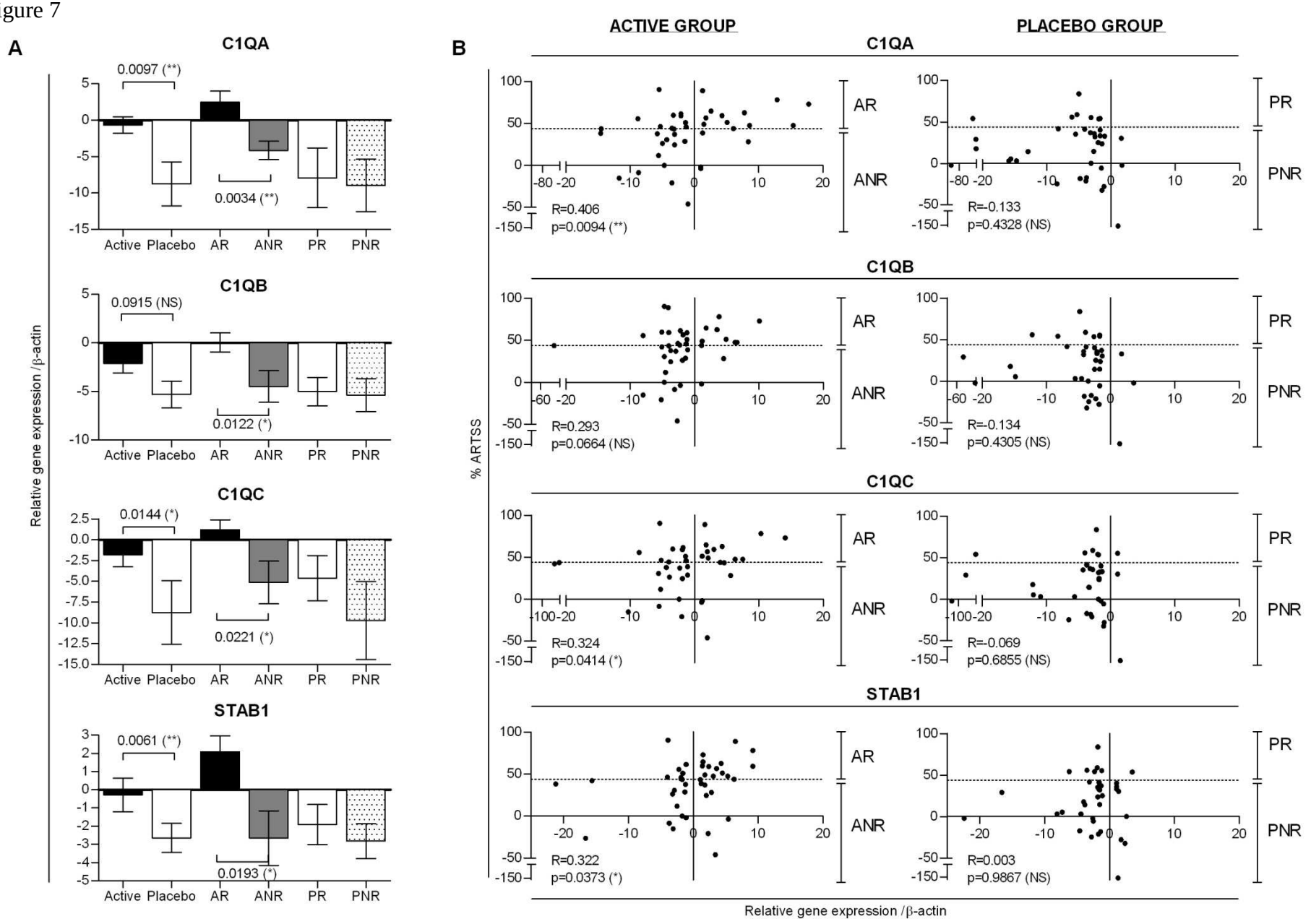
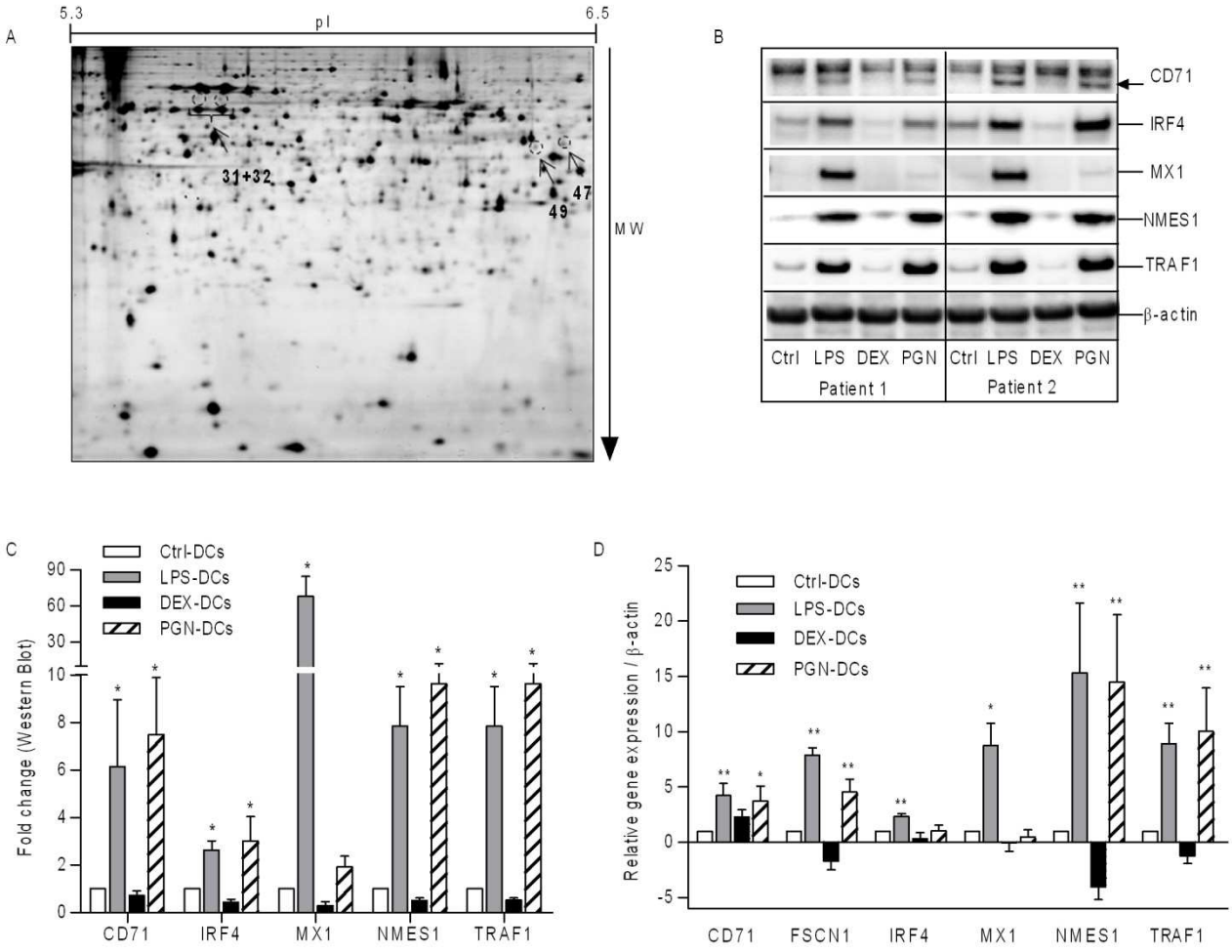

A
C1QA
0.0097 (**)
0.0034 (**)
C1QB
0.0915 (NS)
0.0122 (*)
C1QC
0.0144 (*)
0.0221 (*)
STAB1
0.0061 (**)
0.0193 (*)
Active Placebo AR ANR PR PNR
Relative gene expression /β-actin
B
ACTIVE GROUP
PLACEBO GROUP
C1QA
C1QB
C1QC
STAB1
AR
ANR
PR
PNR
R=0.406
p=0.0094 (**)
R=-0.133
p=0.4328 (NS)
R=0.293
p=0.0664 (NS)
R=-0.134
p=0.4305 (NS)
R=0.324
p=0.0414 (*)
R=-0.069
p=0.6855 (NS)
R=0.322
p=0.0373 (*)
R=0.003
p=0.9867 (NS)
% ARTSS
Relative gene expression /β-actin

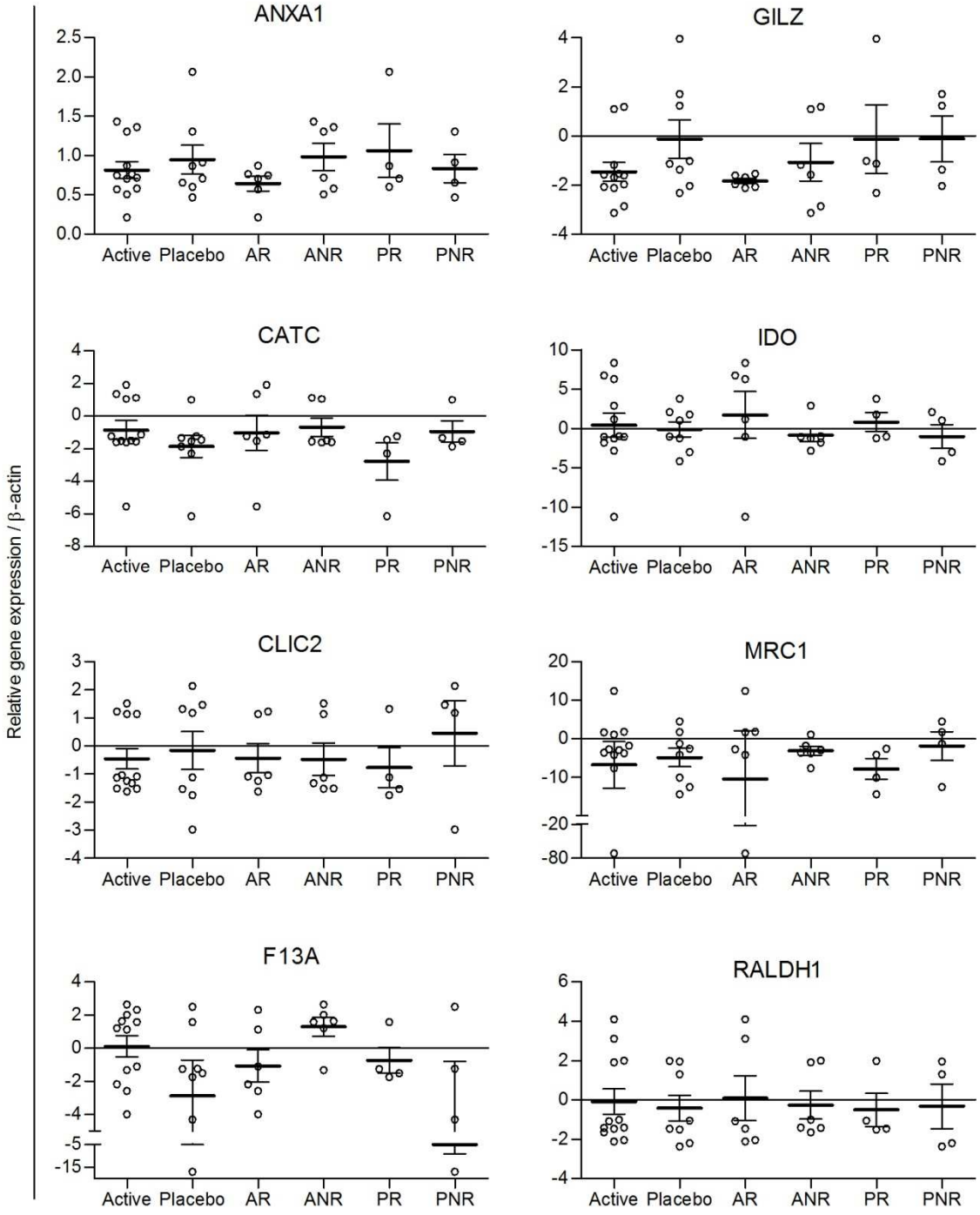
Table 1

Identification Method	Swissprot Accession no.	Protein Name	Fold increase in mRNA (vs. Ctrl-DCs)	Go annotation function (nextprot)	Involvement in effector immunity / tolerance
2D-DIGE	GPX1_HUMAN	Glutathione peroxidase 1	4.7	Oxidoreduction	• GPX1-KO mice → symptoms and pathology of inflammatory bowel disease [39]
	IMDH2_HUMAN	Inosine-5' monophosphate dehydrogenase 2	4.2	Oxidoreduction GMP/purine biosynthesis	• Induction after glucocorticoid and mycophenolate mofetil treatment [40, 41]
	OSTF1_HUMAN	Osteoclast stimulating factor 1	2.7	Signal transduction, ossification	• Unknown
	TPP1_HUMAN	Tripeptidyl-peptidase 1	2.9	Serine protease, lysosomal hydrolase	• Correlation with colorectal carcinoma progression and metastasis [42]
2D-DIGE and label free MS	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	3.9	Signal transduction	• Inhibition of inflammatory mediators generation [43] • Higher levels in healthy buccal tissues when compared with inflammatory exudates from the periodontal tissue [44] • ANXA1-KO mice → exacerbation of arthritis [45] • ANXA1 auto-antibodies in patients with inflammatory disorders like rheumatoid arthritis, systemic and cutaneous lupus erythematosus [44]
	CLIC2_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 2	4.6	Ion channel, ion transport	• Unknown
	F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	6.2	Coagulation factor	• Intracellular expression in dermal DCs [46] • Local consumption and/or loss of Factor XIII within the inflamed tissue during acute episodes of inflammatory bowel diseases [47] • Human deficiency is associated with impaired wound healing [48]
	FKBP5_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	14.9	Chaperone	• Induction after glucocorticoid treatment [40]
Label free MS	C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B	12.4	Complement subunits, innate immunity, signal transduction	• Component of the classical complement pathway. Binds to immune complexes to elicit microbial killing and enhance phagocytosis [49] • Treatment of moDCs with C1q induces tolerogenic DCs secreting IL-10, capable to phagocytose apoptotic cells [50] • Human deficiency leads to the development of lupus-like autoimmune disease [51]. Deficient patients are at greater risks of spontaneous miscarriages or preterm birth [52] • Importance during the early stage of pregnancy [30]
	C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	6.7		
	CATC_HUMAN	Dipeptidyl peptidase 1	4.1	Thiol protease, hydrolase, activation of F13A	• Overexpression in adenocarcinomas when compared to the normal gastric mucosa [53] • Human deficiency is associated with the Papillon-Lefèvre syndrome characterized by severe early-onset periodontitis (gingival inflammation and loss of connective tissues supporting the teeth) [54]
	MRC1_HUMAN	Macrophage mannose receptor 1	4.7	Endocytosis, phogocytosis of glycoproteins	• Mediate allergen uptake by DCs [55] • Ligation by tumoral mucins on tumor associated macrophages induces an immunosuppressive profile [56] • Crosslinking on moDCs induces anergic suppressive/regulatory DCs [57]
	STAB1_HUMAN	Stabilin-1	11.7	Receptor of acetylated LDL, inflammatory response	• Induction after glucocorticoid treatment [58] • Expression by alternatively activated macrophages in the placenta [59] and in tissues during wound healing [60] • Silencing in placental leukocytes increased the secretion of the pro-inflammatory cytokine TNF-α [28] • Presence of $CD11b^+$ $F4/80^+$ $STAB1^+$ macrophages in malignant tumors [61]

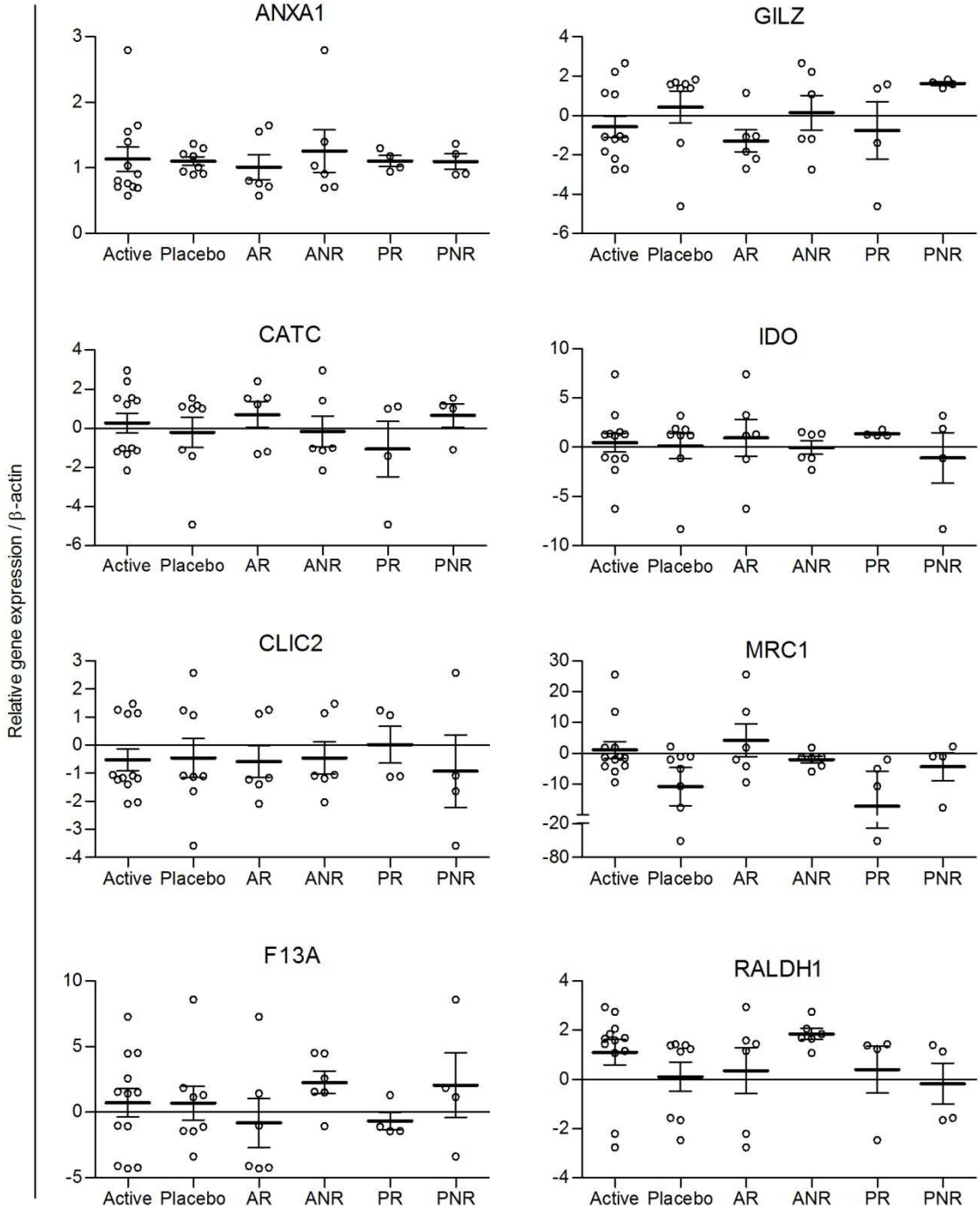
Suppl. Fig. 1


A
5.3
pI
6.5
MW
31+32
47
49
B
CD71
IRF4
MX1
NMES1
TRAF1
β-actin
Ctrl LPS DEX PGN Ctrl LPS DEX PGN
Patient 1
Patient 2
C
Ctrl-DCs
LPS-DCs
DEX-DCs
PGN-DCs
Fold change (Western Blot)
CD71
IRF4
MX1
NMES1
TRAF1
D
Ctrl-DCs
LPS-DCs
DEX-DCs
PGN-DCs
Relative gene expression / β-actin
CD71
FSCN1
IRF4
MX1
NMES1
TRAF1

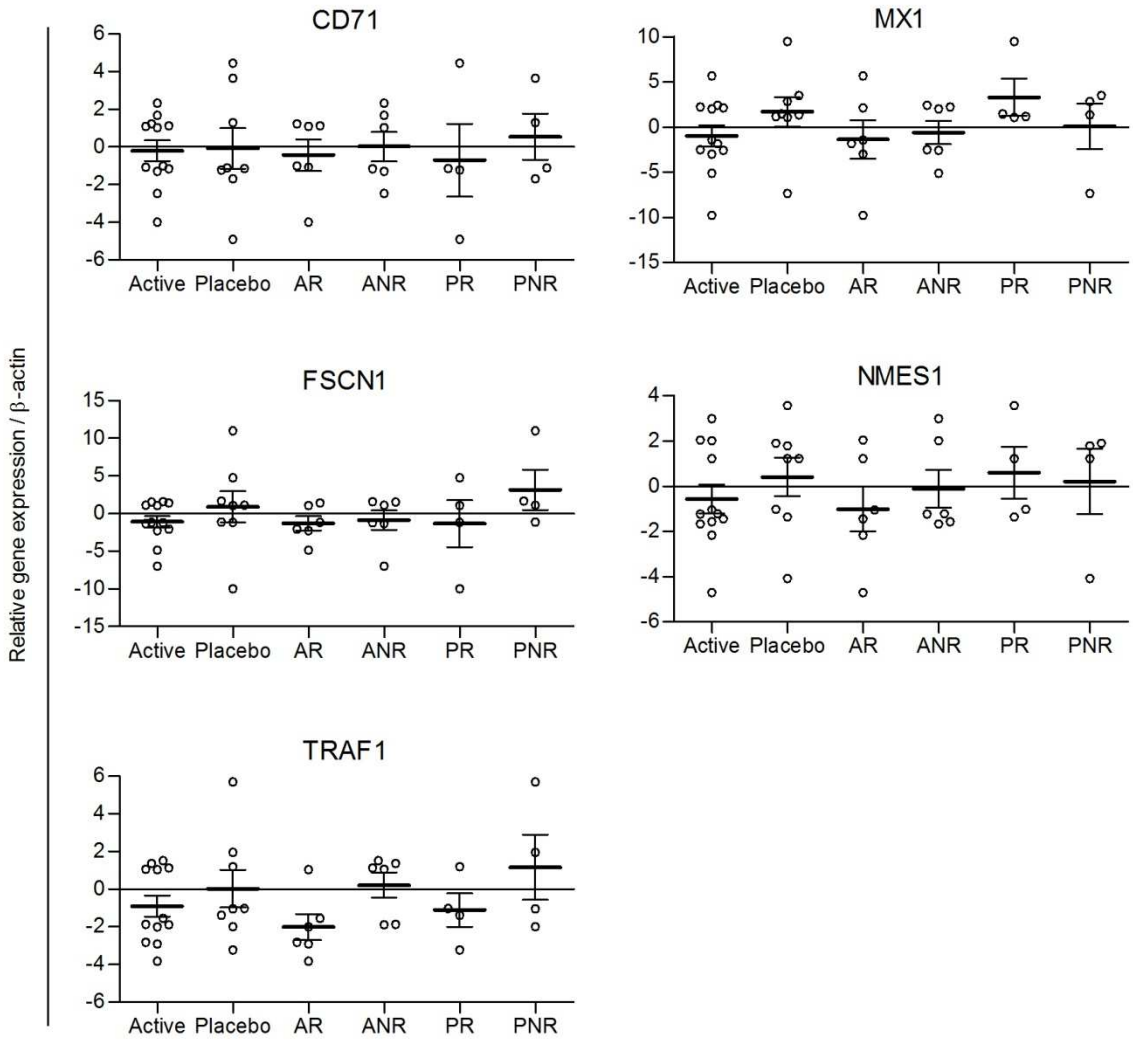
Suppl. Fig. 2. Tolerogenic genes / PBMCs unrestimulated / 20 patients



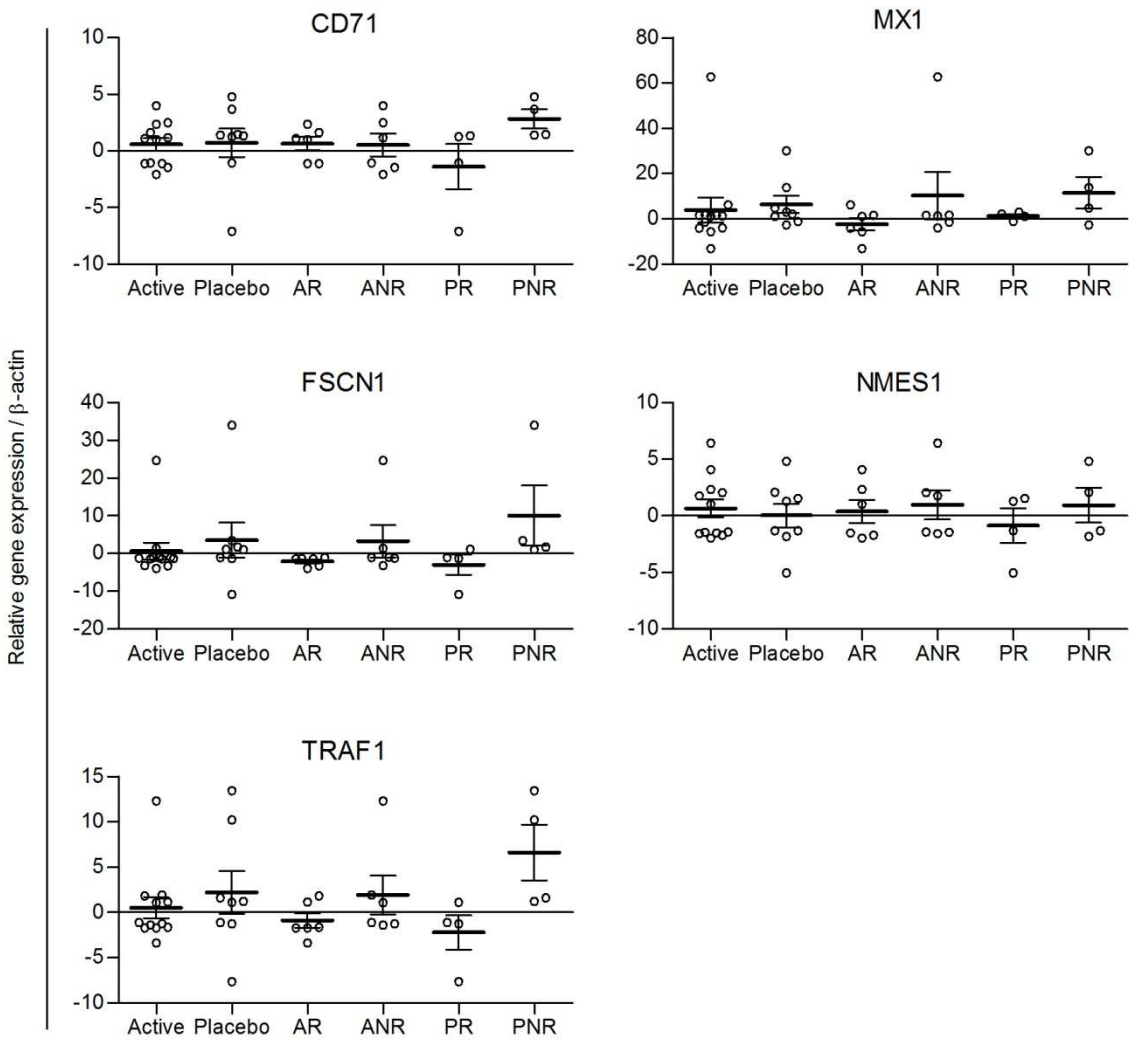
Suppl. Fig. 3. Tolerogenic genes / PBMCs restimulated / 20 patients



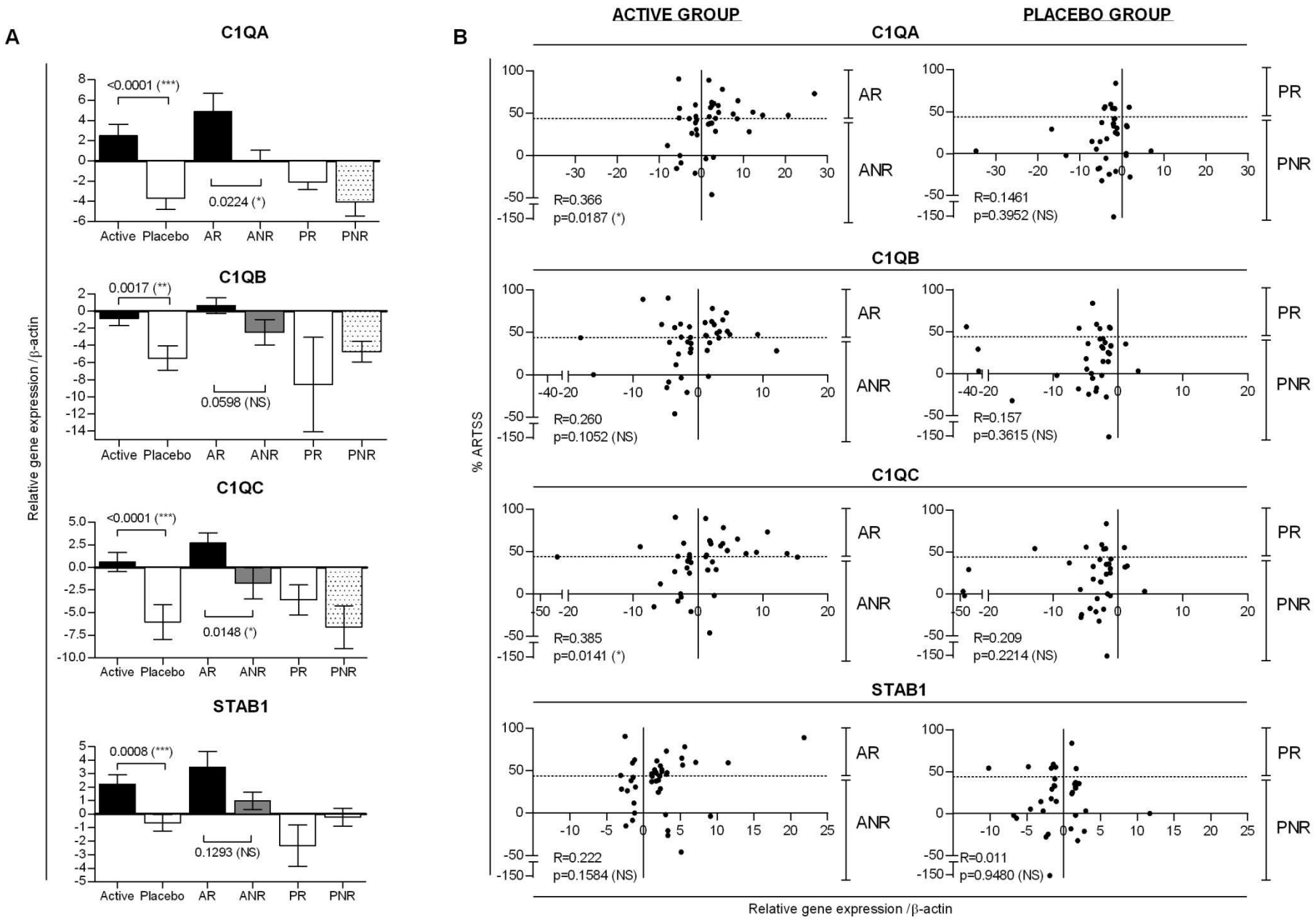
Suppl. Fig. 4 Effector genes / PBMCs unrestimulated / 20 patients



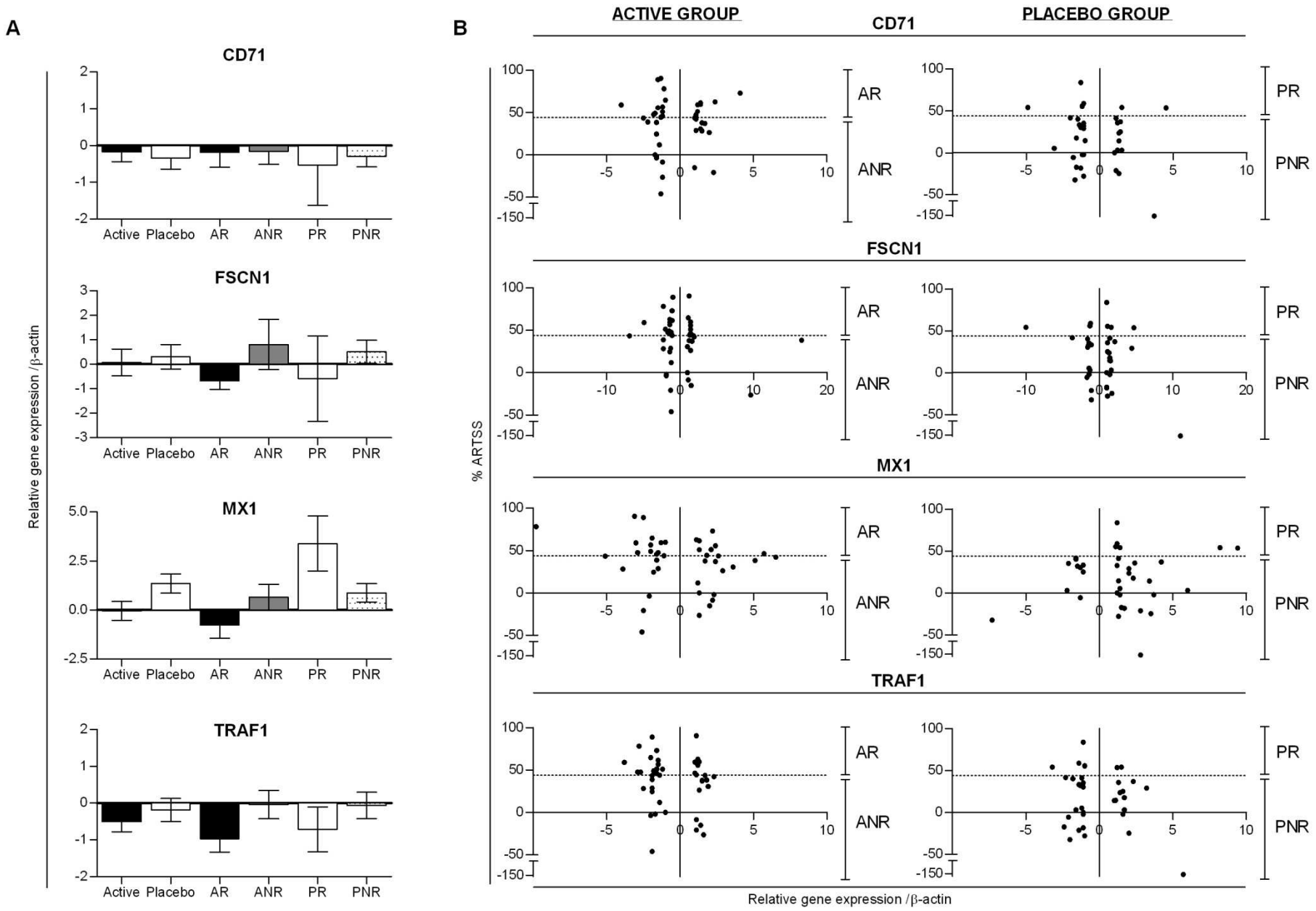
Suppl. Fig. 5 Effector genes / PBMCs restimulated / 20 patients



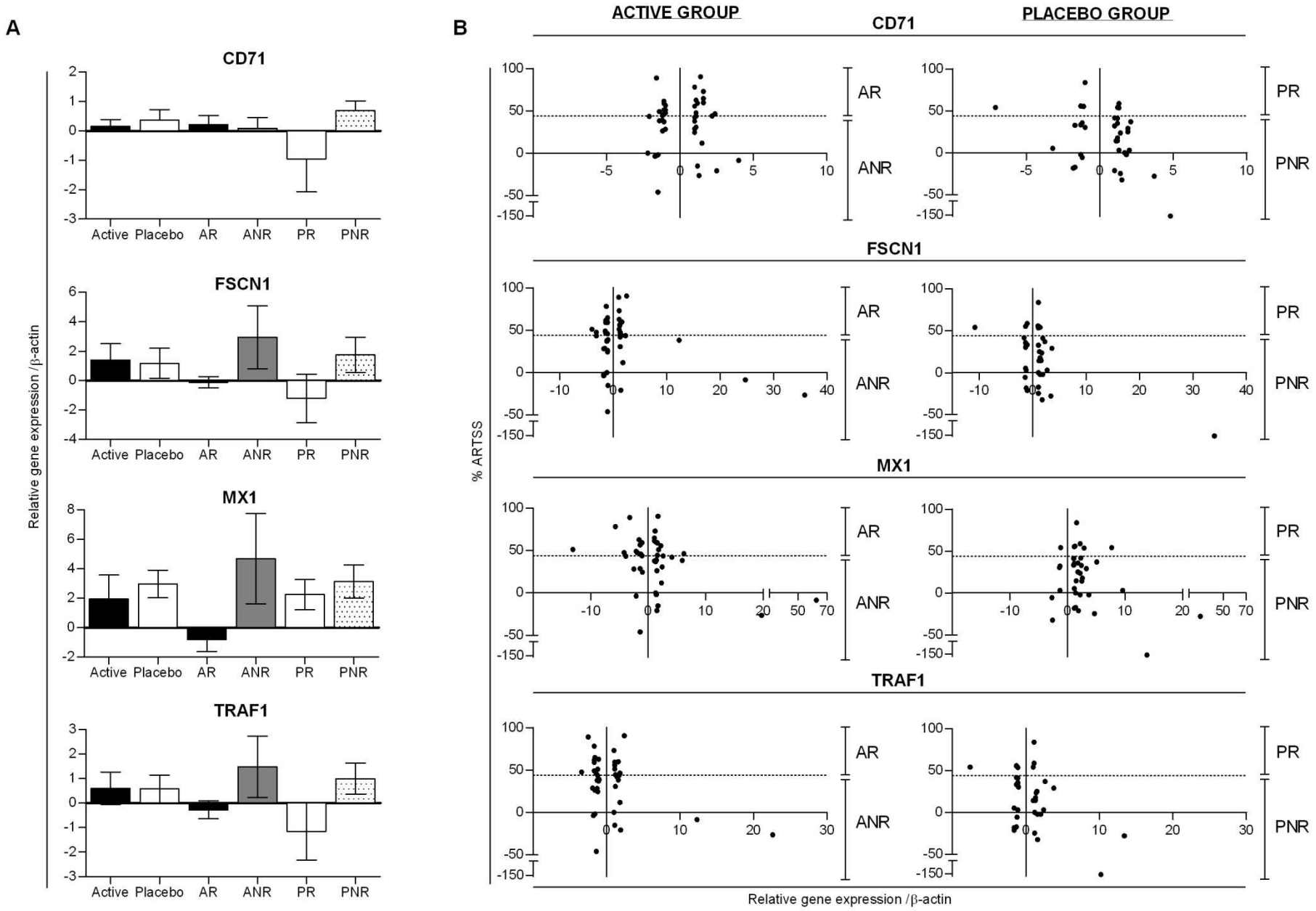
Suppl. Fig. 6 Tolerogenic genes / PBMCs restimulated / 82 patients



Suppl. Fig. 7 Effector genes / PBMCs unrestimulated / 82 patients



Suppl. Fig. 8 Effector genes / PBMCs restimulated / 82 patients



Suppl. Table 1

A

Proteins upregulated in DEX-DCs and downregulated in LPS-DCs and PGN-DCs

Spot no./ Picking no.	Anova (p)	q value	Power	Max. fold	Average normalized volumes				Accession no.	Protein name	Mascot protein score	MW (kDa)	pI	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	m/z measured	z	Δ m/z	Rt (min)	Mascot peptide score (>10)	P	Range	Sequence	Modification (C:Carbamidomethylation, O:Oxidation)
					Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs																
1023/26	8.67E-06	6.24E-04	1.00	2.80	1.23	0.69	**1.66**	0.59	OSTF1_HUMAN	Osteoclast stimulating factor 1	125.0	23.8	5.34	29.9	4	764.05	3	-4.16	32.64	24.00	0	120 - 138	K,DIVEMLFTQPNIELNQQNK,L	O: 5
																652.38	2	-3.90	36.20	24.20	0	151 - 162	K,GYADIVQLLLAK,G	
																889.78	3	-3.89	27.44	34.70	0	58 - 82	R,TGLIPSNYVAEQAESIDNPLHEAAK,R	
																498.76	2	-8.00	18.91	42.10	0	19 - 26	R,ALYTFEPR,T	
315/5	5.61E-05	2.21E-03	1.00	1.80	1.29	0.83	**1.33**	0.75	EF2_HUMAN	Elongation factor 2	339.7	95.3	6.42	17.5	10	920.49	3	4.64	37.20	10.60	0	457 - 481	R,YVEPIEDVPCGNIVGLVGVDQFLVK,T	C: 10
																689.86	2	3.17	21.74	13.10	0	728 - 739	R,CLYASVLTAQPR,L	C: 1
																747.91	2	5.10	33.93	21.10	0	288 - 299	R,TFCQLILDPIFK,V	C: 3
																660.00	3	4.48	21.22	26.10	0	768 - 785	R,GHVFEESQVAGTPMFVVK,A	O: 14
																745.05	3	5.76	30.72	33.00	1	648 - 667	R,KIWCFGPDGTGPNILTDITK,G	C: 4
																569.76	2	2.60	19.68	37.20	0	639 - 647	K,YEWDVAEAR,K	
																554.32	2	1.16	21.78	41.10	0	416 - 426	R,VFSGLVSTGLK,V	
																715.03	3	3.79	21.63	45.00	1	606 - 625	K,ARPFPDGLAEDIDKGEVSAR,Q	
																722.89	2	3.39	37.24	51.30	1	846 - 858	K,EGIPALDNFLDKL,-	
																546.30	2	2.32	19.71	53.60	0	2 - 10	M,VNFTVDQIR,A	
356/3	3.50E-03	4.54E-02	0.93	1.50	1.08	0.83	**1.22**	0.89	F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	748.7	83.2	5.69	32.1	20	607.99	3	4.77	17.75	10.10	0	663 - 678	R,NVWVHLDGPGVTRPMK,K	O: 15
																744.38	3	8.52	23.70	10.30	1	79 - 96	R,RGQSFYVQIDFSRPYDPR,R	
																982.98	2	6.27	39.24	14.40	0	312 - 327	R,YGQCWVFAGVFNTFLR,C	C: 4
																725.01	3	7.76	25.80	18.80	1	517 - 535	R,SNVDMDFEVENAVLGKDFK,L	O: 5
																1089.54	2	8.20	26.13	19.50	0	639 - 658	R,GTQVVGSDMTVTVQFTNPLK,E	O: 9
																488.27	4	4.48	15.39	21.50	1	663 - 679	R,NVWVHLDGPGVTRPMKK,M	O: 15
																545.28	5	7.05	20.80	21.90	0	683 - 704	R,EIRPNSTVQWEEVCRPWVSGHR,K	C: 14
																763.40	2	9.22	30.56	26.90	0	572 - 584	K,ETFDVTLEPLSFK,K	
																651.34	4	9.61	27.32	27.90	0	14 - 38	R,AVPPNNSNAAEDDLPTVELQGVVPR,G	
																728.89	2	7.29	18.07	28.30	0	717 - 728	R,HVYGELDVQIQR,R	
																810.40	3	9.64	27.80	30.90	1	484 - 504	K,FQEGQEEERLALETALMYGAK,K	O: 17
																838.87	2	6.86	15.99	35.00	0	469 - 483	K,QIGGDGMMDITDTYK,F	O: 7, 8
																663.92	2	7.86	30.39	37.50	0	625 - 636	K,STVLTIPEIIIK,V	
																920.15	3	8.66	24.47	48.40	1	13 - 38	R,RAVPPNNSNAAEDDLPTVELQGVVPR,G	
																785.91	2	7.17	29.66	53.60	0	160 - 172	R,MYVAVWTPYGVLR,T	O: 1
																844.47	2	6.87	29.55	63.10	0	115 - 130	K,GTYIPVPIVSELQSGK,W	
																648.85	2	6.72	23.50	64.70	0	493 - 504	R,LALETALMYGAK,K	O: 8
																827.45	2	7.80	26.07	65.80	1	572 - 585	K,ETFDVTLEPLSFKK,E	
																649.03	3	7.54	33.98	72.00	0	39 - 55	R,GVNLQEFLNVTSVHLFK,E	
																891.92	2	8.22	25.07	76.00	0	517 - 532	R,SNVDMDFEVENAVLGK,D	O: 5
848/24	1.75E-06	2.23E-04	1.00	1.40	1.20	1.03	**1.39**	1.01	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	63.3	38.7	6.68	7.8	2	775.91	2	-1.27	29.25	21.90	0	215 - 228	K,GTDVNVFNTILTTR,S	
																694.38	2	-4.15	33.49	41.40	0	59 - 71	K,GVDEATIIDILTK,R	
891/25	7.82E-07	1.13E-04	1.00	1.40	1.02	0.91	**1.25**	0.91	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	485.7	38.7	6.68	31.6	10	714.34	3	-2.49	27.83	13.80	0	10 - 26	K,QAWFIENEEQEYVQTVK,S	
																635.68	3	-3.53	16.02	14.50	1	82 - 98	K,AAYLQETGKPLDETLKK,A	
																689.97	3	-1.62	18.45	27.10	1	186 - 204	K,GDRSEDFGVNEDLADSDAR,A	
																535.99	3	-4.96	36.28	29.80	0	99 - 113	K,ALTGHLEEVVLALLK,T	
																560.31	3	-5.96	25.27	32.00	1	214 - 228	R,KGTDVNVFNTILTTR,S	
																694.39	2	-3.43	33.40	52.50	0	59 - 71	K,GVDEATIIDILTK,R	
																870.37	2	-5.60	20.58	59.30	0	189 - 204	R,SEDFGVNEDLADSDAR,A	
																775.91	2	-3.21	29.18	72.30	0	215 - 228	K,GTDVNVFNTILTTR,S	
																631.80	2	-4.46	17.87	76.10	0	114 - 124	K,TPAQFDADELR,A	
																851.94	2	-4.25	34.63	90.00	0	129 - 144	K,GLGTDEDTLIEILASR,T	
731/11	1.67E-04	5.19E-03	1.00	1.30	0.92	0.77	**1.02**	0.89	TPP1_HUMAN	Tripeptidyl-peptidase 1	151.9	61.2	6.01	10.7	4	512.97	3	-1.60	23.62	27.40	0	493 - 506	R,ILSGRPPLGFLNPR,L	
																661.66	3	0.44	30.74	36.20	0	448 - 465	R,AYPDVAALSDGYWVVSNR,V	
																535.61	3	-1.75	19.24	40.00	0	507 - 520	R,LYQQHGAGLFDVTR,G	
																492.26	3	2.62	17.27	48.20	0	246 - 259	R,LFGGNFAHQASVAR,V	
987/27	1.04E-03	1.79E-02	0.97	1.30	1.00	1.00	**1.26**	0.97	CLIC2_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 2	1017.3	28.3	5.32	61.9	15	657.05	4	5.64	18.61	29.70	1	223 - 244	R,EEFTHTCPEDKEIENTYANVAK,Q	C: 7
																540.32	2	3.46	32.74	33.10	0	36 - 43	R,LFMILWLK,G	O: 3
																559.94	3	4.24	22.19	43.40	1	106 - 119	K,YKESFDVGCNLFAK,F	C: 9
																769.87	2	3.96	34.19	50.60	0	202 - 214	R,DFDIPAEFSGVWR,Y	
																823.44	2	4.43	26.46	55.60	0	63 - 77	K,DLAPGTNPPFLVYNK,E	
																619.97	3	4.99	29.30	57.50	1	200 - 214	K,YRDFDIPAEFSGVWR,Y	
																693.82	2	4.10	24.88	58.60	0	108 - 119	K,ESFDVGCNLFAK,F	C: 7
																790.77	3	6.40	23.44	62.40	1	57 - 77	R,KPEELKDLAPGTNPPFLVYNK,E	
																600.29	2	4.35	15.42	63.10	0	47 - 56	K,FNVTTVDMTR,K	O: 8
																1010.03	2	2.48	34.00	64.00	0	172 - 189	R,LFLDGDQLTLADCSLLPK,L	C: 13
																725.72	3	4.15	30.43	84.10	1	171 - 189	R,RLFLDGDQLTLADCSLLPK,L	C: 14
																716.39	3	2.68	37.91	87.80	1	81 - 98	K,TDFIKIEEFLEQTLAPPR,Y	
																938.45	3	2.24	33.84	98.10	0	146 - 170	R,LDDYLNTPLLDEIDPDSAEEPPVSR,R	
																771.92	2	4.20	25.47	113.00	0	86 - 98	K,IEEFLEQTLAPPR,Y	
																990.49	3	4.43	32.08	117.20	1	145 - 170	K,RLDDYLNTPLLDEIDPDSAEEPPVSR,R	
1096/57	5.64E-05	2.21E-03	1.00	1.20	1.21	1.17	**1.40**	1.16	GPX1_HUMAN	Glutathione peroxidase 1	330.6	22.0	6.18	56.2	8	561.76	2	-13.96	19.92	22.20	0	156 - 164	R,NDVAWNFEK,F	
																708.38	4	-13.20	29.09	28.40	0	6 - 34	R,LAAAAAQSVYAFSARPLAGGEPVSLGSLR,G	
																705.68	3	-13.58	25.09	32.00	0	68 - 86	R,GLVVLGFPCNQFGHQENAK,N	C: 9
																566.29	2	-13.31	21.98	33.70	0	147 - 155	K,LITWSPVCR,N	C: 8
																620.29	3	-13.94	19.77	38.60	0	129 - 146	R,EALPAPSDDATALMTDPK,L	O: 14
																668.65	3	-13.58	26.36	53.50	0	96 - 112	K,YVRPGGGFEPNFMLFEK,C	O: 13
																585.33	2	-13.71	24.15	58.50	0	165 - 175	K,FLVGPDGVPLR,R	
																442.59	3	-13.89	20.44	63.70	1	165 - 176	K,FLVGPDGVPLRR,Y	
630/9	5.68E-05	2.21E-03	1.00	1.20	1.10	1.01	**1.22**	1.03	IMDH2_HUMAN	Inosine-5' monophosphate dehydrogenase 2	63.4	55.8	6.48	9.6	3	696.05	3	3.03	24.30	13.00	1	292 - 311	K,DKYPNLQVIGGNVVTAAQAK,N	
																683.39	3	7.55	22.80	15.20	1	356 - 375	R,RFGVPVIADGGIQNVGHIAK,A	
																655.71	3	7.08	29.40	26.10	1	207 - 224	K,GKLPIVNEDDELVAIIAR,T	
883/18	1.32E-05	8.48E-04	1.00	1.20	1.07	0.97	**1.14**	1.01	GBB2_HUMAN	Guanin nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 2	197.0	37.3	5.56	16.5	4	919.44	3	-3.04	32.23	30.60	0	257 - 280	R,ADQELLMYSHDNIICGITSVAFSR,S	C: 15; O: 7
																687.35	3	-3.02	24.29	43.20	1	23 - 42	R,KACGDSTLTQITAGLDPVGR,I	C: 3
																644.65	3	-2.72	27.94	57.30	0	24 - 42	K,ACGDSTLTQITAGLDPVGR,I	C: 2
																677.35	2	-3.96	24.53	60.20	0	79 - 89	K,LIIWDSYTTNK,V	
									GBB1_HUMAN	Guanin nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta 1	162.5	37.3	5.56	19.1	4	911.42	3	-4.57	27.39	13.00	0	257 - 280	R,ADQELMTYSHDNIICGITSVSFSK,S	C: 15; O: 6
																715.36	3	-4.42	23.07	33.60	1	23 - 42	R,KACADATLSQITNNIDPVGR,I	C: 3
																672.66	3	-4.82	26.59	55.60	0	24 - 42	K,ACADATLSQITNNIDPVGR,I	C: 2
																677.35	2	-3.96	24.53	60.20	0	79 - 89	K,LIIWDSYTTNK,V	
720/23	1.82E-07	3.50E-05	1.00	1.20	1.05	0.98	**1.16**	1.01	IF4A3_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-III	182.2	46.8	6.32	16.3	6	509.27	2	-7.41	21.21	14.40	0	244 - 252	R,DELTLEGIK,Q	
																776.86	2	-5.41	20.45	15.80	0	183 - 195	K,MLVLDEADEMLNK,G	O: 1, 10
																498.27	2	-8.20	20.13	23.20	0	253 - 260	K,QFFVAVER,E	
																580.32	2	-4.53	24.03	28.80	0	330 - 339	R,VLISTDVWAR,G	
																606.85	2	-5.39	19.00	41.50	0	106 - 116	R,ETQALILAPTR,E	
																609.98	3	-5.83	19.74	58.50	0	52 - 67	R,GIYAYGFEKPSAIQQR,A	

B

	Spot no./ Picking no.	Anova (p)	q value	Power	Max. fold	Average normalised volumes				Accession no.	Protein name	Mascot protein score	MW (kDa)	pI	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	m/z measured	z	Δ m/z	Rt (min)	Mascot peptide score (>10)	P	Range	Sequence	Modification (C:Carbamidomethylation, O:Oxidation)
						Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs																
Proteins downregulated in LPS-DCs and PGN-DCs	1182/28	1.62E-05	9.23E-04	1.00	2.70	1.50	0.60	**1.28**	0.55	COF1_HUMAN	Cofilin-1	186.7	18.5	9.13	0.4	5	670.89	2	-4.82	24.48	11.60	0	153 - 166	K,LGGSAVISLEGKPL,-	
																	1021.53	3	-1.89	33.86	16.40	1	46 - 73	K,NIILEEGKEILVGDVGQTVDDPYATFVK,M	
																	664.02	3	-4.31	33.18	38.70	1	96 - 112	K,KEDLVFIFWAPESAPLK,S	
																	722.70	3	-3.99	30.27	59.60	0	54 - 73	K,EILVGDVGQTVDDPYATFVK,M	
																	669.31	2	-6.76	19.07	60.20	0	82 - 92	R,YALYDATYETK,E	
	849/17	2.76E-05	1.38E-03	1.00	1.60	1.20	0.83	**1.12**	0.77	MK14_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 14	55.4	41.3	5.41	12.2	2	917.47	3	13.50	32.92	10.60	0	95 - 118	R,SLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVK,C	O: 15
																	1096.60	2	14.13	36.74	45.70	0	268 - 287	K,MNFANVFIGANPLAVDLLEK,M	O: 1
	489/7	5.41E-04	1.13E-02	0.99	1.50	1.24	0.89	**1.31**	0.95	SAMH1_HUMAN	SAM domain and HD domain-containing protein 1	249.2	72.2	6.76	28.6	12	797.38	3	4.15	32.24	11.40	1	493 - 512	K,LKAEDFIVDVINMDYGMQEK,N	O: 13, 17
																	565.04	4	4.06	32.03	11.80	0	165 - 185	R,FEHSLGVGYLAGCLVHALGEK,Q	C: 13
																	544.80	2	0.81	22.53	12.20	0	57 - 66	R,GGFEEPVLLK,N	
																	941.50	2	-0.48	39.43	13.10	0	422 - 437	K,LTDNIFLEILYSTDPK,L	
																	600.32	2	1.05	25.66	14.30	0	295 - 304	K,SFLYEIVSNK,R	
																	574.95	3	0.97	19.73	17.20	0	149 - 164	K,QLGGGYYVFPGASHNR,F	
																	460.55	3	-4.42	17.75	17.80	0	513 - 523	K,NPIDHVSFYCK,T	C: 10
																	833.94	2	2.45	31.27	22.90	0	378 - 392	K,VGNIIDTMITDAFLK,A	O: 8
																	654.33	2	0.55	20.75	25.60	0	86 - 97	R,FENLGVSSLGER,K	
																	655.32	2	0.83	18.57	27.90	0	393 - 405	K,ADDYIEITGAGGK,K	
																	694.71	3	2.29	23.23	28.20	0	577 - 595	R,NFTKPQDGDVIAPLITPQK,K	
																	580.94	3	-0.37	18.03	42.90	1	353 - 366	R,DKEVGNLYDMFHTR,N	O: 10
	1/1	3.60E-05	1.73E-03	1.00	1.40	1.19	0.82	**1.14**	0.87	ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M (CD11b)	663.6	127.1	7.01	27.2	20	715.69	3	4.26	15.53	13.00	0	550 - 570	R,GAVYLFHGTSGSGISPSHSQR,I	
																	775.94	2	6.58	18.72	17.20	0	46 - 60	R,VVVGAPQEIVAANQR,G	
																	520.93	3	5.39	22.46	17.40	0	310 - 322	R,DHVFQVNNFEALK,T	
																	462.25	3	1.74	22.17	17.80	0	1.004 - 1.015	R,LPSHSDFLAELR,K	
																	1044.02	2	5.43	35.10	23.20	0	395 - 413	R,VDSDMNDAYLGYAAAIILR,N	O: 5
																	450.91	3	2.84	19.41	25.80	0	426 - 436	R,YQHIGLVAMFR,Q	O: 9
																	606.84	2	5.44	32.04	26.60	0	759 - 768	R,LFTALFPFEK,N	
																	602.34	2	4.45	25.85	26.70	0	913 - 922	K,TEFQLELPVK,Y	
																	642.33	2	4.53	29.35	28.30	0	121 - 131	K,GLCFLFGSNLR,Q	C: 3
																	664.96	3	5.89	18.75	28.30	0	61 - 77	R,GSLYQCDYSTGSCEPIR,L	C: 6, 13
																	805.40	2	6.92	15.12	29.00	0	845 - 860	R,LACESASSTEVSGALK,S	C: 3
																	543.83	2	3.88	19.23	29.40	0	252 - 261	K,ILVVITDGEK,F	
																	655.03	3	5.41	30.44	30.40	0	716 - 732	K,LQLPNCIEDPVSPIVLR,L	C: 6
																	548.79	2	3.05	22.96	35.30	0	283 - 292	R,YVIGVGDAFR,S	
																	681.86	2	6.22	18.90	39.70	0	33 - 45	R,GFGQSVVQLQGSR,V	
																	720.46	2	7.83	36.90	45.30	0	964 - 976	R,SLPISLVFLVPVR,L	
																	553.28	3	4.54	17.27	52.00	0	923 - 937	K,YAVYMVVTSHGVSTK,Y	O: 5
																	662.92	2	1.53	23.28	54.80	0	213 - 224	R,SLVKPITQLLGR,T	
																	607.82	4	7.83	22.15	59.30	0	667 - 688	R,EGQIQSVVTYDLALDSGRPHSR,A	
																	783.06	3	8.55	27.62	61.60	1	262 - 282	K,FGDPLGYEDVIPEADREGVIR,Y	
	2/2	4.73E-05	2.18E-03	1.00	1.40	1.18	0.87	**1.12**	0.89	ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M	751.2	127.1	7.01	22.0	19	642.34	2	6.40	29.60	13.20	0	121 - 131	K,GLCFLFGSNLR,Q	C: 3
																	683.99	3	8.52	25.75	18.40	0	503 - 519	R,WQCDAVLYGEQGQPWGR,F	C: 3
																	557.30	3	6.10	20.51	20.00	1	1.002 - 1.015	K,ERLPSHSDFLAELR,K	
																	664.96	3	6.19	18.86	20.40	0	61 - 77	R,GSLYQCDYSTGSCEPIR,L	C: 6, 13
																	606.84	2	8.90	32.20	27.90	0	759 - 768	R,LFTALFPFEK,N	
																	520.93	3	5.97	22.61	30.90	0	310 - 322	R,DHVFQVNNFEALK,T	
																	547.95	3	4.83	19.91	34.60	0	923 - 937	K,YAVYMVVTSHGVSTK,Y	
																	548.80	2	5.06	23.04	35.10	0	283 - 292	R,YVIGVGDAFR,S	
																	537.02	4	4.55	15.58	40.10	0	550 - 570	R,GAVYLFHGTSGSGISPSHSQR,I	
																	543.83	2	3.70	19.33	41.10	0	252 - 261	K,ILVVITDGEK,F	
																	450.91	3	3.51	19.50	41.80	0	426 - 436	R,YQHIGLVAMFR,Q	O: 9
																	517.63	3	4.66	18.88	43.60	0	46 - 60	R,VVVGAPQEIVAANQR,G	
																	720.46	2	7.41	37.07	45.20	0	964 - 976	R,SLPISLVFLVPVR,L	
																	553.28	3	3.63	17.29	46.40	0	923 - 937	K,YAVYMVVTSHGVSTK,Y	O: 5
																	442.28	3	4.33	23.47	51.10	0	213 - 224	R,SLVKPITQLLGR,T	
																	607.82	4	8.00	22.20	57.80	0	667 - 688	R,EGQIQSVVTYDLALDSGRPHSR,A	
																	833.90	2	8.39	29.15	69.20	0	185 - 197	K,TLFSLMQYSEEFR,I	O: 6
																	805.39	2	5.06	15.21	73.50	0	845 - 860	R,LACESASSTEVSGALK,S	C: 3
																	681.86	2	5.20	19.01	75.60	0	33 - 45	R,GFGQSVVQLQGSR,V	
	491/8	2.50E-04	7.22E-03	0.99	1.30	1.10	0.88	**1.15**	0.86	SAMH1_HUMAN	SAM domain and HD domain-containing protein 1	129.9	72.2	6.76	13.9	6	580.94	3	-0.03	18.06	11.30	1	353 - 366	R,DKEVGNLYDMFHTR,N	O: 10
																	833.94	2	0.65	31.28	15.70	0	378 - 392	K,VGNIIDTMITDAFLK,A	O: 8
																	694.71	3	1.71	23.21	17.30	0	577 - 595	R,NFTKPQDGDVIAPLITPQK,K	
																	600.32	2	-0.95	25.78	17.50	0	295 - 304	K,SFLYEIVSNK,R	
																	654.33	2	-0.52	20.77	25.60	0	86 - 97	R,FENLGVSSLGER,K	
																	574.95	3	-1.29	19.76	34.20	0	149 - 164	K,QLGGGYYVFPGASHNR,F	
	610/10	2.26E-06	2.60E-04	1.00	1.30	1.13	0.89	**1.11**	0.96	VIME_HUMAN	Vimentin	265.7	53.6	4.91	26.6	9	793.06	3	1.88	22.68	13.00	1	322 - 342	R,QVQSLTCEVDALKGTNESLER,Q	C: 7
																	745.88	2	1.75	21.41	15.40	0	322 - 334	R,QVQSLTCEVDALK,G	C: 7
																	568.94	3	-2.39	16.85	16.70	1	171 - 184	R,VEVERDNLAEDIMR,L	O: 13
																	714.86	2	-1.85	16.97	22.60	0	51 - 64	R,SLYASSPGGVYATR,S	
																	511.95	3	-1.98	24.87	34.50	1	223 - 235	R,KVESLQEEIAFLK,K	
																	499.26	3	-4.33	16.03	34.80	0	37 - 50	R,TYSLGSALRPSTSR,S	
																	734.99	3	4.24	24.65	35.40	0	346 - 364	R,EMEENFAVEAANYQDTIGR,L	O: 2
																	556.95	3	-0.21	20.80	37.10	0	425 - 439	R,ETNLDSLPLVDTHSK,R	
																	513.97	3	-3.52	23.85	57.00	1	130 - 143	K,ILLAELEQLKGQGK,S	
	672/16	5.58E-04	1.13E-02	0.99	1.20	1.17	1.06	**1.13**	1.01	RHG01_HUMAN	Rho GTPase-activating protein1	236.4	50.4	5.83	28.0	7	702.89	2	-5.42	24.23	14.30	0	253 - 264	K,NPEQEPIPIVLR,E	
																	984.99	2	-3.37	33.43	16.20	0	422 - 439	K,FLLDHQGELFPSPDPSGL,-	
																	640.34	3	-3.90	29.44	22.00	0	370 - 386	R,FLTAFLVQISAHSDQNK,M	
																	920.98	2	-2.20	30.43	30.70	0	186 - 200	K,IFVNYLSELSEHVK,L	
																	559.81	2	-3.85	20.02	39.50	0	412 - 421	K,AINPINTFTK,F	
																	674.02	3	-2.75	26.75	50.30	0	265 - 282	R,ETVAYLQAHALTTEGIFR,R	
																	771.09	3	-4.40	32.10	55.30	0	350 - 369	R,VPATLQVLQTLPEENYQVLR,F	

C

	Spot no./ Picking no.	Anova (p)	q value	Power	Max. fold	Average normalised volumes				Accession no.	Protein name	Mascot protein score	MW (kDa)	pI	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	m/z measured	z	Δ m/z	Rt (min)	Mascot peptide score (>10)	P	Range	Sequence	Modification (C:Carbamidomethylation, O:Oxidation)
						Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs																
Proteins upregulated in DEX, LPS and PGN-DCs	652/13	3.57E-08	1.66E-05	1.00	1.70	0.78	0.96	**1.30**	0.89	FKBP5_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	170.4	51.2	5.62	10.5	5	750.02	3	-1.11	16.16	11.50	1	9 - 29	K,NNEESPTATVAEQGEDITSKK,D	
																	554.28	2	-3.95	19.65	22.40	0	89 - 98	K,AWDIGVATMK,K	O: 9
																	580.28	3	-2.77	20.17	40.80	1	357 - 371	R,RGEAQLLMNEFESAK,G	O: 8
																	569.30	2	-4.53	26.53	42.50	0	74 - 83	R,NEPFVFSLGK,G	
																	689.34	2	-3.62	23.58	47.10	0	212 - 222	R,EEQCILYLGPR,Y	C: 4
	647/15	4.31E-08	1.66E-05	1.00	1.60	0.81	1.01	**1.27**	1.00	FKBP5_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	166.2	51.2	5.62	19.0	6	750.02	3	-2.97	16.19	14.40	1	9 - 29	K,NNEESPTATVAEQGEDITSKK,D	
																	554.28	2	-6.30	19.69	24.40	0	89 - 98	K,AWDIGVATMK,K	O: 9
																	689.34	2	-3.91	23.67	27.00	0	212 - 222	R,EEQCILYLGPR,Y	C: 4
																	709.68	3	-2.59	26.34	28.90	0	185 - 204	R,DVAFTVGEGEDHDIPIGIDK,A	
																	580.28	3	-5.01	20.36	35.00	1	357 - 371	R,RGEAQLLMNEFESAK,G	O: 8
																	569.30	2	-3.13	26.70	36.50	0	74 - 83	R,NEPFVFSLGK,G	

D

Proteins upregulated in LPS-DCs or PGN-DCs

Spot no./ Picking no.	Anova (p)	q value	Power	Max. fold	Average normalised volumes				Accession no.	Protein name	Mascot protein score	MW (kDa)	pI	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	m/z measured	z	Δ m/z	Rt (min)	Mascot peptide score (>10)	P	Range	Sequence	Modification (C:Carbamidomethylation, O:Oxidation)
					Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs																
0975/59	2.05E-03	3.08E-02	0.95	2.7	0.94	**2.09**	0.79	**1.83**	2B11_HUMAN	HLA class II histocompatibilité antigen DRB-1-1 beta chain	260.8	29.9	8.89	36.1	5	655.31	3	-13.86	18.95	37.20	0	78 - 94	R.AVTELGRPDAEYWNSQK.D	
																789.34	3	-13.90	21.51	40.70	1	59 - 77	R.CIYNGEESVRFDSDVGEYR.A	C: 1
																600.79	2	-14.18	20.55	44.80	0	255 - 266	K.GHSGLQPTGFLS.-	
																710.35	4	-12.89	25.98	59.60	0	135 - 159	K.TQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVR.W	C: 12
																887.74	3	-14.23	25.30	78.70	0	196 - 218	R.SGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWR.A	C: 7
									2B1G_HUMAN	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-16 beta chain	244.7	30.0	8.89	36.1	5	801.67	3	-13.69	23.38	24.50	1	59 - 77	R.YFYNQEESVRFDSDVGEYR.A	
																655.31	3	-13.88	18.95	37.20	0	78 - 94	R.AVTELGRPDAEYWNSQK.D	
																600.79	2	-14.18	20.55	44.80	0	255 - 266	K.GHSGLQPTGFLS.-	
																710.35	4	-12.89	25.98	59.60	0	135 - 159	K.TQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVR.W	C: 12
																887.74	3	-14.23	25.30	78.70	0	196 - 218	R.SGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWR.A	C: 7
1299/61	5.27E-05	2.21E-03	1.00	2.4	0.42	**0.84**	0.55	**1.00**	H4_Human	Histone H4	100.9	11.4	11.85	17.5	2	495.30	2	10.58	23.08	44.00	0	61 - 68	K.VFLENVIR.D	
																590.82	2	9.90	18.53	56.80	0	47 - 56	R.ISGLIYEETR.G	
1048/56	1.67E-04	5.19E-03	1.00	2.4	0.81	**1.28**	0.70	**1.65**	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta 1	182.5	22.8	5.97	24.9	4	481.22	2	-13.41	24.08	19.20	0	13 - 20	R.GPSWDPFR.D	
																635.99	3	-13.82	26.50	26.10	0	172 - 188	K.LATQSNEITIPVTFESR.A	
																582.30	2	-14.18	26.85	68.00	0	28 - 37	R.LFDQAFGLPR.L	
																595.30	3	-13.20	24.88	70.40	0	97 - 112	R.VSLDVNHFAPDELTVK.T	
0643/47	5.12E-06	4.20E-04	1.00	2.3	0.58	**1.34**	0.61	**1.18**	FSCN1_HUMAN	Fascin	130.4	54.5	7.02	10.8	4	573.79	2	-13.87	25.31	11.90	0	23 - 32	K.YLTAEAFGFK.V	
																879.43	2	-13.74	21.80	17.30	0	314 - 330	K.YWTLTATGGVQSTASSK.N	
																414.26	3	-13.27	21.10	40.80	0	380 - 389	K.LINRPIIVFR.G	
																607.32	3	-12.19	21.23	60.40	0	202 - 217	R.LVARPEPATGYTLEFR.S	
0563/46	2.21E-09	2.55E-06	1.00	2.1	0.79	**1.53**	0.74	**1.21**	EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1	649.2	60.6	6.36	37.2	15	852.10	3	-9.89	29.37	13.00	1	487 - 509	K.LADVDKDGLLDDEEFALANHLIK.V	
																748.88	2	-10.69	22.69	14.10	1	269 - 280	R.KLFEAEEQDLFK.D	
																742.35	2	-12.66	18.90	16.10	0	359 - 370	K.MQELLQTQDFSK.F	O: 1
																620.82	2	-11.22	25.10	18.00	0	232 - 242	R.VYGALMWSLGK.I	O: 6
																535.32	2	-16.55	22.20	18.60	0	185 - 193	R.ILLFDAHK.L	
																569.07	4	-10.48	20.86	19.60	1	510 - 530	K.VKLEGHELPADLPPHLVPPSK.R	
																697.85	2	-11.91	29.41	24.80	0	194 - 205	K.LDISDEFSEVIK.A	
																696.34	3	-10.54	28.64	46.00	0	444 - 461	K.DKPTYDEIFYTLSPVNGK.I	
																744.88	2	-12.59	28.72	47.10	0	14 - 26	K.EPELFQTVAEGLR.Q	
																672.01	3	-12.83	30.98	56.50	0	252 - 268	R.VYIGSFWSHPLLIPDNR.K	
																684.83	2	-11.57	26.46	58.30	0	270 - 280	K.LFEAEEQDLFK.D	
																494.91	3	-14.63	19.89	64.30	0	345 - 357	R.EHQISPGDFPSLR.K	
																618.82	2	-9.90	24.09	64.40	0	125 - 135	K.LNAFGNAFLNR.F	
																710.37	2	-11.33	22.12	66.20	0	330 - 341	K.ELVNNLGEIYQK.I	
																845.91	2	-12.36	26.03	76.00	0	378 - 392	K.LLDTVDDMLANDIAR.L	O: 8
0424/37	4.61E-06	4.20E-04	1.00	1.7	0.93	**1.14**	0.65	**1.11**	GFPT1_HUMAN	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 1	128.5	78.8	6.71	9.6	4	685.66	3	-8.80	18.36	12.90	0	475 - 494	R.ETDCGVHINAGPEIGVASTK.A	C: 4
																816.94	2	-6.98	23.06	15.60	0	458 - 474	R.GALTVGITNTVGSISR.E	
																781.94	2	-8.55	35.57	35.00	0	177 - 190	R.VIQQLEGAFALVFK.S	
																866.93	2	-7.43	30.33	65.00	0	291 - 306	R.VIFLEDDDVAAVVDGR.L	
1290/62	1.16E-03	1.97E-02	0.97	1.7	0.96	**1.29**	0.82	**1.41**	FABPH_HUMAN	Fatty acid binding protein, heart ou FABP3	218.6	14.8	6.37	25.6	4	553.55	4	-13.81	27.76	33.10	1	108 - 127	R.ELIDGKLILTLTHGTAVCTR.T	C: 18
																734.32	2	-13.35	19.87	55.40	0	67 - 79	K.LGVEFDETTADDR.K	
																532.58	3	-14.72	16.37	63.50	1	67 - 80	K.LGVEFDETTADDRK.V	
																519.28	3	-13.72	19.42	66.60	0	114 - 127	K.LILTLTHGTAVCTR.T	C: 12
0584/45	3.41E-04	8.88E-03	0.99	1.6	0.71	**1.10**	0.68	**0.97**	HCK_HUMAN	Tyrosine-protein kinase HCK	255.9	59.6	6.28	16.4	7	1794.92	3	-12.26	26.10	17.30	1	214 - 228	R.STFSTLQELVDHYKK.G	
																1196.62	2	-12.62	19.39	28.30	0	29 - 39	K.FLQVGGNTFSK.T	
																2188.02	3	-12.66	23.31	29.40	0	291 - 310	K.TMKPGSMSVEAFLAEANVMK.T	O: 2, 7, 19
																1666.82	3	-12.44	29.32	31.30	0	214 - 227	R.STFSTLQELVDHYK.K	
																1344.74	2	-13.72	23.15	35.10	0	384 - 396	R.AANILVSASLVCK.I	C: 12
																1528.71	2	-10.80	30.28	42.10	0	136 - 147	R.VDSLETEEWFFK.G	
																1338.66	2	-12.66	21.20	58.20	0	202 - 213	R.TLDNGGFYISPR.S	
0601/41	1.92E-05	9.98E-04	1.00	1.6	0.80	**1.06**	0.74	**1.17**	DC1L1_HUMAN	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	57.9	56.5	5.99	5.2	2	581.96	3	-8.73	22.91	26.70	0	345 - 359	K.AEDNFEDIITKPPVR.K	
																593.32	2	-9.15	20.16	31.20	0	69 - 80	K.NVLLLGEDGAGK.T	
0434/34	3.26E-04	8.81E-03	0.99	1.5	0.93	**1.04**	0.77	**1.17**	MOES_HUMAN	Moesin	564.7	67.8	6.03	24.4	11	694.66	3	3.59	23.94	16.40	0	9 - 27	R.VTTMDAELEFAIQPNTTGK.Q	O: 4
																447.78	2	3.99	26.28	20.10	0	101 - 107	R.LFFLQVK.E	
																540.29	2	5.19	23.44	34.40	0	185 - 193	R.EDAVLEYLK.I	
																552.80	2	7.48	27.76	46.40	0	238 - 246	K.IGFPWSEIR.N	
																573.96	3	6.49	21.56	47.80	0	413 - 427	K.TQEQLALEMAELTAR.I	O: 9
																591.80	2	4.14	24.79	53.30	0	264 - 273	K.APDFVFYAPR.L	
																830.91	2	6.94	32.23	54.80	0	41 - 53	R.EVWFFGLQYQDTK.G	
																956.15	3	12.90	36.76	56.00	0	108 - 133	K.EGILNDDIYCPPETAVLLASYAVQSK.Y	C: 10
																616.66	3	5.84	19.02	57.50	1	412 - 427	K.KTQEQLALEMAELTAR.I	O: 10
																953.97	2	1.88	28.77	66.90	0	194 - 209	K.IAQDLEMYGVNYFSIK.N	O: 7
																1041.51	2	5.06	36.11	107.80	0	84 - 100	K.FYPEDVSEELIQDITQR.L	
0613/40	1.09E-04	3.60E-03	1.00	1.5	0.94	**1.30**	0.90	**1.20**	gi|47419918	Tryptophanyl-tRNA synthetase cytoplasmic isoform b	720.1	53.1	5.80	53.7	16	442.72	2	-14.63	21.67	12.90	1	424 - 430	R.KLSFDFQ.-	
																1113.01	2	-7.02	33.08	13.00	0	260 - 277	R.TDIQCLIPCAIDQDPYFR.M	C: 5, 9
																775.73	3	-8.20	36.25	16.60	0	237 - 257	K.ISFPAIQAAPSFSNSFPQIFR.D	
																714.31	3	-8.29	30.79	26.00	0	191 - 208	K.TFIFSDLDYMGMSSGFYK.N	O: 10, 12
																695.35	3	-10.79	25.54	26.90	0	122 - 140	R.GPSSEAMHVGHLIPFIFTK.W	O: 7
																570.61	3	-10.47	24.22	32.90	1	410 - 423	K.EVTDEIVKEFMTPR.K	O: 11
																596.33	2	-12.98	20.54	34.40	1	56 - 65	K.GIDYDKLIVR.F	
																833.06	3	-4.32	31.39	36.90	1	258 - 277	R.DRTDIQCLIPCAIDQDPYFR.M	C: 7, 11
																701.32	2	-10.76	19.76	42.60	0	378 - 390	K.DYTSGAMLTGELK.K	O: 7
																510.58	3	-11.38	16.41	46.00	1	378 - 391	K.DYTSGAMLTGELKK.A	O: 7
																633.31	2	-9.73	24.85	51.50	0	180 - 190	K.DIIACGFDINK.T	C: 5
																900.91	2	-10.27	20.77	58.60	0	309 - 325	K.MSASDPNSSIFLTDTAK.Q	O: 1
																728.32	2	-10.79	17.88	61.00	0	101 - 112	R.DMNQVLDAYENK.K	O: 2
																601.01	3	-10.92	28.47	75.90	0	392 - 407	K.ALIEVLQPLIAEHQAR.R	
																708.82	2	-8.80	26.48	86.60	0	224 - 236	K.GIFGFTDSDCIGK.I	C: 10
																900.93	2	-9.16	29.34	94.00	0	164 - 179	K.DLTLDQAYSYAVENAK.D	
0351/36	1.20E-04	3.96E-03	1.00	1.4	1.01	**1.14**	0.86	**1.17**	UFL1_HUMAN	E3 UFM1-protein ligase 1	209.5	89.5	6.35	12.3	7	894.08	3	-7.62	20.27	9.90	1	746 - 769	K.TGQGDYPLNNELDKEQEDVASTTR.K	
																706.84	2	-8.17	24.97	10.50	0	263 - 274	R.QNGYLEFDALSR.L	
																664.32	2	-8.68	19.90	15.20	0	560 - 571	K.FFADDTQAALTK.H	
																588.33	2	-8.78	25.73	29.00	0	275 - 285	R.LGIPDAVSYIK.K	
																625.69	3	-7.34	27.07	38.60	0	192 - 209	R.GLFSAITRPTAVNSLISK.Y	
																605.33	2	-9.18	26.27	42.00	0	175 - 185	R.GVIFTEAFVAR.H	
																583.81	2	-8.83	23.85	64.20	0	242 - 251	K.AVFVPDIYSR.T	
0553/43	1.54E-05	9.22E-04	1.00	1.4	0.98	**1.12**	0.82	**1.12**	LMNA_HUMAN	Lamin-A/C	357.5	74.1	6.60	13.4	7	415.24	3	-12.83	22.28	14.10	1	134 - 144	R.LKDLEALLNSK.E	
																955.46	2	-8.82	28.20	45.70	0	352 - 366	R.MQQQLDEYQELLDIK.L	O: 1
																584.95	3	-10.54	15.64	45.70	0	281 - 296	R.NSNLVGAAHEELQQSR.I	
																715.89	2	-9.79	23.26	57.40	0	299 - 311	R.IDSLSAQLSQLQK.Q	
																449.89	3	-14.23	18.53	57.50	0	367 - 377	K.LALDMEIHAYR.K	O: 5
																535.94	3	-9.60	17.12	57.60	1	440 - 453	R.VAVEEVDEEGKFVR.L	
																514.78	2	-13.95	19.69	80.40	0	241 - 249	R.LADALQELR.A	
0407/35	7.65E-07	1.13E-04	1.00	1.4	0.95	**1.02**	0.80	**1.09**	MOES_HUMAN	Moesin	453.4	67.8	6.02	23.4	10	832.85	4	-2.98	16.20	23.90	0	465 - 495	K.TAMSTPHVAEPAENEQDEQDENGAEASADLR.A	O: 3
																830.90	2	-6.90	32.42	32.50	0	41 - 53	R.EVWFFGLQYQDTK.G	
																518.27	3	-9.91	23.99	36.00	1	181 - 193	R.GMLREDAVLEYLK.I	O: 2
																540.28	2	-9.43	23.88	37.90	0	185 - 193	R.EDAVLEYLK.I	
																953.96	2	-6.19	28.93	38.90	0	194 - 209	K.IAQDLEMYGVNYFSIK.N	O: 7
																694.67	3	-6.77	24.22	48.90	0	9 - 27	R.VTTMDAELEFAIQPNTTGK.Q	O: 4
																616.65	3	-7.62	19.37	54.30	1	412 - 427	K.KTQEQLALEMAELTAR.I	O: 10
																1041.50	2	-6.85	36.31	55.50	0	84 - 100	K.FYPEDVSEELIQDITQR.L	
																591.80	2	-7.52	25.24	57.50	0	264 - 273	K.APDFVFYAPR.L	
																573.95	3	-5.68	21.95	69.20	0	413 - 427	K.TQEQLALEMAELTAR.I	O: 9
0644/39	8.88E-05	3.11E-03	1.00	1.3	0.82	**1.11**	0.83	**1.08**	SYWC_HUMAN	Tryptophanyl-tRNA synthetase cytoplasmic	123.1	53.1	5.80	14.7	4	521.76	4	9.97	25.24	12.30	0	163 - 181	R.GPSSEAMHVGHLIPFIFTK.W	O: 7
																708.84	2	11.80	26.08	15.60	0	265 - 277	K.GIFGFTDSDCIGK.I	C: 10
																775.75	3	8.95	35.89	33.30	0	278 - 298	K.ISFPAIQAAPSFSNSFPQIFR.D	
																601.02	3	10.04	28.09	61.90	0	433 - 448	K.ALIEVLQPLIAEHQAR.R	

	Spot no./ Picking no.	Anova (p)	q value	Power	Max. fold	Average normalised volumes				Accession no.	Protein name	Mascot protein score	MW (kDa)	pI	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	m/z measured	z	Δ m/z	Rt (min)	Mascot peptide score (>10)	P	Range	Sequence	Modification (C:Carbamidomethylation, O:Oxidation)
						Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs																
Proteins upregulated in LPS-DCs or PGN-DCs	0537/42	1.14E-07	2.63E-05	1.00	1.3	0.85	**1.03**	0.78	**1.01**	HCK_HUMAN	Tyrosine-protein kinase HCK	70.6	59.6	6.28	10.7	4	765.36	2	-8.87	30.33	10.40	0	136 - 147	R,VDSLETEEWFFK,G	
																	556.61	3	-8.67	29.32	16.60	0	214 - 227	R,STFSTLQELVDHYK,K	
																	599.31	2	-11.62	19.42	20.10	0	29 - 39	K,FLQVGGNTFSK,T	
																	685.67	3	-9.34	34.62	23.50	0	358 - 375	K,LIDFSAQIAEGMAFIEQR,N	O: 12
	0437/33	6.49E-04	1.23E-02	0.98	1.3	0.86	**1.07**	0.86	**1.10**	gi|493066	Glycyl-tRNA synthetase	89.1	77.5	5.84	7.9	4	729.39	2	-7.15	34.28	12.00	0	549 - 561	R,TFFSFPAVVAPFK,C	
																	565.94	3	-12.15	21.81	15.20	0	530 - 542	R,IMYTVFEHTFHVR,E	O: 2
																	594.64	3	-8.66	26.00	18.70	0	311 - 325	K,FQNVADLHLYLYSAK,A	
																	696.37	2	-9.25	25.71	43.20	0	265 - 277	K,LPFAAAQIGNSFR,N	
	0675/49	8.45E-06	6.24E-04	1.00	1.3	0.98	**1.09**	0.94	**1.21**	IRF4_HUMAN	Interferon regulatory factor 4	214.7	51.7	6.42	19.7	8	682.32	2	-14.31	22.40	10.20	0	37 - 47	K,YPGLVWENEEK,S	
																	583.28	2	-12.42	18.02	17.60	0	114 - 123	R,SQLDISDPYK,V	
																	624.64	3	-12.86	22.55	21.10	0	412 - 426	R,QLYYFAQQNSGHFLR,G	
																	651.83	2	-13.90	25.90	21.50	0	26 - 36	R,QWLIDQIDSGK,Y	
																	666.89	2	-13.45	19.88	23.40	0	400 - 411	K,LITAHVEPLLAR,Q	
																	487.63	3	-14.92	17.41	27.40	1	399 - 411	R,KLITAHVEPLLAR,Q	
																	562.03	4	-14.37	34.03	40.90	0	358 - 376	K,LFDTQQFLSELQAFAHHGR,S	
																	619.28	2	-12.76	22.13	53.50	0	104 - 113	K,SNDFEELVER,S	
	0215/30	5.51E-04	1.13E-02	0.99	1.2	0.88	**1.02**	0.84	**1.05**	VINC_HUMAN	Vinculin	595.3	123.7	5.37	20.4	15	1026.81	3	9.20	26.42	16.40	0	1,077 - 1,103	R,TNISDEESEQATEMLVHNAQNLMQSVK,E	O: 14, 23
																	729.41	2	5.82	19.62	17.60	0	353 - 366	K,AQQVSQQLDVLTAK,V	
																	553.31	2	4.69	19.41	18.30	0	434 - 444	R,SLGEISALTSK,L	
																	585.83	2	7.35	15.56	18.30	0	670 - 680	R,ELTPQVVSAAR,I	
																	664.01	3	3.72	19.78	26.10	0	88 - 105	K,LVQAAQMLQSDPYSVPAR,D	O: 7
																	654.82	2	4.86	17.68	27.70	0	709 - 720	K,MTGLVDEAIDTK,S	O: 1
																	500.81	2	5.59	17.41	31.20	0	1,056 - 1,064	R,IPTISTQLK,I	
																	797.37	3	14.66	23.75	36.10	0	587 - 607	R,MQEAMTQEVSDVFSDTTTPIK,L	O: 1, 5
																	615.36	2	2.56	26.29	44.20	0	200 - 210	K,ELLPVLISAMK,I	O: 10
																	596.31	2	5.81	17.89	44.70	0	237 - 246	K,MSAEINEIIR,V	O: 1
																	587.33	2	7.79	18.45	45.40	0	571 - 581	R,ALASQLQDSLK,D	
																	742.91	2	4.03	27.12	55.20	0	548 - 561	R,VDQLTAQLADLAAR,G	
																	794.41	3	6.75	21.97	57.60	1	608 - 629	K,LLAVAATAPPDAPNREEVFDER,A	
																	692.03	3	3.37	24.79	63.00	0	739 - 758	K,VAMANIQPQMLVAGATSIAR,R	O: 3, 10
																	1018.53	2	3.09	35.79	93.10	0	114 - 132	R,GILSGTSDLLLTFDEAEVR,K	
	0588/38	2.90E-04	8.12E-03	0.99	1.2	0.89	**0.98**	0.79	**0.96**	gi|780808	p21-activated protein kinase	259.2	58.0	5.62	29.9	9	541.28	2	-11.38	19.27	13.70	0	139 - 147	K,YLSFTPPEK,D	
																	515.27	4	-10.88	18.41	15.80	0	29 - 47	K,DPLSANHSLKPLPSVPEEK,K	
																	548.82	2	-11.63	22.84	18.40	0	119 - 128	K,NPQAVLDVLK,F	
																	986.51	2	-8.98	26.52	24.10	0	452 - 469	R,ALYLIATNGTPELQNPEK,L	
																	486.95	3	-9.22	23.69	27.20	1	288 - 299	K,KELIINEILVMK,E	O: 11
																	829.64	4	-2.82	19.77	27.80	0	161 - 191	K,GTEAPAVVTEEEDDDEETAPPVIAPRPDHTK,S	
																	557.33	3	-8.34	24.81	28.60	0	503 - 518	K,LAKPLSSLTPLIMAAK,E	O: 13
																	644.33	3	-7.62	18.66	40.80	0	197 - 216	R,SVIDPVPAPVGDSHVDGAAK,S	
																	547.80	2	-11.21	22.01	53.30	0	53 - 62	K,IISIFSGTEK,G	
	0863/53	1.80E-05	9.92E-04	1.00	1.2	0.96	**1.15**	0.93	**1.14**	PP1B_HUMAN	Serine/threonine protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	341.4	37.2	5.80	30.6	8	755.34	3	-14.09	20.02	17.30	0	168 - 186	K,IFCCHGGLSPDLQSMEQIR,R	C: 3, 4; O: 15
																	597.75	2	-14.95	19.90	37.70	0	132 - 140	R,IYGFYDECK,R	C: 8
																	547.26	3	-14.65	21.59	38.10	0	246 - 259	R,AHQVVEDGYEFFAK,R	
																	651.71	3	-13.78	38.20	41.00	0	43 - 59	R,EIFLSQPILLELEAPLK,I	
																	599.81	2	-14.17	28.89	42.40	0	113 - 121	K,YPENFFLLR,G	
																	587.96	3	-14.22	15.40	44.20	0	304 - 319	K,YQYGGLNSGRPVTPPR,T	
																	480.60	3	-12.56	26.70	56.20	1	111 - 121	K,IKYPENFFLLR,G	
																	554.27	3	-12.31	20.97	64.60	0	60 - 73	K,ICGDIHGQYTDLLRL,L	C: 2
	1082/60	1.04E-03	1.79E-02	0.97	1.2	1.03	**1.12**	0.95	**1.03**	MOL1A_HUMAN	MPS one binder kinase activator like 1A	67.7	25.1	6.27	10.7	2	499.56	3	-14.63	17.76	17.80	0	93 - 104	K,YEYHWADGTNIK,K	
																	641.86	2	-11.71	27.93	49.80	0	200 - 210	R,ELAPLQELIEK,L	
	0691/48	1.04E-03	1.79E-02	0.97	1.2	0.92	**1.04**	0.92	**1.07**	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	834.6	47.1	7.71	41.9	12	1004.51	3	-13.52	29.04	27.90	0	133 - 162	R,HIADLAGNSEVILPVPAFNVINGGSHAGNK,L	
																	759.71	3	-14.09	24.49	44.90	1	33 - 54	R,AAVPSGASTGIYEALELRDNDK,T	
																	817.40	2	-14.36	19.28	50.60	0	344 - 358	K,VNQIGSVTESLQACK,L	C: 14
																	654.30	3	-13.87	25.72	55.60	0	203 - 221	K,DATNVGDEGGFAPNILENK,E	
																	518.90	3	-14.59	18.90	61.00	1	257 - 269	K,YDLDFKSPDDPSR,Y	
																	647.32	3	-12.62	29.57	66.40	0	163 - 179	K,LAMQEFMILPVGAANFR,E	O: 3, 7
																	915.12	3	-12.90	30.60	68.50	1	203 - 228	K,DATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLK,T	
																	703.85	2	-14.11	24.00	70.80	0	16 - 28	R,GNPTVEVDLFTSK,G	
																	713.36	2	-14.09	26.76	80.80	0	270 - 281	R,YISPDQLADLYK,S	
																	778.88	2	-14.26	27.34	85.10	0	240 - 253	K,VVIGMDVAASEFFR,S	O: 5
																	1017.02	2	-12.80	26.12	100.80	0	307 - 326	K,FTASAGIQVVGDDLTVTNPK,R	
																	902.96	2	-13.20	27.85	122.00	0	33 - 50	R,AAVPSGASTGIYEALELR,D	

E

	Spot no./ Picking no.	Anova (p)	q value	Power	Max. fold	Average normalised volumes				Accession no.	Protein name	Mascot protein score	MW (kDa)	pI	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	m/z measured	z	Δ m/z	Rt (min)	Mascot peptide score (>10)	P	Range	Sequence	Modification (C:Carbamidomethylation, O:Oxidation)
						Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs																
Proteins upregulated in LPS-DCs	0445/32	1.13E-07	2.63E-05	1.00	10.4	0.32	**3.29**	0.39	0.48	gi|5410451	Interferon-induced protein p78 or Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	299.9	75.5	5.51	22.8	10	751.40	3	-7.81	32.96	13.00	0	61 - 83	R,ALGVEQDLALPAIAVIGDQSSGK,S	
																	648.33	3	-8.28	24.61	16.90	0	282 - 298	R,GQQEIQDQLSLSEALQR,E	
																	647.78	2	10.69	21.89	23.60	0	444 - 462	R,ELPGFVNYR,T	
																	457.22	3	-13.29	22.15	25.40	0	301 - 310	K,IFFENHPYFR,D	
																	819.45	2	-9.36	35.75	26.90	0	170 - 184	R,DVPDLTLIDLPGITR,V	
																	577.84	2	-11.10	22.47	28.90	0	338 - 347	K,SLPLLENQIK,E	
																	471.61	3	-12.55	20.45	29.00	0	242 - 254	R,TIGILTKPDLVDK,G	
																	838.42	3	-9.06	27.48	35.20	0	146 - 169	K,AQNAIAGEGMGISHELITLEISSR,D	O: 10
																	497.28	2	-13.07	22.04	38.40	0	482 - 490	R,LAFTDVSIK,N	
																	699.90	2	-8.27	30.67	55.80	0	84 - 97	K,SSVLEALSGVALPR,G	
	0431/31	3.39E-06	3.56E-04	1.00	4	0.55	**2.18**	0.57	0.79	gi|188901	Interferon-induced Mx protein or Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	289.9	75.5	5.57	17.8	9	457.22	3	-11.98	22.45	11.40	0	301 - 310	K,IFFENHPYFR,D	
																	497.28	2	-11.46	22.31	15.80	0	482 - 490	R,LAFTDVSIK,N	
																	568.27	3	-8.51	20.47	18.80	0	414 - 427	K,WSTIIENNFQEGHK,I	
																	751.41	3	-5.28	33.33	29.20	0	61 - 83	R,ALGVEQDLALPAIAVIGDQSSGK,S	
																	486.27	3	-8.51	24.72	33.00	0	49 - 60	K,VRPCIDLIDSLR,A	C: 4
																	547.78	2	-10.04	22.10	34.50	0	444 - 452	R,ELPGFVNYR,T	
																	451.55	3	-9.13	25.91	42.10	0	491 - 500	K,NFEEFFNLHR,T	
																	819.45	2	-7.41	36.25	42.80	0	170 - 184	R,DVPDLTLIDLPGITR,V	
																	699.90	2	-7.99	31.04	51.30	0	84 - 97	K,SSVLEALSGVALPR,G	
	0911/54	2.07E-04	6.22E-03	1.00	1.7	0.73	**1.12**	0.64	0.89	CASP7_HUMAN	Caspase-7	80.8	34.3	5.67	18.2	4	549.80	2	6.13	25.35	13.80	0	29 - 38	R,SSFVPSLFSK,K	
																	607.62	3	7.54	16.35	17.00	1	53 - 66	R,DRVPTYQYNMNFEK,L	O: 10
																	791.03	3	5.15	20.21	20.60	0	188 - 210	R,GTELDDGIQADSGPINDTDANPR,Y	
																	527.78	2	5.76	23.76	29.40	0	180 - 187	K,LFFIQACR,G	C: 7
	0983/55	2.58E-04	7.22E-03	0.99	1.2	1.03	**1.19**	1.00	1.09	PSME2_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 2	247.6	27.3	5.33	36.4	5	783.70	3	-13.78	22.90	11.30	1	62 - 82	R,APLDIPIPDPPPKDDEMETDK,Q	O: 17
																	844.45	3	-12.52	38.85	13.00	0	40 - 61	K,IIYLNQLLQEDSLNVADLTSLR,A	
																	767.86	2	-14.40	20.54	64.60	0	132 - 145	K,IEDGNDFGVAIQEK,V	
																	633.32	3	-13.73	34.20	67.00	0	211 - 226	R,AFYAELYHIISSNLEK,I	
																	843.90	2	-12.98	37.20	85.30	0	22 - 34	R,QNLFQEAEEFLYR,F	

Suppl. Table 2

A

	Identification data																Quantification data							
																					Average normalized abundance			
	Swissprot accession no.	Protein name	MW [kDa]	pI	Scores	No. of identified peptides	Peptide number	Retention time (min)	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Sequence	Modification (C: Carbamidomethylation)	Range	Max. fold	Highest mean condition	Lowest mean condition	P value (FDR p value<0.01)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
Proteins upregulated in DEX-DCs	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	38.7	6.7	230	4	1961	214.3	463.2588	1386.7606	3	-4.35	88.1	0	K.GVDEATIIDILTK.R		59 - 71	2.2	DEX	PGN	5.2E-05	3704	3798	4354	2011
							509	219.5	568.3043	1701.8785	3	7.38	54.1	0	K.GLGTDEDTLIEILASR.T		129 - 144	1.6	DEX	PGN	1.2E-04	12517	14568	15378	9741
							1871	90.4	689.9756	2066.8777	3	13.17	54.9	1	K.GDRSEDFGVNEDLADSDAR.A		186 - 204	1.6	DEX	LPS	5.1E-04	10689	8718	13646	13301
							11604	94.4	888.9798	1775.9305	2	8.17	32.9	0	K.AAYLQETGKPLDETLK.K		82 - 97	1.5	DEX	LPS	6.5E-05	2449	1990	3013	2980
	C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B	26.7	9.6	37.3	2	13231	133.4	620.0446	2476.1554	4	-2.44	16.3	1	R.DQTIRFDHVITNMNNNYEPR.S		137 - 156	1.6	DEX	LPS	1.0E-03	7474	6593	10221	8449
							19155	133.4	826.3954	2476.1553	3	3.64	21	1	R.DQTIRFDHVITNMNNNYEPR.S		137 - 156	3.6	DEX	LPS	2.1E-08	1617	1092	3965	1379
	C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	25.8	9.4	110.7	4	8073	45.0	486.9368	1457.7739	3	10.04	24.2	0	R.QTHQPPAPNSLIR.F		127 - 139	3.7	DEX	LPS	1.5E-06	2380	1158	4308	1536
							6258	109.8	542.7985	1083.5713	2	10.27	47.1	0	K.FQSVFTVTR.Q		118 - 126	2.7	DEX	LPS	7.7E-07	2790	1759	4812	1828
							24223	59.8	629.3506	1256.6837	2	2.33	14.3	0	K.TNQVNSGGVLLR.L		199 - 210	2.3	DEX	LPS	3.6E-06	1570	1031	2406	1529
							24349	107.2	964.4634	1926.8959	2	8.46	25.1	0	R.FNAVLTNPQGDYDTSTGK.F		140 - 157	5.0	DEX	LPS	4.2E-07	1342	543	2725	687
	CATC_HUMAN	Dipeptidyl peptidase 1	51.8	6.6	68.3	3	5390	170.8	742.9782	2225.8962	3	7.44	15.2	0	R.NQASCGSCYSFASMGMLEAR.I		251 - 270	2.6	DEX	PGN	7.2E-07	7502	6021	9396	3657
							3945	145.9	865.7112	2594.0883	3	9.06	35.1	0	R.YYSSEYHYVGGFYGGCNEALMK.L	C: 16	340 - 361	1.9	DEX	PGN	4.0E-04	11690	8807	14732	7926
							1762	198.8	885.7148	2654.1305	3	-2.99	18	0	K.YAQDFGLVEEACFPYTGTDSPCK.M	C: 12, 22	310 - 332	2.2697	DEX	PGN	4.1E-04	11220	11320	15459	6811
	F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	83.2	5.7	63	2	20260	209.7	777.9020	1553.8065	2	-10.93	23.5	0	R.MYVAVWTPYGVLR.T		160 - 172	1.7	DEX	PGN	1.8E-03	1971	2140	2262	1339
							6391	140.1	822.8599	1643.7171	2	-7.21	39.5	0	K.QISGDGMMDITDTYK.F		469 - 483	1.8	DEX	PGN	1.9E-03	5225	3779	6244	3546
	CLIC2_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 2	28.3	5.3	50.5	2	7739	92.1	477.7511	1906.9823	4	-3.64	23.1	1	K.FNVTTVDMTRKPEELK.D		47 - 62	2.1	DEX	PGN	8.2E-05	3143	2980	3857	1794
							10895	93.8	636.6660	1906.9823	3	-3.18	27.4	1	K.FNVTTVDMTRKPEELK.D		47 - 62	1.5	PGN	LPS	7.9E-05	4231	3661	4306	5511
	FKBP5_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	51.2	5.6	67.4	3	9738	175.4	575.5305	2298.0951	4	-0.93	28.3	2	R.RGEAQLLMNEFESAKGDFEK.V		357 - 376	1.6	DEX	Control	1.2E-06	2312	2935	3640	2531
							8734	71.2	750.0259	2247.0503	3	2.49	24.1	1	K.NNEESPTATVAEQGEDITSKK.D		9 - 29	1.7	DEX	LPS	1.1E-04	3106	3004	5224	4552
							13942	104.4	860.0977	2577.2719	3	-0.21	15	1	K.KGEICHLLCKPEYAYGSAGSLPK.I		99 - 121	1.6	DEX	LPS	1.8E-08	2696	2594	4046	3529
	MRC1_HUMAN	Macrophage mannose receptor 1	165.9	6.1	151.9	5	5273	80.6	423.2085	1266.6067	3	-2.38	38.6	0	K.EQAFLTYHMK.D		992 - 1,001	2.0	DEX	PGN	5.8E-05	5903	5085	6814	3380
							3370	106.9	429.2109	1284.6173	3	-4.96	38.4	1	K.IFGFMEEERK.N		959 - 968	1.9	DEX	PGN	2.5E-04	5812	4925	6954	3623
							12591	80.5	634.3085	1266.6067	2	-3.35	33.9	0	K.EQAFLTYHMK.D		992 - 1,001	1.6	PGN	LPS	2.0E-04	2955	2477	3197	4056
							10431	107.1	643.3158	1284.6173	3	-0.16	25.9	1	K.IFGFMEEERK.N		959 - 968	2.1	DEX	PGN	3.5E-07	3515	2641	5337	2561
							10477	172.2	674.2778	2019.8156	3	-2.01	15.1	0	R.SDGWLWCGTTTDYDTDK.L	C: 7	188 - 204	1.9	DEX	PGN	2.1E-05	4212	3284	5181	2678
	STAB1_HUMAN	Stabilin-1	275.3	6.1	93.1	4	5542	81.8	435.0323	2170.1251	5	1.26	21	0	R.WWTLAGQEITVTFNQFTK.Y		443 - 460	1.6	DEX	PGN	1.3E-05	2351	2076	2394	1519
							16243	42.6	642.2781	1923.7874	3	9.55	16.5	0	R.TCTCDTAHTVGDGLTCR.A		1,566 - 1,582	3.1	DEX	LPS	2.6E-05	1497	698	2159	958
							16277	196.6	722.3887	2164.1317	3	5.81	19.8	0	R.VLLPPEALHWEPDDAPIPR.R		1,707 - 1,725	1.9	DEX	LPS	1.4E-06	3290	2208	4172	2409
							10654	124.0	861.3708	2581.0719	3	7.22	35.8	0	R.SGFAGTACELCAPGAFGPHCQACR.C	C: 8, 11, 20, 23	1,999 - 2,022	2.8	DEX	LPS	3.6E-05	3198	1627	4503	1961

B

	Identification data																Quantification data							
																					Average normalized abundance			
	Swissprot accession no.	Protein name	MW [kDa]	pI	Scores	No. of identified peptides	Peptide number	Retention time (min)	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Sequence	Modification (C: Carbamidomethylation)	Range	Max. fold	Highest mean condition	Lowest mean condition	P value (FDR p value<0.01)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
Proteins downregulated in LPS-DCs and PGN-DCs	CYTC_HUMAN	Cystatin-C	15.8	9.9	101.1	3	2299	79.4	600.9745	1799.8836	3	10.02	44.2	1	R.LVGGPMDASVEEEGVRR.A		35 - 51	2.4	Control	PGN	1.1E-07	9896	4615	7747	4130
							2815	117.2	613.8149	1225.5979	2	14.13	30.1	0	R.ALDFAVGEYNK.A		52 - 62	1.7	Control	LPS	3.9E-04	8638	4977	6610	6399
							10703	70.6	687.6684	2059.9534	3	14.52	26.8	0	K.TQPNLDNCPFHDQPHLK.R	C: 8	102 - 118	2.6	Control	LPS	4.1E-05	7814	3029	5925	4231
	GELS_HUMAN	Gelsolin precursor	85.6	5.9	154.9	2	3426	63.4	660.8014	1319.5816	2	5.03	62.8	0	K.SEDCFILDHGK.D	C: 4	328 - 338	1.6	PGN	LPS	5.1E-04	6824	6357	6735	10105
							7549	202.5	758.0333	2271.0808	3	-1.19	92.1	0	R.AQPVQVAEGSEPDGFWEALGGK.A		627 - 648	1.9	Control	PGN	2.4E-06	5384	6460	5372	5326
	ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M	127.1	7.0	41.4	1	3624	135.2	480.2564	1437.7538	3	-4.43	41.4	1	K.EFVSTVMEQLKK.S		171 - 182	1.6	Control	PGN	5.4E-09	4013	3163	3832	2442

C

	Identification data																Quantification data							
																					Average normalized abundance			
	Swissprot accession no.	Protein name	MW [kDa]	pI	Scores	No. of identified peptides	Peptide number	Retention time (min)	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Sequence	Modification (C: Carbamidomethylation)	Range	Max. fold	Highest mean condition	Lowest mean condition	P value (FDR p value<0.01)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
Proteins downregulated in PGN-DCs	AHNK_HUMAN	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	628.7	5.7	63.4	2	12274	99.0	450.2529	1796.9884	4	-3.27	34.1	2	K.VKGDVDVSLPKVEGDLK.G		2,593 - 2,609	1.6	DEX	PGN	1.9E-03	2567	2515	2629	1610
							5207	126.1	462.8339	2309.1441	5	-4.72	29.3	1	K.GPKVDIDAPDVDVHGPDWHLK.M		728 - 748	1.8	Control	PGN	5.1E-07	3089	2871	3047	1734
	ANXA2_HUMAN	Annexin A2	38.6	8.5	224.9	4	436	207.1	514.9538	1541.8413	3	-1.13	72.9	0	K.GVDEVTIVNILTNR.S		50 - 63	1.9	LPS	PGN	6.1E-06	15012	16344	14692	8508
							3422	172.1	539.6210	2154.0503	4	2.06	14	1	K.AYTNFDAERDALNIETAIK.T		29 - 47	2.7	LPS	PGN	1.1E-13	6561	7172	6388	2694
							1701	86.7	677.3357	1352.6572	2	-0.27	67	1	K.DISDTSGDFRK.A		158 - 169	2.7	PGN	LPS	7.5E-10	15123	14124	15099	38660
							614	158.6	794.8936	1587.7603	2	7.77	71	1	K.SYSPYDMLESIRK.E		234 - 246	1.7	PGN	DEX	6.2E-11	36362	36743	35236	60496
	ANXA5_HUMAN	Annexin A5	35.9	4.8	99.4	2	1216	186.4	557.2732	2225.0674	4	-1.68	43.7	2	K.NFATSLYSMIKGDTSGDYKK.A		291 - 310	2.0	LPS	PGN	3.3E-09	17023	18183	16940	9102
							1243	118.9	617.8447	1233.6717	2	2.52	55.7	1	R.SEIDLFNIRK.E		277 - 286	1.8	PGN	LPS	2.3E-07	11213	10552	11135	18740
	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.7	186.1	4	9417	170.3	475.9128	1424.7188	3	-1.52	28.6	0	R.YISPDQLADLYK.S		270 - 281	1.7	LPS	PGN	1.3E-10	2355	2632	2384	1516
							1797	151.5	570.0373	2276.1285	4	-3.67	38.2	1	R.AAVPSGASTGIYEALELRDNDK.T		33 - 54	1.5	LPS	PGN	3.4E-05	11376	12725	11939	8482
							1294	203.6	686.5996	2742.3712	4	-0.70	41.6	1	K.DATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLK.T		203 - 228	1.7	LPS	PGN	1.5E-05	9053	10739	9334	6441
							19795	218.3	954.4961	1906.9798	2	-1.10	77.7	0	K.LAMQEFMILPVGAANFR.E		163 - 179	2.5	LPS	Control	4.1E-04	852	2122	930	1090
	ENPL_HUMAN	Endoplasmin	92.4	4.6	73.6	2	7323	187.7	517.2602	1548.7647	3	-3.79	39.6	1	K.EFEPLLNWMKDK.A		614 - 625	1.5	LPS	PGN	2.3E-05	3024	3283	2784	2141
							1277	118.4	528.7813	2111.1045	4	-3.97	34	1	K.NLLHVTDTGVGMTREELVK.N		143 - 161	1.6	LPS	PGN	5.6E-06	14655	15149	14275	9251
	KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57.9	9.0	185.9	4	5892	91.0	453.9051	1358.6976	3	-3.06	47.8	0	R.NTGIICTIGPASR.S	C: 6	44 - 56	1.6	LPS	PGN	3.8E-06	4840	5088	4933	3221
							85	35.1	471.7306	1882.8962	4	-1.55	42.2	0	R.LNFSHGTHEYHAETIK.N		74 - 89	1.7	PGN	LPS	1.4E-03	88255	65132	79819	113607
							204	173.4	522.7764	2087.0800	4	-1.67	77.8	1	R.EAEAAIYHLQLFEELRR.L		384 - 400	2.7	LPS	PGN	8.4E-07	50825	64042	54639	23540
							1572	193.6	617.0783	2464.2850	4	-0.35	18.1	0	R.TATESFASDPILYRPVAVALDTK.G		93 - 115	1.7	LPS	PGN	4.1E-08	14316	15813	13706	9310
	LOX15_HUMAN	Arachidonate 15-lipoxygenase	74.8	6.1	199.9	4	962	124.6	453.2351	1808.9170	4	-3.12	53.4	0	R.SSDFQLHELQSHLLR.G		349 - 363	1.9	Control	PGN	9.5E-05	14475	13698	13685	7723
							7950	173.1	527.2931	2105.1489	4	-2.68	24.8	0	K.ANVLCSQQHLAAPLVMLK.L	C: 6	286 - 304	2.4	LPS	PGN	2.2E-08	3002	3452	2981	1442
							979	124.6	603.9809	1808.9170	3	2.17	78	0	R.SSDFQLHELQSHLLR.G		349 - 363	1.9	PGN	LPS	9.3E-05	16095	14500	14656	26859
							4098	199.9	627.8240	2507.2730	4	-2.44	43.7	1	R.NAKLDMPYEYLRPSVVENSVAI.-		641 - 662	1.7	LPS	PGN	1.3E-04	4943	5230	4148	3052
	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18.0	9.0	99.8	2	970	157.4	533.5926	1597.7381	3	11.15	64.9	0	R.IIPGFMCQGGDFTR.H	C: 7	56 - 69	1.7	LPS	PGN	7.4E-09	17897	20499	18929	11953
							2005	183.8	698.8323	2790.3218	4	8.5	34.9	0	K.HTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAK.T	C: 24	92 - 118	1.5	LPS	PGN	2.4E-08	14389	15463	14751	10133
	RL17_HUMAN	60S ribosomal protein L17	21.4	10.9	99.9	2	5745	153.3	396.8833	1187.6373	3	-7.72	50.7	0	K.SAEFLLHMLK.N		87 - 96	2.4	LPS	PGN	4.1E-10	2053	2187	2171	919
							1295	175.1	593.6583	1777.9574	3	-2.44	49.2	0	K.GLDVDSLVIEHIQVNK.A		106 - 121	1.8	LPS	PGN	1.4E-05	9608	12208	11055	6614
	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	26.7	6.5	126.6	3	957	79.7	436.4644	1741.8318	4	-1.91	39.3	1	K.DCGATWVVLGHSERR.H	C: 2	86 - 100	1.8	DEX	PGN	2.5E-07	9019	7514	8238	4642
							3383	145.7	541.6070	1620.8181	3	12.7	22.5	0	K.VTNGAFTGEISPGMIK.D		70 - 85	1.8	LPS	PGN	4.6E-12	5463	5933	5788	3250
							704	79.7	581.6188	1741.8318	3	1.57	64.8	1	K.DCGATWVVLGHSERR.H	C: 2	86 - 100	1.8	PGN	LPS	6.4E-07	12456	10795	12344	19374
	VIME_HUMAN	Vimentin	53.6	4.9	317.5	7	7999	84.0	382.7116	1526.8205	4	-2.11	30.5	1	R.HLREYQDLLNVK.M		379 - 390	1.8	LPS	PGN	4.5E-05	2681	3037	2885	1659
							356	150.6	474.7371	1894.9207	4	-0.75	45.7	2	K.SRLGDLYEEEMRELR.R		144 - 158	1.8	LPS	PGN	1.0E-06	29904	32923	30758	18143
							4832	90.2	509.9507	1526.8205	3	6.37	34.2	1	R.HLREYQDLLNVK.M		379 - 390	1.8	PGN	LPS	2.5E-05	10970	9574	10119	16791
							13029	200.8	678.3442	1354.6769	2	-2.24	63.5	0	D.FSLADAINTEFK.N		86 - 97	2.4	DEX	PGN	2.7E-08	1963	2997	3661	1555
							3205	220.8	709.3633	2125.0579	3	4.77	59	0	R.LLQDSVDFSLADAINTEFK.N		79 - 97	3.0	LPS	PGN	1.3E-03	4034	5669	3578	1912
							150	70.7	748.4063	1494.7791	2	12.69	50.5	0	R.TYSLGSALRPSTSR.S		37 - 50	2.5	PGN	LPS	6.9E-09	75084	68014	71654	171573
							1485	45.2	918.9094	1835.7922	2	6.56	34.1	0	R.DGQVINETSQHHDDLE.-		451 - 466	2.7	PGN	LPS	1.9E-04	9454	7092	9330	18883

D

	Identification data															Quantification data							
																				Average normalized abundance			
	Swissprot accession no.	Protein name	MW [kDa]	pI	Scores	No. of identified peptides	Peptide number	Retention time (min)	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Sequence	Modification (C: Carbamidomethylation)	Range	Max. fold	Highest mean condition	Lowest mean condition	P value (FDR p value<0.01)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
Proteins upregulated in LPS-DCs and PGN-DCs	4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain	68.0	4.7	144.7	5	8517	89.8	473.2920	1416.8453	3	6.26	38.7	1	R.LKLEPHEGLLLR.F		614 - 625	3.2	PGN	DEX	7.1E-12	1995	2584	1584	5011
							2185	130.8	623.0004	1865.9748	3	2.45	32.5	0	R.IGDLQAFQGHGAGNLAGLK.G		227 - 245	1.9	PGN	DEX	1.3E-07	12354	15099	9853	19010
							23701	85.2	632.8595	1263.7075	2	-2.38	34	1	K.FTGLSKEELLK.V		161 - 171	3.2	PGN	DEX	1.6E-09	772	902	742	2345
							9951	209.4	753.3784	1504.7522	2	-6.59	24.3	0	K.GQSEDPGSLLSLFR.R		511 - 524	2.1	PGN	DEX	8.9E-09	2202	3316	1797	3757
							12529	150.3	770.7379	2309.1863	3	2.41	15.2	1	K.ADLLLSTQPGREEGSPLELER.L		593 - 613	2.5	PGN	DEX	4.9E-09	1172	1606	992	2494
	FSCN1_HUMAN	Fascin	54.5	7.0	419.1	9	2618	153.2	573.7976	1145.5757	2	4.30	64.5	0	K.YLTAEAFGFK.V		23 - 32	2.9	LPS	DEX	6.0E-09	5272	12192	4268	9920
							1823	61.7	595.8332	1189.6343	2	14.73	52.4	0	R.YLAPSGPSGTLK.A		230 - 241	3.2	LPS	DEX	3.0E-08	5270	13501	4172	12927
							585	120.0	607.3306	1818.9628	3	3.92	69.2	0	R.LVARPEPATGYTLEFR.S		202 - 217	3.8	LPS	DEX	2.3E-08	14077	43171	11509	34373
							11514	39.4	620.9362	1859.7890	3	-1.22	20.7	1	K.DGNVTCEREVPGPDCR.F	C: 6, 15	75 - 90	2.9	PGN	DEX	9.7E-07	2193	4564	1864	5420
							3778	206.5	669.5896	2674.3385	4	-3.42	67.4	1	K.VGKDELFALEQSCAQVLQAANER.N	C: 13	248 - 271	3.7	LPS	DEX	1.4E-03	1457	4827	1297	2691
							16192	74.4	719.3540	1436.6970	2	-2.45	37.8	0	R.LSCFAQTVSPAEK.W	C: 3	119 - 131	3.0	PGN	DEX	8.7E-07	1277	2967	1015	3039
							12409	176.2	730.8250	1459.6191	2	11.22	43.2	0	K.NASCYFDIEWR.D	C: 4	331 - 341	2.3	LPS	DEX	5.7E-07	1686	3669	1582	2883
							5626	211.4	769.8630	1537.6937	2	11.56	18.8	0	K.ASAETVDPASLWEY.-		480 - 493	2.5	LPS	DEX	6.1E-08	3769	8074	3263	7013
							2831	146.2	788.3758	2362.0900	3	6.60	45.1	1	R.YFGGTEDRLSCFAQTVSPAEK.W	C: 11	111 - 131	2.6	LPS	DEX	2.3E-08	11477	26754	10218	25086
	ICAM1_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 1	57.8	9.4	107.7	4	10605	145.5	540.8301	1079.6591	2	-12.39	34.4	0	K.LLGIETPLPK.K		57 - 66	2.2	PGN	DEX	3.5E-08	2034	3073	1611	3474
							15834	93.9	563.7616	1125.5125	2	-3.38	21	0	R.DLEGTYLCR.A	C: 8	450 - 458	2.2	PGN	DEX	6.7E-07	1923	3181	1669	3685
							20135	158.9	616.6557	1846.9247	3	11.10	28.1	0	R.SFSCSATLEVAGQLIHK.N	C: 4	368 - 384	1.6	LPS	DEX	6.8E-06	2443	3615	2201	3591
							25867	49.0	848.3863	1694.7604	2	-1.37	24.2	0	R.GGSVLVTCSTSCDQPK.L	C: 8, 12	41 - 56	4.5	PGN	DEX	1.6E-08	712	1451	459	2047
	NAMPT_HUMAN	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	55.5	6.8	195.3	5	14667	125.5	542.8127	1083.6077	2	2.92	37.8	0	K.AVPEGFVIPR.G		118 - 127	2.4	PGN	Control	3.6E-05	1108	2300	1140	2059
							9687	114.0	658.3418	1972.0014	3	1.10	64	0	R.GVSSQETAGIGASAHLVNFK.G		197 - 216	2.2	LPS	Control	6.5E-05	3132	6743	3159	6311
							5106	180.4	745.7443	2234.2271	3	-7.14	35.5	0	R.STQAPLIIRPDSGNPLDTVLK.V		303 - 323	2.2	LPS	DEX	5.0E-04	10385	22063	10021	19083
							19147	163.9	857.9393	1713.8461	2	10.44	34.9	0	K.YLLETSGNLDGLEYK.L		175 - 189	2.3	LPS	Control	1.4E-04	1595	3727	1618	3501
							10989	223.8	1079.5556	2157.0987	2	-0.97	23.1	0	R.VIQGDGVDINTLQEIVEGMK.Q		350 - 369	3.0	LPS	DEX	4.0E-05	1117	3243	1076	1860
	KYNU_HUMAN	Kynureninase	52.3	6.6	63.4	2	5137	142.1	583.6397	1747.8934	3	2.24	24	0	R.VAPVPLYNSFHDVYK.F		435 - 449	1.8	LPS	DEX	3.5E-06	5499	9648	5472	8408
							10919	222.2	883.9642	1765.9098	2	2.29	39.4	1	K.FTNLLTSILDSAETKN.-		450 - 465	1.7	LPS	DEX	1.7E-06	1985	3298	1907	2875
	NMES1_HUMAN	Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	9.6	10.0	70.3	2	5801	179.2	784.1048	2349.2805	3	5.14	37.2	0	K.LITINQGWKPIEELQNVQR.V		62 - 80	4.2	LPS	DEX	1.9E-08	3296	12391	2947	10587
							18571	128.6	868.9244	1735.8417	2	-4.30	33.1	0	K.NPEPWETVDPTVPQK.L		47 - 61	2.6	PGN	DEX	2.0E-07	2542	5287	2380	6293
	PLEK_HUMAN	Pleckstrin	40.1	9.3	58.6	2	3186	148.0	589.2828	1764.8220	3	2.60	31.4	0	K.QQDHFFQAAFLEER.D		76 - 89	1.6	PGN	DEX	1.3E-03	6202	7374	5583	8952
							6033	69.5	699.3304	1396.6293	2	12.13	27.2	0	K.GSTLTSPCQDFGK.R	C: 8	52 - 64	1.8	PGN	DEX	2.2E-04	4865	5383	4404	8014
	SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	24.7	9.1	241.6	5	5170	211.1	581.9640	1742.8740	3	-2.20	40	0	K.AIWNVINWENVTER.Y		203 - 216	3.1	LPS	Control	2.0E-06	1688	5243	1720	2998
							4591	126.0	712.9133	1423.8035	2	6.01	53.4	0	K.GDVTAQIALQPALK.F		76 - 89	2.6	LPS	Control	3.2E-04	3540	9075	3831	7881
							8675	138.6	743.4171	2227.2212	3	3.69	50.3	1	K.YQEALAKGDVTAQIALQPALK.F		69 - 89	3.0	LPS	Control	1.4E-05	2416	7274	2509	4560
							7193	169.7	806.9073	3223.5873	4	3.96	38	0	K.HSLPDLPYDYGALEPHINAQIMQLHHSK.H		26 - 53	2.3	LPS	Control	1.4E-04	8143	18609	8426	13174
							3709	211.2	872.4463	1742.8740	2	2.31	59.9	0	K.AIWNVINWENVTER.Y		203 - 216	3.0	LPS	Control	8.2E-07	3217	9671	3414	6175
	SQSTM_HUMAN	Sequestosome-1	47.7	5.0	45.2	2	15008	90.1	732.6720	2195.0034	3	-4.20	22.2	0	R.NMVHPNVICDGCNGPVVGTR.Y	C: 9, 12	120 - 139	3.0	PGN	DEX	3.7E-08	1446	2612	1340	4003
							8208	108.0	857.7456	2570.2249	3	-3.85	23	0	R.AGEARPGPTAESASGPSEDPSVNFLK.N		213 - 238	3.3	PGN	DEX	6.8E-09	2448	3825	2411	7969
	TFR1_HUMAN	Transferrin receptor protein 1	84.8	6.2	39	2	18967	197.3	717.4201	1432.8177	2	5.52	22.8	0	K.VSASPLLYTLIEK.T		496 - 508	3.3	PGN	DEX	5.0E-08	831	1655	706	2330
							11972	132.6	734.9010	1467.8045	2	-11.63	16.2	0	R.SSGLPNIPVQTISR.A		326 - 339	2.9	PGN	DEX	4.3E-08	1317	2671	1195	3406
	THIO_HUMAN	Thioredoxin	11.6	4.82	382.1	6	7120	135.8	445.2201	1332.6359	3	1.94	27.6	1	K.CMPTFQFFKK.G	C: 1	73 - 82	2.3	LPS	DEX	5.0E-09	2293	5159	2276	3532
							1867	116.5	446.2177	1335.6307	3	0.46	87	0	K.TAFQEALDAAGDK.L		9 - 21	2.5	LPS	PGN	1.9E-05	5734	13178	6045	5240
							1742	81.6	488.6022	1462.7643	3	14.00	67.7	0	K.MIKPFFHSLSEK.Y		37 - 48	2.1	LPS	DEX	4.4E-04	10809	21593	10467	20805
							330	181.4	603.2855	1204.5409	2	12.87	37.4	0	K.CMPTFQFFK.K	C: 1	73 - 81	2.4	LPS	DEX	1.2E-05	30419	69901	29547	50103
							63	116.5	668.8228	1335.6307	2	0.29	88.2	0	K.TAFQEALDAAGDK.L		9 - 21	2.3	PGN	Control	5.9E-06	101297	224091	103322	228649
							107	155.6	629.8500	1257.6816	2	3.03	74.2	1	K.EKLEATINELV.-		95 - 105	2.6	LPS	DEX	7.9E-06	48549	118886	46574	117462
	TNR5_HUMAN	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	30.6	5.4	57.7	4	5299	97.6	695.3142	2082.9265	3	-3.66	16	0	K.QYLINSQCCSLCQPGQK.L		30 - 46	3.1	PGN	DEX	1.1E-08	5447	10296	3752	11645
							3515	112.1	868.8444	3471.3539	4	-1.30	26.7	0	K.GTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHR.S	C: 9, 11, 17, 22, 25	95 - 123	4.3	PGN	DEX	2.3E-08	5861	12674	3587	15265
							29290	97.6	1042.4677	2082.9209	2	-3.66	15	0	K.QYLINSQCCSLCQPGQK.L		30 - 46	5.8	PGN	DEX	8.3E-10	834	1816	431	2516
	TRAF1_HUMAN	TNF receptor-associated factor 1	46.1	5.7	54.8	2	9091	80.4	623.3240	2489.2623	4	1.86	42.8	1	K.EVEASHLALATSIHQSQLDRER.I		207 - 228	3.7	PGN	DEX	1.0E-09	1818	4985	1732	6495
							6477	146.5	754.3574	2260.0405	3	4.33	12	0	K.AHPEVAEAGIGCPFAGVGCSFK.G		77 - 98	4.8	PGN	DEX	7.2E-09	2328	9905	2223	10621
	WDR1_HUMAN	WD repeat-containing protein 1	66.2	6.2	66.7	2	7295	171.4	523.8017	2091.1827	4	-2.40	26.7	2	R.LYSILGTTLKDEGKLLEAK.G		471 - 489	1.6	LPS	PGN	2.8E-05	2734	2750	2581	1747
							10869	90.7	816.9345	1631.8519	2	1.57	40	1	R.DYSGQGVVKLDVQPK.C		397 - 411	1.6	PGN	LPS	6.7E-07	2553	2394	2605	3843

E

	Identification data															Quantification data							
																				Average normalized abundance			
	Swissprot accession no.	Protein name	MW [kDa]	pI	Scores	No. of identified peptides	Peptide number	Retention time (min)	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Sequence	Modification (C: Carbamidomethylation)	Range	Max. fold	Highest mean condition	Lowest mean condition	P value (FDR p value<0.01)	Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
Proteins upregulated in LPS-DCs	ANXA6_HUMAN	Annexin A6	75.8	5.3	64.2	2	4332	84.8	445.2175	1776.8391	4	1.01	26.6	1	K.SLEDALSSDTSGHFRR.I		484 - 499	1.5	Control	PGN	3.4E-04	3787	3652	3594	2467
							5147	212.7	594.9641	1781.8737	3	-1.80	37.6	0	K.WGTDEAQFIVLGNR.S		192 - 206	1.6	LPS	PGN	6.0E-05	1988	2562	2084	1608
	EF1A3_HUMAN	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	50.2	9.8	192.8	3	162	124.3	636.6763	1906.9941	3	6.77	56.1	1	K.YYVTIIDAPGHRDFIK.N		85 - 100	1.9	PGN	DEX	1.1E-07	67654	69590	63692	121609
							353	116.6	657.8783	1313.7343	2	5.86	58.9	0	R.EHALLAYTLGVK.Q		135 - 146	1.7	PGN	DEX	3.1E-09	49861	52072	48138	81980
							3999	97.9	702.8753	1403.7198	2	11.59	77.8	0	K.YYVTIIDAPGHR.D		85 - 96	2.4	PGN	LPS	8.8E-11	4234	4116	4145	9686
	MX1_HUMAN	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	75.5	5.5	35.1	1	22956	209.2	676.3363	2025.9864	3	0.36	35.1	0	K.ALEEPAVDMLHTVTDMVR.L		464 - 481	3.5	LPS	DEX	6.8E-08	1244	4136	1192	1198
	PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7	27.9	9.3	60.7	2	8383	66.9	592.8458	1183.6925	2	-13.01	33.8	1	R.GRDIVVLGVEK.K		37 - 47	1.5	PGN	LPS	2.3E-03	3424	3013	3617	4544
							9326	209.8	728.6694	2182.9809	3	2.48	26.9	0	K.ICALDDNVCMAFAGLTADAR.I		62 - 81	1.5	LPS	PGN	2.5E-04	2203	2612	2212	1693

F

Proteins upregulated in PGN-DCs

Identification data															Quantification data						
Swissprot accession no.	Protein name	MW [kDa]	pI	Scores	No. of identified peptides	Peptide number	Retention time (min)	m/z meas.	Mr calc.	z	Δ m/z [ppm]	Scores	P	Sequence	Modification (C: Carbamidomethylation)	Range	Max. fold	Highest mean condition	Lowest mean condition	P value (FDR p value<0.01)	Average normalized abundance			
																					Ctrl-DCs	LPS-DCs	DEX-DCs	PGN-DCs
6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	53.1	7.0	63.7	2	3055	72.8	504.2767	1006.5448	2	-5.85	23.8	1	K.KSFLEDIR.K		317 - 324	1.6	PGN	LPS	5.0E-06	7835	7137	7616	11625
						2724	149.1	764.3768	1526.7405	2	-0.98	39.9	0	R.DYPGAHTYELLAK.P		448 - 460	1.7	PGN	Control	6.5E-06	8080	8587	8579	13947
ACBP_HUMAN	Acyl-CoA-binding protein	10.0	6.2	99.4	2	1563	128.8	490.2388	1956.9292	4	-1.56	43.3	0	K.TKPSDEEMLFIYGHYK.Q		18 - 33	2.1	LPS	PGN	3.7E-09	12747	13940	12757	6564
						1191	128.8	653.3171	1956.9292	3	0.16	56.1	0	K.TKPSDEEMLFIYGHYK.Q		18 - 33	1.5	PGN	DEX	8.4E-10	21984	21707	21195	31805
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	104.8	5.2	49.6	2	7849	76.8	624.8418	1247.6622	2	5.45	30.3	1	K.NFITAEELRR.E		860 - 869	2.4	PGN	LPS	7.0E-13	2497	2295	2406	5406
						17559	107.5	651.8549	1301.6914	2	2.93	19.3	1	K.EGLLLWCQRK.T	C: 7	167 - 176	1.6	PGN	DEX	2.9E-07	2829	2951	2737	4340
ANX11_HUMAN	Annexin A11	54.4	8.5	125.6	3	479	152.3	543.5401	2170.1382	4	-3.19	50.4	2	R.GTITDAPGFDPLRDAEVLRK.A		192 - 211	1.9	DEX	PGN	1.1E-09	29177	28473	30290	16267
						736	152.3	724.3858	2170.1382	3	-1.22	38.2	2	R.GTITDAPGFDPLRDAEVLRK.A		192 - 211	1.7	PGN	LPS	5.6E-10	25413	23614	26068	41108
						11360	114.6	784.9912	1567.7730	2	-3.26	37	1	R.SETDLLDIRSEYK.R		462 - 474	1.5	PGN	LPS	2.2E-03	2783	2429	2938	3724
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	47.3	5.5	94.7	2	1693	63.0	510.7961	2039.1462	4	4.43	65.7	0	R.LKPKPIDVQVITHMMQR.Y		358 - 374	2.0	PGN	LPS	2.0E-08	10799	9498	10123	17278
						5546	88.3	764.8768	1527.7392	2	-0.08	29	1	K.ERYSYVCPDLVK.E	C: 7	229 - 240	1.7	PGN	LPS	1.1E-07	5713	5402	5595	9284
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	34.3	7.0	127.2	3	2521	74.6	629.3102	1256.5972	2	6.88	39.9	1	K.RNCFASVFEK.Y	C: 3	118 - 127	1.9	PGN	LPS	4.2E-11	8144	7600	7689	14592
						7113	60.2	662.3541	1322.6830	2	8.02	53.4	0	K.ELQAHGADELLK.R		66 - 77	2.7	PGN	LPS	1.0E-09	2497	2208	2481	5972
						15267	125.5	672.3632	1342.6994	2	9.29	33.9	0	R.DNTINLIHTFR.D		238 - 248	2.2	PGN	LPS	6.6E-13	2120	2096	2113	4670
CALM_HUMAN	Calmodulin	16.8	3.9	190	4	608	82.1	464.7169	1854.8418	4	-1.77	84.3	2	K.MKDTDSEEEIREAFR.V		77 - 91	1.7	DEX	PGN	6.5E-06	19131	18507	20170	12032
						456	82.1	619.2866	1854.8418	3	-2.06	36.4	2	K.MKDTDSEEEIREAFR.V		77 - 91	1.6	PGN	LPS	1.0E-04	27338	24856	28457	40690
						4697	97.5	633.3104	1264.6048	2	1.16	35.2	0	K.DGNGYISAAELR.H		96 - 107	3.4	PGN	DEX	6.6E-07	1950	1647	1540	5173
						16318	103.3	798.8671	1595.7063	2	8.33	34.1	1	K.DTDSEEEIREAFR.V		79 - 91	2.0	PGN	LPS	6.5E-06	1391	1018	1527	2081
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	51.9	9.1	111.9	2	13613	92.8	542.8009	1083.5812	2	5.58	65.1	0	K.EPAVLELEGK.K		318 - 327	2.2	PGN	LPS	1.3E-08	2453	1914	2147	4261
						4576	80.2	638.8257	1275.6248	2	9.44	46.8	0	K.EFHTTGLAWSK.T		199 - 209	1.6	PGN	LPS	8.4E-05	5612	5082	5398	7997
CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1	191.5	5.4	43.9	2	8503	94.2	536.3116	1070.6124	2	-3.53	25.9	0	K.HDVVFLITK.Y		270 - 278	2.0	PGN	LPS	3.2E-06	2646	2409	2683	4770
						21687	87.4	730.3626	1458.6891	2	14.8	18	1	R.FLRENPYYDSR.V		893 - 903	1.5	PGN	LPS	5.0E-06	2071	1815	2052	2731
COF1_HUMAN	Cofilin-1	18.5	9.1	172.7	3	277	86.0	437.2309	1308.6748	3	-2.98	56.5	1	K.AVLFCLSEDKK.N	C: 5	35 - 45	1.6	DEX	PGN	1.0E-04	28916	29249	29655	18615
						8809	96.1	446.5452	1336.6187	3	-3.68	36.6	0	R.YALYDATYETK.E		82 - 92	2.2	LPS	PGN	1.1E-08	2888	3028	2876	1358
						964	85.9	655.3476	1308.6748	2	4.48	79.6	1	K.AVLFCLSEDKK.N	C: 5	35 - 45	2.4	PGN	LPS	7.8E-11	14082	13247	13903	31963
COX5B_HUMAN	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	13.7	10.2	69	2	8045	101.4	438.9166	1313.7343	3	-4.83	37.7	1	K.KGLDPYNVLAPK.G		57 - 68	1.8	DEX	PGN	1.3E-06	2269	2263	2478	1385
						7551	101.3	657.8784	1313.7343	2	6.01	31.3	1	K.KGLDPYNVLAPK.G		57 - 68	2.5	PGN	LPS	3.7E-09	2647	2120	2694	5286
CYTB_HUMAN	Cystatin-B	11.1	7.9	151.2	2	3662	79.8	356.4330	1421.7052	4	-1.59	51.6	0	K.VHVGDEDFVHLR.V		57 - 68	1.6	LPS	PGN	5.5E-04	4050	4392	4316	2750
						343	79.8	474.9123	1421.7052	3	0.05	99.6	0	K.VHVGDEDFVHLR.V		57 - 68	1.9	PGN	LPS	3.2E-07	47731	43797	47250	81174
ECHM_HUMAN	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	31.4	9.4	95.3	2	2935	77.9	489.6186	1465.8365	3	-1.73	29.4	0	K.NNTVGLIQLNRPK.A		44 - 56	1.7	DEX	PGN	1.1E-04	5282	4105	5561	3213
						14844	77.9	733.9306	1465.8365	2	6.91	65.9	0	K.NNTVGLIQLNRPK.A		44 - 56	4.1	PGN	LPS	3.3E-11	1390	976	1389	3957
EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1	50.1	9.7	205.9	4	246	124.4	477.7552	1906.9941	4	-1.28	45.2	1	K.YYVTIIDAPGHRDFIK.N		85 - 100	1.9	LPS	PGN	2.0E-05	44018	49843	43272	26910
						2659	188.0	629.6006	2514.3768	4	-1.37	35.1	0	R.VETGVLKPGMVVTFAPVNVTTEVK.S		267 - 290	1.6	LPS	PGN	2.5E-07	9984	12310	9823	7657
						545	221.8	664.5862	2654.3222	4	-2.43	106.7	0	K.DGNASGTTLLEALDCILPPTRPTDK.P	C: 15	220 - 244	2.2	LPS	PGN	1.2E-06	19725	23516	18225	10533
						9160	102.3	712.0275	2133.0776	3	-7.93	18.9	1	K.QLIVGVNKMDSTEPPYSQK.R		147 - 165	1.8	PGN	DEX	1.5E-04	4207	4434	2788	4953
F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	36.8	6.7	99.7	2	10642	50.3	617.3059	1232.5972	2	0.05	76	0	R.YVGSMVADVHR.T		245 - 255	1.9	PGN	LPS	7.6E-08	3474	3117	3355	6021
						12790	125.4	791.4028	1580.7835	2	4.79	23.7	1	R.DFDPAVTEYIQRK.K		219 - 231	1.9	PGN	LPS	1.7E-10	2955	2762	3025	5129
FLNA_HUMAN	Filamin-A	280.6	5.7	431.9	10	3964	56.8	453.4853	1809.9156	4	-1.91	38.7	1	R.RAPSVANVGSHCDLSLK.I	C: 12	2,149 - 2,165	2.8	Control	PGN	1.3E-08	3767	3152	3658	1361
						3587	93.8	478.9110	1433.7151	3	-2.71	23.6	0	R.ANLPQSFQVDTSK.A		1,465 - 1,477	1.8	LPS	PGN	5.8E-05	4386	4693	4177	2678
						5870	169.2	511.9413	1532.8086	3	-4.27	22.2	0	K.SPFSVAVSPSLDLSK.I		959 - 973	1.7	LPS	PGN	6.0E-06	3116	3220	2964	1920
						12043	63.1	577.8159	1153.6244	2	-6.18	28.2	0	R.NGHVGISFVPK.E		2,004 - 2,014	1.6	PGN	LPS	1.3E-03	1482	1350	1521	2204
						1847	56.8	604.3160	1809.9156	3	5.85	85.9	1	R.RAPSVANVGSHCDLSLK.I	C: 12	2,149 - 2,165	2.1	PGN	LPS	1.3E-08	10372	7891	9894	16647
						7990	82.0	642.3793	1282.7398	2	3.34	54.4	0	K.VTVLFAGQHIAK.S		356 - 367	2.3	PGN	LPS	1.0E-09	4111	3596	4065	8390
						11264	92.7	646.8640	1291.7136	2	-0.12	44.6	1	K.GKLDVQFSGLTK.G		905 - 916	1.8	PGN	LPS	8.0E-11	2763	2649	2675	4794
						14045	52.5	682.8584	1363.6984	2	2.86	18.2	1	K.VDVGKDQEFTVK.S		983 - 994	2.5	PGN	LPS	1.3E-06	1314	1057	1268	2625
						11673	72.0	751.8846	1501.7599	2	-3.49	56.1	0	R.FVPAEMGTHTVSVK.Y		2,202 - 2,215	2.2	PGN	LPS	2.7E-07	2367	2040	2150	4456
						2392	79.0	934.4245	1866.8353	2	-0.44	60	0	R.SPVTVTVGQACNPSACR.A	C: 11, 16	468 - 484	1.7	PGN	LPS	5.7E-07	10756	9626	10527	16365
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50.6	6.1	91.6	3	8722	84.7	590.3545	1178.6846	2	8.38	38.8	0	R.VICILSHPIK.N	C: 3	300 - 309	1.8	PGN	LPS	3.0E-08	3088	2702	3031	4767
						780	75.5	639.9493	1916.8098	3	8.46	36.8	0	R.TYDATTHFETTCDIK.N	C: 12	403 - 418	1.8	LPS	Control	2.1E-03	29167	27659	27971	33420
						17193	87.4	904.4874	1806.9615	2	-0.65	16	1	K.YIAIVSTTVETKEPEK.E		349 - 375	1.9	PGN	LPS	4.2E-07	1330	1122	1245	2159
GNAI1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	40.3	5.6	108	2	4467	100.6	690.8675	1379.7085	2	8.63	58.8	0	K.TTGIVETHFTFK.D		181 - 192	1.8	PGN	LPS	8.9E-13	7841	7275	8117	13432
						5999	61.7	793.8680	1585.7083	2	8.31	49.2	0	K.EIYTHFTCATDTK.N	C: 8	318 - 330	2.0	PGN	LPS	9.8E-10	3280	2893	3390	5829
H2AV_HUMAN	Histone H2A.V	13.5	11.0	97.1	2	2002	56.5	457.6047	1369.7830	3	5.74	71.1	0	K.ATIAGGGVIPHIHK.S		103 - 116	2.1	PGN	LPS	7.2E-05	8760	7334	9216	15245
						8793	155.3	488.2700	1949.0582	4	-3.74	26	1	R.HLQLAIRGDEELDSLIK.A		86 - 102	2.5	LPS	PGN	5.9E-04	2328	3610	3327	1444
H4_HUMAN	Histone H4	11.4	11.8	254.6	4	1793	182.3	437.5721	1309.6952	3	-0.54	81.7	0	K.TVTAMDVVYALK.R		81 - 92	1.6	LPS	PGN	1.6E-03	9501	10197	10167	6530
						173	40.0	494.6263	1480.8474	3	6.51	50.5	1	R.DNIQGITKPAIRR.L		25 - 37	3.0	PGN	LPS	6.9E-04	44202	28398	44775	85837
						609	58.6	663.3846	1324.7463	2	6.29	61.2	0	R.DNIQGITKPAIR.R		25 - 36	2.7	PGN	LPS	1.2E-04	13431	12607	14756	34129
						4456	65.1	668.8707	1335.7147	2	9.11	61.2	1	K.RISGLIYEETR.G		46 - 56	1.9	PGN	LPS	1.5E-05	3762	3287	3887	6319
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	84.6	4.8	79.3	2	5701	102.4	595.8520	1189.6819	2	6.33	33.4	0	K.ELHINLIPNK.Q		75 - 84	1.6	PGN	LPS	1.1E-03	3179	2640	3037	4306
						19911	62.0	770.3843	1538.7464	2	4.95	45.9	1	R.YESLTDPSKLDSGK.E		61 - 74	2.9	PGN	LPS	7.5E-08	1240	1083	1109	3161
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	42.7	5.9	148.2	2	1138	102.5	546.0102	2180.0134	4	-0.79	67	1	K.TYGADLASVDFQHASEDARK.T		111 - 130	1.6	DEX	PGN	1.6E-04	15255	16333	16589	10496
						2366	102.5	727.6830	2180.0134	3	6.30	81.2	1	K.TYGADLASVDFQHASEDARK.T		111 - 130	1.8	PGN	Control	9.5E-07	9134	9256	9906	16632
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	189.1	6.1	158.4	4	7777	81.2	492.3261	982.6288	2	9.04	38.7	1	K.RLIVDVIR.F		1,390 - 1,397	2.5	PGN	LPS	3.0E-07	1506	1102	1510	2739
						7900	209.5	582.3196	1743.9407	3	-2.14	34	0	K.GVLLEIEDLQVNQFK.N		1,572 - 1,586	2.1	LPS	PGN	3.6E-07	1585	2095	1701	1012
						8727	89.8	613.8445	1225.6667	2	6.35	68.4	0	K.ITLQDVVSHSK.K		925 - 935	1.6	PGN	LPS	6.2E-04	2925	2636	2910	4129
						7403	98.7	630.3644	1258.7067	2	5.95	17.3	1	K.MREEVITLIR.S		892 - 901	1.7	PGN	LPS	1.7E-07	2150	1978	2318	3300
LEG3_HUMAN	Galectin-3	26.1	9.1	137.4	2	463	60.3	550.6253	1648.8434	3	6.47	73.9	0	K.VAVNDAHLLQYNHR.V		211 - 224	1.8	PGN	LPS	2.6E-06	24791	21077	23155	38156
						6184	73.9	637.3121	1272.6000	2	7.59	63.5	0	R.GNDVAFHFNPR.F		152 - 162	1.5	PGN	LPS	4.3E-06	4219	3860	3980	5830
LMNA_HUMAN	Lamin-A/C	74.1	6.6	73.6	2	13340	59.7	694.3244	1186.6306	2	3.07	25.6	1	K.LRDLEDSLAR.E		320 - 329	2.1	PGN	DEX	6.0E-06	1207	1193	1192	2484
						12008	67.7	876.9393	1751.8550	2	5.11	48	0	R.NSNLVGAAHEELQQSR.I		281 - 296	2.1	PGN	LPS	3.7E-10	1961	1899	1972	3937
MYH9_HUMAN	Myosin-9	226.4	5.4	501.7	12	1001	78.0	527.2900	1578.8366	3	7.33	46.6	1	R.AGVLAHLEEERDLK.I		765 - 778	1.6	PGN	LPS	2.2E-05	13802	12193	13718	19168
						14618	65.5	536.3129	1070.6124	2	-1.10	19.5	1	K.KLVWVPSDK.S		30 - 38	1.9	PGN	LPS	1.3E-04	2342	1780	2016	3410
						9579	182.3	539.2752	1614.8110	3	-4.44	16.9	0	R.IMGIPEEEQMGLLR.V		328 - 341	1.8	LPS	PGN	2.3E-07	2829	3314	2792	1856
						5916	198.7	576.6225	1726.8488	3	-1.79	40.9	0	K.NLPIYSEEIVEMYK.G		126 - 139	1.5	LPS	PGN	1.0E-05	3223	3506	2963	2329
						5916	101.8	578.3381	1154.6660	2	4.86	50.3	1	R.KSLEDQAEQLQAQQSK.A		1,923 - 1,932	1.5	PGN	LPS	1.1E-07	3899	3633	3854	5593
						4230	64.1	610.8341	1219.6449	2	7.20	56.9	1	K.KFDQLLAEEK.T		1,445 - 1,454	2.1	PGN	LPS	2.5E-08	4215	3497	3959	7451
						8171	102.5	647.8181	1293.6176	2	3.13	66.1	0	K.ADFCIIHYAGK.V	C: 4	566 - 576	2.0	PGN	LPS	1.4E-09	3957	3759	4102	7534
						2192	209.5	688.0895	2748.3202	4	3.15	25.4	1	K.DFSALESQLQDTQELLQEENRQK.L		1,302 - 1,324	2.6	LPS	PGN	2.6E-05	6062	8037	6107	3050
						4246	67.0	706.9144	1411.8035	2	7.62	85.6	1	K.KVEAQLQELQVK.F		1,249 - 1,260	2.0	PGN	LPS	5.0E-07	3650	3065	3513	6124
						26543	181.2	768.3819	2302.1289	3	-2.16	22.1	1	K.IRELESQISELQEDLESER.A		1,106 - 1,124	1.6	PGN	Control	2.2E-04	3997	5113	4218	6414
						14735	78.7	823.9135	1645.7981	2	8.69	54.4	1	R.ALEEAMEQKAELER.L		1,484 - 1,497	1.8	PGN	LPS	4.2E-06	1426	1200	1492	2176
						12416	61.0	965.4311	1720.9642	2	-9.59	17	1	K.QTLDDTQVNKLQCVK.V		1,220 - 1,234	1.9	PGN	LPS	2.3E-03	1761	1416	1955	2650
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	16.9	4.4	85.9	2	615	221.6	630.0092	1886.9964	3	4.94	37.3	0	K.VLDFEHFLPMLQTVAK.N		64 - 79	2.0	LPS	PGN	1.6E-03	21271	24544	20606	18109
						9278	101.9	742.3718	1482.7103	2	12.62	48.6	1	K.EAFQLFDRTGDGK.I		14 - 26	2.2	PGN	LPS	8.4E-06	2846	2685	2787	5834
NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	17.3	9.4	84.1	2	3658	124.1	588.3367	1174.6499	2	7.62	29.6	0	K.DRPFFPGLVK.Y		57 - 66	2.1	PGN	LPS	2.4E-11	4231	3605	3903	7740
						8429	76.7	672.8838	1343.7561	2	-2.29	54.5	0	R.TFIAIKPDGVQR.G		7 - 18	2.2	PGN	LPS	1.3E-11	2548	2287	2577	5053
NSF_HUMAN	Vesicle-fusing ATPase	82.5	6.6	33.1	2	14321	114.4	641.0253	1920.0581	3	-2.11	22.1	1	K.THPSVPGSIAFSLPQRK.W		51 - 68	1.7	PGN	LPS	6.0E-07	3280	2971	3268	4976
						27706	135.8	701.7058	2102.1120	3	-7.88	11	1	K.NSDRTHLVSVLLEGPPHSGK.T		514 - 550	1.9	PGN	LPS	3.7E-06	1491	1454	1486	2442
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	57.1	4.6	97.5	2	4916	133.9	541.3459	1080.6696	2	7.11	21.8	0	K.THILFLPK.S		255 - 263	2.1	PGN	DEX	2.2E-07	3666	3482	3215	6621
						6793	61.6	579.8041	1157.5829	2	9.25	75.7	0	K.SNFAEALAAHK.Y		32 - 42	3.4	PGN	LPS	1.6E-07	3132	2300	2705	7867
*PGRP1_BOSIN	*Peptidoglycan recognition protein 1 OS=Bos indicus	*21	*9.6	*26	*1	*7756	*46.1081	*731.6759	*2192.0103	*3	*-1.99	*26	*0	*R.YVVVSHTAGSVCNTPASCQR.Q		*50 - 69	91.8	PGN	Control	0.0E+00	129	130	129	11807
PLEC_HUMAN	Plectin	531.5	5.7	49.4	2	8685	71.5	632.3250	1893.9545	3	-0.68	23.5	1	R.GTQGAEEVLRAHEEQLK.E		1,234 - 1,250	1.8	PGN	LPS	1.3E-10	3420	3204	3209	5755
						13874	130.2	854.9118	1707.8203	2	-6.59	25.9	0	R.LLDPEDVDVPQPDEK.S		372 - 386	1.5	PGN	LPS	1.8E-06	2759	2586	2821	3965
PLSL_HUMAN	Plastin-2	70.2	5.2	136.9	2	2437	154.2	501.5883	1501.7446	3	-1.05	56.3	0	K.MNLSVPDTIDER.T		166 - 178	1.6	LPS	PGN	2.1E-06	6023	7292	5858	4563
						1568	63.5	769.3926	1536.7606	2	6.51	81.6	1	K.KLENCIYVAKGLGK.N	C: 5	456 - 468	1.7	PGN	DEX	2.1E-10	9257	8937	8816	15216
SYWC_HUMAN	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	53.1	5.8	98	3	5773	95.6	505.2523	1512.7494	3	-9.45	26	1	K.DYTSGAMLTGELKK.A		419 - 432	1.7	LPS	PGN	5.1E-05	2480	3179	2399	1909
						7753	195.5	600.9668	1799.8578	3	11.54	40.9	0	K.DLTLDQAYSYAVENAK.D		205 - 220	1.5	LPS	DEX	1.2E-04	2688	3704	2447	2505
						14636	95.7	757.3864	1512.7494	2	5.84	31.1	1	K.DYTSGAMLTGELKK.A		419 - 432	2.2	PGN	DEX	1.7E-05	1195	1355	1185	2649
TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon	59.6	5.3	46.5	2	17046	141.6	696.3648	1390.7344	2	-13.89	29.5	1	R.DVDFELIKVEGK.V		203 - 214	1.5	PGN	LPS	3.5E-07	1600	1588	1619	2383
						10262	121.1	711.8633	1421.7224	2	-7.32	17	1	K.EKFEEMIQQIK.E		282 - 293	1.5	PGN	LPS	8.5E-13	2604	2511	2612	3887
TKT_HUMAN	Transketolase	67.8	8.5	86.2	2	2460	83.9	400.8783	1199.6131	3	-4.64	31	1	K.NSTFSEIFKK.E		344 - 353	1.8	DEX	PGN	1.9E-03	5398	5362	5995	3381
						5021	83.8	600.8221	1199.6186	2	9.16	55.2	1	K.NSTFSEIFKK.E		344 - 353	2.1	PGN	LPS	4.2E-06	6464	5853	7224	12506
TLN1_HUMAN	Talin-1	269.6	5.7	124.2	3	2737	53.3	568.2882	1701.8322	3	6.19	24.8	1	R.EGTETFADHREGILK.T		2,007 - 2,021	1.8	PGN	LPS	8.3E-06	5380	4564	5162	8101
						15617	64.2	621.8150	1241.6041	2	9.16	25.5	1	K.FLPSELRDEH.-		2,532 - 2,541	2.0	PGN	LPS	1.4E-08	1392	1238	1324	2452
						3910	73.7	745.7291	2234.1543	3	5.00	73.9	0	R.LASEAKPAAVAAENEEIGSHIK.H		1,896 - 1,917	1.7	PGN	LPS	6.2E-06	6109	5101	6034	8428
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase	49.9	5.2	212.1	3	4228	234.2	648.7006	1943.0827	3	-1.39	67	0	R.DVTATVDSLPLITASILSK.K		203 - 221	3.0	LPS	PGN	2.8E-05	3598	8066	4725	2708
						4313	213.4	765.4665	1528.9090	2	6.21	84.5	0	K.ALPLALVLHELGAGR.S		394 - 408	3.0	PGN	DEX	2.6E-10	3288	3614	2814	8569
						5388	234.1	972.5614	1943.0827	2	13.15	60.6	0	R.DVTATVDSLPLITASILSK.K		203 - 221	2.2	LPS	PGN	1.1E-03	4122	8395	5466	3873
						8705	91.5	563.2329	1686.6800	3	-1.86	17.8	0	R.DMGYHVSMMADSTSR.W		339 - 353	1.6	Control	PGN	6.8E-04	2526	2345	2379	1622
VATA_HUMAN	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68.3	5.2	39.4	2	11851	125.3	655.3206	1308.6173	2	7.16	21.6	1	R.DIKWDFTPCK.N	C: 9	130 - 139	1.8	PGN	LPS	1.0E-09	4121	3746	4025	6649

DISCUSSION / PERSPECTIVES

Le diagnostic de l'allergie repose aujourd'hui sur les prick tests cutanés et le dosage plasmatique des IgE spécifiques au moyen de tests réalisés *in vitro* (CAP system, Vidas, ELISA) **[376]**. Bien que ces méthodes permettent de définir le profil de sensibilisation d'un patient donné et d'identifier précisément les allergènes en cause, elles ne sont pas adaptées au suivi des modifications immunitaires des patients en cours de traitement. De nombreux marqueurs ont été proposés pour évaluer l'inflammation allergique comme le taux d'éosinophiles ou d'ECP dans les crachats **[377]**, ou de tryptase dans les sécrétions nasales **[378]**. La mesure de NO exhalé représente une autre méthode biologique indirecte et non invasive de mesure de l'hyperréactivité des voies respiratoires **[379]**. Tous ces marqueurs concernent les symptômes inflammatoires associés aux mécanismes immuns tardifs et sont de ce fait pertinents pour suivre l'effet des traitements symptomatiques comme les corticoïdes ou les antihistaminiques. Cependant, l'ITA est un traitement étiologique qui permet de rééquilibrer la balance immune des patients allergiques (d'une réponse Th2 spécifique de l'allergène à une réponse de type Th1 ou Treg). Ainsi, une combinaison de biomarqueurs adaptée à l'ITA est essentielle au suivi des patients lors des traitements et des études cliniques.

Les biomarqueurs sont des biomolécules qui permettent, entre autres, de suivre la progression des maladies et la réponse des patients après intervention thérapeutique **[380]**. Un grand nombre d'études protéomiques visant à découvrir des biomarqueurs se sont concentrées sur les fluides biologiques comme le sérum ou l'urine car ces derniers sont disponibles facilement lors des études cliniques. Par ailleurs, les méthodes d'obtention de ces fluides sont non invasives et la constitution de sérothèques est possible, permettant l'analyse à postériori des échantillons. De plus, le sérum est facilement accessible et des changements rapides de concentrations protéiques en réponse aux pathologies sont souvent détectés **[381]**. Toutefois, l'analyse des protéines sériques est complexe du fait d'une gamme dynamique importante. En effet, certaines des protéines sériques sont très abondantes comme l'albumine, ce qui complique l'identification et la quantification d'analytes de plus faible abondance **[381]**.

Face à ces difficultés techniques, une alternative consiste à décomplexifier les systèmes en utilisant une approche réductionniste basée sur l'utilisation de modèles cellulaires se rapprochant au maximum des conditions physiologiques. Notre hypothèse initiale, portant sur l'étude des DCs comme médiateurs de l'efficacité de l'immunothérapie, nous a conduit à utiliser un modèle décrit dans la littérature, les DCs dérivées des monocytes (moDCs). En effet, la génération de DCs, par différenciation *in vitro* à partir des monocytes en présence d'IL-4 et de GM-CSF, permet d'obtenir une quantité importante de cellules « primaires », facilitant ainsi les études fonctionnelles. Par

opposition, l'étude *ex vivo* des DCs chez l'homme reste limitée du fait de leur faible présence dans le sang (1 à 2% des leucocytes). Ainsi, la trans-différenciation réalisée *in vitro* permet d'obtenir un système cellulaire adapté à l'étude des DCs humaines. Par ailleurs, Cheolho Cheong *et al.* ont décrit la présence de moDCs *in vivo* chez des souris exposées au LPS **[382]**. Ces cellules sont DC-SIGN/CD209^{+} (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion moleule-3-grabbing non-integrin*) et présentent une morphologie classique de DCs leur permettant de présenter l'antigène aux LTs de migrer vers les zones T des nœuds lymphatiques périphériques *via* l'expression de la L-sélectine ou du CCR7 **[382]**. Cette étude confirme donc la pertinence physiologique de notre modèle.

Le criblage de différentes molécules biologiques ou pharmacologiques sur les moDCs nous a permis d'identifier un nouvel inducteur de tolérance : les protéases d'*Aspergillus oryzae*. Ce traitement *in vitro* induit des DCs régulatrices qui sécrètent du TGF-β, expriment certains gènes tolérogènes et sont capables d'induire la génération de LTs anergiques et suppressifs. L'étude du récepteur par lequel les protéases interagissent avec les DCs pourrait être décisive pour comprendre le mécanisme d'induction de tolérance par ASP. Les moDCs expriment différents PARs, en particulier PAR1, PAR2 et PAR3 **[383]**. Actuellement, les voies de signalisation en aval de ces récepteurs sont encore peu connues et la fonction de ces récepteurs est fortement controversée. En effet, dans les pathologies allergiques, l'activation de PAR2 dans les voies respiratoires simultanément à une exposition à un antigène inhalé semble induire la sensibilisation vis-à-vis de l'allergène **[383]**. De même, les souris déficientes en PAR2 présentent des réactions d'hypersensibilité de contact diminuées et sont complètement résistantes à l'arthrite induite par des adjuvants **[384]**. Par opposition, un rôle protecteur de l'activation de PAR2 a été démontré dans un modèle d'asthme allergique chez la souris **[385]**. En ce qui concerne PAR1, la controverse existe également puisque des souris déficientes en PAR1 montrent un recrutement atténué des cellules inflammatoires dans les liquides bronchoalvéolaires par comparaison aux souris sauvages **[383]**. Dans d'autres modèles comme celui de la colite médiée par les Th2, PAR1 a été décrit pour son effet anti-inflammatoire **[386]**. Par ailleurs, la stimulation de PAR1 a permis d'augmenter le processus de cicatrisation chez des rats présentant des ulcères expérimentaux **[383]**. Enfin, PAR1 semble protéger les souris de gastrites induites par *Helicobacter pylori* indiquant à nouveau un rôle anti-inflammatoire *via* la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires comme MIP2 (*Macrophage-inflammatory protein 2*) **[386]**. Quant à PAR3, son rôle est encore inconnu. Ainsi, l'étude de l'interaction entre ASP et la DC pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles voies de signalisation, probablement médiées par les PARs et aboutissant à la tolérance. Ces voies pourraient être utilisées dans le traitement de nombreuses maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn par exemple.

L'étude des mécanismes d'induction de tolérance par ASP nous a également amené à étudier la signalisation intracellulaire en amont de GILZ. En effet, dans les DEX-DCs, l'induction de GILZ est possible après liaison de la DEX à son récepteur spécifique nucléaire, le GR (cf. Fig. 22). La liaison du GC entraine la formation d'un homodimère du GR qui est transloqué dans le noyau où il va agir sur l'ADN pour activer la transcription de gènes anti-inflammatoires comme GILZ **[387]**. Après traitement par ASP, nous avons montré que GILZ est induit indépendamment du GR puisqu'un inhibiteur du GR comme le RU486 n'a pas d'effet sur l'expression génique. L'étude de cette nouvelle voie de signalisation semble très intéressante et pertinente afin de développer de nouveaux traitements anti-inflammatoires. En effet, l'action anti-inflammatoire des GCs est médiée en partie par GILZ **[387]** et la possibilité d'induire ce régulateur transcriptionnel par une voie différente de celle du GR pourrait permettre de réduire les effets secondaires importants des GCs. En effet, cette classe d'anti-inflammatoires induit de l'ostéoporose et augmente le risque de fractures chez l'adulte **[65]**. Ces effets sont dus à la liaison du GR à des éléments de réponses négatifs aux GCs qui inhibent la transcription de l'ostéocalcine (protéine de la matrice extracellulaire nécessaire à la minéralisation osseuse) dans les ostéoblastes **[65]**. Un mécanisme similaire entraine une inhibition de la synthèse de métalloproteases et de collagène, deux facteurs importants pour la cicatrisation **[65]**. De nombreux autres effets secondaires sont connus et le développement d'anti-inflammatoires plus spécifiques, permettant de diminuer les effets secondaires dus à l'activation de la transactivation de certains gènes, sont en cours de développement **[388]**. Ainsi, l'étude d'une possible voie d'induction de GILZ non médiée par le GR paraît d'un intérêt considérable pour l'élaboration de ce type de traitements.

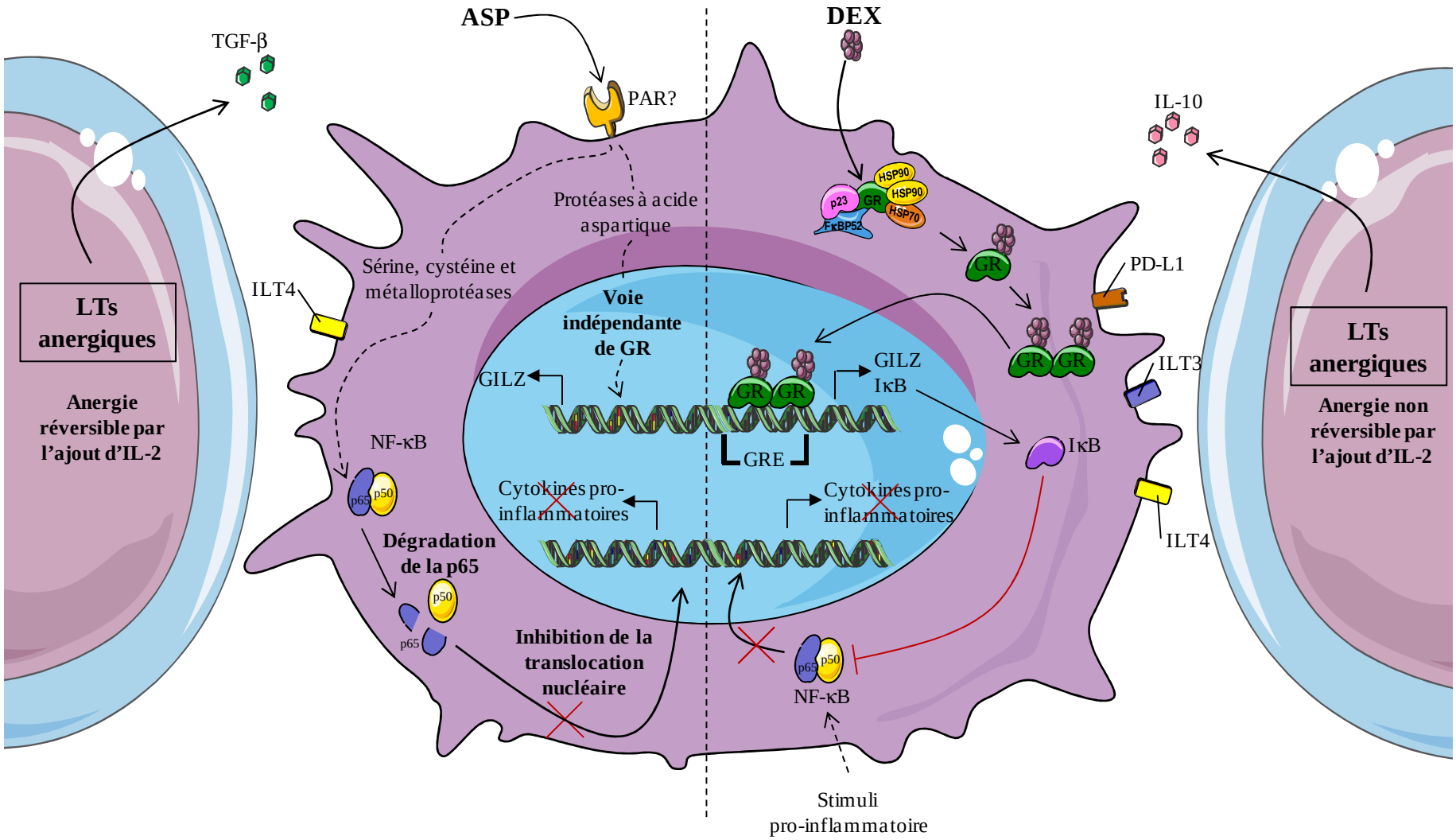


Figure 22: Mécanismes impliqués dans l'activité tolérogène des ASP-DCs.
Alors que GILZ est induit après engagement du GR dans les DEX-DCs, ce régulateur transcriptionnel semble être induit par une voie différente dans les ASP-DCs. Par ailleurs, alors que NF-κB est séquestré dans le cytoplasme (dû à l'augmentation de la synthèse d'IκB) dans les DEX-DCs, l'activité de cet important médiateur inflammatoire est inhibée dans les ASP-DCs du fait de la dégradation très précoce de la p65. Les LTs générés après coculture avec les ASP-DCs sécrètent du TGF-β et présentent une anergie réversible alors que les LTs générés après coculture avec les DEX-DCs sécrètent de l'IL-10 mais présentent une anergie non réversible.

Par ailleurs, les ASP-DCs présentent un phénotype très stable, puisque s'ils sont placés dans un environnement hautement inflammatoire (en présence de LPS par exemple), le phénotype régulateur reste inchangé. Ce phénotype de DCs est particulièrement intéressant pour des protocoles de réinfusion de DCs tolérogènes chez des patients en attente de transplantation ou atteints de maladies auto-immunes. Des études cliniques utilisant des IL-10 DCs pour augmenter la survie des greffons sont actuellement réalisées par l'équipe de M.G. Roncarolo en Italie **[170, 345]**. Une des principales limites de ces études est que les DCs reversent leur phénotype lorsqu'elles se retrouvent *in vivo* dans des conditions inflammatoires. Dans ce contexte, les ASP-DCs semblent présenter un phénotype plus stable et pourraient être testées dans ce type d'approches.

Une autre perspective importante de ce travail sur les protéases d'*Aspergillus oryzae* consisterait à étudier l'effet *in vivo* de ce mélange de protéases dans un modèle de désensibilisation allergénique chez la souris. En effet, puisque les DCs sont des intermédiaires très importants entre l'immunité innée et adaptive, il est probable que l'anergie induite par ASP sur les LTs puisse permettre au système immunitaire d'ignorer les antigènes contenus dans les pollens ou autres sources allergéniques et donc de rétablir une tolérance vis-à-vis de l'allergène. Toutefois, les composants d'ASP pourraient avoir des actions multiples sur les différents types cellulaires du système immunitaire comme les basophiles qui présentent des PARs à leur surface et qui ont été décrits comme des inducteurs importants de la réponse allergique **[389, 390]**.

Il serait également possible d'étudier, à plus grande échelle, l'impact de l'exposition aux protéases d'*Aspergillus oryzae* dans différentes populations. En effet, ce champignon est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire au Japon, notamment pour la production de produits fermentés tels que la bière, le saké ou les dérivés du soja **[391]**. Une étude épidémiologique comparative entre différentes populations permettrait de déterminer si ces molécules peuvent avoir un effet bénéfique global sur la santé de l'homme.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à définir des biomarqueurs d'efficacité des traitements d'ITA. Pour ce faire, le protéome cellulaire total de DCs effectrices ou régulatrices générées *in vitro* a été étudié. Alors que l'efficacité de l'immunothérapie est souvent reliée à son impact sur les cellules de l'immunité adaptative comme les LTs **[392]** (cf. Fig 23), nous avons supposé que celle-ci avait un effet sur d'autres types cellulaires reliés à l'immunité innée comme les DCs **[393]**. En effet, une étude a récemment permis de démontrer, par des approches de biologie des systèmes, que les PBMCs et les DCs peuvent présenter des signatures précoces, prédictives de réponses adaptatives à long terme **[394]**. En particulier, deux protéines exprimées dans les PBMCs quelques jours après la vaccination ont pu être corrélées (avec une confiance de plus de 90%) à des

réponses T $CD8^+$ dans une étude clinique. Une autre signature correspondant à un facteur de croissance semble prédire à 100% les réponses anticorps après vaccination contre la fièvre jaune **[394]**. Ce nouveau concept nous a donc permis de formuler l'hypothèse selon laquelle le succès de l'ITA pourrait être relié à une baisse systémique des DCs effectrices et à une augmentation des DCs régulatrices. Différentes études dans la littérature montrent un potentiel effet de l'immunothérapie sur les CPAs. Chez des patients atteints d'allergie au venin d'hyménoptère, l'ITSC semble agir au niveau des monocytes en induisant leur production d'IL-12 et de TNF-α, deux cytokines qui peuvent inhiber efficacement les réponses Th2 **[395]**. L'ITSC semble aussi affecter les PBMCs puisqu'une augmentation de la sécrétion d'IFN-α s'est révélée augmentée en réponse au CpG chez des patients allergiques aux acariens, impliquant indirectement les pDCs dans le succès de l'immunothérapie **[396]**. Enfin, deux études décrivent un impact direct de l'ITA sur les DCs. Le premier décrit une diminution des DCs matures au cours de l'ITSL puisque le CD86 et la production d'IL-12 sont diminués après traitement alors que la sécrétion d'IL-10 est augmentée **[144]**. La deuxième étude décrit une relation entre l'efficacité clinique et l'augmentation de CPAs exprimant PD-L1 et sécrétant de l'IL-10 **[161]**.

Notre approche de protéomique, appliquée aux modèles cellulaires de DCs effectrices et régulatrices nous a permis d'identifier plusieurs candidats biomarqueurs de la tolérance. Parmi eux, la protéine du complément C1Q et STAB1 (stabiline 1) se sont révélés augmentés au cours de l'immunothérapie spécifique. Ces deux protéines surexprimées par les DCs régulatrices obtenues par traitement *in vitro* avec différents agents pharmacologiques ont été décrites dans la littérature pour leur rôle tolérogène *in vivo*. En effet, lors de la grossesse, le système immunitaire de la mère doit tolérer les alloantigènes fœtaux codés par les gènes paternels pour permettre la survie et la croissance du fœtus, mais au même moment, son système immunitaire doit assurer une protection efficace vis-à-vis des pathogènes de l'environnement. Différents mécanismes de tolérance à l'interface fœto-maternelle ont été décrits, en particulier une accumulation locale et systémique de Tregs mais aussi une modulation des CPAs de la décidue **[300, 397]**. Ces DCs ont un phénotype macrophagique et expriment STAB1 ainsi que d'autres molécules tolérogènes comme l'IL-10, ILT2, ILT4, MRC-1, ou F13A, ces dernières étant par ailleurs identifiées dans notre étude protéomique **[398]**. De manière importante, C1Q semble également contribuer aux changements physiologiques du placenta lors des phases précoces de la grossesse **[399]**. Ce rôle est confirmé par les études montrant que les femmes déficientes en C1Q et atteintes de lupus présentent des risques plus élevés de fausse couche ou d'accouchement prématuré par rapport à la population globale **[399]**. Ainsi, les surexpressions de C1Q et de STAB1 sont connues sur des CPAs tolérogènes *in vivo* et sont retrouvées dans les PBMCs de patients ayant subis une ITA contre les pollens de graminées. Ceci laisse supposer que des DCs tolérogènes similaires à celles observées dans nos

modèles *in vitro* sont induites au cours du traitement et expriment des biomarqueurs précoces de l'immunothérapie.

Différentes études fonctionnelles doivent être réalisées afin de comprendre les mécanismes tolérogènes mis en jeu. Dans un premier temps, il paraît essentiel de suivre l'expression des marqueurs sur des populations de cellules purifiées (DCs) après immunothérapie afin de s'assurer de la spécificité de l'expression. Parallèlement, il est intéressant de répertorier les types cellulaires exprimant les marqueurs (monocytes, DCs, LBs, LTs, NKs…). Des études de surexpression ou d'inhibition de C1Q et/ou STAB1 sont également nécessaires afin de tester l'impact réel de ces molécules dans la fonction régulatrice des DCs mais aussi dans l'ITA. La surexpression de STAB1 ou C1Q pourrait permettre de déterminer si ces protéines sont nécessaires et suffisantes pour obtenir un phénotype de DCs régulatrices. Par ailleurs, l'inhibition de STAB1 ou C1Q par des siRNA permettrait de tester le rôle de ces protéines dans le phénotype tolérogène induit après traitement par la DEX *in vitro*. La capacité de ces DCs à générer des LTs suppressifs *in vitro* pourrait également être étudiée dans ce modèle. Il serait tout aussi intéressant d'évaluer l'impact de STAB1 et de C1Q *in vivo* dans des modèles de désensibilisation chez la souris. En effet, alors que le rôle des DCs dans la sensibilisation allergique a été clairement démontré **[400]**, il serait intéressant de tester l'impact de la désensibilisation chez des souris KO pour C1Q et STAB1.

Enfin, il est essentiel d'évaluer la faisabilité d'un suivi des biomarqueurs cellulaires d'intérêt lors d'études cliniques ou en routine chez des patients sous immunothérapie. STAB1 et C1Q sont des marqueurs exprimés par les DCs mais nos résultats montrent que la mesure de leur expression est possible sur une population plus hétérogène telle que les PBMCs, probablement du fait de la spécificité d'expression et du faible niveau basal d'expression sur les DCs. Cette observation permet un suivi plus simple, évitant ainsi l'étape de tri cellulaire très coûteuse et difficilement automatisable en routine. La mesure de l'expression des marqueurs peut être envisagée par plusieurs techniques : tout d'abord, la PCR quantitative est utilisable, puisqu'elle nous a permis, dans notre étude, de distinguer les patients répondeurs des non-répondeurs. L'évaluation du suivi des molécules en cytométrie de flux pourrait également être réalisée. C1Q est potentiellement exprimé à la surface des DCs, il pourrait donc être mesuré par cytométrie en extracellulaire alors que STAB1 pourrait être détecté en intracellulaire après perméabilisation des cellules. Finalement, avec l'utilisation de méthodes à haut débit, applicables aux cohortes de patients d'études cliniques, nous pourrons confirmer la validité et la pertinence des biomarqueurs décrits ici, notamment dans le cadre d'autres allergies (acariens, bouleau ou venins d'hyménoptères).

Les études protéomiques présentées ici montrent toutefois des limites et pourraient être approfondies ou étendues à d'autres modèles cellulaires. La première limite est que nous avons ici

étudié le protéome total des DCs, incluant des protéines membranaires, des protéines issues des organelles intracellulaires, des protéines nucléaires et surtout cytoplasmiques. Une étude complémentaire de fractionnement cellulaire en amont de l'analyse protéomique permettrait de se focaliser sur les protéines membranaires ou les protéines sécrétées. En effet, l'interaction entre les cellules est médiée soit par contact cellulaire soit par la sécrétion de molécules dans le milieu et le suivi de ces marqueurs peut se révéler essentiel pour définir un phénotype ou une fonctionnalité cellulaire particulière. L'étude de ces fractions pourrait donc permettre de définir de nouveaux marqueurs de DCs tolérogènes ou effectrices importants pour le suivi des patients placés sous immunothérapie.

La deuxième limite de notre étude est qu'elle a été réalisée sur les DCs qui ne représentent que 0.5 à 1% des PBMCs et qui ne sont que très rarement collectées lors des études cliniques (protocoles lourds / coûteux). Des études protéomiques à grande échelle pourraient par ailleurs être réalisées sur d'autres types cellulaires essentiels dans l'immunothérapie comme les LTs ou les LBs, beaucoup plus abondants dans le sang périphérique. Par ailleurs, des études protéomiques pourraient également être entreprises afin de comparer le statut d'individus allergiques, stratifiés selon leur historique clinique, vis-à-vis d'individus sains. De tels marqueurs permettraient de sélectionner des patients avant immunothérapie ou de mieux définir la maladie allergique. Dans cette optique, une étude a comparé des LT $CD4^+$ chez des individus sains ou allergiques pendant et en dehors de la saison pollinique **[401]**. Trois protéines permettant de distinguer les protéomes des allergiques et des patients sains en dehors de la saison pollinique ont été décrites (Talin-1, Nipsnap ou *Glutamate cystéine ligase regulatory protein*) alors que trois autres protéines ont permis de les différencier pendant la saison pollinique (Carbonyl reductase, glutathione S–transférase-w-1 et 2,4-diénoyl-CoA reductase). Les résultats sont toutefois à prendre avec précaution, puisque les expériences de validation n'ont pas toutes été concluantes et que par ailleurs, aucune donnée fonctionnelle n'était disponible.

Enfin, des études protéomiques pourraient être envisagées à partir d'autres échantillons biologiques comme les sécrétions nasales ou encore les condensats d'air exhalés **[401, 402]**. Des études sur les sécrétions nasales ont été décrites dans d'autres pathologies comme la fibrose cystique démontrant la faisabilité de l'approche, qui peut toutefois se révéler complexe du fait de l'hétérogénéité des cellules dans ces sécrétions. Une étude consistant à comparer les protéines exhalées chez des allergiques par comparaison aux sains a également été décrite. Cette étude a montré que les protéines les plus importantes dans les condensats d'air exhalé d'asthmatiques sont les cytokératines, l'albumine, l'hémoglobine, le lysozyme, la dermcidine et la calgranuline B **[402]**. Toutefois, le rôle exact de ces molécules dans le développement de la maladie ou la physiologie des voies respiratoires n'est pas connu et la présence de protéines abondantes telle que l'albumine

présume d'une faible profondeur d'analyse dans ces études. Ainsi de nombreuses études protéomiques restent à réaliser afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs du succès de l'immunothérapie ou reliés à l'efficacité clinique.

Les changements observés lors de la validation des marqueurs C1Q et STAB1 dans les PBMCs de l'étude clinique VO56 nous amènent à nous poser de nouvelles questions et à compléter le schéma des mécanismes d'action de l'immunothérapie (cf. Fig. 23).

Si on part de l'hypothèse que C1Q et STAB1 sont spécifiques des DCs présentes dans les PBMCs (ce qu'il reste à démontrer), nos expériences suggèrent que les DCs peuvent être stimulées spécifiquement par l'allergène, puisque les taux des deux marqueurs augmentent après restimulation par l'extrait 5 graminées. Les mécanismes impliqués sont complètement inconnus mais laissent supposer que des « DCs mémoires » existent dans le sang des patients traités par ITA.

Par ailleurs, la baisse des deux marqueurs chez les patients traités avec le placebo ou chez les patients non-répondeurs cliniques indique que la restimulation contrôlée du patient par l'allergène dans la chambre à pollen peut être nécessaire afin de détecter des différences entre les groupes. Cette restimulation par l'allergène a lieu naturellement chez les patients lors de la saison pollinique, mais il est important de s'interroger sur la validité de ces marqueurs hors de la saison et dans une allergie comme celle aux acariens. En effet, une des premières mesures à appliquer après l'identification d'une telle allergie est l'éviction, notamment *via* des changements de literie ou des aménagements de l'environnement intérieur du domicile. Le patient n'est alors plus exposé à l'allergène et les variations observées dans l'étude clinique peuvent s'atténuer ou disparaître.

Enfin, ce travail met en évidence une nouvelle voie permettant d'expliciter les mécanismes de l'immunothérapie allergénique par voie sublinguale. En effet, alors que les mécanismes d'induction de la tolérance impliquant les LTs ou les LBs dans le sang périphérique sont largement documentés **[24]**, un impact potentiel de l'ITA sur les DCs reste encore énigmatique. Nous pouvons formuler une hypothèse sur ce mécanisme en relation avec un ensemble de voies déjà décrites à ce jour et résumées dans la Figure 23. Lors de l'ITA par voie sublinguale, l'allergène interagit avec les cellules épithéliales de la muqueuse buccale qui vont recruter des DCs **[403]**. Ces DCs orales peuvent prendre en charge l'allergène, puis migrer en fonction de leur expression du CCR7 vers les zones lymphoïdes locales de la muqueuse (si $CCR7^-$ DCs) ou migrer vers les ganglions lymphatiques (cf. Fig. 23) **[403]**. Ces deux zones sont alors le siège d'une conversion de LTs naïfs en Tregs. Les Tregs générés dans la muqueuse sublinguale peuvent y rester puisqu'ils ont été retrouvés après immunothérapie par l'équipe de Scadding **[155]** alors que les Tregs des nœuds lymphatiques migrent dans le sang où ils auront différentes actions. Ces Tregs, inhibent les réponses Th2 ou Th17 spécifiques de l'allergène, et pourraient également interagir avec les APCs. Ainsi,

comme décrit par l'équipe de Suciu-Foca, les Tregs sont capables d'interagir avec des DCs pour les rendre tolérogènes par des mécanismes impliquant ILT3 **[283]**. Ainsi on peut supposer que les Tregs générés au site d'administration induisent de façon précoce la sécrétion de molécules anti-inflammatoires par les monocytes et induisent des DCs tolérogènes exprimant C1Q et STAB1. Ces APCs tolérogènes pourraient alors générer des Tregs capables de migrer vers les organes cibles (poumons - muqueuse nasale) pour induire la tolérance durable nécessaire au succès de l'immunothérapie (cf. Fig. 23). Cette hypothèse de la cascade suppressive décrit pour la première fois dans la transplantation ou les cancers **[285, 404]** pourrait ainsi s'appliquer à l'immunothérapie spécifique de l'allergène.

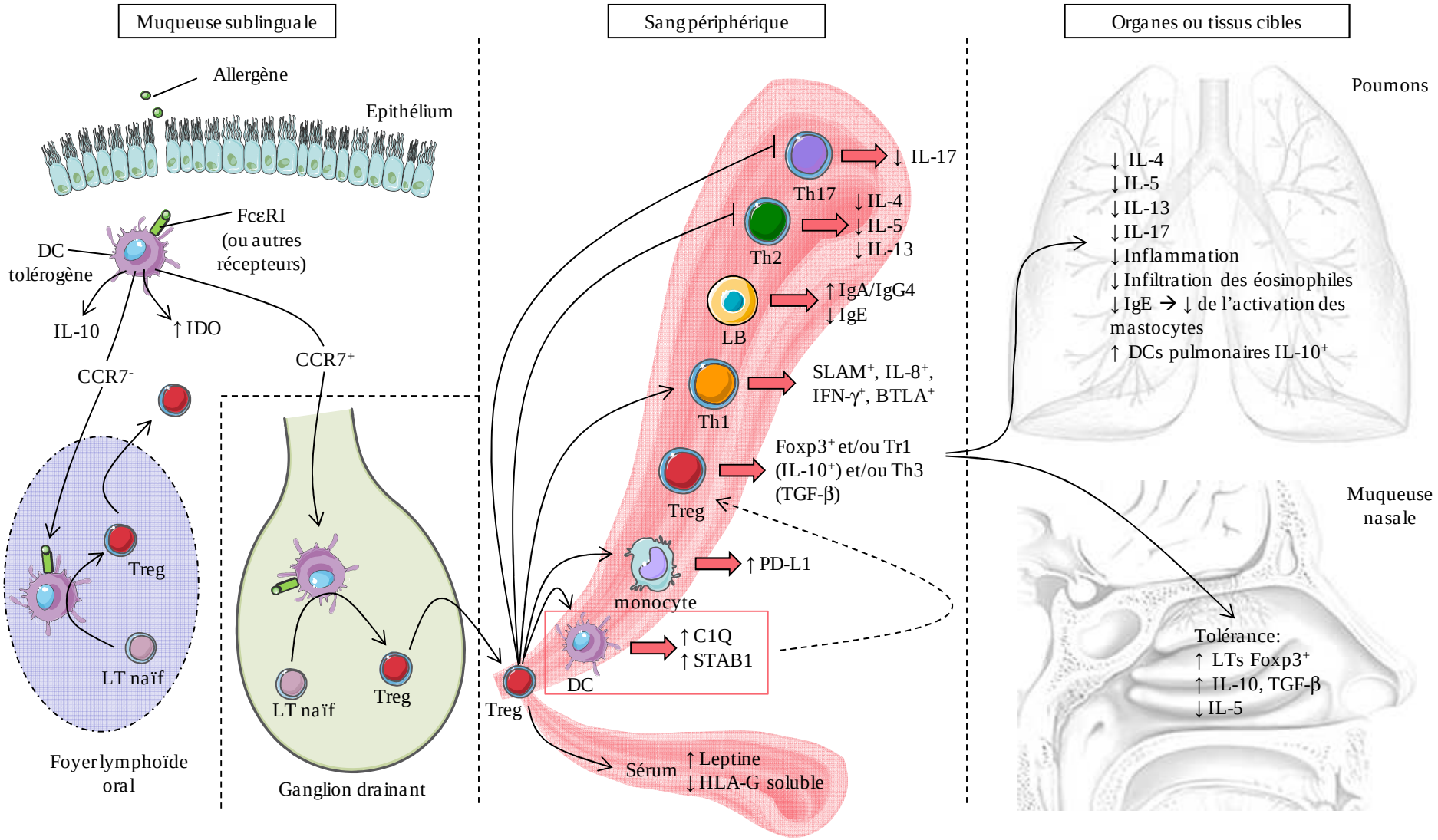


Figure 23: Mécanismes de l'ITSL établis et suggérés.
L'hypothèse présentée ici repose sur une cascade suppressive. Les DCs prennent en charge l'allergène au site d'administration et migrent vers les foyers lymphoïdes oraux et/ou vers les ganglions drainants pour induire la génération de Tregs. Les Tregs générés dans les ganglions migrent dans le sang où ils peuvent interagir avec les LTs ou les monocytes. Nous proposons ici que ces DCs tolérogènes peuvent induire des Tregs qui vont migrer vers les poumons et la muqueuse nasale pour induire de la tolérance.

CONCLUSION

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier des marqueurs associés à la tolérance dans les DCs tolérogènes ou à l'inflammation dans les DCs effectrices afin de déterminer si ces types cellulaires étaient impliqués dans le succès de l'ITA. Dans ce cas, les marqueurs identifiés pourraient être utilisés comme biomarqueurs d'efficacité du traitement.

La recherche d'inducteurs biologiques ou pharmacologiques de DCs tolérogènes ou effectrices nous a permis de mettre en évidence un nouvel inducteur de tolérance, les protéases d'*Aspergillus Oryzae*. Le traitement de moDCs avec ces protéases induit un phénotype tolérogène singulier rendant les DCs aptes à induire une réponse T anergique. Le mécanisme d'induction de tolérance semble être médiée par GILZ et par la dégradation de la p65, une des sous unités de NF-κB. Une étude plus détaillée des protéases d'ASP a permis de montrer un effet synergique entre protéases à acide aspartique qui induisent GILZ et les sérines, cystéines ou métallo-protéases nécessaires à la dégradation de la p65 et donc à l'inhibition de la voie GILZ. Afin de mieux comprendre les mécanismes de tolérance mis en jeu, différentes expériences complémentaires doivent être réalisées, à la fois sur les DCs et sur les LTs.

Les approches protéomiques de 2D-DIGE et de spectrométrie de masse « label free » ont ensuite été utilisées pour caractériser le protéome des DCs générées *in vitro*. Ces expériences nous ont permis d'identifier des marqueurs spécifiques de DCs tolérogènes ou effectrices qui ont pu être validés sur différents modèles cellulaires. En particulier, l'expression des marqueurs de tolérance a été confirmée dans différents modèles cellulaires humains de DCs tolérogènes, nous permettant de classifier les marqueurs en fonction de leur diversité d'expression.

La dernière étape a consisté à tester notre hypothèse initiale qui supposait que l'ITA induit une baisse des DCs effectrices et une augmentation des DCs régulatrices. Pour cela, nous avons utilisé les PBMCs prélevés avant et après immunothérapie dans une étude clinique de phase IIb, visant à tester un comprimé de désensibilisation aux 5 graminées par voie sublinguale sur une cohorte de 82 patients. Les résultats de cette étude confirment que certains marqueurs de DCs régulatrices sont augmentés quatre mois après le début du traitement d'immunothérapie, en particulier les protéines C1Q et STAB1. Ces deux protéines sont connues pour leur rôle actif dans l'induction de tolérance et permettent de distinguer les patients répondeurs cliniques des non-répondeurs ou encore des patients traités avec un comprimé placebo. Différentes études à grandes échelles doivent par ailleurs être réalisées afin de valider la spécificité de ces marqueurs sur les DCs ainsi que leur pertinence dans d'autres types d'allergies, en particulier aux acariens.

Toutefois, ces résultats confirment l'intérêt des approches protéomiques basées sur les modèles cellulaires dans la recherche de biomarqueurs et surtout, mettent en évidence deux nouveaux biomarqueurs d'efficacité précoce de l'immunothérapie spécifique. S'ils sont validés dans d'autres études cliniques, ils pourront être utilisés dans le suivi des patients sous immunothérapie et permettront d'adapter les schémas d'administration pour envisager une médecine plus personnalisée.

PUBLICATIONS / BREVETS / COMMUNICATIONS ORALES

3. Publications / Revues

A. Zimmer, J. Bouley, M. Le Mignon, E. Pliquet, S. Horiot, M. Turfkruyer, V. Baron-Bodo, F. Horak, E. Nony, L. Mascarell, P. Moingeon,
A regulatory dendritic cell signature predicts the clinical efficacy of allergen specific immunotherapy, en préparation

A. Zimmer, S. Luce, F. Gaignier, E. Nony, M. Naveau, A. Biola-Vidamment, M. Pallardy, L. Van Overtvelt, L. Mascarell, P. Moingeon
Identification of a new phenotype of tolerogenic Human Dendritic cells induced by fungal proteases from *Aspergillus oryzae*, **Journal of Immunology**, 2011, 186, 3966-3976

T. Batard, **A. Zimmer**, M. Turfkruyer, E. Nony, J. Bouley, S. Luce, S. Tourdot, Laurent Mascarell, Philippe Moingeon
Evaluation of the anti-inflammatory potential of sublingual immunoglublin (SLIG) in a murine model of allergic asthma, soumis à **Vaccine**

L. Mascarell, V. Lombardi, **A. Zimmer**, A. Louise, S. Tourdot, L. Van Overtvelt, P. Moingeon
Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector $CD4^+$ T cells, **Clinical and Experimental Allergy**, 2009, 39, 1910-1919

L. Mascarell, N. Saint-Lu, H. Moussu, **A. Zimmer**, A. Louise, Y. Lone , D. Ladant, C. Leclerc, S. Tourdot, L. Van Overtvelt, P. Moingeon.
Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice, 2011, **Mucosal Immunology**, sous presse

L. Mascarell, **A. Zimmer**, L. Van Overtvelt, S. Tourdot, P. Moingeon
Induction of allergen-specific Tolerance via mucosal routes, **Current topics in microbiology and immunology**, sous presse

P. Moingeon, **A. Zimmer**, L. Van Overtvelt, S. Tourdot, L. Mascarell
Immunité buccale et allergie, **Revue française d'allergologie**, 2010, 50, 274-276

P. Moingeon, **A. Zimmer**, V. Baron-Bodo, L. Van Overtvelt, L. Mascarell
L'immunothérapie spécifique agit-elle sur l'immunité innée ?, **Revue française d'allergologie**, 2010, 50, 207-210

4. Brevets

A. Zimmer, J. Bouley, V. Baron-Bodo, E. Nony, L. Mascarell, P. Moingeon, A regulatory dendritic cell signature predicts the clinical efficacy of allergen specific immunotherapy, en préparation

T. Batard, P. Moingeon, L. Mascarell, **A.Zimmer**, E. Nony
Utilisation d'imunoglobulines IgG1 et /ou de ligands du récepteur CD32 pour le traitement de maladies et manifestations inflammatoires par voie mucosale, Brevet WO 2010/128265. Déposé le 7 mai 2010, priorité le 7 mai 2009, Publié le 11 novembre 2010

5. Communications orales

A. Zimmer
Characterization of a new phenotype of tolerogenic dendritic cells induced by fungal proteases from *Aspergillus oryzae*
Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 13 juin 2011, Istanbul, Turquie

A. Zimmer
Caractérisation immunologique et protéomique des cellules dendritiques tolérogènes humaines. Application à la recherche de biomarqueurs dans l'allergie
Journées de l'école doctorale 425, Innovation thérapeutique, 23 mai 2011, Chatenay Malabry, France

A. Zimmer
Characterization of a new phenotype of tolerogenic dendritic cells induced by fungal proteases from *Aspergillus oryzae*
World international regulatory meeting, 25 mars 2011, Davos, Suisse

ANNEXES

Evaluation of the anti-inflammatory potential of sublingual immunoglublin (SLIG) in a murine model of allergic asthma

T. Batard, **A. Zimmer**, M. Turfkruyer, E. Nony, J. Bouley, S. Luce, S. Tourdot, Laurent Mascarell, Philippe Moingeon

Soumis à Vaccine

Evaluation of the anti-inflammatory potential of sublingual immunoglublin (SLIG) in a murine model of allergic asthma

T. Batard*, A. Zimmer, E. Nony, J. Bouley, S. Luce, M. Turfkruyer, S. Tourdot, L. Mascarell, P. Moingeon

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 55 59 21 17; fax: +33 (0)1 55 59 21 02

Stallergenes, 6 rue Alexis de Tocqueville, 92160 Antony, FRANCE

Abstract

Aim: Subcutaneous administration of anti-IgE in humans provides benefit in severe persistent uncontrolled allergic asthma. On this basis, and given the well established efficacy of sublingual allergenic immunotherapy in respiratory type I allergies, we investigated the therapeutic potential of sublingual immunoglobulin (SLIG), especially SLIG with a specificity for IgE, in a murine model of allergic asthma.
Methods: BALB/c mice sensitized with ovalbumin (OVA) were treated sublingually with rat monoclonal IgG1 or IgG2a, either specific for mouse IgE or with no reported specificity (control isotypes), as compared to PBS (negative control) and particulate OVA (positive control). After treatment, we assessed airway hyperresponsiveness (AHR) by whole body plethysmography and cellular infiltrates in bronchial alveolar lavage (BAL).
Results: AHR and BAL eosinophil infiltrates were substantially decreased in mice treated with particulate OVA as well as in animals treated with the various rat IgG1, irrespective of their specificity for murine IgE. In contrast, no improvement was observed in mice treated with PBS or the various rat IgG2a. An analysis conducted by mass spectrometry indicated that the differential efficacy between rat IgG1 and IgG2a observed in this model was not related to the presence of a specific glycan moiety, such as sialic acid, which might have influenced the capacity of those immunoglobulins to interact with lectins borne by oral immune cells.
Conclusions: In a murine model of allergic asthma, SLIG induces tolerance independently of the immunoglobulin specificity and in the absence of allergen. More generally, the anti-inflammatory potential of SLIG could be applied to the treatment of asthma and other inflammatory diseases.

Keywords: Allergy, asthma, inflammation, sublingual immunoglobulin, tolerance, treatment.

1. Introduction

Type I allergy is an inflammatory disease whose prevalence is increasing worldwide. When allergen avoidance is not possible, allergy can be improved by symptomatic drugs, such as anti-histamines and glucocorticosteroids, or by etiologic treatments, meant to impact the disease itself [1]. The only etiologic treatment available today is allergen-specific immunotherapy for moderate to severe allergic rhinitis [1-2]. In addition, anti-IgE are used to treat severe persistent uncontrolled allergic asthma [3]. The latter approach is allergen-nonspecific and consists in subcutaneous injections of high doses of a non-anaphylactogenic humanized IgG1 directed to human IgE [3]. Once injected, this anti-IgE monoclonal antibody induces a dramatic decrease of circulating free IgE and down-regulates FcεRI expression on basophils [4]. Yet, the exact mechanisms by which anti-IgE exerts its beneficial effects remain to be further understood. In a mouse model of anaphylaxis, a rat IgG1 directed to mouse IgE as well as a rat IgG1 with unrelated specificity displayed beneficial effects when administered subcutaneously. Those effects were mediated by a signal delivered through the inhibitory IgG receptor, namely FcγRIIB (CD32B), as they were abrogated in CD32B knock-out mice. Accordingly, the beneficial effects of the IgG1 specific to mouse IgE was totally borne by its Fc portion, as compared to the Fab portion [5]. In this respect, it is worth noting that intravenous immunoglobulin (IVIG) might provide benefit in human steroid-dependent asthma [19].

In the context of a growing interest in the sublingual treatment of allergic inflammation, we investigated whether immunoglobulin could mediate an anti-inflammatory activity when used via the sublingual route. To this aim, we used a mouse model of ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma to study the effect of rat IgG1 or IgG2a administered sublingually (SLIG), using immunoglobulins either directed either towards mouse IgE or with no reported specificity. Unexpectedly, rodent monoclonal antibodies tested reduced all signs associated with allergic asthma, provided they were of the IgG1 isotype, but independently of their specificity.

2. Materials and methods

2.1. Mice, reagents and antibodies

Six- to eight-weeks-old BALB/c female mice were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). Animal handling was performed by trained personnel and international standards for the care and use of animals were applied. Phosphate-buffer saline (PBS) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Ovalbumin (OVA) grade V with low endotoxin content was purchased from Sigma (St. Louis, MO) and was further purified on an endotoxin removing gel (Pierce, Rockford, IL). Residual endotoxin concentrations determined by Endochrome-K assay (R1708K, Charles River, Wilmington, MA) were always less than 0.1 EU/µg protein. A polymerized form of maize maltodextrin (polysaccharidic formulated core or PSC) was used as a mucoadhesive particulate antigen delivery system [6-7]. PSC-OVA was prepared as described elsewhere [7]. The various rat monoclonal antibodies tested in the present study are as follow: two IgG1/κ to mouse IgE, one of clone R35-92 (which induces IgE bridging) and one of clone R35-72 (which induces no IgE bridging), both purchased from BD Biosciences (San Jose, CA); an IgG2a/κ to mouse IgE, of clone LO-ME-2 (which induces IgE bridging), purchased from Invitrogen (San Diego, CA); IgG1/κ and IgG2a/κ control isotypes, from eBioscience (San Diego, CA). All antibodies were dialysed against 10 volumes of PBS using 30 kDa membranes (Amicon Ultra-4, Millipore Corp., Molsheim, France). Desalted samples were further filtered (Millex 0.22 µm, Millipore corp.) to prevent bacterial growth in absence of sodium azide. Protein concentrations were determined at 280 nm by using a spectrophotometer (Secomam XL, Uvikon, Ales, France) before and after filtration.

2.2. Sublingual immunotherapy in BALB/c mice

For sensitization, female BALB/c mice were first injected intraperitoneally on days 0 and 14 with 10 µg OVA adsorbed on 2 mg $Al(OH)_3$ in 100 µl PBS. From day 21, a 20-min aerosol challenge was performed with 1% (m/v) OVA on 4 consecutive days using an aerosol delivery system (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK). For tolerance induction, antibodies (10 or 25 µg per dose, in 50 µl of PBS) were applied sublingually to groups of eight mice twice a week during 2 months. As a negative control of efficacy, mice were sublingually treated with PBS. Since PSC-OVA has demonstrated its efficacy in this mice model of OVA-induced allergic asthma [7], mice treated sublingually with 500 µg PSC-OVA were used for positive contol.

Measurements of airway hyperresponsiveness (AHR) were performed by whole body plethysmography (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK) and results were expressed as enhanced pause (Penh). The Penh index, expressed as an increase relative to the baseline airway resistance, was obtained by dividing the Penh value measured after exposure to increased inhaled

metacholine (from 0 to 100 mg) with the one measured after inhalation of nebulised PBS, as previously described [7].

For analysis of inflammatory cells in broncho-alveolar lavages (BAL), mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg body weight), and BAL performed with 3 x 400 µl PBS. BAL fluids were centrifuged at 800 *g* for 10 min at 4°C. Cell pellets were resuspended in PBS, spun onto glass slides by cytocentrifugation, fixed and stained with May-Grünwald Giemsa (Réactifs RAL, Martillac, France). Eosinophils and macrophages were counted under light microscopy using a 200-fold magnification.

2.3. Antibody responses

Blood samples were collected at the retroorbital sinus in order to assess OVA-specific antibody levels by ELISA. Sera were collected after centrifugation at 10 000 rpmfor 10 min. For detection of OVA-specific IgG1 and IgG2a antibodies, purified OVA (0.2 µg) was coated overnight at 4°C onto ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark). After washing and blocking steps, mouse sera dilutions (1/100 to 1/12800 for IgG1 and 1/20 to 1/12560 for IgG2a) were incubated for 1 hour at 37°C. Plates were washed and biotinylated-rat anti-mouse IgG1 (dilution 1/100, BD Pharmingen, San Jose, CA) or anti-mouse IgG2a antibodies (dilution 1/200, BD Pharmingen) were added for 1 hour at 37°C. Peroxidase-conjugated streptavidin (dilution 1/400, BD Pharmigen) was used for detection, using orthophenylenediamine as a substrate (Sigma Chemicals Aldrich). The reaction was stopped with 3 N HCl and optical densities determined at 492 nm using an ELISA plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

For determination of OVA-specific IgE titers, goat antibodies to mouse IgE antibodies (1 µg/well, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas) were coated onto ELISA plates. After washing and blocking steps, mouse sera dilutions (1/10 to 1/320) were incubated for 1 hour at 37°C. OVA-digoxigenin was incubated (at a 1/100 dilution) for 1 hour at 37°C and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-digoxigenin Fab antibody fragments (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) were used at a 1/1000 dilution for detection in combination with 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) substrate (Roche). Optical densities were measured at 405 nm using an ELISA plate reader. Antibody titers were defined as the reverse of the last dilution for which the optical density value was two-fold over background.

To determine allergen-specific antibody levels at mucosal surfaces, saliva samples were collected to perform determination of OVA-specific IgA levels by ELISA. Briefly, microplates were coated with a goat anti-mouse IgA (0.1 µg/well, Bethyl Laboratories), washed, and supernatant dilutions (1/10 to 1/320) were incubated for 1 hour at 37°C, followed by OVA-digoxigenin (dilution 1/100). Plates were washed and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-digoxigenin (Roche) was used for detection, as described above.

2.4. Th immune responses

To assess T cell responses, spleen and cervical lymph nodes (CLNs) were removed and processed to obtain a single cell suspension. Lung and CLN cells were plated at 10^6 cells per well and stimulated with OVA (100 µg/ml) or medium alone. After 72 hours at 37°C in 5% CO_2 / 95% air, IL10, IL13, IL17A and IFNγ were measured in culture supernatants using a Cytometric Bead Array (CBA) Flex kit (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.5. Immunohistology studies of lingual tissues from naïve and OVA-sensitized BALB/c mice

For immunohistology, spleen and lingual tissues were recovered from naïve mice and frozen at -80°C. Tissue sections (4-6 µm wide) were serially cut, air-dried for at least 30 min, fixed in acetone for 1-2 min, and incubated for 10 min in 3% hydrogen peroxide (Sigma) to block endogenous peroxidase activity. After washing in Tris buffered saline (TBS: 0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4), primary antibodies, namely anti-CD16/32 (clone 2.4G2, BD Biosciences) or anti-SIGN-R1 (clone ER-TRP9, Abcam) diluted 1/100 in TBS were added onto samples and incubated for 1 hour at room temperature. Tissue sections were washed in TBS and incubated with biotinylated rabbit anti-goat IgG secondary antibodies (Sigma, 1/400) for 30 min before adding streptavidin-biotin horseradish peroxidase (Sigma). After 30 min, samples were washed and specific staining was visualized using diaminobenzidine (Sigma) as a substrate. Tissue sections processed in the absence of primary antibody were included as negative controls.

2.6. Mass spectrometry analyses of antibody N*-glycosylation*

For *N*-glycosylation analyses, rat monoclonal antibodies administered sublingually were denatured (6 M urea, room temperature, 5 min) and reduced (75 mM dithiothreitol, 50°C, 15 min) before analysis using electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) after liquid chromatography (LC). The analysis of reduced heavy chains by ESIMS was carried out after chromatographic separation from the light chains. Rat antibodies were also subjected to LC-ESIMS following deglycosylation (PNGase F treatment, Glycoprofile II, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) or enzymatic removal of sialic acid (sialidase Au, QA Bio, , Abingdon, UK) according to manufacturers' instructions. Briefly, around 2 µg of reduced antibody were injected on an Acquity C_4, 10 cm x 2.1 mm, 1.7 µm column (BEH300, Waters) thermostated at 80°C and connected to a reversed-phase high performance liquid chromatography (RS-HPLC) system (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). A CH_3CN (with 0.1% v/v formic acid) gradient was performed with a 400 $\mu l.min^{-1}$ flow rate to ensure proper detection at 210 nm. A Qq-TOF (Maxis, Bruker, Wissembourg, France) mass spectrometer was connected to the RS-HPLC for accurate mass measurement and operated in positive ionisation mode. Mass spectra deconvolution was performed using MaxEnt algorithm (Waters corp., Saint-Quentin-en-Yveline, France) using the following parameters: 45,000-55,000 Da, data point spacing auto, resolution 40,000. Masses of intact, desialylated and deglycosylated heavy chains were compared in order to determine glycosylation patterns.

2.7. Statistical analysis

Statistical differences between groups were assessed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis). Results were considered statistically significant for a p-value below 0.05. Statistical and graphical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad, La Jolla, CA).

3. Results

3.1. Effect of sublingual administration of rodent IgG1 and IgG2a antibodies on lung inflammation in OVA-sensitized mice (Fig. 1A and B)

Mice sensitized with OVA and administered sublingually with PBS as a negative control clearly display airways hyperresponsiveness (AHR), as indicated by the elevated Penh values in response to metacholine and lung eosinophil infiltrates in comparison to healthy mice. OVA-sensitized mice treated sublingually with PSC-OVA as a positive control displayed low PenH values and low lung eosinophil infiltrates, in agreement with our previous studies [7].

Sublingual treatment with rat IgG2a/κ, either specific for IgE or with no reported specificity (control isotype), had no impact on AHR. In contrast, sublingual treatment with the various rat IgG1/κ antibodies induced a reduction of AHR in most animals when compared with mice treated with PBS. This beneficial effect was observed for the two doses tested (10 and 25 µg). Surprisingly, this effect was not only observed with rat IgG1 specific for mouse IgE (whether they be able to induce IgE cross-linking or not), but also with a rat IgG1 with no reported specificity (control isotype), the decrease in eosinophil counts in BAL being significant (Fig. 1B; $p < 0.05$).

3.2. Effect of sublingual administration of rodent IgG1 and IgG2a on OVA-specific serum IgG1, IgG2a, IgE and salivary IgA responses in OVA-sensitized mice (Fig. 2)

No noticeable changes in OVA-specific antibody responses were observed in most treated groups of mice. As an exception, OVA-sensitized mice treated with 10 µg of rat IgG2a specific for mouse IgE exhibited increased levels of anti-OVA IgG1 when compared to mice administered with PBS. This increase was probably not relevant as it was not observed in those mice administered with the same rat IgG2a at the higher dose of 25 µg. As previously observed in lung mucosa [7], OVA-sensitized mice treated with PSC-OVA displayed increased levels of OVA-specific IgA in saliva, which might be involved in the efficacy of this treatment.

3.3. Assessment of cellular immune responses

We investigated immunological changes associated with symptomatic improvement in our therapeutic model of sublingual treatment of allergic asthma. As a control, PSC-OVA decreased Th2 cytokine production (i.e. IL13 and IL10) both in lungs and CLNs, as compared to mice administered with PBS (Fig. 3 and 4). A decrease in the production of Th2 cytokines (i.e. IL13 and IL10) was observed in lungs but not in CLNs after administration of all tested rodent immunoglobulins, except the rat IgG1 anti-IgE of clone R35-72 when tested at 10 µg/ml (Figure 3 and 4). Strikingly, this IgG1 clone induced a strong increase in IL10, IL13, IL17A and IFNγ production in CLNs (Fig. 4).

3.4. Expression of CD16/CD32 and SIGN-R1 receptors in lingual tissues from naïve and OVA-sensitized BALB/c mice

We subsequently analyzed lingual tissues in naïve and OVA-sensitized BALB/c mice by immunohistology, using specific antibodies to CD16/CD32 and SIGN-R1, as described in

materials and methods. In naïve as well as in OVA-sensitized mice, CD16/CD32 were detected at the mucosal/submucosal interface of both ventral and dorsal tissue sites of the tongue, but also in the subepithelial area (Fig. 5, upper panels). In contrast, SIGN-R1 was only detected in the subepithelial tissues, that is, remote from the site of sublingual administration, no matter whether mice were naïve or OVA-sensitized (Fig. 5 lower panels).

3.5. Fc N-*glycosylation analyses of administered rodent IgG1 and IgG2a*

We further compared the oligosaccharide structures of the different rodent IgG tested in OVA-sensitized mice by using LC-ESIMS, both prior and after enzymatic digestions (i.e. deglycosylation and sialic acid removal). Figure 6 (panel B) illustrates the structural heterogeneity of heavy chain glycoforms from rat monoclonal antibody R35-92, with the successive addition of different monosaccharides to the *N*-linked oligosacharide. The mass spectrum of deglycosylated R35-92 (Fig. 6, panel A) shows the mass (49075 Da) of the heavy chain polypeptide wheras the mass spectrum of native heavy chain (Fig. 6, panel B) shows a mass increment of 1298 Da, consistent with the addition of a biantennary, non sialylated, non-galactosylated, non-fucosylated structure (observed mass 50373 Da). Core-fucosylated, galactosylated and sialylated biantennary glycans were also evidenced. Sialidase treatment confirmed the presence of both mono- and bisialylated fucosylated biantennary, structures (data not shown). Similar experiments were performed for all tested monoclonal antibodies (data not shown). Results are summarised in table 1.

According to RS-HPLC followed by on-line high resolution, high accuracy ESIMS analysis, all tested rat monoclonal antibodies showed *N*-glycosylated heavy chains. Regular oligosaccharide structures were observed, the majority of which were biantennary and non-galactosylated *N*-glycans. Yet, tested antibodies exhibited some differences in their glycosylation. For instance, IgG1 from clone R35-92 displayed significant sialylation (~30%), as opposed to the other tested immunoglobulins. Moreover, all antibodies except the IgG1 control isotype displayed partial or total fucosylation except the IgG1 control isotype (table 1).

4. Discussion

According to the literature, immunoglublins may display an anti-inflammatory activity which seems independent of any antigen specificity. For instance, clinical studies indicate that IVIG might provide benefit in steroid-dependent asthma [19]. Also, a monoclonal IgG1 with no reported specificy was able to prevent allergen-dependent anaphylaxis in mice, when administered subcutaneously [5]. Yet, no data suggested that sublingual administration of immunoglobulin, whether it be of a known specificity or not, may display an anti-inflammatory activity. In the present study, we investigated the therapeutic potential of sublingual immunoglubulin (SLIG), especially SLIG with a specificity for IgE, in a murine model of allergic asthma.

To this aim, rodent immunoglobulins of two different isotypes, namely IgG1 and IgG2a, were administered sublingually to BALB/c mice previously sensitized to ovalbumin. Such animals were confirmed to have developed allergic asthma, as they showed lung inflammation in association with OVA-specific Th2 responses. The measurement of airway hyperresponsiveness (using the PenH score) and lung inflammation (through cell type characterization) in comparison with control mice established that the immunoglobulins tested reduced all signs associated with

allergic asthma, provided they were of the IgG1 isotype. Indeed, none of the IgG2a tested induced beneficial effects (Fig. 1). It is worth noting that the beneficial effects of IgG1 were observed whether they be specific for mouse IgE or with no reported specificy, indicating that the efficacy of IgG1 was most likely borne by their Fc portions. This strongly suggests that antigen-nonspecific immune mechanisms were involved in the anti-inflammatory potential of IgG1 in this model.

Ravetch *et al.* have thoroughly studied the anti-inflammatory activity of intravenous immunoglobulin (IVIG) in autoimmune diseases. According to a murine model of rheumatoid arthritis, this activity could be attributed to a small fraction of IVIG, consisting of IgG whose Fc-linked *N*-glycans are sialylated through an α2,6 sialic acid-galactose linkage. Indeed, IVIG-derived samples enriched in sialylated IgG or (at least α2,6) sialylated IgG Fc, as well as a recombinant IgG1 Fc fragment with an α2,6 sialylation, displayed an increased therapeutic activity when compared with whole IVIG. In contrast, fully desialylated IVIG or IgG Fc (but not IVIG with only α2,3 desialylation), as well as an IVIG-derived fraction specifically enriched in solely α2,3 sialylated IgG Fc, proved inefficient [8-9]. In the same model of murine rheumatoid arthritis, the receptor involved in the beneficial activities of α2,6 sialylated IgG1 Fc was identified with SIGN-R1 expressed by macrophages of the splenic marginal zone. The authors postulated that binding occurring between SIGN-R1 and α2,6 sialylated IgG1 Fc is critical for the secretion of an anti-inflammatory soluble factor by SIGN-R1-expressing macrophages, thus called "regulatory" macrophages. The secreted soluble factor would then induce increased expression of the inhibitory receptor CD32B by effector macrophages, thereby altering the inflammatory state [10]. This proposed mechanism is in accordance with the observation that mice deficient in the macrophage growth/differentiation factor CSF-1 or mice lacking CD32B fail to respond to IVIG treatment [11-13].

Although not administered through the same route and not tested in the same murine model of inflammation, the rat IgG1 antibodies we have tested might exert their anti-inflammatory activities through the same mechanism. However, analysis of the glycosylation patterns revealed that sialylation was absent in two of the IgG1 that displayed anti-inflammatory activities (Table 1), establishing that sialylation is not required for those activities. Fucosylation does not play an important role either, as one of the IgG1 with anti-inflammatory activities exhibited no fucosylation (Table 1). This is not surprising since fucosylation has been reported to impact antibody-dependant cytotoxycity [14-18], but not anti-inflammatory activities. According to the immunohistologic analysis of lingual tissues from both naïve and ovalbumin-sensitized mice, SIGN-R1 was only detected in subepithelial tissues, that is, at a distance from the sublingual mucosa. Altogether, we conclude that mechanisms supporting SLIG-induced tolerance are distinct from the ones reported by Ravetch *et al.* for IVIG.

Lingual tissues of both naïve and ovalbumin-sensitized mice were also analysed for the presence of classical immunoglobulin receptors. Importantly, those receptors were detected at the mucosal/submucosal interface of the tongue as well as in subepithelial tissues. Due to the lack of specific reagents, we could not determine whether detected receptors were the activating CD16 (FcγRIII) or the inhibitory receptor CD32B. Yet, in reference to the mechanism reported by Ravetch *et al.,* and according to aforementioned study of Kang *et al.* [5], it is possible that SLIG acts through a direct interaction with the inhibitory receptor CD32B (FcγRIIB). This direct mechanism would imply that, in the sublingual mucosa, the balance between activating and inhibitory receptors is in favour of the latter. In this respect, a preliminary immunohistology analysis of human gengiva, suggests that the balance between the activating receptor CD16 and

the CD32 receptors is strongly in favor of the latter (data not shown), and we hypothesize that they include mostly the inhibitory subtype, namely CD32B. Noteworthily, Ig-mediated oral tolerance has been described in mice by Verhasselt *et al.* [20]. This form of oral tolerance is conveyed to neonates by breast-milk and involves the neonatal Fc receptor (FcRn), but not CD23B, as shown with FcRn- and CD32B-deficient mice. It is mediated by immune complexes, while the anti-inflammatory effects of SLIG presently described clearly does not depent on the presence of antigen.

In conclusion, we demonstrated for the first time that sublingual administration of immunoglobulin can reduce allergic inflammation. This activity is restricted to immunoglobulins with specific isotype such as IgG1, as opposed to IgG2a, and does not depend on any antigen-specificity. Both sialylation and fucosylation do not play a critical role in the anti-inflammatory activity of SLIG, which is possibly mediated by CD32B. As CD32 receptors appear to be more abundant than CD16 in the human buccal mucosa (our unpublished observations), SLIG could be applied in human. Since the anti-inflammatory activities of SLIG is independent of the allergen in a model of allergic asthma, SLIG could be applied to inflammatory diseases other than allergic disorders, such as nonallergic asthma and autoimmune diseases.

References

[1] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). Allergy 2008;63 Suppl 86:8-160.

[2] Canonica GW, Bousquet J, Casale T, Lockey RF, Baena-Cagnani CE, Pawankar R, et al. Sub-lingual Immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009. Allergy 2009;64 Suppl 91:1-59.

[3] D'Amato G, Salzillo A, Piccolo A, D'Amato M, Liccardi G. A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy for severe allergic (IgE-mediated) asthma. Ther Clin Risk Manag 2007;3:613–19.

[4] MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, et al. Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-lgE antibody. J Immunol 1997;158:1438-45.

[5] Kang NI, Jin ZW, Lee HK. Anti-IgE mAb suppresses systemic anaphylaxis through the inhibitory IgG receptor FcγRIIb in mice: Interaction between anti-IgE and FcγRIIb. Immune Network 2007;7:141-8.

[6] Baudner BC, Balland O, Giuliani MM, Von Hoegen P, Rappuoli R, Betbeder D, et al. Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. Infect Immun 2002;70:4785-90.

[7] Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, Berjont N, Bardon T, Betbeder D, et al. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol 2007;120:278-85.

[8] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 2006;313:670-3.

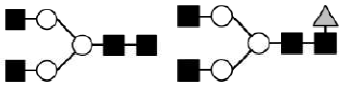
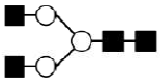
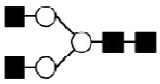
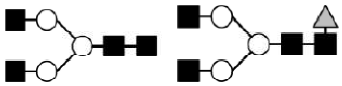
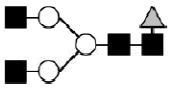
[9] Anthony RM, Nimmerjahn F, Asshline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with arecombinant IgG Fc. Science 2008;320:373-6.

[10] Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MC, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:19571-8.

[11] Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. Science 2001;291:484–6.
[12] Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, Ravetch JV. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. Immunity 2003;18:573–81.
[13] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Madaio MP, Ravetch JV. Pathology and protection in nephrotoxic nephritis is determined by selective engagement of specific Fc receptors. J Exp Med 2006;203:789–97.
[14] Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. J Biol Chem 2002;277:26733-40.
[15] Peipp M, Lammerts van Bueren JJ, Schneider-Merck T, Bleeker WW, Dechant M, Beyer T, et al. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. Blood 2008;112:2390-9.
[16] Sibéril S, de Romeuf C, Bihoreau N, Fernandez N, Meterreau JL, Regenman A, et al. Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: Impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory FcγR functions. Clin Immunol 2006;118:170-9.
[17] Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem 2003;278:3466– 73.
[18] Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 *N*-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. J Biol Chem 2002;277:26733– 40.
[19] Orange JS, Hossny EM, Weiler CR, Ballow M, Berger M, Bonilla FA, et al. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. J Allergy Clin Immunol 2006;117:S525-53.
[20] Mosconi E, Rekima A, Seitz-Polski B, Kanda A, Fleury S, Tissandie E, et al. Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. Mucosal Immunol 2010;3:461-74.

Tables and figures

Table 1

Antibody clone	Isotype	Anti-inflam-matory ativity	Sialylation	Fucosylation	Main glycoform(s)
R35-92	IgG1, κ	Yes	30%	50%	
R35-72	IgG1, κ	Yes	ND*	40%	
Control isotype	IgG1, κ	Yes	ND	ND	
LO-ME-2	IgG2a, κ	No	ND	50%	
Control isotype	IgG2a, κ	No	ND	100%	

[a] Sialylation and fucosylation were estimated by LC-ESIMS on the basis of total ionic current of each glycoform. Legend: (△) fucose, (■) *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), (○) mannose. ND: not detected. Complete annotation can be found at the CFG web site: http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf.

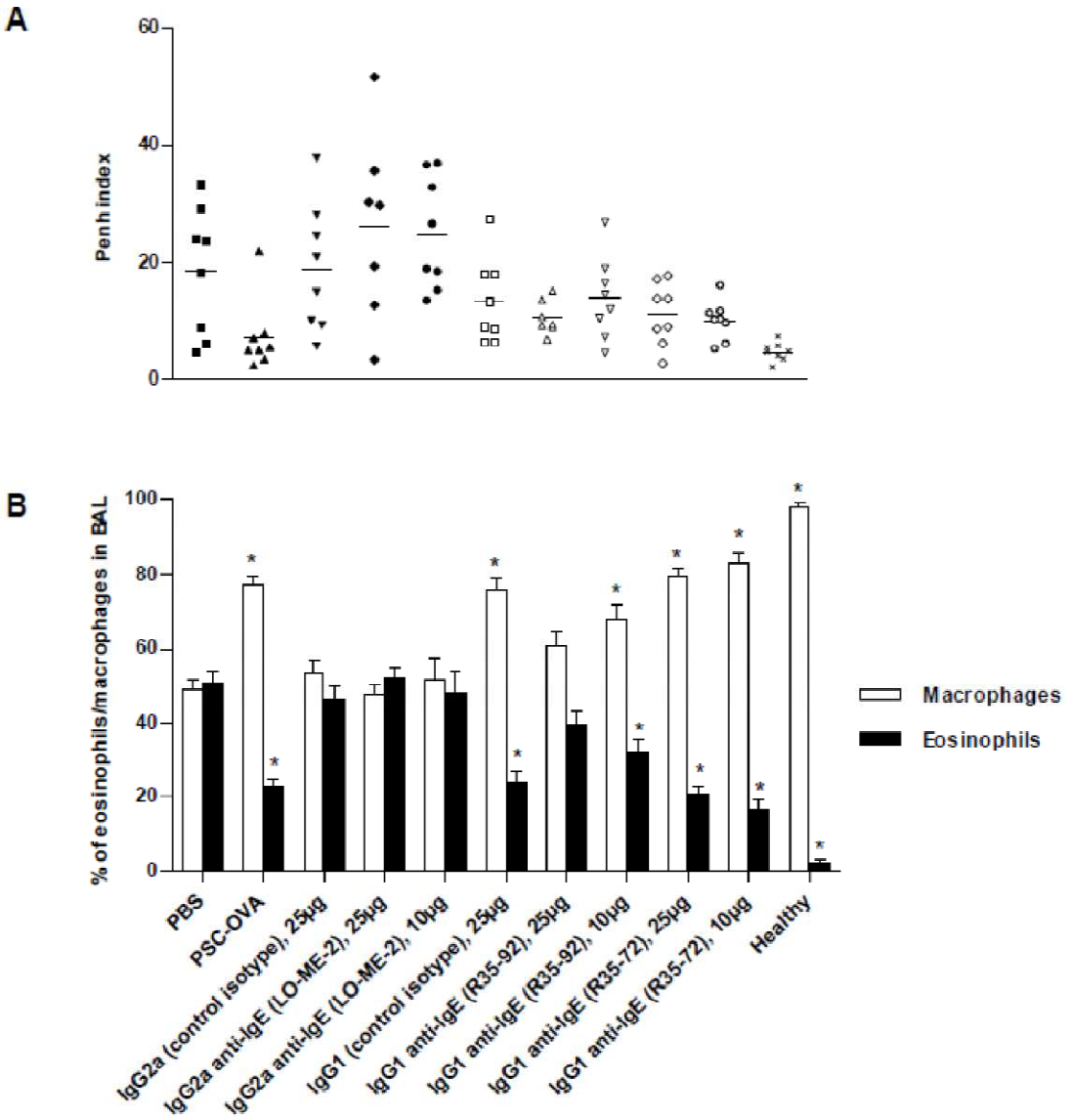

A
Penh index
60
40
20
0
B
% of eosinophils/macrophages in BAL
100
80
60
40
20
0
Macrophages
Eosinophils
PBS
PSC-OVA
IgG2a (control isotype), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 10µg
IgG1 (control isotype), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 10µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 10µg
Healthy

Fig. 1

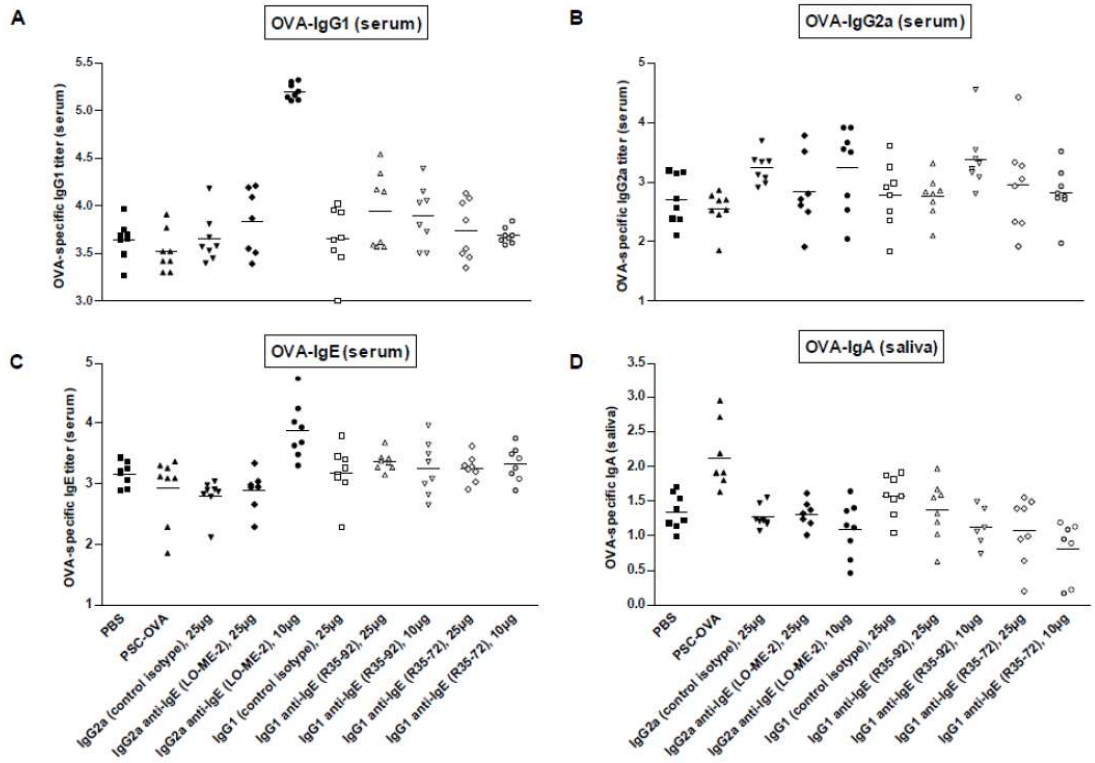

A
OVA-IgG1 (serum)
OVA-specific IgG1 titer (serum)
B
OVA-IgG2a (serum)
OVA-specific IgG2a titer (serum)
C
OVA-IgE (serum)
OVA-specific IgE titer (serum)
D
OVA-IgA (saliva)
OVA-specific IgA (saliva)
PBS
PSC-OVA
IgG2a (control isotype), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 10µg
IgG1 (control isotype), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 10µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 10µg

Fig. 2

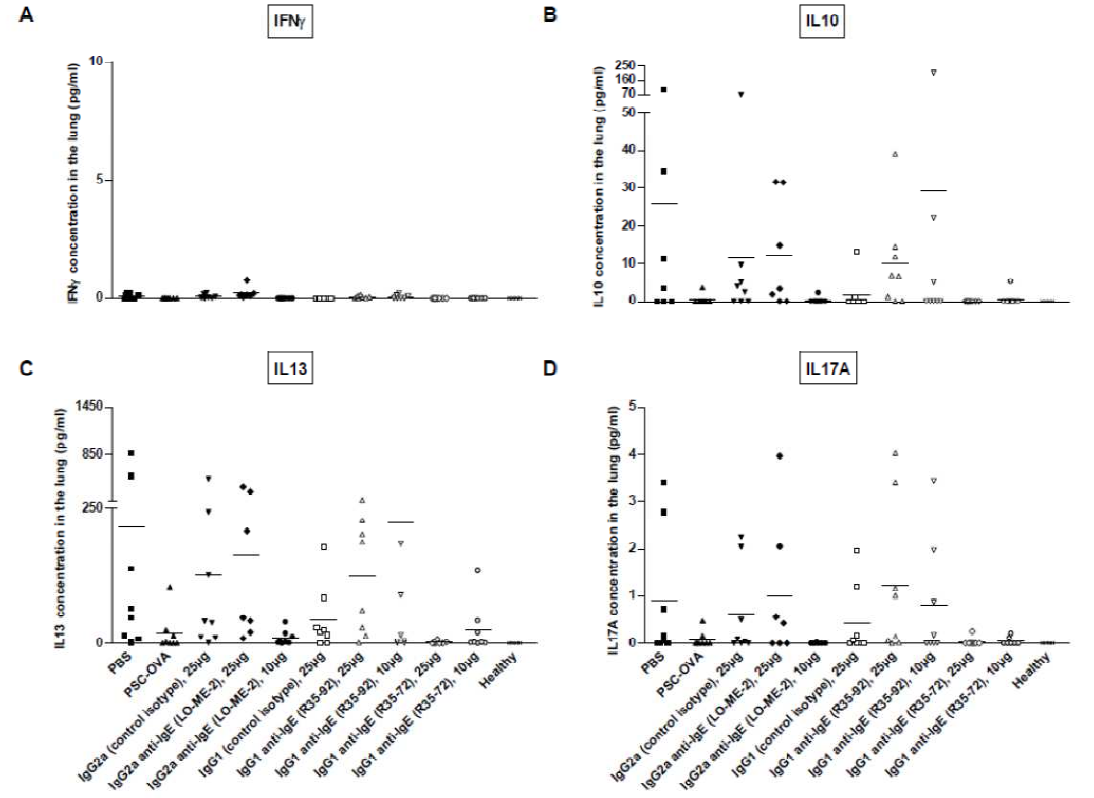

A
IFNγ
IFNγ concentration in the lung (pg/ml)
B
IL10
IL10 concentration in the lung (pg/ml)
C
IL13
IL13 concentration in the lung (pg/ml)
D
IL17A
IL17A concentration in the lung (pg/ml)
PBS
PSC-OVA
IgG2a (control isotype), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 10µg
IgG1 (control isotype), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 10µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 10µg
Healthy

Fig. 3

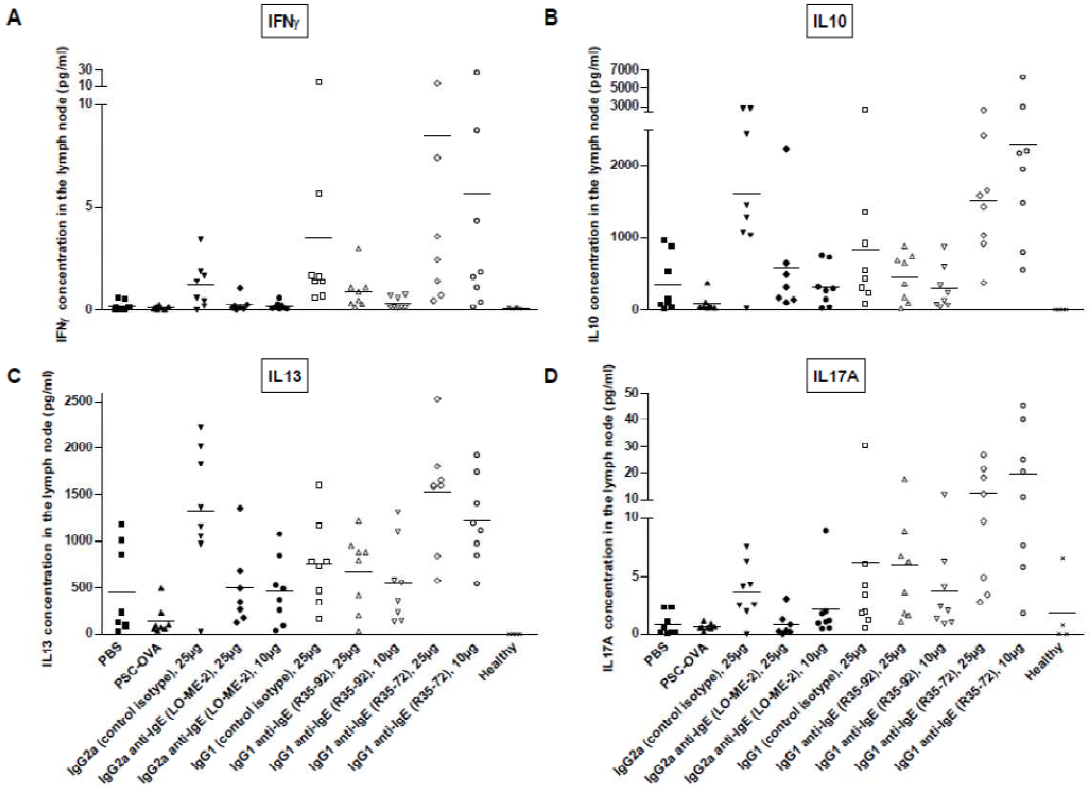

A
IFNγ
IFNγ concentration in the lymph node (pg/ml)
B
IL10
IL10 concentration in the lymph node (pg/ml)
C
IL13
IL13 concentration in the lymph node (pg/ml)
D
IL17A
IL17A concentration in the lymph node (pg/ml)
PBS
PSC-OVA
IgG2a (control isotype), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 25µg
IgG2a anti-IgE (LO-ME-2), 10µg
IgG1 (control isotype), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-92), 10µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 25µg
IgG1 anti-IgE (R35-72), 10µg
Healthy

Fig. 4

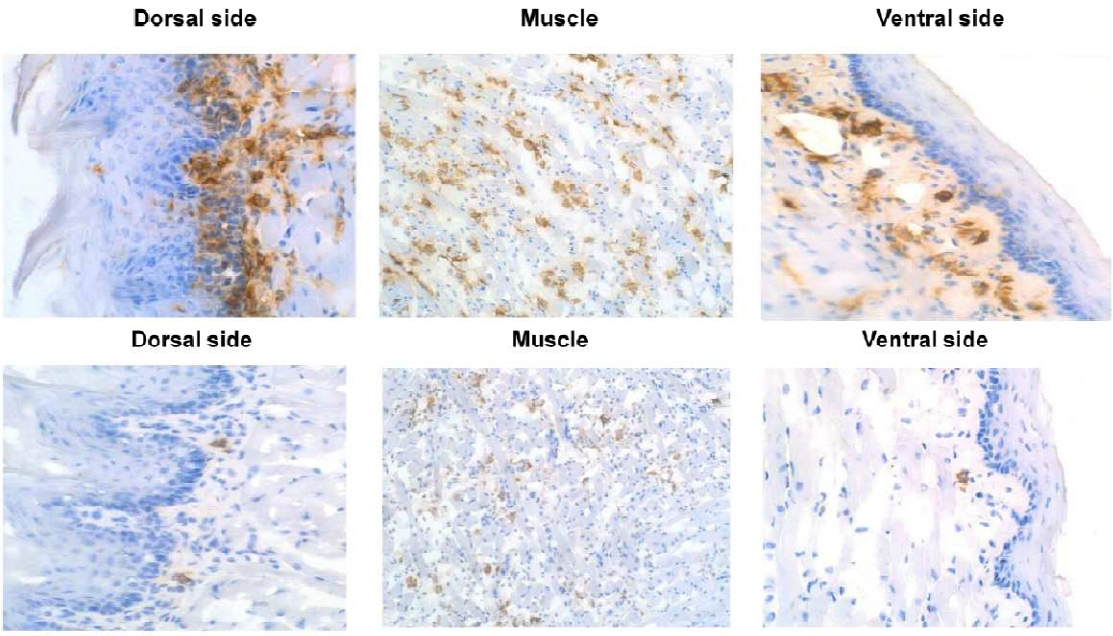

Dorsal side
Muscle
Ventral side
Dorsal side
Muscle
Ventral side

Fig. 5

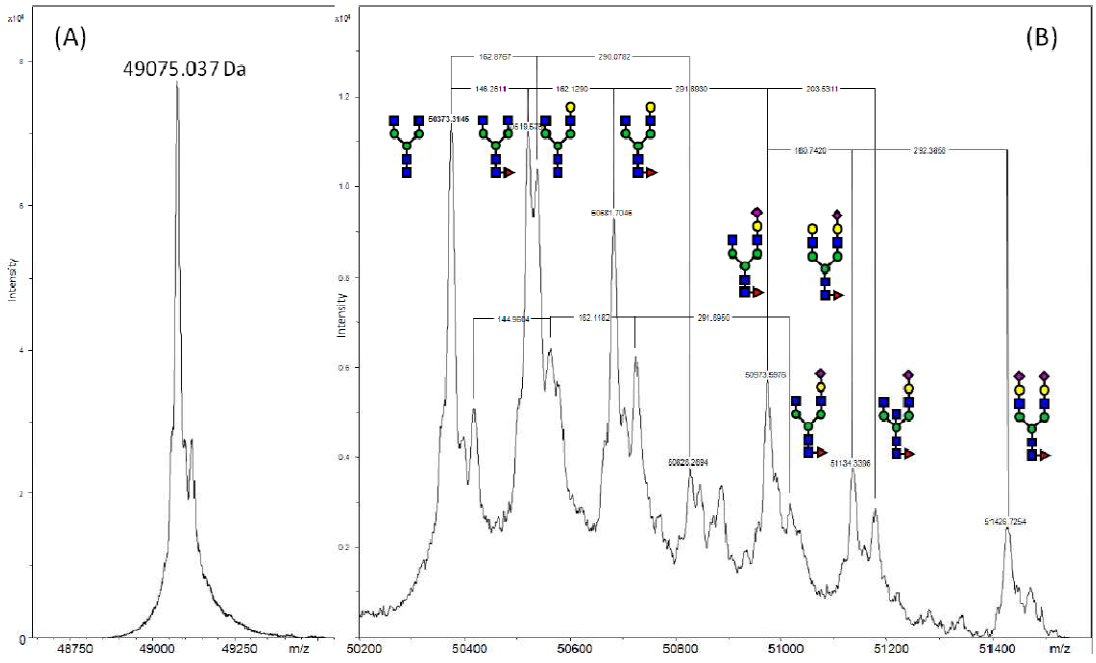

(A)
49075.037 Da
Intensity
48750
49000
49250
m/z
(B)
Intensity
50200
50400
50600
50800
51000
51200
51400
m/z

Fig. 6

Legends

Table 1
Analysis of Fc-linked *N*-glycans of the different rat antibodies tested sublingually in the mouse model of allergic asthma[(a)]

Fig. 1. Effect of sublingual administration of various rat IgG1 and IgG2a on AHR and lung inflammation in OVA-sensitized mice. (A) AHR was determined by measuring the Penh value in response to metacholine (100 mg/ml). Eight individual mice were analysed within each group. Horizontal bars represent the mean response within each group, each dot representing the Penh value obtained in an invididual animal. (B) Macrophages and eosinophils counted in BAL; results are shown as mean +/- SEM; n = 8 mice per group; * $p < 0.05$ compared with mice administered with PBS. Results are representative of three experiments (IgG1 of R35-95 clone and IgG1 control isotype) or two experiments (the other immunoglubulins tested).

Fig. 2. Effect of sublingual administration of various rat IgG1 and IgG2a on antibody responses in OVA-sensitized mice. Levels of OVA-specific seraum IgG1, IgG2a, IgE and salivary IgA were measured by ELISA as described in materials and methods.

Fig. 3. Effect of sublingual administration of various rat IgG1 and IgG2a on cellular immune responses in OVA-sensitized mice. Levels of IFNγ, IL10, IL13 and IL17A were assessed in culture supernatant of OVA-stimulated lung cells using a CBA assay.

Fig. 4. Effect of sublingual administration of various rat IgG1 and IgG2a on cellular immune responses in OVA-sensitized mice. Levels of IFNg, IL10, IL13 and IL17A were assessed in culture supernatant of OVA-stimulated lymph node cells using a CBA assay.

Fig. 5. Distribution of CD16/CD32 (upper panels) and SIGN-R1 (lower panels) in the lingual tissues from naïve mice, as analyzed by immunohistology. Similar results were obtained with OVA-sensitized BALB/c mice (results not shown).

Fig. 6. Deconvoluted HC mass spectra of rat monoclonal antibody R35-92. (A) Mass spectrum of the deglycosylated and reduced heavy chain. (B) Mass spectrum of the reduced heavy chain. *N*-linked oligosaccharides were determined based on mass differences between deglycosylated and native experimental masses. Acquisition was performed on a Qq-ToF MS instrument (Maxis, Bruker) in positive ion mode with external calibration. Legend : (▲) fucose (+146 Da), (■) *N*-acetyl-glucosamine (+203 Da), (●) mannose (+162 Da), (○) galactose (+162 Da), (◆) *N*-acetyl-neuraminic acid (+291 Da). Complete annotation is available at the CFG web site (http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf).

Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice

L. Mascarell, N. Saint-Lu, H. Moussu, **A. Zimmer**, A. Louise, Y. Lone , D. Ladant, C. Leclerc, S. Tourdot, L. Van Overtvelt, P. Moingeon.

Mucosal Immunology, sous presse

nature publishing group

ARTICLES

Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice

L Mascarell[1], N Saint-Lu[1], H Moussu[1], A Zimmer[1], A Louise[2], Y Lone[3], D Ladant[4], C Leclerc[5,6], S Tourdot[1], L Van Overtvelt[1] and P Moingeon[1]

Sublingual allergen-specific immunotherapy (SLIT) is a safe and efficacious treatment for type 1 respiratory allergies. Herein, we investigated the key subset(s) of antigen-presenting cells (APCs) involved in antigen/allergen capture and tolerance induction during SLIT. Following sublingual administration, fluorochrome-labeled ovalbumin (OVA) is predominantly captured by oral CD11b$^+$CD11c$^-$ cells that migrate to cervical lymph nodes (CLNs) and present the antigen to naive CD4$^+$ T cells. Conditional depletion with diphtheria toxin of CD11b$^+$, but not CD11c$^+$ cells, in oral tissues impairs CD4$^+$ T-cell priming in CLNs. In mice with established asthma to OVA, specific targeting of the antigen to oral CD11b$^+$ cells using the adenylate cyclase vector system reduces airway hyperresponsiveness (AHR), eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavages (BALs), and specific Th2 responses in CLNs and lungs. Oral CD11b$^+$CD11c$^-$ cells resemble tolerogenic macrophages found in the lamina propria (LP) of the small intestine in that they express the mannose receptor CD206, as well as class-2 retinaldehyde dehydrogenase (RALDH2), and they support the differentiation of interferon-γ/interleukin-10 (IFNγ/IL-10)-producing Foxp3$^+$ CD4$^+$ regulatory T cells. Thus, among the various APC subsets present in oral tissues of mice, macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following SLIT.

INTRODUCTION

The induction of antigen-specific tolerance is a major goal in the treatment of allergy, autoimmunity, and inflammatory disorders. The administration of antigen/allergen alone or together with an immunopotentiator or vector system via mucosal routes (e.g., nasal, oral, or sublingual) has been shown to elicit tolerogenic immune responses in various murine models of established asthma or autoimmune diseases.[1–19] Out of these routes, the sublingual one is of specific interest, as it has been established as effective for inducing antigen-specific tolerance in humans with respiratory allergies.[20–31] With respect to immune mechanisms underlying sublingual immunotherapy (SLIT), the current model is that the allergen is quickly captured by oral tolerogenic dendritic cells (DCs) that subsequently migrate to cervical lymph nodes (CLNs) and induce T helper type 1 (Th1)/regulatory T cell (Treg) responses.[32,33] However, it is still unclear which antigen-presenting cells (APCs) are critical for allergen uptake at the administration site and subsequent priming of naive T cells in draining lymph nodes.

Recently, we identified three subsets of oral APCs in mice, including Langerhans cells, plasmacytoid DCs, as well as a major subset of CD11b$^+$ myeloid APCs.[16,34] In the present study, we investigated the role of such oral/lingual APCs in tolerance induction in sensitized BALB/c mice following sublingual administration of mucoadhesive polysaccharidic core (PSC) nanoparticles carrying ovalbumin (OVA) as a model antigen. We provide evidence that CD11b$^+$CD11c$^-$ cells located along the lamina propria (LP) of the oral mucosa are critical to capture and transport the allergen to draining lymph nodes. Furthermore, these macrophage-like cells exhibit a tolerogenic phenotype with a marked capacity to support regulatory CD4$^+$ T-cell differentiation.

[1]Research and Development, Stallergènes SA, Antony, France. [2]Plateforme de cytométrie de flux, Institut Pasteur, Paris, France. [3]INSERM U542, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France. [4]Institut Pasteur, Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, Paris, France. [5]Institut Pasteur, Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, Paris, France. [6]INSERM U883, Paris, France. Correspondence: P Moingeon (pmoingeon@stallergenes.fr)

Received 14 December 2010; accepted 1 June 2011; doi:10.1038/mi.2011.28

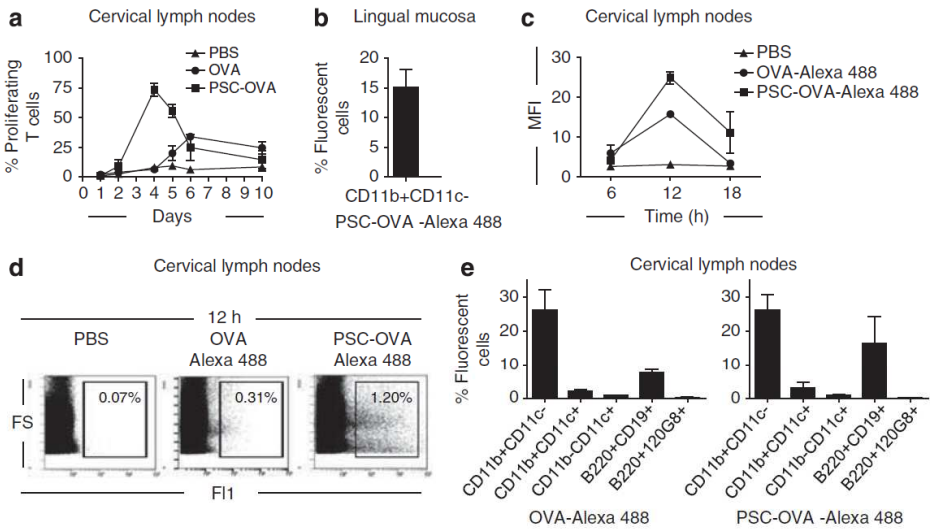


Figure 1 *In vivo* antigen capture and T-cell proliferation following sublingual administration of ovalbumin (OVA) formulated in mucoadhesive nanoparticles. (**a**) *In vivo* proliferation in cervical lymph nodes (CLNs) of OVA-specific CD4+ T cells adoptively transferred into BALB/c mice, subsequently treated by the sublingual route with phosphate-buffer saline (PBS), OVA, and PSC-OVA. Data are representative of three independent experiments. (**b**–**e**) Naive BALB/c mice were sublingually treated with PBS, OVA-Alexa Fluor 488 alone, or formulated in polysaccharidic core (PSC). After 0.5, 12, or 18 h, oral/lingual tissues and CLNs were removed and cells analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Results are expressed as percentages of positive cells. Fluorescent cells were phenotyped by FACS using a combination of markers (CD11b, CD11c, B220, CD19, and 120G8) and results were expressed as mean percentages of positive cells±s.e.m. Data are representative of three independent experiments.

RESULTS

Sublingual administration of the antigen results in capture and presentation by CD11b+ cells

We analyzed antigen-specific CD4+ T-cell responses in draining lymph nodes as well as distant lymphoid organs after sublingual administration of OVA, either in solution or formulated with mucoadhesive nanoparticles (PSC). As reported elsewhere,[13,35] the latter is significantly more efficient in establishing tolerance when compared with soluble antigen, likely because it both increases the duration of contact between the mucosa and facilitates capture by professional APCs. T-cell proliferation was assessed *in vivo* at various time points (for up to 10 days) after sublingual immunization of animals in which carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled OVA-specific CD4+ T cells from DO11.10 mice had been transferred. Only background proliferation was detectable in CLNs from phosphate-buffer saline (PBS)-treated mice, with $<5\%$ proliferating T cells (**Figure 1a**). T cells from mice treated with soluble OVA reached a maximum stimulation at day 6 with 34±1.2% (mean±s.e.m., $n=3$) proliferating T cells (**Figure 1a**). Interestingly, administration of OVA adsorbed on mucoadhesive nanoparticles induced an earlier and stronger T-cell proliferation, with a peak at day 4 (with 73.4±5.6% proliferating T cells; **Figure 1a**). In contrast, no significant CD4+ T-cell proliferation was detected in axillary and mesenteric lymph nodes or in the spleen (data not shown).

To identify which APCs are involved in antigen capture, naive mice were sublingually treated with Alexa Fluor 488-labeled OVA, either in solution or formulated with PSC. Fluorescent cells were analyzed in oral tissues by fluorescence-activated cell sorting (FACS) after 30 min, 6, 12, or 18 h. In agreement with our previous study,[16] significant amounts of the antigen were detected at the mucosal surface 5 min after sublingual administration, then reaching the mucosal/submucosal junction between 15 and 60 min before disappearing (data not shown). Although we cannot exclude that epithelial cells can contribute to antigen uptake, the capture of fluorescent antigen was prominent in CD11b+CD11c−MHC-II+ cells recovered from oral tissues of mice treated with PSC-OVA-Alexa Fluor 488 (**Figure 1b**). Fluorescent cells were subsequently identified by FACS in draining CLNs, with the mean fluorescence intensity reaching a maximum after 12 h in mice treated with either soluble OVA-Alexa Fluor 488 or PSC-OVA-Alexa Fluor 488 (**Figure 1c**). Whereas only background fluorescence was found in PBS-treated mice, up to 1.20% fluorescent cells were detected in CLNs from PSC-OVA-Alexa Fluor 488-treated mice, to be compared with only 0.31% fluorescent cells in OVA-Alexa Fluor 488-treated mice, consistent with the hypothesis that a better targeting of oral APCs is critical to enhance tolerance induction (**Figure 1d**). Such fluorescent CLN cells from OVA- or PSC-OVA-treated mice were analyzed by FACS for surface expression of specific markers (i.e., CD11b, CD11c, B220, CD19, and 120G8). Both CD11b+CD11c− cells and to a lesser extent B lymphocytes (B220+CD19+) present in CLNs had captured soluble or particulate OVA within 12–18 h (**Figure 1e** and **Supplementary Figure S1** online). Noteworthy, whereas particulate antigen was consistently captured by approximately fourfold more APCs (**Figure 1d**), no

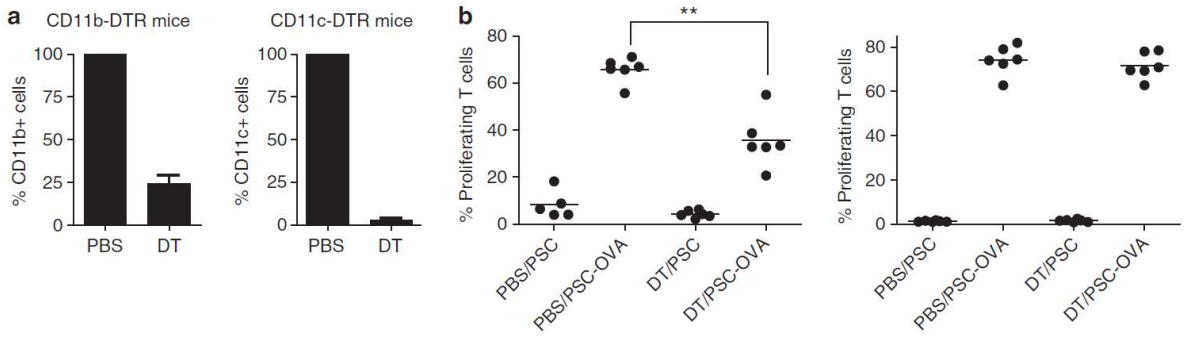


Figure 2 Depletion of CD11b$^+$, but not CD11c$^+$ antigen-presenting cells (APCs), decreases T-cell proliferation in cervical lymph nodes (CLNs) after sublingual administration of PSC-OVA. (**a**) Percentages of CD11b$^+$ and CD11c$^+$ cells from oral/lingual tissues in CD11b or CD11c-DTR mice after diphtheria toxin (DT) treatment. (**b**) *In vivo* proliferation in CLNs of ovalbumin (OVA)-specific CD4$^+$ T cells adoptively transferred into phosphate-buffer saline (PBS)- or DT-treated CD11b or CD11c-DTR mice, receiving subsequently by the sublingual route either polysaccharidic core (PSC) or PSC-OVA. Data shown are compiled from two independent experiments. $^{**}P<0.01$.

significant qualitative differences were found regarding APC subsets involved (**Figure 1e**).

Conditional ablation of CD11b$^+$, but not CD11c$^+$ cells, decreases allergen presentation to CD4$^+$ T cells

To further investigate the role of such oral/lingual CD11b$^+$ cells in allergen capture and presentation, we used transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) as a CD11b or CD11c promoter-driven transgene (i.e., CD11b-DTR and CD11c-DTR mice, respectively), thus enabling *in vivo* conditional depletion of these cells following DT injections. In the first set of experiments, we established that two intraperitoneal (IP) injections of DT deplete 74.7±8.7% (mean±s.e.m., $n=3$) CD11b$^+$ and 97±2% CD11c$^+$ cells in oral/lingual tissues from CD11b or CD11c-DTR mice, respectively (**Figure 2a**). DT treatment in CD11b-DTR mice had no detectable impact on the numbers of CD11c$^+$ APCs (and conversely DT treatment in CD11c-DTR animals did not affect CD11b$^+$ APCs) in the spleen or the oral mucosa (**Supplementary Figure S2** online). Also, the homing in CLNs of CFSE-labeled OVA-specific CD4$^+$ T cells adoptively transferred was not modified in DT-treated mice when compared with PBS-treated mice (**Supplementary Figure S3** online). Thus, after adoptive transfer of CFSE-labeled OVA-specific CD4$^+$ T cells in mice treated with either PBS or DT, PSC or PSC-OVA were sublingually administered and OVA-specific CD4$^+$ T-cell proliferation was analyzed by FACS in CLNs at day 4. As expected, OVA-specific CD4$^+$ T cells from CD11b or CD11c-DTR mice pretreated with PBS exhibited a strong proliferation (**Figure 2b**) after sublingual administration of PSC-OVA, with 65±5.6% (mean±s.e.m., $n=6$) and 74±7.3% proliferating T cells, respectively, whereas marginal or no stimulation was observed following administration of PSC alone. Depletion of CD11b$^+$, but not CD11c$^+$ oral cells, altered OVA-specific CD4$^+$ T-cell proliferation in response to PSC-OVA with only 38±9.5% residual proliferating T cells in mice following removal of CD11b$^+$ cells (**Figure 2b**). These results demonstrate a key role of oral CD11b$^+$ cells in antigen capture and presentation to T cells in CLNs.

Specific targeting of the antigen to oral CD11b$^+$ cells using the CyaA-E5-OVA vector system enhances tolerance induction in asthmatic mice

To confirm these results, specific addressing of the antigen to oral CD11b$^+$ cells was undertaken *in vivo* in sensitized animals using the recombinant detoxified CyaA-E5 from *Bordetella pertussis* fused to OVA. The latter has been identified as a vector system that binds specifically to the CD11b molecule and improves antigen delivery to the major histocompatibility complex (MHC) class I and II pathways.[36,37] Specifically, we confirmed that the conjugation of OVA with CyaA-E5 facilitates capture by oral CD11b$^+$ cells when compared with OVA alone (**Supplementary Figure S4** online). Mice were sensitized with OVA (**Supplementary Figure S5** online) and confirmed to develop airway hyperresponsiveness (AHR) together with eosinophil infiltrates in bronchoalveolar lavages (BALs) as well as OVA-specific Th2 responses (data not shown). Animals received sublingually twice a week for 2 months either 2 or 500 µg of soluble OVA, or 2 µg of OVA presented as CyaA-E5-OVA (**Supplementary Figure S5** online). Healthy (i.e., nonsensitized) mice used as controls in these experiments exhibited, as expected, low AHR, whereas OVA-sensitized animals treated sublingually with PBS alone displayed a high AHR (**Figure 3a**). Sublingual treatment with 2 µg soluble OVA had a moderate impact on AHR, whereas in contrast, similar amounts of OVA administered as CyaA-E5-OVA induced a statistically significant ($P<0.05$) reduction of AHR in most animals, to a level observed with a higher dose (i.e., 500 µg) of soluble OVA (**Figure 3a**). These reductions were also associated with a significant ($P<0.01$) decrease in eosinophil counts in BALs (**Figure 3b**) whereas macrophage numbers rather increased (data not shown). Importantly, CyaA-E5 alone had no significant impact on either AHR or eosinophil infiltrates in BALs (**Figure 3a** and **b**).

Following SLIT, OVA-specific interleukin (IL)-5, IL-10, and IL-13 production were significantly ($P<0.05$) reduced in CD4$^+$ T cells obtained from lungs of mice treated with CyaA-E5-OVA or a high dose (500 µg) of soluble OVA when compared with animals receiving either PBS, CyaA-E5, or a low dose (2 µg) of

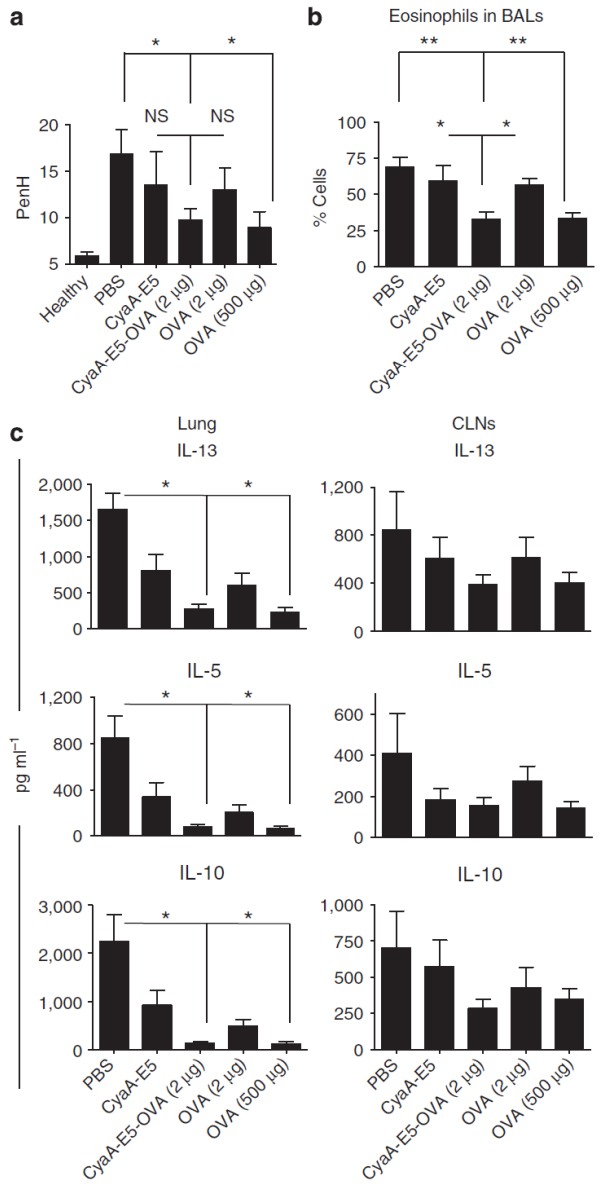


Figure 3 Sublingual administration of CyaA-E5-OVA improves lung function and reduces bronchial inflammation as well as Th2 responses in the lungs and cervical lymph nodes (CLNs). (**a**) Airway hyperresponsiveness was determined in ovalbumin (OVA)-sensitized mice sublingually treated with either phosphate-buffer saline (PBS), soluble OVA (2 and 500 µg), CyaA-E5 (50 µg), or CyaA-E5-OVA (50 µg) by measuring Penh values in response to methacholine as described in the methods section. (**b**) Eosinophil counts in bronchoalveolar lavages (BALs). (**c**) Interleukin (IL)-5, IL-10, and IL-13 production by restimulated CLN or lung cells. Data are representative of two independent experiments (with eight mice per experimental group). Results are shown as mean±s.e.m; $n=8$ mice per group. Data were compared using the nonparametric test (Kruskal–Wallis). NS, not significant. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$.

soluble OVA (**Figure 3c**, left panel). Similar trends were also observed in CD4$^+$ T cells from CLNs (**Figure 3c**, right panel), without reaching statistical significance. Although not shown, no detectable changes in OVA-specific IgE or IgG seric antibodies were observed in any of the groups, consistent with our previous results suggesting the persistence of long-lived memory B cells following OVA sensitization.[13]

Phenotypic and functional characterization of CD11b$^+$ macrophage-like cells in oral/lingual tissues

To further characterize oral CD11b$^+$CD11c$^-$ APCs, we analyzed oral/lingual tissues from naive C57BL/6 mice by immunohistology using specific antibodies, as described in the Methods section. CD11b and CD206 surface markers were detected in cells located at the mucosal/submucosal interface in both ventral and dorsal sides of the tongue, and in lower amounts within submucosal tissues (**Figure 4a**). The combined detection of CD11b, CD206, and MHC-II molecules by FACS confirmed that these markers were coexpressed by cells displaying phenotypic similarities with macrophages (**Figure 4b**). We further compared the phenotype and function of CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophage-like cells isolated by cell sorting (with a purity of at least 99%) from oral/lingual tissues with those found in the small intestine, previously described as highly tolerogenic.[38] Nontolerogenic splenic macrophages were used as controls in these experiments. Specifically, we analyzed by PCR the expression in these cells of *retinaldehyde dehydrogenase* enzymes (RALDH), known to catalyze the production of retinoic acid from retinaldehyde, thus promoting the development of regulatory Foxp3$^+$ T cells.[39] As shown in **Figure 4c**, splenic macrophages did not express any of these enzymes, whereas intestinal and oral/lingual macrophages expressed RALDH 1 and 2 and RALDH2, respectively.

To confirm whether oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophage-like cells have a capacity, like their intestinal counterparts, to induce Foxp3$^+$ Tregs, both oral/lingual and intestinal macrophages (2×10^3 cells) were isolated by cell sorting (with a purity of at least 99%) and cocultured with 2×10^4 naive OVA-specific CD4$^+$ T cells (CD69$^-$CD25$^-$CD62L^{high}CD44^{int}CD45RB^{high}, data not shown) from OT-II mice in the presence of either medium or the $OVA_{323-339}$ peptide (10 µg ml^{-1}), with or without transforming growth factor-β (TGF-β; 1 ng ml^{-1}) for 4 days. Foxp3 expression was monitored by FACS as described in the Methods section. As expected, CD4$^+$ T cells cultured in medium alone, with or without TGF-β, only expressed Foxp3 at background levels when cocultured with either oral/lingual or intestinal macrophages (**Figure 5**). In response to the $OVA_{323-339}$ peptide presented by either oral/lingual or intestinal macrophages, a significant upregulation of Tregs was detected, mainly under noninflammatory conditions (i.e., in presence of TGF-β) with 6.5±1.8 and 3.6±0.5% (mean±s.e.m., $n=3$) Foxp3$^+$ cells induced among OVA-specific CD4$^+$ T cells, respectively. As we previously showed that oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophage-like cells express *Toll-like receptor* (*TLR*)*2*, *4*, *5*, and *7* genes,[16] we further tested the influence of various TLR agonists such as Pam3CSK4 (2 µg ml^{-1}), lipopolysaccharide (2 µg ml^{-1}), flagellin (5 µg ml^{-1}), or R848 (2 µg ml^{-1}) on Foxp3 expression.

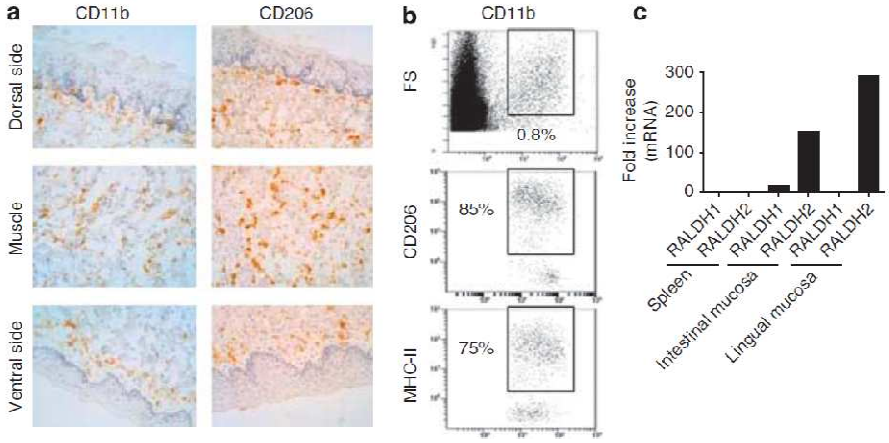


Figure 4 Oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$ cells exhibit a macrophage-like phenotype. (**a**) For immunohistology analysis, oral/lingual tissues from naive BALB/c mice were processed as described in the Methods section and stained with anti-CD206 and anti-CD11b antibodies (magnification ×100). (**b**) Coexpression of CD11b, CD206, and major histocompatibility complex (MHC-II) molecules using fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses. (**c**) Expression of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH)1 and RALDH2 in CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ cells purified from spleen, intestinal, or oral/lingual tissues. Data are representative of three independent experiments.

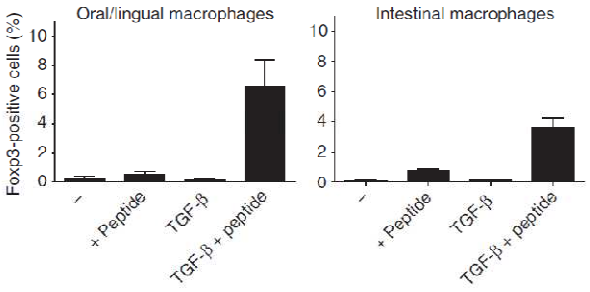


Figure 5 Oral/lingual CD11b$^+$ macrophage-like cells induce Foxp3 expression. Foxp3 expression was assessed in CD4$^+$ T cells cocultured with CD11b$^+$CD11c$^-$MHC$^-$II$^+$ macrophages purified from oral/lingual or intestinal tissues in the presence or absence of the $OVA_{323–339}$ peptide with or without transforming growth factor-β (TGF-β). Data are cumulated from three independent experiments.

Adding TLR ligands to CD11b$^+$ macrophage-CD4$^+$ T-cell cocultures did not alter significantly Foxp3 expression (data not shown). We also analyzed other transcription factors such as T-bet, GATA-3, and RORγT in naive OVA-specific CD4$^+$ T cells cocultured with oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ cells purified by cell sorting in the presence of either medium or the $OVA_{323–339}$ peptide, with or without TGF-β for 4 days. GATA-3 and RORγt were barely detectable in all experimental groups (**Supplementary Figure S6** online). In contrast, naive CD4$^+$ T cells cocultured with oral APCs in the presence of the $OVA_{323–339}$ peptide, with or without TGF-β, significantly increased T-bet expression (**Supplementary Figure S6** online). Together, these results suggest that oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophage-like cells promote the differentiation of interferon-γ (IFNγ)-producing Th1 cells and Foxp3$^+$ regulatory CD4$^+$ T cells.

Oral/lingual CD11b$^+$ macrophage-like cells induce IFN-γ/IL-10-secreting CD4$^+$ T cells with a suppressive function

We further evaluated the impact of oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophage-like cells on the polarization of naive OVA-specific CD4$^+$ T cells obtained from OT-II mice following stimulation with the $OVA_{323–339}$ peptide, in comparison with tolerogenic intestinal APCs as a control. As shown in **Figure 6**, both oral/lingual and intestinal CD11b$^+$ macrophages treated with selected TLR agonists (i.e., Pam3CSK4 and R848) polarized T-cell responses to peptide-pulsed CD11b$^+$ macrophages toward IFNγ and IL-10 production ($P < 0.01$). In contrast, lipopolysaccharide and flagellin had no impact on T-cell polarization. In these experiments, TGF-β consistently downregulated TLR agonist-induced IFNγ production ($P < 0.05$) and tended to downregulate IL-10. Only background levels of IL5 and IL17 were detected in these cocultures, irrespective of the test conditions (data not shown).

CD4$^+$ T cells primed with oral/lingual or intestinal CD11b$^+$ macrophages exhibited a suppressive activity on antigen-specific proliferation of CFSE-labeled third-party naive CD4$^+$ T cells (**Figure 7**) using ratios ranging between 1:1 and 1:4 suppressive/responding cells. Interestingly, CD4$^+$ T cells primed with either oral/lingual or intestinal macrophages treated with Pam3CSK4, R848, or TGF-β displayed a superior suppressive activity (**Figure 7**). Although not shown, no synergy was observed when combining Pam3CSK4 or R848 with TGF-β in macrophage-CD4$^+$ T-cell cocultures. As a control, we also analyzed the effect of CD4$^+$ T cells primed with either oral/lingual or intestinal CD11c$^+$ DCs on antigen-specific proliferation of CFSE-labeled third-party naive CD4$^+$ T cells. No suppressive activity was detected in these experiments at ratios (suppressive/effector cells) between 1:2 and 1:4 when using cells exposed to either Pam3CSK4, R848, or TGF-β, whereas a moderate suppressive effect was shown in a 1:1 ratio in the presence of Pam3CSK4 and R848 (**Supplementary Figure S6** online).

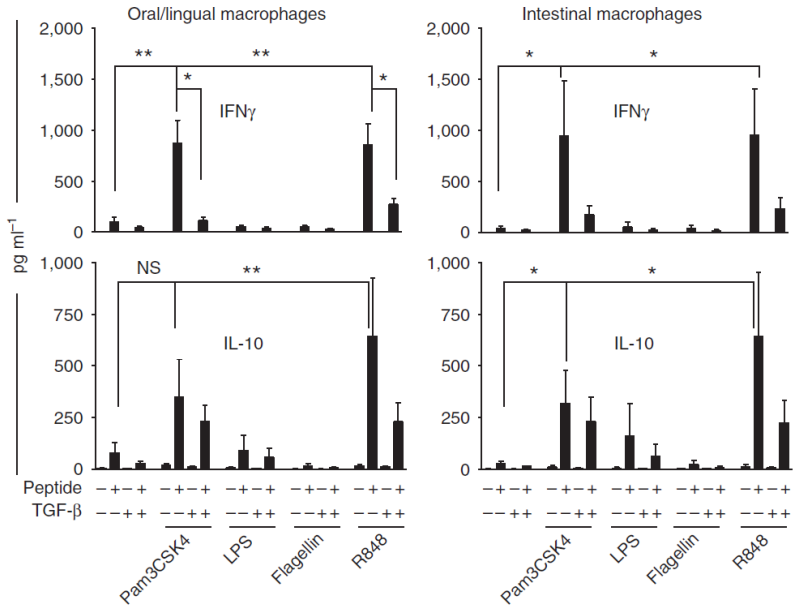


Figure 6 Oral/lingual CD11b$^+$ macrophage-like cells enhance interferon-γ/interleukin-10 (IFNγ/IL-10) production by T cells in the presence of Pam3CSK4 or R848. IFNγ and IL-10 production were assessed in supernatants from T cells cocultured with CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophages purified from either oral/lingual or intestinal tissues in the presence or absence of the $OVA_{323–339}$ peptide with or without Toll-like receptor (TLR) agonists (Pam3CSK4, lipopolysaccharide (LPS), flagellin, or R848) and transforming growth factor-β (TGF-β). Data are compiled from four independent experiments. *$P<0.05$; **$P<0.01$.

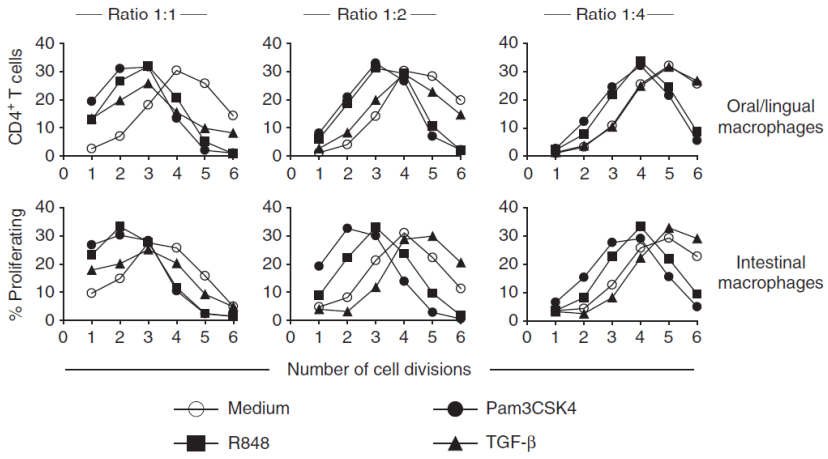


Figure 7 Oral/lingual CD11b$^+$ macrophage-like cells promote the development of suppressive CD4$^+$ T cells upon stimulation with Pam3CSK4, R848, or transforming growth factor-β (TGF-β). The suppressive capacity of T cells primed by oral/lingual CD11b$^+$CD11c$^-$MHC-II$^+$ macrophages purified from oral/lingual or intestinal tissues in the presence of Pam3CSK4, R848, or TGF-β was evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled third-party ovalbumin (OVA)-specific naive CD4$^+$ T cells stimulated with the $OVA_{323–339}$ peptide. Ratios between 1:1 and 1:4 suppressive/responder cells were tested. Data are representative of three independent experiments.

Altogether, these results indicate that oral/lingual CD11b$^+$ macrophages are *bona fide* tolerogenic APCs supporting Th1 and Treg polarization, similar to their intestinal counterparts.

DISCUSSION

Sublingual immunotherapy is now established as a safe and efficient approach to induce antigen-specific tolerance and is being broadly used to treat type I respiratory allergies in humans.[12,20,22–31] With respect to immune mechanisms involved, SLIT has been shown to elicit IFNγ- and IL-10-secreting allergen-specific CD4$^+$ T cells in peripheral blood as well as increased numbers of Foxp3$^+$ Tregs in oral tissues.[40–44] Although such systemic and local (i.e., mucosal) changes in CD4$^+$ T-cell responses are thought to be critical for

tolerance induction during SLIT, mechanisms involved at the site of administration, most particularly as it relates to which APC subset(s) is(are) involved in allergen capture, are not fully understood. In this respect, Langerhans DCs have been proposed as a prominent APC subpopulation in the human sublingual/oral mucosa,[45–49] based upon their proven capacity to capture the allergen *in vitro*.[50] In our previous study on the characterization of oral APCs in mice, we detected the presence of Langerhans cells ($CD207^+$) in the mucosa itself, although in lower numbers when compared with humans.[16,48] This latter study also revealed the presence of myeloid and plasmacytoid APCs in submucosal tissues, all capable of supporting the differentiation of IL-10/IFNγ-producing suppressive $CD4^+$ T cells.[16,34]

In this context, we undertook the present study to identify which of those APCs are critical for tolerance induction following SLIT, taking advantage of mice models to assess both allergen capture and T-cell priming *in vivo*. Herein, we obtained converging arguments supporting a key role for $CD11b^+CD11c^-$ cells as tolerogenic oral APCs. First, following sublingual administration to BALB/c mice, the OVA antigen is mostly captured in oral tissues by $CD11b^+CD11c^-$ cells located along the LP within 15–60 min.[16] Second, allergen uptake by $CD11b^+CD11c^-$ cells that subsequently migrate to draining lymph nodes is increased fourfold when administering the antigen using mucoadhesive particles known to promote tolerance induction. Third, conditional depletion of most $CD11b^+$ cells *in vivo* following DT administration significantly impairs OVA-specific $CD4^+$ T-cell priming in draining lymph nodes following sublingual immunization. In contrast, complete ablation of $CD11c^+$ cells had no effect in these experiments, suggesting that conventional oral $CD11b^+CD11c^+$ myeloid DCs do not play a major role in antigen capture under these conditions. Last, specific targeting of the OVA antigen to oral $CD11b^+$ cells achieved *in vivo* using a detoxified recombinant CyaA-E5 from *B. pertussis* as a vector system[36,37,51–55] significantly enhanced tolerance induction. Specifically, sublingual administration of CyaA-E5-OVA to OVA-sensitized BALB/c mice decreased AHR, reduced eosinophil infiltrates in BALs, and downregulated Th2 responses in CLNs, to levels similar to those obtained when administering a 250-fold higher amount of soluble OVA. Although IL-10 has been described as a potent immunosuppressive cytokine, its decrease in this therapeutic model may be explained by the downregulation of OVA-specific Th2 cells, also known to produce IL-10.[56]

In the murine oral mucosa, $CD11b^+CD11c^-$MHC-II^+ cells express CD206, Siglec-1 (data not shown), synthesize RALDH1 and RALDH2, and induce Foxp3 expression in $CD4^+$ T cells. Oral/lingual $CD11b^+$ APCs stimulated with TLR2 or TLR7/8 agonists (i.e., Pam3CSK4 or R848, respectively) also support the development of IFNγ/IL-10-producing $CD4^+$ T cells displaying a suppressive activity. With these features combined, they resemble macrophages found along the LP of the small intestine previously shown to be highly tolerogenic, in contrast to $CD11b^+CD11c^+$ DCs that rather elicit proinflammatory Th17 responses.[38] Interestingly, engagement of the β2 integrin CD11b was reported in itself to provide anti-inflammatory signals to the APCs,[57] thus possibly contributing to the tolerogenic function of oral/lingual $CD11b^+$ macrophages.

Surprisingly, besides oral/lingual macrophage-like cells, our data also point out to a potential role for B cells in sublingual tolerance induction. Although these cells are not present at the administration site in oral tissues,[34] they are identified as allergen/antigen capturing/presenting cells in CLNs following sublingual administration. This observation is in agreement with a previous report demonstrating that sublingual coadministration of OVA together with the cholera toxin B subunit induces a tolerogenic effect on B cells in CLNs that subsequently promotes the expansion of regulatory (i.e., $Foxp3^+$, LAP^+ $TGF\text{-}\beta^+$, and $IL\text{-}10^+$) $CD4^+$ T cells.[15] Beyond the known capacity of B cells to produce IgG1 and IgG4 antibodies with anti-inflammatory activity, their role in antigen-specific tolerance induction could also encompass IL-10 production.[30,58]

Taken together, our data imply that improving the targeting of the allergen to oral/lingual $CD11b^+$ macrophage-like cells could enhance tolerance induction during SLIT. We do not exclude that other oral APCs could also contribute to sublingual tolerance in humans, most particularly as, in contrast to mice, $CD207^+$ Langerhans cells are more abundant in the superbasal layer of the human oral mucosa.[48] Nonetheless, $CD11b^+$ cells are also detected in the papillary chorion of the human oral tissues (our unpublished data) and thus, we hypothesize that they also play a role in tolerance induction during SLIT conducted in allergic patients.

METHODS

Mice, reagents, and antibodies. BALB/c, C57BL/6, and OT-II female mice, 6 to 8 weeks old, were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). DO11.10 female mice transgenic for the $OVA_{323-339}$ peptide-specific T-cell receptor and CD11b-DTR female mice purchased from the Jackson Laboratory were bred in the Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnel (CERFE, Evry, France). CD11c-DTR female mice were obtained from Yu-chun Lone. These transgenic mice express the human DTR under the control of the CD11b or CD11c promoter, respectively. International levels of ethical standards were applied for animal handling.

PBS, RPMI-1640, and OVA-Alexa fluor 488 were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). OVA grade V with low endotoxin content was purchased from Sigma (St Louis, MO) and further purified on an endotoxin removing gel (Pierce, Rockford, IL). Residual endotoxin concentrations determined by Endochrome-K assay (R1708K, Charles River, Wilmington, MA) were always <0.1 EU per μg protein. Pam3CSK4, lipopolysaccharide, flagellin, and R848 were purchased from Invivogen (Toulouse, France).

The following monoclonal antibodies (mAbs) were used, either as purified antibodies for immunohistology or labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), PE cyanin 5, PE cyanin 7, or allophycocyanin (APC) for flow cytometry analysis: anti-MHC-II (I-A/I-E) IgG2b, anti-B220 IgG2a (e-Biosciences, San Diego, CA), anti-CD11b IgG2b, anti-CD11c IgG1, anti-Thy1.1 IgG1 (BD Biosciences, San Jose, CA), anti-CD206 IgG2a (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and anti-pDC (120G8) IgG2a (Dendritics, Dardilly, France). Corresponding isotype-matched mAbs were used as controls in all experiments.

Vector systems. A polymerized form of maize maltodextrin (PSC) prepared as described elsewhere was used as a mucoadhesive particulate antigen delivery system.[13,35] The detoxified form of the CyaA from *B. pertussis* carrying the OVA protein (CyaA-E5-OVA) and the

control detoxified CyaA without any insert (CyaA-E5) were prepared as described previously.[51] Briefly, CyaA-E5 and CyaA-E5-OVA are detoxified derivatives of CyaA obtained following insertion of the dipeptide Leu-Gly between codons 188 and 189 of CyaA located in its catalytic domain. CyaA-E5-OVA is a recombinant detoxified CyaA protein resulting from the insertion of the OVA protein between Arg^{224} and Ala^{225} of CyaA.

Conditional ablation of oral APCs and *in vivo* T-cell proliferation assay

For *in vivo* proliferation assays, CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR)-labeled purified $CD4^+$ T cells from DO11.10 mice (5×10^6) were adoptively transferred by retroorbital intravenous injections into BALB/c mice at day 0. After 24 h, mice were sublingually treated with PBS, PSC, OVA, or PSC-OVA (500 µg) in 20 µl PBS. At various time points (days 1, 2, 4, 5, 6, and 10), CLNs were harvested, OVA-specific T cells were stained with the anticlonotypic PE-KJ1.26 mAb, and percentages of proliferating T cells were evaluated by FACS based on a decrease in CFSE-associated fluorescence. For *in vivo* proliferation assays performed in CD11b or CD11c-DTR mice, animals were treated with either PBS or DT (with two IP injections at days 0 and 1, using 500 and 100 ng of DT, respectively) before adoptive transfer of 5×10^6 CFSE-labeled OVA-specific $CD4^+$ T cells from OT-II mice. Proliferating LN T cells were analyzed at the peak of expansion, i.e., 4 days after sublingual administration of either PSC alone or PSC-OVA (500 µg).

Sublingual immunotherapy and analyses of immune responses.

For OVA sensitization, mice were immunized IP on days 0 and 14 with 10 µg OVA adsorbed on 2 mg $Al(OH)_3$, administered in 100 µl PBS. At day 21, a 20-min aerosol challenge was performed with 1% w/v OVA on 4 consecutive days using an aerosol delivery system (Buxco Europe, Winchester, UK). For tolerance induction, soluble or vectorized OVA was applied sublingually to groups of eight mice twice a week during 2 months in 50 µl of PBS. Control mice were sensitized with OVA followed by sham tolerization with PBS or CyaA-E5 alone. At days 90 and 91, a 20-min aerosol challenge was performed with 1% w/v OVA using an aerosol delivery system (Buxco Europe). Measurements of AHR were performed by whole body plethysmography (Buxco Europe) and results were expressed as enhanced pause (Penh).[13] The Penh index, expressed as an increase relative to the baseline airway resistance, was obtained as a ratio between Penh values measured after exposure to increased inhaled methacholine (from 0 to 100 mg) and nebulized PBS.[13]

For the analysis of inflammatory cells in BALs, mice were anesthetized by IP injection of pentobarbital (50 mg kg^{-1} body weight), and BAL performed with 600 µl PBS. BAL fluids were centrifuged at 800 *g* for 10 min at 4 °C. Cell pellets were resuspended in PBS, spun onto glass slides by cytocentrifugation, and fixed and stained with May-Grünwald Giemsa (Réactifs RAL, Martillac, France). Eosinophils, macrophages, and lymphocytes were counted under light microscopy using a 200-fold magnification.

To assess T-cell responses, lung and CLNs were removed. Lungs were treated for 15 min at 37 °C with 400 U ml^{-1} collagenase type IV plus 50 µg ml^{-1} DNase I (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) in RPMI-1640. After blocking residual enzymatic activity with 5 mM EDTA in PBS, lungs were dissociated in PBS. Lung and CLN cells were plated at 10^6 cells per well and stimulated with OVA (100 µg ml^{-1}) or medium alone. After 72 h at 37 °C in 5% CO_2/95% air, IL-5, IL-10, IL-13, and IFNγ were measured in culture supernatants using a cytometric bead array Flex kit.

Immunohistology. For immunohistology, spleen and oral (i.e., buccal floor and lingual) mucosal tissues were recovered from naive mice and frozen at −80 °C. Tissue sections (4–6 µm wide) were serially cut, air-dried for at least 30 min, fixed in acetone for 1 to 2 min, and incubated for 10 min in 3% hydrogen peroxide (Sigma) to block endogenous peroxidase activity. After washing in Tris-buffered saline (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4), primary antibodies (diluted 1:100 in Tris-buffered saline) were added onto samples and incubated for 1 h at room temperature. Tissue sections were washed in Tris-buffered saline and incubated with biotinylated rabbit anti-goat IgG secondary antibodies (Sigma, 1:400) for 30 min before adding streptavidin-biotin horseradish peroxydase (Sigma). After 30 min, samples were washed and specific staining was visualized using diaminobenzidine (Sigma) as a substrate. Tissue sections processed in the absence of a primary antibody were included as negative controls.

Isolation and characterization of oral/lingual $CD11b^+CD11c^-$ cells and FACS analysis

To analyze the phenotype and function of oral/lingual or CLN APCs, tissues were removed from BALB/c or C57BL/6 mice, and treated for 15 min at 37 °C with 400 U ml^{-1} collagenase type IV, 50 µg ml^{-1} DNase I (Roche Diagnostic), and 2 U ml^{-1} dispase (Invitrogen) in RPMI-1640, before processing in a gentle MACS dissociator (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany). After blocking residual enzymatic activity with 5 mM EDTA in PBS, oral tissues were dissociated in PBS. Cells were recovered and stained with various antibodies for 15 min at 4 °C, as described above. Results were expressed as mean percentages of positive cells, after subtracting background staining obtained with corresponding isotype-matched mAbs.

Intestinal or oral/lingual immune cells were stained, at 4 °C for 15 min, with anti-CD11b-PE, anti-CD11c-APC, and anti-MHC-II-FITC antibodies. Isolation of 99% pure populations of $CD11b^+CD11c^-MHC\text{-}II^+$ cells was performed with a MoFlo (Dako) cell sorter with purity confirmed by flow cytometry re-analysis. Naive $CD4^+$ T cells were purified from spleens of OT-II mice by magnetic bead separation using the mouse CD4-negative isolation kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. OVA-specific T cells (2×10^4) were incubated with 2×10^3 of the various macrophage populations in the presence of the $OVA_{323-339}$ peptide (10 µg ml^{-1}), with or without TGF β (1 ng ml^{-1}) and TLR agonists such as Pam3CSK4 (2 µg ml^{-1}), lipopolysaccharide (2 µg ml^{-1}), flagellin (5 µg ml^{-1}), or R848 (2 µg ml^{-1}) for 4 days. OVA-specific T cells were stained with PE-labeled anti-CD4 mAbs (BD Biosciences, San Jose, CA), fixed, and permeabilized. Intracellular staining with APC-labeled anti-Foxp3 mAbs was performed using the Foxp3 staining kit following the manufacturer's instruction (eBiosciences). Corresponding isotype-matched mAbs were used as controls in all experiments. IFNγ, IL-5, IL-10, and IL-17 production were measured by cytometric bead array in culture supernatants, according to the manufacturer's (R&D Systems, Minneapolis, MN) guidelines.

RNA isolation and real-time PCR analysis. Total RNA (RNeasy Mini kit, Qiagen) was isolated from 2×10^4 $CD11b^+CD11^-MHC\text{-}II^+$ cells purified by cell sorting from oral/lingual tissues, small intestine, or spleen; complementary DNAs were synthesized using random hexamers (Taqman Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's protocol. Real-time PCR analysis of murine RALDH1 (Mm 00657317_m1) and RALDH2 (Mm 00501306_m1) gene expression was conducted with Predesigned TaqMan Gene Expression Assays and reagents (Applied Biosystems) according to the manufacturer's specifications, using a 7300 Real-time PCR system (Applied Biosystems). In all, 40 cycles of amplification were performed as follows: 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; and 72 °C, 30 s. Levels of mRNA for each gene were normalized to the amount of β-actin mRNA (Mn00801778_m1).

***In vitro* T-cell suppression assay.** Both oral/lingual and intestinal $CD11b^+CD11^+MHC\text{-}II^+$ cells were sorted (with a purity of >99%), and 2×10^3 of those cells were cocultured with 2×10^4 naive OVA-specific $CD4^+$ T cells from OT-II mice in the presence of the $OVA_{323-339}$ peptide (10 µg ml^{-1}), with or without TGF-β (1 ng ml^{-1}) and TLR agonists such as Pam3CSK4 (2 µg ml^{-1}) or R848 (2 µg ml^{-1}) for 4 days. As previously described,[16] $CD4^+$ T cells (i.e., potential suppressive cells) recovered from primary cocultures with oral/lingual and intestinal $CD11b^+CD11^-MHC\text{-}II^+$ cells were further restimulated in the presence

of third-party (i.e., responder cells) CFSE-labeled OVA-specific CD4+ T cells cocultured with murine BM-DCs and the $OVA_{323-339}$ peptide (10 μg ml^{-1}) for 4 days. Ratios between 1:1 and 1:4 suppressive/responder cells were tested. As controls, 2×10^4 CFSE-labeled OVA-specific CD4+ T cells were cultured with or without the $OVA_{323-339}$ peptide (10 μg ml^{-1}) for 4 days. OVA-specific T cells were stained with anti-CD4 mAbs and proliferating cells were evaluated by FACS based on a decrease in CFSE-associated fluorescence.

Statistical analysis. Data were compared using the nonparametric test (Kruskal–Wallis). Results were considered statistically significant when the P-value was < 0.05.

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/mi

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by Stallergènes. Several co-authors are currently employed by Stallergènes (L.M., H.M., A.Z., S.T., L.V.O., and P.M.).

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2011 Society for Mucosal Immunology

REFERENCES

1. Liu, Y.H. & Tsai, J.J. Production of salivary immunoglobulin A and suppression of Dermatophagoides pteronyssinus-induced airway inflammation by local nasal immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **138**, 161–168 (2005).
2. Daniel, C. *et al.* Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy* **61**, 812–819 (2006).
3. Hisbergues, M. *et al.* In vivo and in vitro immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by Lactobacillus plantarum bacteria. *Clin. Exp. Allergy* **37**, 1286–1295 (2007).
4. Mousavi, T., Tajik, N., Moradi, M. & Radjabzadeh, M.F. CpG Immunotherapy in Chenopodium album sensitized mice: the comparison of IFN-gamma, IL-10 and IgE responses in intranasal and subcutaneous administrations. *Clin. Mol. Allergy* **6**, 10 (2008).
5. Lee, S.E. *et al.* Inhibition of airway allergic disease by co-administration of flagellin with allergen. *J. Clin. Immunol.* **28**, 157–165 (2008).
6. Hufnagl, K. *et al.* Airway inflammation induced after allergic poly-sensitization can be prevented by mucosal but not by systemic administration of poly-peptides. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1192–1202 (2008).
7. Winkler, B. *et al.* The role of Foxp3+ T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. *Allergy* **61**, 173–180 (2006).
8. Faria, A.M. & Weiner, H.L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* **13**, 143–157 (2006).
9. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **194**, 629–644 (2001).
10. Oida, T. *et al.* CD4+CD25− T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+ CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J. Immunol.* **170**, 2516–2522 (2003).
11. Chen, M.L., Yan, B.S., Bando, Y., Kuchroo, V.K. & Weiner, H.L. Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **180**, 7327–7337 (2008).
12. Mascarell, L., Van Overtvelt, L. & Moingeon, P. Novel ways for immune intervention in immunotherapy: mucosal allergy vaccines. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **26**, 283–306 (2006).
13. Razafindratsita, A. *et al.* Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 278–285 (2007).
14. Mascarell, L. *et al.* A synthetic triacylated pseudo-dipeptide molecule promotes Th1/TReg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. *Vaccine* **26**, 108–118 (2007).
15. Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C. & Holmgren, J. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J. Immunol.* **181**, 8278–8287 (2008).
16. Mascarell, L. *et al.* Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 603–609 (2008).
17. Lombardi, V. *et al.* Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1819–1829 (2008).
18. Van Overtvelt, L. *et al.* IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **145**, 152–162 (2008).
19. Saint-Lu, N. *et al.* Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. *Allergy* **64**, 1003–1013 (2009).
20. Wilson, D.R., Torres, L.I. & Durham, S.R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2) (2003).
21. Wilson, D.R., Lima, M.T. & Durham, S.R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* **60**, 4–12 (2005).
22. Pajno, G.B., Peroni, D.G., Vita, D., Pietrobelli, A., Parmiani, S. & Boner, A.L. Safety of sublingual immunotherapy in children with asthma. *Paediatr. Drugs* **5**, 777–781 (2003).
23. Passalacqua, G., Guerra, L., Pasquali, M., Lombardi, C. & Canonica, G.W. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy. *Ann. Allergy Asthma. Immunol.* **93**, 3–12 (2004).
24. Penagos, M. *et al.* Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3–18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **97**, 141–148 (2006).
25. Canonica, G. *et al.* Sub-lingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009. *Allergy* **64**, 1–59 (2009).
26. Dahl, R. *et al.* Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 434–440 (2006).
27. Didier, A. *et al.* Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 1338–1345 (2007).
28. Wahn, U. *et al.* Efficacy and safety of 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 160–166 (2009).
29. Horak, F. *et al.* Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 471–477, 477.e1 (2009).
30. Durham, S.R. *et al.* Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 131–138 (2010).
31. Compalati, E., Passalacqua, G., Bonini, M. & Canonica, G.W. The efficacy of sublingual immunotherapy for house dust mites respiratory allergy: results of a GA2LEN meta-analysis. *Allergy* **64**, 1570–1579 (2009).
32. Moingeon, P., Batard, T., Fadel, R., Frati, F., Sieber, J. & Van Overtvelt, L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* **61**, 151–165 (2006).
33. Allam, J.P., Bieber, T. & Novak, N. Dendritic cells as potential targets for mucosal immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **9**, 554–557 (2009).
34. Mascarell, L. *et al.* Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4+ T cells. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 1910–1919 (2009).
35. Baudner, B.C. *et al.* Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. *Infect. Immun.* **70**, 4785–4790 (2002).
36. Guermonprez, P. *et al.* The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **193**, 1035–1044 (2001).
37. El Azami El Idrissi, M., Ladant, D. & Leclerc, C. The adenylate cyclase of Bordetella pertussis: a vector to target antigen presenting cells. *Toxicon* **40**, 1661–1665 (2002).

38. Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R. & Pulendran, B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* **8,** 1086–1094 (2007).
39. Sun, C.M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* **204,** 1775–1785 (2007).
40. Bohle, B., Kinaciyan, T., Gerstmayr, M., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B. & Ebner, C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120,** 707–713 (2007).
41. Cosmi, L. *et al.* Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin-10-production. *Clin. Exp. Allergy* **36,** 261–272 (2006).
42. Ciprandi, G. *et al.* Induction of interleukin 10 by sublingual immunotherapy for house dust mites: a preliminary report. *Ann. Allergy Asthma. Immunol.* **95,** 38–44 (2005).
43. Savolainen, J., Jacobsen, L. & Valovirta, E. Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy* **61,** 1184–1190 (2006).
44. Scadding, G.W. *et al.* Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin. Exp. Allergy* **40,** 598–606 (2010).
45. Allam, J.P. *et al.* Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112,** 141–148 (2003).
46. Novak, N., Bieber, T. & Katoh, N. Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. *J. Immunol.* **167,** 797–804 (2001).
47. Allam, J.P. *et al.* Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121,** 368–374 (2008).
48. Allam, J.P. *et al.* Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? *Allergy* **63,** 720–727 (2008).
49. Larche, M. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy: are oral Langerhans cells the masters of tolerance? *J. Allergy Clin. Immunol.* **126,** 646–647 (2010).
50. Allam, J.P. *et al.* Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126,** 638–645 e631 (2010).
51. Dadaglio, G., Moukrim, Z., Lo-Man, R., Sheshko, V., Sebo, P. & Leclerc, C. Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* **68,** 3867–3872 (2000).
52. Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C. & Sebo, P. Delivery of a MalE CD4+-T-Cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase. *Infect. Immun.* **70,** 1002–1005 (2002).
53. Schlecht, G., Loucka, J., Najar, H., Sebo, P. & Leclerc, C. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J. Immunol.* **173,** 6089–6097 (2004).
54. Mascarell, L., Fayolle, C., Bauche, C., Ladant, D. & Leclerc, C. Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8+ T-cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis. *J. Virol.* **79,** 9872–9884 (2005).
55. Mascarell, L. *et al.* Delivery of the HIV-1 Tat protein to dendritic cells by the CyaA vector induces specific Th1 responses and high affinity neutralizing antibodies in non human primates. *Vaccine* **24,** 3490–3499 (2006).
56. Saraiva, M. & O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 170–181 (2010).
57. Han, C., Jin, J., Xu, S., Liu, H., Li, N. & Cao, X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat. Immunol.* **11,** 734–742 (2010).
58. Francis, J.N. *et al.* Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121,** 1120–1125 e1122 (2008).

Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector $CD4^+$ T cells

L. Mascarell, V. Lombardi, **A. Zimmer**, A. Louise, S. Tourdot, L. Van Overtvelt, P. Moingeon

Clinical and Experimental Allergy, 2009, 39, 1910-1919

doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03337.x
Clinical & Experimental Allergy, **39**, 1910–1919
© 2009 Blackwell Publishing Ltd

ORIGINAL ARTICLE Experimental Models of Allergic Disease

Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4$^+$ T cells

L. Mascarell[1], V. Lombardi[1], A. Zimmer[1], A. Louise[2], S. Tourdot[1], L. Van Overtvelt[1] and P. Moingeon[1]
[1]Research and Development, Stallergènes SA, Antony, France and [2]Plateforme de cytométrie de flux, Institut Pasteur, Paris, France

Clinical & Experimental Allergy

Summary

Background Sublingual immunotherapy (SLIT) is safe and reduces both symptoms and medication requirements in patients with type I respiratory allergies. Nonetheless, immune mechanisms underlying SLIT need to be further documented.

Objective A detailed characterization of the lingual immune system was undertaken in mice, to investigate the presence of tolerogenic and pro-inflammatory mechanisms.

Methods Immune cells were characterized in lingual tissues from BALB/c mice using immunohistology and flow cytometry. Resident CD4$^+$ T cells were sorted and toll-like receptor (TLR) expression profiles as well as functional characterization were assessed by RT-PCR, T cell suppressive assays and cytokine gene expression, respectively.

Results Eosinophils and mast cells were only detected in submucosal tissues. No NK, NK-T, γ/δ, CD8$^+$ T cells, nor B-lymphocytes were detected. Potential antigen presenting cells include various subsets of dendritic cells (CD207$^+$ Langerhans cells, CD11b$^+$CD11c$^+$ myeloid cells and 120G8$^+$ plasmacytoid DCs) together with F4/80$^+$ macrophages. Noteworthy, both CD103$^-$ and CD103$^+$ CD4$^+$ T cells expressing TLR2 and TLR4 receptors are present along the lamina propria, in vicinity of myeloid CD11b$^+$CD11c$^\pm$ dendritic cells. Such resident lingual CD4$^+$ T lymphocytes comprise both suppressive T cells as well as cells with memory/effector functions (i.e. expressing IFNγ, IL4, IL10 and IL17 genes following stimulation), irrespective of the presence of the mucosal addressing marker CD103.

Conclusion The sublingual route is pertinent to induce antigen-specific tolerance, due to (i) limited numbers of pro-inflammatory cells, rather located in submucosal tissues, (ii) co-localization of APCs and resident CD4$^+$ T cells with regulatory functions. Since the oral immune system can also elicit pro-inflammatory effector responses, the cytokine milieu in which allergens are presented by sublingual APCs needs to be controlled during immunotherapy (e.g. with adjuvants) in order to favour tolerance over inflammation.

Keywords antigen presenting cells, CD103, mucosal CD4$^+$ T cell, mucosal immunity, sublingual immunotherapy
Submitted 15 January 2009; revised 29 June 2009; accepted 1 July 2009

Correspondence:
Philippe Moingeon, Research and Development, Stallergènes SA, 6 rue Alexis de Tocqueville, 92160 Antony, France.
E-mail: pmoingeon@stallergenes.fr
Cite this as: L. Mascarell, V. Lombardi, A. Zimmer, A. Louise, S. Tourdot, L. Van Overtvelt and P. Moingeon, *Clinical & Experimental Allergy*, 2009 (39) 1910–1919.

Introduction

Allergen-specific sublingual immunotherapy (SLIT) is established as a safe and efficient treatment for type I respiratory allergies, both in adults and children [1–7]. Although, SLIT-induced allergen-specific T cell responses are thought to play a critical role in tolerance induction, immune mechanisms involved at the site of administration are still elusive [8]. Improving our understanding of the latter is critical in order to better target the allergen to appropriate immune cells, thus favouring tolerance induction as opposed to pro-inflammatory responses. Interestingly, all subsets of oral antigen presenting cells (APCs) described so far in mice or in humans were shown to support antigen-specific tolerance, following induction of IFNγ and/or IL10 producing CD4$^+$ T cells with a suppressive function [9–11]. In contrast, little is known regarding the presence of resident regulatory or effector lymphoid cells in oral tissues.

In this study, we conducted a comprehensive analysis of the lingual immune system in BALB/c mice. Few pro-inflammatory cells [i.e. eosinophils, mast cells (MC)] cells

and no lymphoid cells, besides resident $CD4^+$ T lymphocytes, are detected within lingual tissues. The latter co-localize along the lamina propria with $CD11b^+$ myeloid APCs, and comprise both regulatory and effector/memory T cells.

Materials and methods

Mice, reagents and antibodies

Six- to eight-week-old BALB/c female mice were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). DO11.10 female mice transgenic for the ovalbumin $(OVA)_{323-339}$ peptide-specific T cell receptor (TCR) [12] were bred in the Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnel (CERFE, Evry, France). International levels of ethical standards were applied for animal handling.

Phosphate-buffered saline (PBS) and RPMI 1640 were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The following monoclonal antibodies (mAbs) were used, either as purified antibodies for immunohistology or labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC) for flow cytometry analysis: anti-MHC Class II (I-A/I-E) IgG2b, anti-CD86 IgG2a, anti-CD69 IgG, anti-CD25 IgG1, anti-CD62L IgG2a, anti-CD44 IgG2b, anti-CD45RB IgG2a, anti-CCR7 IgG2a, anti-CD103 IgG2a, anti-CD8α IgG2a, anti-CD117 IgG2b, anti-F4/80 IgG2a, anti-pan NK IgM, anti-CD40 IgG2a, anti-CD80 IgG, anti-GR-1 IgG2b, anti CD19 IgA, anti-CD207 IgG2a, anti-CD3 IgG2b, anti-CD28 IgG (all from eBiosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD4 IgG2b, anti-CD3 IgG1, anti-follicular dendritic cells IgG2c (clone FDC-M1), anti-γδ T cells IgG2a, anti-CD11b IgG2b, anti-CD11c IgG1 (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD205 IgG (NLDC-145 clone; Cedarlane Laboratories Ltd, Burlington, ON, Canada). Corresponding isotype-matched mAbs were used as controls in all experiments.

Animal sensitization

Mice sensitization was performed by two intraperitoneal (i.p.) injections at 14-day intervals of 10 μg OVA adsorbed on 2 mg $Al(OH)_3$, administered in a volume of 100 μL. This was followed by a 20 min aerosol challenge with 1% w/v OVA on 4 consecutive days using an aerosol delivery system (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK). Such, OVA-sensitized mice exhibit airway hyperresponsiveness (AHR) in response to metacholine in a dose-dependent manner (from 12.5 to 100 mg/mL) as well as OVA-specific IgEs.

Immunohistology and fluorescence-activated cell sorter analysis of lingual immune cells

For immunohistology, spleen, thymus and lingual tissues were recovered from naïve or OVA-sensitized mice and frozen at −80 °C. In our analyses, the buccal floor is also included and considered as part of the ventral side of the tongue. Tissue sections (4–6 μm wide) were serially cut, air-dried for at least 30 min, fixed in acetone for 1–2 min, and incubated for 10 min in 3% hydrogen peroxide (Sigma, St Louis, MO, USA) to block endogenous peroxidase activity. After washing in Tris-buffered saline (TBS: 0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4), primary antibodies (diluted 1/100 in TBS) were added onto samples and incubated for 1 h at room temperature. Tissue sections were washed in TBS and incubated with biotinylated rabbit anti-goat IgG secondary antibodies (Sigma, 1/400) for 30 min before adding streptavidin–biotin horseradish peroxidase (SA-HRP, Sigma). After 30 min, samples were washed and specific staining was visualized using diaminobenzidine (DAB, Sigma) as a substrate. Tissue sections processed in the absence of primary antibodies were included as negative controls.

To analyse the phenotype and function of immune cells, lingual tissues removed from BALB/c mice were treated for 45 min at 37 °C with 400 U/mL collagenase type IV, 50 μg/mL DNAse I (Roche diagnostic, Mannheim, Germany) and 2 U/mL dispase (Invitrogen) in RPMI 1640. After blocking residual enzymatic activity with 5 mM EDTA in PBS, lingual tissues were dissociated in PBS. Cells were recovered and stained with various antibodies for 15 min at 4 °C as described above. Results were expressed as a mean percentage of positive cells±SD ($n = 3$), after subtracting background staining obtained with corresponding isotype-matched mAbs.

RNA isolation and real-time polymerase chain reaction analysis

Total RNA (RNeasy Mini kit, Qiagen) was isolated from 10^4 $CD4^+$ T cells purified by cell sorting from lingual tissues or spleen; cDNAs were synthesized using random hexamers (Taqman Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Real-time PCR analysis of IFNγ Mn00801778_m1), IL4 (Mn00445259_m1), IL10 (Mn00439616_m1), IL17 (Mn00439619_m1), TLR 1–7 (Mn00441868_s1; Mn00442346_m1; Mn00446577_g1; Mn00445274_m1; Mn00546288_s1; Mn00446590_m1, respectively) and TLR9 (Mn00446193_m1) gene expression was conducted with Predesigned TaqMan Gene Expression Assays and reagents (Applied Biosystems) according to the manufacturer's specifications, using a 7300 Real-time PCR system (Applied Biosystems). Forty cycles of amplification were performed as follows: 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s. Levels of mRNA for each gene were normalized to the amount of β-actin mRNA Mn00801778_m1), which is an appropriate reference gene to allow the quantification of cytokine gene expression in lingual T cells [see supporting information, table showing

the expression of various housekeeping genes i.e. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Mn999-99915_g1), β-microglobulin Mn00437762_m1)] and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT; Mn01324427_m1). For TLR gene expression, PCR products were visualized after electrophoresis on 1.5% agarose gels, using a transilluminator.

Functional characterization of lingual $CD4^+$ T cells

Both splenic and lingual T cells were stained at 4 °C for 15 min, with anti-CD3-APC, anti-CD4-PE and anti-CD103-FITC mAbs. $CD3^+CD4^+CD103^-$ and $CD3^+CD4^+CD103^+$ pure T cell populations were isolated with a MoFlo (Dako, Glostrup, Denmark) cell sorter. Cells within each subset were more than 99% pure, as confirmed by flow cytometry analysis.

For T cell activation, both $CD3^+CD4^+CD103^-$ and $CD3^+CD4^+CD103^+$ T cells sorted from spleen and lingual tissues (2×10^4/well) were stimulated using a combination of anti-CD3 and anti-CD28 (1 μg/mL, each) antibodies in RPMI 1640, supplemented with 10% foetal calf serum and antibiotics (all from invitrogen) in 96-well round-bottom plates. After 24 h, T cells were recovered for gene expression analysis.

For suppressive assays, naïve $CD4^+$ T cells were purified from spleens of DO11.10 mice and CFSE-labelled as previously described [13]. 2×10^4 of such CFSE-labelled OVA-specific $CD4^+$ T cells were co-cultured with each of the sorted $CD3^+CD4^+CD103^-$ and $CD3^+CD4^+CD103^+$ T cell populations in presence of murine BM-DCs and $OVA_{323-339}$ peptide (10 μg/mL) for 4 days using 1/2–1/8 (suppressive/responder) cell ratios. As a control, 2×10^4 CFSE-labelled OVA-specific $CD4^+$ T cells were cultured with or without the $OVA_{323-339}$ peptide (10 μg/mL) for 4 days. OVA-specific T cells were stained with the PE-KJ1.26 anti clonotypic mAb and proliferating cells were evaluated by fluorescence-activated cell sorter (FACS), based on a decrease in CFSE-associated fluorescence.

Results

Mapping and distribution of immune markers in lingual tissues from BALB/c mice

The phenotype and tissue distribution of immune cells was assessed by immunohistology in lingual tissues from naïve and OVA-sensitized BALB/c mice, using a panel of specific antibodies, as described in 'Materials and methods'. Frequencies of immune cells expressing a given marker were further evaluated in parallel from tissues digested by collagenase and dispase, after antibody staining and flow cytometry analysis. Staining in the absence of primary antibodies was always negative in those experiments (data not shown). Qualitative and quantitative results obtained in three independent experiments conducted in both naïve and sensitized animals are summarized in Table 1. Collectively, those results revealed the presence of APCs, pro-inflammatory cells and resident $CD3^+CD4^+$ T lymphocytes, as will be discussed below.

Identification of antigen presenting cells in lingual tissues from BALB/c mice

In agreement with our previous study [11], we detected surface markers associated with at least four subsets of APCs, including $CD207^+$ Langerhans cells, $120G8^+$ plasmacytoid DCs, as well as $CD11b^+CD11c^+$ and $CD11b^+CD11c^-$ myeloid APCs. While the three first subsets represent each <0.1% total cells, $CD11b^+CD11c^-$ cells (Fig. 1 and Table 1) are the most abundant APCs (representing 1.44±0.42% and 0.78±0.10% of total cells in naïve and OVA-sensitized mice, respectively, mean+SD, $n=3$). Furthermore, we also detected $F4/80^+$ macrophages located in submucosal tissues (Fig. 1 and Table 1). In contrast, follicular dendritic cells were missing, consistent with the absence of structured lymphoid tissues in the mouth of mice (Table 1). Although not shown, no further recruitment of such APCs was observed in tissue sections of naïve mice sublingually treated with the OVA protein for 4, 24 or 48 h.

Other surface markers classically associated with APCs, such as MHC-II (1.17±0.64% and 0.62±0.12% in naïve and OVA-sensitized mice, respectively, mean±SD, $n=3$) and CD86 (0.43±0.20% and 0.12±0.04% in naïve and OVA-sensitized mice, respectively, mean±SD, $n=3$) molecules were mostly detected on cells located in both ventral and dorsal tissue sections of the lingua, as well as along the lamina propria together with $CD11b^+$ APCs (Fig. 1 and Table 1). Other co-stimulatory molecules such as CD40 and CD80 were not detected by immunohistology in any of the tissue sections analysed (Table 1). Noteworthy, we did not detect any differences between dorsal and ventral sides of lingual tissues in term of distribution of those potential APCs (Table 1). Collectively, those results suggest that (i) lingual tissues contain multiple potential APCs, including LCs, myeloid and plasmacytoid DCs, together with macrophages, (ii) such cells do not express high levels of co-stimulatory molecules [11].

Characterization of pro-inflammatory and lymphoid cells in lingual tissues from BALB/c mice

Tissue sections stained with haematoxylin, eosin and safran revealed the presence of pro-inflammatory cells, i.e. eosinophils and mast cells (MCs), deep within submucosal tissues in naïve mice (Fig. 2a). The presence of MCs (0.65±0.35% and 0.48±0.29% in naïve and OVA-sensitized mice, respectively, mean±SD, $n=3$) and granulocytes (0.27±0.12% and 1.11±0.29% in naïve

Table 1. Mapping and distribution of cells expressing various markers in lingual tissues from naïve or OVA-sensitized mice

	Percentage of total cells		Distribution		
Markers	Naïve mice (%)	OVA-sensitized mice (%)	Mucosa/lamina propria (dorsal side)	Muscle	Mucosa/lamina propria (ventral side)
CMH-II	1.17±0.64	0.62±0.12	+	+	+
CD40	ND	ND	–	–	–
CD80	ND	ND	–	–	–
CD86	0.43±0.20	0.12±0.04	+	–	+
CD11b	1.44±0.42	0.78±0.10	+	+	+
CD11c	0.10±0.01	0.12±0.03	+	–	+
120G8	0.11±0.08	<0.1	+	–	+
CD205	<0.1	ND	+	–	+
CD207	<0.1	ND	+	–	+
F4/80	0.15±0.07	0.20±0.10	–	+	–
FDC	ND	ND	–	–	–
GR-1	0.27±0.12	1.11±0.29*	–	+	–
CD117	0.65±0.35	0.48±0.29*	–	+	–
CD3	0.23±0.15	0.11±0.04	+	–	+
CD4	0.20±0.08	0.11±0.04	+	–	+
CD8	ND	ND	–	–	–
γδ TCR	ND	ND	–	–	–
CD19	ND	ND	–	–	–
CD103	<0.1	0.11±0.04	+	–	+
CD49b	ND	ND	–	–	–

Both dorsal/ventral and muscle tissue sections of the tongue of BALB/c mice were analyzed by immunohistology, using a panel of specific antibodies, as described in methods. Frequencies of immune cells expressing a given marker were evaluated by flow cytometry and expressed as mean percentages of total cells±SD, out of three independent experiments conducted in both naïve and sensitized animals. ND = not detected. For distribution, results are expressed as presence (+) or absence (–) of cells expressing a given marker depending upon tongue area. *Refer to cells located in muscular tissue but also close to the mucosal/submucosal interface.

and OVA-sensitized mice, respectively, mean±SD, $n = 3$) in muscular tissues was confirmed using anti-CD117 and anti-GR-1 antibodies, respectively (Fig. 2b and Table 1). Beyond the noticeable influx of GR-1^+ granulocytes in OVA-sensitized mice, such pro-inflammatory cells were also found closer to the mucosal/submucosal interface when compared with naïve animals (Table 1).

We failed to detect B lymphocytes ($CD19^+$) in lingual tissues. Also, no natural killer ($CD49b^+$), γ/δ nor $CD8^+$ cells were detected by immunohistology (Table 1). In contrast, we detected $CD4^+$ T cells (0.20±0.08% and 0.11±0.04% in naïve and OVA-sensitized mice, respectively, mean+SD, $n = 3$) in lingual tissues (Fig. 3a, right panels and Table 1), using spleen cells as positive controls (Fig. 3a; left panels). Interestingly, lingual $CD4^+$ T cells are predominantly located along the lamina propria, i.e. in close vicinity with APCs (Fig. 3a). Such cells were confirmed by cytofluorometry to express CD25, CD44 (high), CD45RB (low), CD62L (low), CD69, as well as for 25% of them, the αEβ7 integrin CD103 acting as a mucosal addressing receptor (Figs 3a and b). In addition, $Foxp3^+$ cells were not detected by FACS nor by immunochemistry (data not shown), suggesting that natural regulatory T cells are not present in significant amounts in lingual tissues.

Resident lingual $CD4^+$ T cells exhibit both regulatory and effector properties

We further characterized resident $CD4^+$ T cells (both $CD103^-$ and $CD103^+$) from lingual tissues in comparison with their splenic counterparts. Among TLR genes, TLR2 and TLR4 were significantly expressed in all subsets, most particularly in $CD4^+CD103^+$ T cells (Fig. 4). The presence of those receptors at the cell surface was confirmed by cytofluorometry (data not shown). $CD4^+$ T cells were sorted from corresponding tissues and tested in parallel for their potential regulatory activity, using a third party T cell suppressive assay. As shown in Fig. 5, both $CD4^+CD103^-$ and $CD4^+CD103^+$ T cell subsets exhibit a suppressive activity (Fig. 5). No quantitative differences are observed in this regard between T cells obtained from the spleen or lingual tissues. Although not shown, triggering TLR2 or TLR4 (using Pam3CSK4 or LPS, respectively) did not further enhance T cell suppression in this *in vitro* assay. Patterns of cytokine expression were also analysed in both $CD103^+$ and $CD103^-$ lingual $CD4^+$ T cells after polyclonal activation in five independent experiments (Fig. 6). As their splenic counterparts, the two subsets of resident lingual $CD4^+$ T cells express IFNγ, IL4 and IL17

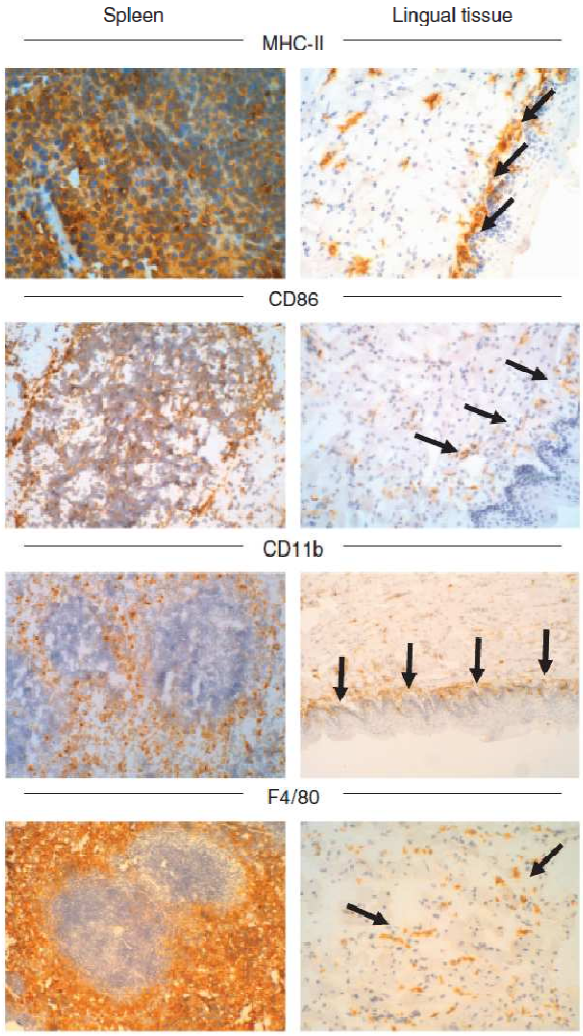


Fig. 1. APC subsets in lingual tissues. For immunohistology analysis, spleen and lingual tissues from naïve BALB/c mice were frozen, processed as described in 'Materials and methods' and stained with the following specific antibodies: anti-MHC-II, anti-CD86, CD11b and anti-F4/80. Tissue sections from spleen were used as positive controls. Arrows indicate the localization of positive cells (magnification ×100). Data are representative of three independent experiments.

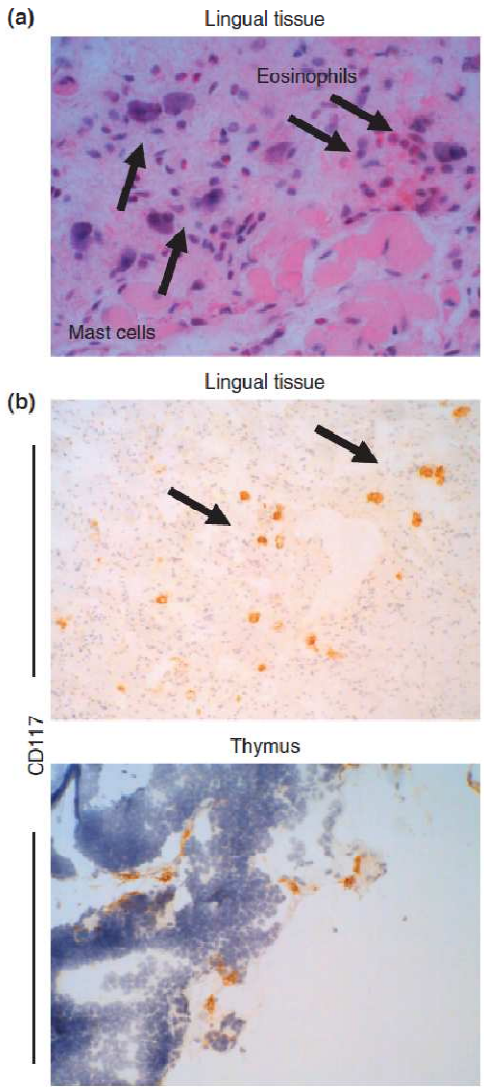


Fig. 2. Pro-inflammatory cells in lingual tissues. (a) Representative lingual tissue sections embedded in paraffin and stained with HES are shown. (b) For immunohistology analysis, thymus and lingual tissues from naïve BALB/c mice were frozen, processed as described in methods and stained with a specific anti-CD117 antibody. Tissue sections from thymus were used as positive controls. Arrows indicate the localization of positive cells (magnification ×100). Data are representative of three independent experiments.

genes following activation (Fig. 6) suggesting that they both contain cells mediating effector functions associated with Th1, Th2 and Th17 polarization. The functional relevance of quantitative differences in patterns of cytokines (e.g. IL4, IL10) elicited in $CD103^+$ and $CD103^-$ lingual $CD4^+$ T cells remains unclear.

Discussion

Successful allergen-specific immunotherapy down-regulates established Th2 responses [14, 15] together with the induction of Th1 [16–26], as well as IL10 producing regulatory T cells [27–30]. Nonetheless, immune mechanisms underlying SLIT remain to be fully elucidated, most particularly at the site of allergen(s) administration. Specifically, one issue to improve current vaccination protocols is to better target the allergen to appropriate APCs in order to enhance tolerance induction, while limiting exposure to pro-inflammatory cells, including MCs and effector T cells. All APCs described thus far in the oral mucosa of mice and human, including LCs, myeloid and

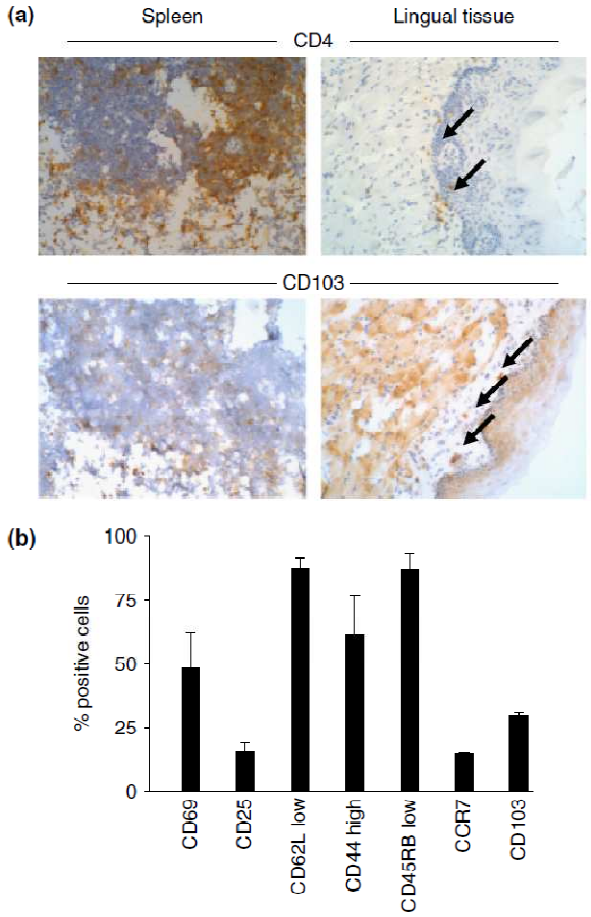


Fig. 3. Phenotype of lingual $CD4^+$ T cells. (a) For immunohistology analysis, spleen and lingual tissues from naïve BALB/c mice were frozen, processed as described in 'Materials and methods' and stained with anti-CD4 (upper panels) or anti-CD103 (lower panels) (magnification ×100). (b) For fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, lingual tissues from naïve mice were processed as described in methods. Cells were stained with anti-CD4-PE and anti-CCR7-FITC, anti-anti-CD25-FITC, anti-CD44-FITC, anti-CD45RB-FITC, anti-CD62L-FITC, CD69-FITC, or anti-CD103-FITC mAbs. After washing, cells were analysed by FACS. Using isotype matched antibodies, background was subtracted. Results are shown as the mean percentage of positive cells for specific markers±SD, $n = 3$ (FITC, fluorescein isothiocyanate).

plasmacytoid DCs, exhibit tolerogenic properties [9–11]. Specifically, such APCs drive naïve T cells to produce IFNγ and/or IL-10. Also, cross-linking of high affinity receptors for IgE (FcεRI) on human LCs induces the expression of regulatory cytokines such as TGFβ or IL-10 [9, 31]. Whereas the oral immune system appears to be prone to elicit antigen-specific tolerance due to the peculiar biology of resident APCs, the presence of pro-inflammatory immune cells remains to be characterized.

Herein, we undertook a detailed characterization of dorsal/ventral lingual immune cells in naïve BALB/c mice.

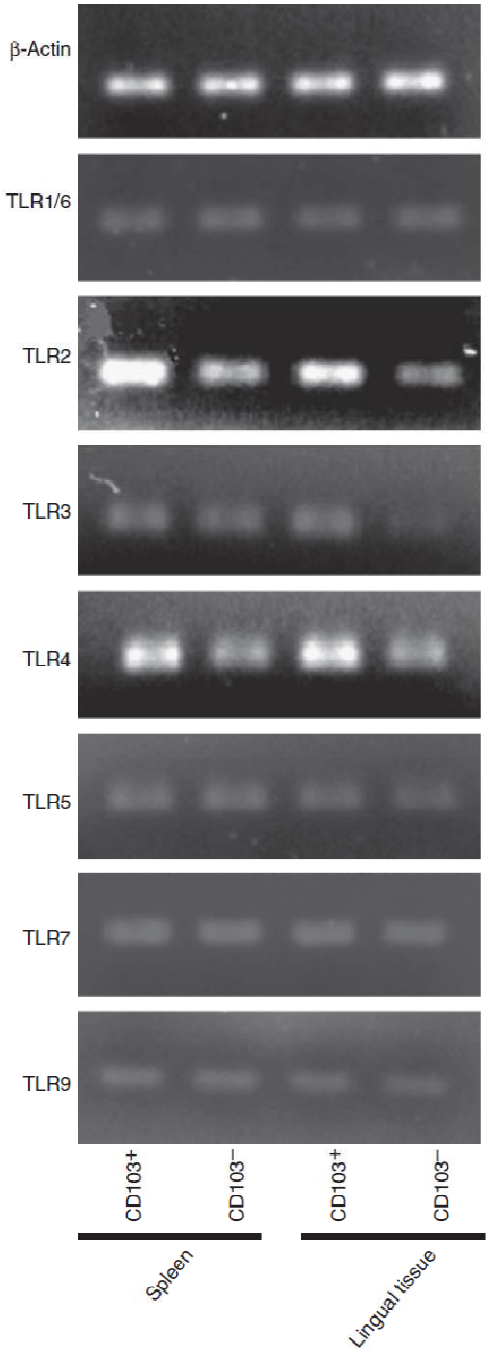


Fig. 4. TLR expression by lingual $CD4^+$ T cells. After sorting of $CD3^+CD4^+CD103^-$ or $CD3^+CD4^+CD103^+$ T cells from BALB/c mice (spleen and lingual tissues) and RNA extraction, PCR was performed with probes specific for either TLR1/6, 2, 3, 4, 5, 7, 9 or β-actin as described in methods. Amplified cDNAs were resolved by agarose gel electrophoresis, and images were collected using a transilluminator. β-Actin was used as an internal standard to assess the quality and quantity of mRNA preparation.

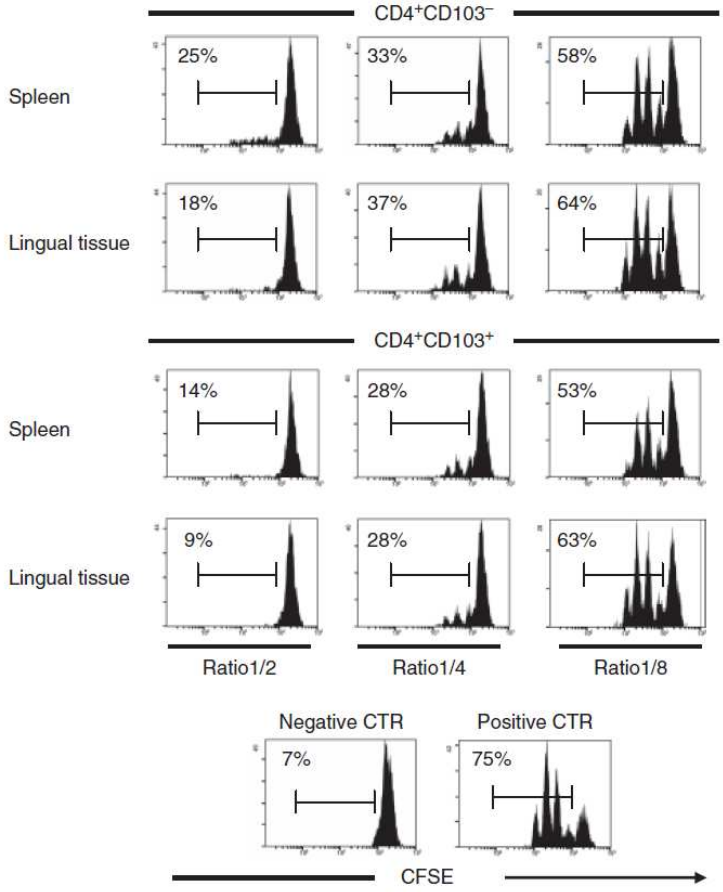


Fig. 5. Suppressive capacity of lingual $CD4^+$ T cells. Sorted splenic and lingual $CD3^+CD4^+CD103^-$ or $CD3^+CD4^+CD103^+$ T cells from DO11.10 mice were cultured with naïve CFSE-labeled ovalbumin (OVA)-specific $CD4^+$ T cells in the presence of murine BM-DCs and the $OVA_{323-339}$ peptide (10 μg/mL) for 4 days. Ratios (suppressive/responder cells) between 1/2 and 1/8 have been tested. As controls, 2×10^4 CFSE-labelled OVA-specific $CD4^+$ T cells were cultured with or without the $OVA_{323-339}$ peptide (10 μg/mL) for 4 days. After staining with the PE-KJ1.26 anti clonotypic mAb, proliferating cells were evaluated by FACS based on a decrease in CFSE-associated fluorescence. CTR, control.

We detected pro-inflammatory cells, i.e. MCs and eosinophils, which are located in submucosal tissues, in agreement with previous studies conducted in humans [32, 33]. One inference is that in the absence of mucosal effraction, allergen contact with such cells should be limited after SLIT. In line with our previous study we confirmed the presence of several subsets of APCs, located at the mucosal/submucosal junction, likely involved in antigen capture during SLIT [11]. These APCs include myeloid $CD11b^+CD11c^-$, $CD11b^+CD11c^+$, with a semi-mature phenotype ($CD40^-CD80^-CD86^+$), consistent with their tolerogenic function [34, 35]. In addition, we further detected in submucosal tissues plasmacytoid dendritic cells but also $F4/80^+$ macrophages, whose potential APC function is currently under investigation.

Although we did not see any significant differences in immune cell distribution in mice depending upon the site, Allam et al. [33] reported such differences in humans in terms of distribution of LCs and MCs within the oral cavity, with the vestibular region identified as the most favourable site for allergen application during SLIT, given its high LC and low MC density.

No B, NK, NK-T, γδ or $CD8^+$ cells were detected in lingual tissues from naïve BALB/c mice, establishing that they are not prime effectors in tolerance induction via the sublingual route. Interestingly, resident mucosal $CD4^+$ T cells were found along the lamina propria, i.e. in the vicinity of the main subset of $CD11b^+$ oral APCs, suggesting that such T cells may initiate adaptive immune responses to antigens. Such T cells exhibit an effector/memory phenotype (CD44 high, CD45RB low, CD62L low and $CD69^+$). Also, they express the αEβ7 integrin CD103, a mucosal homing receptor proposed by others as a marker for regulatory $CD4^+$ T cells [36, 37]. Interestingly, TLR2 and TLR4 genes are significantly expressed in both $CD103^+$ and $CD103^-$ T cells suggesting that appropriate

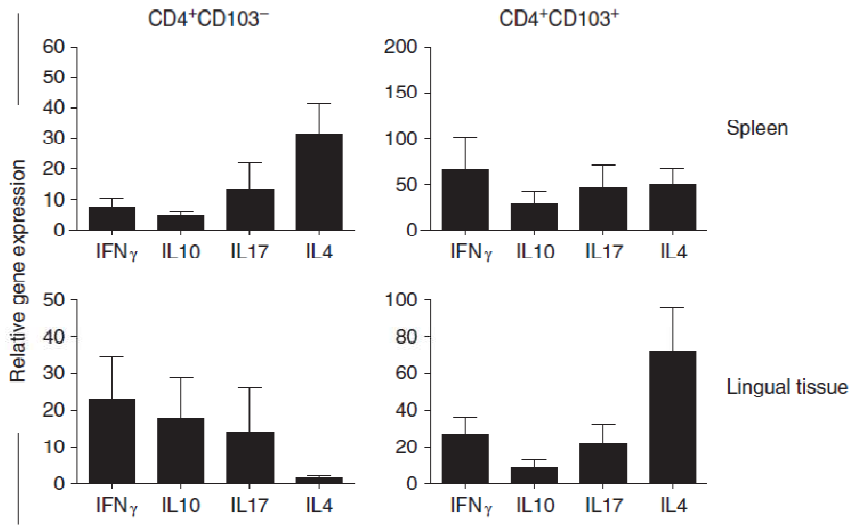


Fig. 6. Cytokine expression profile of activated lingual $CD4^+$ T cells. Sorted splenic and lingual $CD3^+CD4^+CD103^-$ or $CD3^+CD4^+CD103^+$ T cells were activated with a combination of anti-CD3 and CD28 antibodies (1 μg/mL each) for 24 h. Cytokine gene expression profiles were analysed in T cell subsets by RT-PCR using probes specific for IFNγ, IL4, IL10, IL17 and β-actin as described in methods. The expression level of inactivated T cells was arbitrarily set to 1 and data are represented as fold increase±SD ($n = 5$) in activated relative to inactivated T cells.

targeting of those receptors (e.g. with an adjuvant) might modulate the properties of such T cells. We confirmed that lingual resident $CD4^+$ T cells exhibit a regulatory T cell activity, although no differences were found in this regard between $CD103^-$ and $CD103^+$ cells. Interestingly, this organization is reminiscent of another critical site for tolerance induction, namely the intestinal mucosa, with $CD11b^+$ APCs similarly co-localized with $CD4^+$ T cells along the lamina propria [38].

Whereas the default pathway for oral immune responses to antigen seems to be tolerance induction [11, 39, 40], we confirm that the oral immune system also comprises local effector mechanisms. Following polyclonal activation of both $CD103^+$ and $CD103^-$ T cells, cytokine genes associated with Th1, Th2 and Th17 patterns of polarization are induced. In agreement with our observation, recent data emphasize that the oral immune system retains the capacity to promote effector responses [41]. In particular, sublingual administration of inactivated influenza viruses induces specific cytotoxic T lymphocytes as well as mucosal antibody responses [41, 42]. Appropriate targeting of oral immune cells using a mucosal adjuvant, i.e. mCTA-LTB, further enhances those responses, resulting in a complete protection against respiratory viral challenge [41, 42]. Furthermore, resident IL17-producing T cells were recently confirmed to be critical in protecting against oropharyngeal candidiasis [43].

Given such a dual capacity of the lingual immune system, appropriate signalling to APCs, e.g. with adjuvants [13, 44, 45] is needed to promote tolerance over inflammation in the course of allergen-specific immunotherapy.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Jean-Michel Caillaud for performing immunohistology studies.

A declaration of all sources of funding: This study was funded by Stallergènes. Several co-authors are currently employed by Stallergènes SA (L. M., V. L., A. Z., S. T., L. V. O., P. M.).

References

1 Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60:4–12.

2 Passalacqua G, Guerra L, Pasquali M, Lombardi C, Canonica GW. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93:3–12; quiz 12–3, 103.

3 Pajno GB, Peroni DG, Vita D *et al.* Safety of sublingual immunotherapy in children with asthma. *Paediatr Drugs* 2003; 5: 777–81.

4 Penagos M, Compalati E, Tarantini F *et al.* Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97:141–8.

5 Mascarell L, Van Overtvelt L, Moingeon P. Novel ways for immune intervention in immunotherapy: mucosal allergy vaccines. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26:283–306, vii–viii.

6 Dahl R, Kapp A, Colombo G *et al.* Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:434–40.
7 Didier A, Malling HJ, Worm M *et al.* Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1338–45.
8 Moingeon P, Batard T, Fadel R *et al.* Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61: 151–65.
9 Allam JP, Novak N, Fuchs C *et al.* Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:141–8.
10 Allam JP, Peng WM, Appel T *et al.* Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:368–74.
11 Mascarell L, Lombardi V, Louise A *et al.* Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 603–9.
12 Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+ CD8+ TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 1990; 250:1720–3.
13 Mascarell L, Van Overtvelt L, Lombardi V *et al.* A synthetic triacylated pseudo-dipeptide molecule promotes Th1/TReg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. *Vaccine* 2007; 26:108–18.
14 Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:157–64.
15 El Biaze M, Boniface S, Koscher V *et al.* T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003; 58:844–53.
16 Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A *et al.* Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14:216–21.
17 Mavroleon G. Restoration of cytokine imbalance by immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:917–20.
18 Hamid QA, Schotman E, Jacobson MR, Walker SM, Durham SR. Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 254–60.
19 Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P *et al.* The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:468–75.
20 Ebner C, Siemann U, Bohle B *et al.* Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:1007–15.
21 Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178:2123–30.
22 Laaksonen K, Junikka M, Lahesmaa R, Terho EO, Savolainen J. In vitro allergen-induced mRNA expression of signaling lymphocytic activation molecule by PBMC of patients with allergic rhinitis is increased during specific pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:1171–7.
23 Meissner N, Kochs S, Coutelle J *et al.* Modified T-cell activation pattern during specific immunotherapy (SIT) in cat-allergic patients. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:618–25.
24 Majori M, Caminati A, Corradi M *et al.* T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:341–7.
25 Gabrielsson S, Soderlund A, Paulie S *et al.* Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen-specific IL-4- and IL-13-producing cells during pollen season. *Allergy* 2001; 56: 293–300.
26 Norman PS. Immunotherapy 1999–2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1013–23.
27 Jutel M, Akdis M, Budak F *et al.* IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33:1205–14.
28 Gardner LM, Thien FC, Douglass JA, Rolland JM, O'Hehir RE. Induction of T 'regulatory' cells by standardized house dust mite immunotherapy an increase in CD4+ CD25+ interleukin-10+ T cells expressing peripheral tissue trafficking markers. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1209–19.
29 Taylor A, Verhagen J, Akdis CA, Akdis M. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135:73–82.
30 Ciprandi G, Fenoglio D, Cirillo I *et al.* Induction of interleukin 10 by sublingual immunotherapy for house dust mites: a preliminary report. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 95:38–44.
31 Novak N, Bieber T, Katoh N. Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167: 797–804.
32 Marcucci F, Sensi L, Incorvaia C *et al.* Oral reactions to sublingual immunotherapy: a bioptic study. *Allergy* 2007; 62:1475–7.
33 Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N *et al.* Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? *Allergy* 2008; 63:720–7.
34 Steinman RM, Hawiger D, Liu K *et al.* Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann NY Acad Sci* 2003; 987:15–25.
35 Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001; 194:769–79.
36 Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD4+ CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. *J Immunol* 2005; 174:5444–55.
37 Allakhverdi Z, Fitzpatrick D, Boisvert A *et al.* Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1342–9.
38 Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007; 8:1086–94.
39 Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999; 190: 229–39.

40 Sun JB, Flach CF, Czerkinsky C, Holmgren J. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J Immunol* 2008; 181:8278–87.
41 Cuburu N, Kweon MN, Song JH *et al*. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007; 25:8598–610.
42 Song JH, Nguyen HH, Cuburu N *et al*. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:1644–9.
43 Conti HR, Shen F, Nayyar N *et al*. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009; 206:299–311.
44 Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S *et al*. Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:1819–29.
45 Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A *et al*. IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145:152–62.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Relative quantity of mRNAs corresponding to each housekeeping genes normalized to distinct potential endogenous controls (Mean of RQ±SD in activated versus non activated CD4+ CD103− and CD4+ CD103+ T cells from lingual tissues).

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Induction of allergen-specific tolerance via mucosal routes

L. Mascarell, **A. Zimmer**, L. Van Overtvelt, S. Tourdot, P. Moingeon

Current topics in microbiology and immunology, sous presse

Induction of Allergen-Specific Tolerance via Mucosal Routes

Laurent Mascarell, Aline Zimmer, Laurence Van Overtvelt, Sophie Tourdot and Philippe Moingeon

Abstract Allergen-specific immunotherapy is the only curative treatment of allergies against insect venom, house dust mites, tree/grass pollens, or cat dander. Subcutaneous immunotherapy is successful to reorient the immune system and re-establish long-term tolerance. However, major drawbacks for using this route include: repeated injections, as well as the risk of anaphylaxis. In this context, alternative mucosal routes of administration are being considered together with the combined use of adjuvants/vector systems and recombinant allergens or peptide fragments. Herein, we review the current status in the use of mucosal routes (i.e., sublingual, oral, intranasal) for allergen-specific immunotherapy, as well the latest understanding with respect to underlying mechanisms of action.

L. Mascarell · A. Zimmer · L. Van Overtvelt · S. Tourdot · P. Moingeon (✉)
Research and Development, Stallergènes, 6 rue Alexis de Tocqueville,
92160 Antony, France
e-mail: pmoingeon@stallergenes.fr

L. Mascarell
e-mail: lmascarell@stallergenes.fr

A. Zimmer
e-mail: azimmer@stallergenes.fr

L. Van Overtvelt
e-mail: lvanovertvelt@stallergenes.fr

S. Tourdot
e-mail: stourdot@stallergenes.fr

Current Topics in Microbiology and Immunology
DOI: 10.1007/82_2011_132
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011

UNCORRECTED PROOF

Contents

1 Introduction
2 Tolerance Induction by Mucosal Immunotherapy
2.1 General Comments
2.2 Intranasal Immunotherapy
2.3 Oral Immunotherapy
2.4 Sublingual Immunotherapy
3 Interest in Adjuvants and Vector Systems for Mucosal Immunization
4 Conclusions
References

UNCORRECTED PROOF

1 Introduction

The first successful studies of allergen-immunotherapy were conducted in patients with hay fever in 1911, by Noon et al. As of today, many double blind, placebo-controlled (DBPC) studies have shown that subcutaneous allergen-specific immunotherapy (SCIT) is effective in decreasing both immediate and late-phase symptoms as well as the need for medication, when applied to a variety of type I allergies involving either insect venom, house dust mites, grass and tree pollens, or animal epithelia (Bousquet et al. 1998; Larche 2000; Gehlhar et al. 1999; Michils et al. 1998; Pichler and Pichler 2001; Moller et al. 2002; Powell et al. 2007). In terms of mechanisms, successful SCIT is often associated with a decrease in seric allergen-specific IgE antibodies together with an increase in IgG4, including potential blocking antibodies (Wachholz 2003; Pierson-Mullany et al. 2000). Successful SCIT redirects allergen-specific Th2 $CD4^+$ cells (producing IL4, IL5, and IL13) (Durham and Till 1998; El Biaze et al. 2003) toward the Th1 type (secreting IL12/IFNγ) (Mavroleon 1998; Hamid et al. 1997; Benjaponpitak et al. 1999; Ebner et al. 1997; Secrist et al. 1993). In addition, SCIT promotes allergen-specific $CD4^+$ regulatory T cells (i.e., IL10-producing Tr1 or $CD4^+CD25^+$ cells) (Robinson et al. 2004; Meiler et al. 2008). Several drawbacks currently limit the application of SCIT. First of all, repeated injections make this treatment cumbersome, most particularly for children. In addition, systemic reactions to SCIT, albeit infrequent, may occur, which include anaphylactic shocks (Medicines 1986). In this context, tolerance induction via non-invasive mucosal routes has raised considerable interest over the last two decades. Also, various non-mutually exclusive immune mechanisms have been discovered including (i) the development of active suppression via regulatory T cells, (ii) the inhibition of inappropriate immune responses through cellular anergy or clonal deletion, (iii) the generation of blocking antibodies (Faria and Weiner 2005; 2006a, b).

Herein, we review the pertinence of various mucosal routes (i.e., nasal, oral, and sublingual) of allergen administration as alternatives to SCIT. Out of these mucosal routes, only the sublingual one has clearly been documented as

efficacious for establishing antigen-specific tolerance in humans, in the context of large double blind placebo-controlled (DBPC) clinical studies conducted both in adults and children. Immune mechanisms associated with successful specific mucosal immunotherapy are discussed in the context of new strategies based on vectors/adjuvant molecules in order to better target antigen-presenting cells with tolerogenic capacity.

2 Tolerance Induction by Mucosal Immunotherapy

2.1 General Comments

Increasing evidence suggests that dendritic cells (DCs) play a crucial role in the regulation of mucosal immunity and tolerance, as a consequence of their capacity to direct the fate of T cells. The physiology of mucosal APCs, most particularly their capacity to support the differentiation of regulatory T cells, likely explains why the default response is usually tolerogenic at mucosal surfaces. The level of costimulatory molecules as well as the cytokine milieu influence the degree of antigen-presenting cell (APC) maturation and activation, leading to systemic or suppressive T cell responses (MacPherson et al. 2004). In most circumstances, mature DCs (mDCs) trigger specific effector T cells, whereas immature or semi-mature DCs (iDCs or smDCs) rather induce regulatory T cells, clonal deletion or hypo responsiveness (Steinman et al. 2003; Hawiger et al. 2001). Most particularly, iDCs continuously capture, transport, and present self-antigens as well as micro-environmental proteins from mucosal tissues to lymphoid organs to maintain tolerance (Pugh et al. 1983; Liu et al. 1998; Huang et al. 2000). Recent studies suggest that IL10-producing iDCs prime immunological tolerance through $Tr1^+$ regulatory T cells in both mice and humans (Jonuleit et al. 2000; Menges et al. 2002).

APCs from the lamina propria of the small intestine, including $CD11b^+CD11c^+$ DCs and $CD11b^+F4/80^+CD11c^-$ macrophages, promote the development of extrathymic $Foxp3^+$ Treg due to the presence of TGFβ and retinoic acid (RA), i.e., a vitamin A metabolite highly expressed in gut-associated lymphoid tissue (GALT) (Sun et al. 2007; Denning et al. 2007). Together, these data demonstrate that the intestinal immune system has evolved to promote tolerance over inflammation. Although the oral immune system is prone as well to induce specific tolerance (Iwasaki and Kelsall 1999; Mascarell et al. 2008; Sun et al. 2008), it also comprises local effector mechanisms in the form of resident mucosal $CD4^+$ T cells able to promote Th1, Th2 and Th17 patterns of polarization upon polyclonal activation (Mascarell et al. 2009). In agreement with these observations, recent data further demonstrate that the oral immune system retains the capacity to promote protective Th1 effector responses in draining lymph nodes (Cuburu et al. 2007; Song et al. 2008), and that IL17 producing $CD4^+$ T cells are found within the oral cavity (Conti et al. 2009).

UNCORRECTED PROOF

2.2 Intranasal Immunotherapy

Biodistribution studies in humans of radiolabeled *Parietaria judaica* allergen (Par j 1) following intranasal administration suggest that the allergen quickly disappears from the nasal cavity, is transported to the pharynx, and then absorbed through the gastrointestinal tract, reaching a plasmatic peak between 1.5 and 3 h after administration (Bagnasco et al. 1997; Passalacqua et al. 2005). Interestingly, nasal clearance is superior in allergic patients when compared to healthy volunteers, suggesting an IgE-mediated capture mechanism in Par j 1 sensitized patients.

Local nasal immunotherapy (LNIT) has been explored during the last three decades, with some encouraging results, both in terms of safety and efficacy in patients with allergic rhinitis (Canonica and Passalacqua 2003) (Table 1). Pioneer studies using either natural biological or chemically-modified (allergoid) forms demonstrated a significant reduction in both symptoms and requirement for symptomatic medication in patients allergic to ragweed and grass pollens (Deuschl and Johansson 1977; Nickelsen et al. 1981; Georgitis et al. 1983). However, no cumulative effect of LNIT could be confirmed, since the administration of allergoid grass extracts was ineffective in the second year of treatment (Nickelsen et al. 1983). In addition, macronized powder forms of pollens (e.g., parietaria, birch, and grass) or mites as well as strips coated with mite extracts have been used in LNIT and shown to improve clinical efficacy, while reducing local side effects in patients with rhinitis (Andri et al. 1992, 1993, 1996; D'Amato et al. 1995; Andri and Senna 1995; Bellussi et al. 2002; Tsai et al. 2009). Some clinical studies suggested a long lasting protective effect (i.e., up to three or four years after the end of the treatment), most particularly on nasal symptoms (Passalacqua et al. 1997; Andri and Falagiani 2003). Adverse effects were rarely observed (Georgitis et al. 1983) and were limited to the upper respiratory tract (Andri et al. 1992).

Regarding immunological changes associated in humans with LNIT, some studies have shown an increase in serum or nasal IgE, IgG, and IgA antibodies, (Deuschl and Johansson 1977; Georgitis et al. 1983; Nickelsen et al. 1981), whereas others failed to detect any differences in antibody responses (D'Amato et al. 1995). Locally, a reduction of inflammatory cellular infiltrates together with a decrease in histamine and eosinophil cationic protein (ECP) levels in nasal secretions have been observed (Passalacqua et al. 1997; Andri and Falagiani 2003).

To further decipher immune mechanisms associated with intranasal immunotherapy, murine models of established asthma have been developed using prophylactic or therapeutic intranasal treatment with either allergen extracts (from pollen or mite), purified/recombinant major allergens (Bet v 1, Der p 1) or polypeptide fragments (Bet v 1, Phl p 1, and Phl p 5) alone or together with an adjuvant (CpG-ODN, Flagelin, fungal immunomodulatory protein) or a vector system such as probiotics (e.g., *Lactobacillus plantarum*). In those pre-clinical models, LNIT reduced both airway hyperresponsiveness (AHR), cellular infiltration in lungs, specific seric IgE, the IgG1/IgG2a antibody ratio, and IL5 production in T cells.

UNCORRECTED PROOF

Table 1 Comparative properties of mucosal immunization routes

Route of immunization	Allergens	Comments	References
Local nasal immunotherapy (LNIT)	Pollens (ragweed, grasses, parietaria, birch), house dust mites	Clinical efficacy: Local nasal immunotherapy (LNIT) is safe and induces a reduction in both symptoms and medication scores in patients with allergic rhinitis to house dust mite (HDM) and pollens (tree and grass). Chemically modified allergens (allergoids) are better-tolerated than aqueous extracts, but the therapeutic benefit is decreased. Some studies demonstrate a long lasting protective effect on nasal symptoms (grass allergy; three to four years after the end of the treatment). Nevertheless, LNIT requires technical skills to control the dose administered, thus impeding its large utilization in allergen-specific immunotherapy	Canonica and Passalacqua (2003); Deuschl and Johansson (1977); Nickelsen et al. (1981, 1983); Georgitis et al. (1983); Andri et al. (1992, 1993, 1996); D'Amato et al. (1995); Andri and Senna (1995); Bellussi et al. (2002); Tsai et al. (2009); Passalacqua et al. (1997); Andri and Falagiani (2003)
	Used as: natural extracts, allergoids, macronized powder forms, strips coated extracts	Immune mechanisms: *Antibody responses*: LNIT with aqueous extracts or allergoids (ragweed and grass) is associated with an increase in seric or nasal allergen-specific IgA, IgE, and IgG antibodies.	Deuschl and Johansson (1977); Georgitis et al. (1983); D'Amato et al. (1995); Nickelsen et al. (1981)
		Cellular responses: Successful LNIT to parietaria significantly reduces cellular infiltration as well as histamine and eosinophil cationic protein (ECP) nasal secretion	Passalacqua et al. (1997); Andri and Falagiani (2003)
		Pre-clinical models and candidate vaccines: In murine models of established asthma, prophylactic or therapeutic intranasal treatments with either allergen extracts (pollen, mite), purified/recombinant major allergen (i.e., Bet v 1, Der p 1) or polypeptide fragments (i.e., rBet v 1, rPhl p 1, and rPhl p 5) alone or together with an immunopotentiator (CpG-ODN, Flagelin, fungal immunomodulatory protein, *Lactobacillus plantarum*) decrease the Th2 polarization (i.e., reduced AHR, cellular infiltration, seric IgE, IgG1/IgG2a ratio, and IL5 production) together with an increased expression of IgA in saliva or TGFβ, IL10, and Foxp3 in $CD4^+$ T cells	Liu and Tsai (2005); Daniel et al. (2006); Hisbergues et al. (2007); Robinson et al. (2004); Lee et al. (2008); Hufnagl et al. (2008); Winkler et al. (2006)

(continued)

UNCORRECTED PROOF

Table 1 (continued)

Route of immunization	Allergens	Comments	References
Oral immunotherapy (OIT)	Pollens (ragweed, grasses, artemisia, birch), house dust mites, food allergens (milk, egg), autoimmune disease related antigen (type I diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, uveitis, and thyroiditis)	Clinical efficacy: Grass pollen OIT (low or high doses) is ineffective in terms of therapeutic effects, whereas OIT with birch, ragweed, artemisia pollens or HDM extracts (high doses) reduces asthma/rhinitis symptoms both in adults and children	Rebien et al. (1982); Taudorf and Weeke (1983); Mosbech et al. (1987); Urbanek et al. (1990); Taudorf et al. (1987, 1989); Moller et al. (1986); Leng et al. (1990); Litwin et al. (1997); Giovane et al. (1994); Meglio et al. (2004, 2008)
		In OIT with food allergen, children received increasing doses of milk or egg which re-install tolerance toward the allergens in most cases. One placebo-controlled study of OIT for cow's milk and egg allergies does not report an enhanced tolerance recovery. A major drawback of those studies is that they report outcomes in small cohorts of patients often lacking a control group to analyze spontaneous improvement	Buchanan et al. (2007); Staden et al. (2007); Longo et al. (2008)
		OIT for autoimmune diseases has been tested in humans using antigenic peptides or purified/recombinant proteins but failed to demonstrate significant effects over the placebo group	Faria and Weiner (2006)
	Used as: natural extract in aqueous, freeze-dried, powder forms, enterosoluble capsules	Immune mechanisms: *Antibody responses*: OIT with grass pollen allergen extracts does not alter humoral (IgE, IgG) responses. OIT with birch, ragweed, artemisia pollens, or mites extracts decreases seric IgE and up-regulates seric IgG1/IgG4 antibodies in allergic patients (adults and children)	Rebien et al. (1982); Taudorf and Weeke (1983); Taudorf et al. (1987); Moller et al. (1986); Taudorf et al. (1989); Leng et al. (1990); Litwin et al. (1997); Giovane et al. (1994)
		Successful OIT as well as spontaneous re-establishment of oral tolerance to cow's milk or egg allergens are associated with an increase in specific IgG4 and a reduction of food-specific IgE antibody levels	Burks et al. (2008); Staden et al. (2007); Longo et al. (2008); Patriarca et al. (2003); Skripak et al. (2008)

(continued)

UNCORRECTED PROOF

Table 1 (continued)

Route of immunization	Allergens	Comments	References
		Cellular responses: No changes in histamine secretion by basophils following OIT with grass pollen allergen extracts. In the absence of clinical effect, TGFβ-producing Th3 regulatory cells were induced in patients treated for diabetes or multiple sclerosis	Faria and Weiner (2006); Taudorf and Weeke (1983)
		Pre-clinical models and candidate vaccines: Experimental animal models of autoimmune diseases show that $CD4^+$ regulatory T cells involved in oral tolerance induction are highly heterogeneous and include Th3 cells (producing TGFβ and/or IL10), Tr1 cells (producing IL10) and $CD4^+$ $CD25^+$ cells secreting TGFβ or mediating their suppressive function through CTLA-4, PD-1, or latency-associated peptide (LAP) molecules. For example, oral administration of antigen coupled with non toxic cholera toxin B subunit (CTB) as a mucosal adjuvant promotes peripheral tolerance induction through the induction of both $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ and $CD4^+$ $Foxp3^-$ LAP^+ $TGFb^+$ regulatory T cells	Faria and Weiner (2006); Sun et al. (2008); Nakamura et al. (2001); Oida et al. (2003); Chen et al. (2008)
Sublingual immunotherapy (SLIT)	Venoms, pollens (ragweed, birch, grasses, parietaria, olive), house dust mites	Clinical efficacy: SLIT is efficient in treating type I allergies to either house dust mites or pollens (from grass, parietaria, olive, ragweed, cupressus). It reduces both symptoms and medication requirements in adults and children. SLIT exhibits a favorable safety profile and long lasting effects in adults and children with rhinitis. SLIT using grass pollen or HDM sublingual tablets has shown a significant reduction in rhinitis symptoms together with an excellent safety profile in the context of large scale placebo-controlled phase III studies	Wilson et al. (2003); Khinchi et al. (2004); Wilson et al. (2005); Olaguibel and Alvarez Puebla (2005); Calamita et al. (2006); Penagos et al. (2006); Larenas-Linnemann (2009); Passalacqua et al. (2004); Pajno et al. (2003); Mascarell et al. (2006); Antunez et al. (2008); Baena-Cagnani et al. (2005); Fiocchi et al. (2005); Didier et al. (2006); Dahl et al. (2006); Ibanez et al. (2007); Dahl et al. (2008); Wahn et al. (2009); Didier et al. (2009); Horak et al. (2009); Malling et al. (2009)

(continued)

UNCORRECTED PROOF

Table 1 (continued)

Route of immunization	Allergens	Comments	References
	Used as: natural biological extracts, allergoids, tablets	Immune mechanisms: *Antibody responses*: SLIT enhances allergen-specific IgG4 antibodies while decreasing IgE antibodies. In some studies, allergen-specific IgA antibodies are induced	Mascarell et al. (2006); Bahceciler et al. (2005)
		Cellular responses: SLIT to grass pollen or HDM decreases ECP and tryptase nasal secretion. In some studies SLIT used against house dust mites, birch, and grass pollens elicit both Th1 and regulatory T cells (i.e., IL10-producing Tr1 or $Foxp3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$ cells) in peripheral blood or in the nasal mucosa	Meiler et al. (2008); Marcucci et al. (2003, 2001); Passalacqua et al. (1998); Jutel et al. (2003); Gardner et al. (2004); Taylor et al. (2004); Ciprandi et al. (2005); Bohle et al. (2007); Radulovic et al. (2008); Cosmi et al. (2006)
		Pre-clinical models and candidate vaccines: The lingual immune system is prone to induce specific tolerance since mucosal APCs including plasmacytoïd, $CD11b^{+}CD11c^{+}$ and $CD11b^{+}$ $CD11c^{-}$ DCs as well as Langerhans cells promote Th1/Treg responses in draining lymph nodes. Targeting lingual APCs with adjuvants (i.e., selected strains of Lactobacilli, Pam3CSK4, OM-294-BA-MP as well as immunosuppressive drugs e.g.,glucocorticoids plus vitamin D3) or with mucoadhesive particles (polysaccharidic core nanoparticles (PSC) or chitosan) as vector systems improve SLIT efficacy in a therapeutic murine model of asthma by inhibiting Th2 responses (reduction of AHR, lung inflammation, eosinophils in bronchoalveolar lavages, IL5, and IL13 production) while inducing IFNγ (Th1) and/or IL10 (Treg) producing T cells. In humans, the Th1 adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL) is currently under investigation in sublingual immunotherapy	Mascarell et al. (2008, 2007); Allam et al. (2003, 2008); Van Overtvelt et al. (2008); Lombardi et al. (2008); Razafindratsita et al. (2007); Saint-Lu et al. (2009)

UNCORRECTED PROOF

It also increased allergen-specific IgA in saliva and elicited IFNγ and IL10 production by circulating $CD4^+$ T cells (Liu and Tsai 2005; Daniel et al. 2006; Hisbergues et al. 2007; Mousavi et al. 2008; Lee et al. 2008; Hufnagl et al. 2008). In a murine model of birch pollen allergy, immunological tolerance to Bet v 1 correlated with an increased expression of both transforming growth factor-beta (TGFβ), and IL10, as well as the induction of $Foxp3^+CD4^+$ T cells, thus highlighting an active regulatory mechanism (Winkler et al. 2006).

Altogether, LNIT appears safe and efficient in treating allergic rhinitis linked with pollen and mite. As of today, however, LNIT efficacy has not yet been documented in the context of large clinical studies versus placebo. Also, nasal application of allergen extracts makes it difficult to control the exact dose administered to patients, thus currently limiting its broad use in allergen-specific immunotherapy.

2.3 Oral Immunotherapy

In the 1980s, oral immunotherapy (OIT) has been studied in both adults and children with pollen-induced allergic rhinitis (Rebien et al. 1982; Taudorf and Weeke 1983; Mosbech et al. 1987; Urbanek et al. 1990; Taudorf et al. 1987, 1989; Moller et al. 1986; Leng et al. 1990; Litwin et al. 1997) (Table 1). A number of these studies were performed with grass pollen allergens presented either as an aqueous solution, or as powder or enterosoluble forms (Rebien et al. 1982; Taudorf and Weeke 1983; Mosbech et al. 1987; Urbanek et al. 1990). Although OIT with grass pollen was well-tolerated, it has been shown to be clinically ineffective. In addition, no significant changes in seric allergen-specific IgG or IgE levels were detected in comparison to placebo (Rebien et al. 1982; Taudorf and Weeke 1983). Conversely, OIT with high doses of selected allergen aqueous extracts (e.g., *Dermatophagoides pteronyssinus or Artemisia*) (Leng et al. 1990; Giovane et al. 1994) or using encapsulated allergens (e.g., birch or ragweed pollens) (Taudorf et al. 1987, 1989; Moller et al. 1986; Litwin et al. 1997) showed evidence of safety and efficacy associated with a significant decrease in serum-specific IgE antibodies, and an upregulation of serum-specific IgG1/IgG4 antibody levels in allergic patients (adults and children).

OIT is currently being evaluated to re-establish the tolerance to dietary proteins in children who have developed food allergies, such as cow's milk and egg allergies (Burks et al. 2008). Several clinical studies have been conducted in children failing to outgrown those allergies with food allergens (Meglio et al. 2004, 2008; Buchanan et al. 2007; Staden et al. 2007; Longo et al. 2008). Due to the risk of severe reactions, desensitization protocols rely upon the administration of small incremental doses of the food allergen in order to reach amounts normally tolerated (from micrograms to milligrams to grams) followed by a food challenge at the end of the study protocol to evaluate efficacy. In a standardized OIT protocol applied to cow's milk allergy, desensitization was totally or partially successful in

UNCORRECTED PROOF

85% of cases with an acceptable safety profile (Meglio et al. 2004). In addition, a long lasting efficacy was observed for up to 4–5 years after the end of treatment (Meglio et al. 2008). Also, encouraging results were obtained in egg OIT (Buchanan et al. 2007). One limitation of those studies is that they rely upon small cohorts of patients, they often lack a control group and do not measure spontaneous outgrowth. For example, a randomized, placebo-controlled study of OIT for cow's milk and egg allergies comparing a control group (with allergen eviction) with the tolerance induction group, concluded that both groups exhibited tolerance to allergens, thus, pointing out that OIT for food allergy should take into consideration the spontaneous rate of recovery of patients (Staden et al. 2007). Nonetheless, a recent study of children with a severe allergy to cow's milk showed a significant 90% increase in tolerated milk intake, only in the group receiving the therapy, whereas the eviction control group failed the food challenge after 1 year (Longo et al. 2008). These studies raise questions regarding criteria for patient selection, dose incrementation, and treatment duration.

In terms of serological changes, OIT for cow's milk leads to a significant decrease in food-specific IgE levels (Longo et al. 2008; Patriarca et al. 2003) concomitantly with an increase in specific IgG4 levels (Longo et al. 2008; Patriarca et al. 2003; Skripak et al. 2008). In the case of spontaneous re-establishment of oral tolerance to cow's milk or egg allergens in children, allergen-specific IgE levels also decrease significantly (Staden et al. 2007). Accordingly, children whose allergy resolves spontaneously exhibit a reorientation of preexisting Th2 responses toward Th1 and regulatory T cells (Burks et al. 2008).

Oral tolerance has been further tested in human autoimmune diseases such as type I diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, uveitis and thyroiditis, using antigenic peptides as well as purified or recombinant proteins (Faria and Weiner 2006a). Although the induction of regulatory mechanisms such as TGFβ-producing Th3 cells was observed in patients treated for diabetes or multiple sclerosis, phase II/III trials showed no significant effect over the placebo group (Faria and Weiner 2006b). In contrast, specific oral tolerance regimens have demonstrated promising results in experimental animal models of autoimmune diseases. In those experiments, high doses of antigen administered orally promote T cell depletion or anergy (Faria and Weiner 2005), whereas low doses rather induce suppressive mechanisms involving regulatory T cells. Such regulatory T cells are highly heterogeneous and include Th3 cells (producing TGFβ and/or IL10), Tr1 cells (producing IL10), and $CD4^+$ $CD25^+$ T cells mediating their suppressive function through cytokine secretion, or cell contact-dependent mechanisms involving the CTLA-4 or PD-1 molecules (Faria and Weiner 2006a). In addition, new subsets ($CD4^+CD25^-$ or $CD4^+CD25^+$) of regulatory T cells have been described which express latency-associated peptide (LAP), secrete TGFβ and upregulate both TGFβ, and corresponding surface receptors at the cell surface, thus mediating regulatory functions through both soluble factors and cell contact (Nakamura et al. 2001; Oida et al. 2003; Chen et al. 2008).

Altogether, although oral tolerance induction has been successful in a number of animal models, the clinical efficacy of OIT remains to be firmly established in

UNCORRECTED PROOF

humans. The inability of the protein to bypass the gastrointestinal barriers remains problematic in the oral administration of protein drugs. In order to overcome problems of low allergen/protein bioavailability and absorption after OIT, current investigations are focusing on novel and enhanced delivery systems for a safe oral administration of the antigen.

2.4 Sublingual Immunotherapy

Allergen-specific sublingual immunotherapy (SLIT) has been investigated in allergic patients since 1984 (Bousquet et al. 1999; La Rosa et al. 1999; Wilson et al. 2003; Clavel et al. 1998; Vourdas et al. 1998; Bousquet et al. 2001; Pajno et al. 2000; Marogna et al. 2005) (Table 1). During SLIT, the allergen extract is applied as a solution or as a tablet and kept under the tongue for at least 1–2 min, thus facilitating allergen capture by oral Langerhans cells (oLCs). As of today, more than one billion doses have been administered to humans with an excellent safety profile, demonstrating that SLIT is a valid alternative to SCIT (Khinchi et al. 2004). SLIT is efficient in treating type I allergies to either house dust mites, pollens (from grass, parietaria, olive, ragweed, cupressus) or cat dander in adults and children, with a reduction of both symptoms and medication requirements. As such, SLIT can be used in patients with rhinitis with or without mild-asthma (Wilson et al. 2003, 2005; Olaguibel and Alvarez Puebla 2005; Calamita et al. 2006; Penagos et al. 2006; Larenas-Linnemann 2009; Passalacqua et al. 2004; Pajno et al. 2003; Mascarell et al. 2006). Comparative clinical trials in birch pollen-allergic adults or mite-allergic children revealed no statistical difference in terms of efficacy between SCIT and SLIT when high-dose SLIT regimens were used (Khinchi et al. 2004; Antunez et al. 2008). Also, long-term clinical benefits are observed following SLIT in adults and children with rhinitis (Wilson et al. 2003). The safety and efficacy profile of high-dose immunotherapy has been confirmed in children younger than 5 years (Baena-Cagnani et al. 2005; Fiocchi et al. 2005). As of today, the pertinence of SLIT for tolerance induction in humans has been definitively established by multiple DBPC phase III studies conducted in large cohorts of patients allergic to gram pollen (Didier et al. 2006, 2009; Dahl et al. 2006, 2008; Ibanez et al. 2007; Wahn et al. 2009; Horak et al. 2009; Malling et al. 2009). In addition, house dust mite sublingual tablets tested in 509 adults patients in a pivotal phase IIb/III clinical trial induced a significant decrease in rhinitis symptoms while demonstrating a good safety profile after only 1 year of treatment (our unpublished data).

Similarly to SCIT, SLIT reduces allergen-specific inflammatory responses at various levels. For example, it decreases ECP and tryptase nasal secretion (Marcucci et al. 2003, 2001; Passalacqua et al. 1998. It also enhances specific seric IgG4 while decreasing IgE antibodies (Mascarell et al. 2006; Bahceciler et al. 2005), thus inhibiting basophil or mast) cell (MC degranulation. SLIT elicits both Th1 and regulatory T cells (i.e., IL10-producing Tr1 or $Foxp3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$

UNCORRECTED PROOF

T cells) in peripheral blood or in the nasal mucosa (Meiler et al. 2008; Jutel et al. 2003; Gardner et al. 2004; Taylor et al. 2004; Ciprandi et al. 2005; Bohle et al. 2007; Radulovic et al. 2008; Cosmi et al. 2006).

APCs identified thus far in the lingual oral mucosa of both mice and human, consist of oLCs, myeloid $CD11b^{+}CD11c^{-}$, $CD11b^{+}CD11c^{+}$ as well as plasmacytoid DCs (Mascarell et al. 2008; Allam et al. 2003) with a semi-mature phenotype ($CD40^{-}CD80^{-}CD86^{+}$), consistent with a tolerogenic function (Steinman et al. 2003; Hawiger et al. 2001). Those oral APCs located at the mucosal/submucosal junction are likely involved in antigen capture during SLIT (Mascarell et al. 2008) and represent a privileged target for tolerance induction, since they induce IFNγ and/or IL10 producing $CD4^{+}$ T cells mediating suppressive functions (Mascarell et al. 2008; Allam et al. 2008). Also, cross-linking of high affinity receptors for IgE (FcεRI) on human oLCs induces regulatory molecules such as TGFβ, IL10, or indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (Allam et al. 2003; Novak et al. 2001). In contrast, pro-inflammatory cells, i.e., MCs and eosinophils, are located in submucosal tissues in humans and mice (Marcucci et al. 2007; Allam et al. 2008), suggesting that allergen contact with such cells might be limited during SLIT. Differences in distribution of oLCs and MCs have been observed within the oral cavity, with the vestibular region identified as the most favorable site for allergen application during sublingual immunotherapy, given its high oLCs and low MCs density (Allam et al. 2008). In mice, resident mucosal $CD4^{+}$ T cells co-localize with $CD11b^{+}$ tolerogenic APCs in the lamina propria, suggesting that the lingual immune system is organized in a similar manner to the small intestine, another critical site for tolerance induction (Denning et al. 2007; Mascarell et al. 2008). Resident mucosal $CD4^{+}$ T cells express the mucosal homing receptor $\alpha E\beta 7$ integrin CD103, also described as a regulatory marker (Suffia et al. 2005; Allakhverdi et al. 2006).

3 Interest in Adjuvants and Vector Systems for Mucosal Immunization

Given the dual capacity of mucosal immune systems, appropriate signalling to APCs e.g. with immunopotentiators (i.e., synthetic or biological adjuvant molecules) or enhanced targeting via vector systems are needed to promote tolerance over inflammation. For example, selected strains of Lactobacilli have been shown to enhance SLIT efficacy in a therapeutic murine model of asthma (Van Overtvelt et al. 2008). Triggering Toll like receptors (TLR) by lipid A derivatives or lipopeptides (Pam3CSK4 and OM-294-BA-MP, respectively) as well as immunosuppressive drugs (e.g., glucocorticoids with vitamin D3) are also effective in improving SLIT efficacy (Van Overtvelt et al. 2008; Mascarell et al. 2007; Lombardi et al. 2008). In allergen-specific immunotherapy, the use of Th1 adjuvants to potentiate tolerance induction is also currently under investigation. Cytosine-guanine oligonucleotides (CpG) (Simons et al. 2004) and monophosphoryl lipid A (MPL)

UNCORRECTED PROOF

(Drachenberg et al. 2001, 2003) have been shown to be effective in ragweed and grass pollen subcutaneous immunotherapy, respectively. The latter is also presently being tested in sublingual immunotherapy regimens in humans.

Selected formulations can be used to present allergens in a particulate form, thereby targeting APCs with a phagocytic property. For example, targeting oral APCs following sublingual administration of OVA formulated within mucoadhesive particles (e.g., polysaccharidic core nanoparticles or chitosan) induces the proliferation of antigen specific suppressive T cells producing IFNγ/IL10 in draining cervical lymph nodes. Sublingual administration of OVA formulated with such particules enhances tolerance induction in mice with established asthma, with a dramatic reduction of both AHR, lung inflammation, eosinophils numbers in bronchoalveolar lavages, as well as antigen-specific Th2 responses (Razafindratsita et al. 2007; Saint-Lu et al. 2009). Other delivery systems targeting DCs are currently being considered (Bohle et al. 2004; El Azami El Idrissi et al. 2002; Jeannin et al. 2000; Goetsch et al. 2001; Haicheur et al. 2003; Bonifaz et al. 2004; Santeliz et al. 2002; Tighe et al. 2000). For instance, the adenylate cyclase (CyaA) from Bordetella pertussis (El Azami El Idrissi et al. 2002), the B subunit of shiga toxin (STxB) (Haicheur et al. 2003), the outer membrane protein A from Klebsiella pneumoniae (kpOmpA) (Jeannin et al. 2000; Goetsch et al. 2001) or the bacterial cell surface protein of Geobacillus stearothermophilus (S-layer) (Bohle et al. 2004) target DCs and prime efficient Th1 cellular responses. Also, anti-DEC-205 antibodies coupled with antigen target DCs, and induce strong T cell responses in mice when administered together with anti-CD40 antibodies (Bonifaz et al. 2004). Whether or not such delivery systems are relevant to induce allergen-specific tolerance by mucosal routes remain to be addressed.

4 Conclusions

The development of second generation mucosal based-vaccines will benefit from a better understanding of mucosal immune systems. The latter comprise various subsets of tolerogenic APCs organized in a compartmentalized manner and programmed to induce Th1/Treg responses. Based on placebo-controlled clinical studies conducted in large cohort of patients, the sublingual route is as of today the only firmly proven mucosal route to establish tolerance in humans. Targeting the allergen to tolerogenic mucosal DCs using vector systems, mucoadhesive particulate formulations or adjuvant molecules represent a promising strategy to enhance tolerance induction. Until now, the development of allergy vaccines has been exclusively based on natural or modified allergen extracts, but, there is a growing interest in using recombinant allergens including native or hypoallergenic forms, mixture of allergens or allergen-derived peptides (Niederberger et al. 2004; Gafvelin et al. 2005; Purohit et al. 2008; Jutel et al. 2005; Muller et al. 1998; Verhoef et al. 2005; Larche and Wraith 2005; Edlmayr et al. 2009). Thus, identifying relevant recombinant major allergens together with appropriate presentation systems suitable

UNCORRECTED PROOF

for mucosal application will help to develop more efficient and safe allergy vaccines in the future.

References

Allakhverdi Z, Fitzpatrick D, Boisvert A et al (2006) Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. J Allergy Clin Immunol 118:1342–1349

Allam JP, Novak N, Fuchs C et al (2003) Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεRI expression. J Allergy Clin Immunol 112:141–148

Allam JP, Peng WM, Appel T et al (2008) Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. J Allergy Clin Immunol 121:368–74 e1

Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N et al (2008b) Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? Allergy 63:720–727

Andri L, Falagiani P (2003) Symptomatic relief after grass nasal immunotherapy: lasting efficacy after 4–5 years. J Investig Allergol Clin Immunol 13:228–231

Andri L, Senna G (1995) Local nasal immunotherapy. Allergy 50:190

Andri L, Senna GE, Betteli C et al (1992) Local nasal immunotherapy in allergic rhinitis to Parietaria. A double-blind controlled study. Allergy 47:318–323

Andri L, Senna G, Betteli C et al (1993) Local nasal immunotherapy for Dermatophagoides-induced rhinitis: efficacy of a powder extract. J Allergy Clin Immunol 91:987–996

Andri L, Senna G, Betteli C et al (1996) Local nasal immunotherapy with extract in powder form is effective and safe in grass pollen rhinitis: a double-blind study. J Allergy Clin Immunol 97:34–41

Antunez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ (2008) Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. Pediatr Allergy Immunol 19:210–218

Baena-Cagnani CE, Passalacqua G, Baena-Cagnani RC, Croce VH, Canonica WG (2005) Sublingual immunotherapy in pediatric patients: beyond clinical efficacy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 5:173–177

Bagnasco M, Mariani G, Passalacqua G et al (1997) Absorption and distribution kinetics of the major Parietaria judaica allergen (Par j 1) administered by noninjectable routes in healthy human beings. J Allergy Clin Immunol 100:122–129

Bahceciler NN, Arikan C, Taylor A et al (2005) Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites. Int Arch Allergy Immunol 136:287–294

Bellussi L, Bologna M, Di Stanislao C et al (2002) Simplified local nasal immunotherapy in mite dust allergic rhinitis. J Investig Allergol Clin Immunol 12:42–47

Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P et al (1999) The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 103:468–475

Bohle B, Breitwieser A, Zwolfer B et al (2004) A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant fusion protein of a bacterial cell surface (S-layer) protein and the major birch pollen allergen Bet v 1 (rSbsC-Bet v 1) combines reduced allergenicity with immunomodulating capacity. J Immunol 172:6642–6648

Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M et al (2007) Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. J Allergy Clin Immunol 120:707–713

Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A et al (2004) In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. J Exp Med 199:815–824

UNCORRECTED PROOF

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ (1998) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol 102:558–562

Bousquet J, Scheinmann P, Guinnepain MT et al (1999) Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study. Allergy 54:249–260

Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N (2001) Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol 108:S147–S334

Buchanan AD, Green TD, Jones SM et al (2007) Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. J Allergy Clin Immunol 119:199–205

Burks AW, Laubach S, Jones SM (2008) Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. J Allergy Clin Immunol 121:1344–1350

Calamita Z, Saconato H, Pela AB, Atallah AN (2006) Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. Allergy 61:1162–1172

Canonica GW, Passalacqua G (2003) Noninjection routes for immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 111:437–448 quiz 49

Chen ML, Yan BS, Bando Y, Kuchroo VK, Weiner HL (2008) Latency-associated peptide identifies a novel $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 180:7327–7337

Ciprandi G, Fenoglio D, Cirillo I et al (2005) Induction of interleukin 10 by sublingual immunotherapy for house dust mites: a preliminary report. Ann Allergy Asthma Immunol 95:38–44

Clavel R, Bousquet J, Andre C (1998) Clinical efficacy of sublingual-swallow immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled trial of a standardized five-grass-pollen extract in rhinitis. Allergy 53:493–498

Conti HR, Shen F, Nayyar N et al (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. J Exp Med 206:299–311

Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R et al (2006) Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin 10-production. Clin Exp Allergy 36:261–272

Cuburu N, Kweon MN, Song JH et al (2007) Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. Vaccine 25:8598–8610

D'Amato G, Lobefalo G, Liccardi G, Cazzola M (1995) A double-blind, placebo-controlled trial of local nasal immunotherapy in allergic rhinitis to Parietaria pollen. Clin Exp Allergy 25:141–148

Dahl R, Kapp A, Colombo G et al (2006) Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 118:434–440

Dahl R, Kapp A, Colombo G et al (2008) Sublingual grass allergen tablet immunotherapy provides sustained clinical benefit with progressive immunologic changes over 2 years. J Allergy Clin Immunol 121:512–18 e2

Daniel C, Repa A, Wild C et al (2006) Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. Allergy 61:812–819

Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B (2007) Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. Nat Immunol 8:1086–1094

Deuschl H, Johansson GO (1977) Hyposensitization of patients with allergic rhinitis by intranasal administration of chemically modified grass pollen allergen. A pilot study. Acta Allergol 32:248–262

Didier A, Melac M, Combebias A, Andre C (2006) Efficacy and safety of sublingual immunotherapy grass pollen tablets in grass pollen rhinoconjonctivitis. J Allergy Clin Immunol 117(Suppl LB5):721

UNCORRECTED PROOF

Didier A, Melac M, Montagut A et al (2009) Agreement of efficacy assessments for five-grass pollen sublingual tablet immunotherapy. Allergy 64:166–171

Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F (2001) A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. Allergy 56:498–505

Drachenberg KJ, Heinzkill M, Urban E, Woroniecki SR (2003) Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents. Allergol Immunopathol (Madr) 31:270–277

Durham SR, Till SJ (1998) Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 102:157–164

Ebner C, Siemann U, Bohle B et al (1997) Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. Clin Exp Allergy 27:1007–1015

Edlmayr J, Niespodziana K, Linhart B et al (2009) A combination vaccine for allergy and rhinovirus infections based on rhinovirus-derived surface protein VP1 and a nonallergenic peptide of the major timothy grass pollen allergen Phl p 1. J Immunol 182:6298–6306

El Azami El Idrissi M, Ladant D, Leclerc C (2002) The adenylate cyclase of Bordetella pertussis: a vector to target antigen presenting cells. Toxicon 40:1661–5

El Biaze M, Boniface S, Koscher V et al (2003) T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. Allergy 58:844–853

Faria AM, Weiner HL (2005) Oral tolerance. Immunol Rev 206:232–259

Faria AM, Weiner HL (2006a) Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. Clin Dev Immunol 13:143–157

Faria AM, Weiner HL (2006b) Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. Inflamm Allergy Drug Targets 5:179–190

Fiocchi A, Pajno G, La Grutta S et al (2005) Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children aged 3–7 years. Ann Allergy Asthma Immunol 95:254–258

Gafvelin G, Thunberg S, Kronqvist M et al (2005) Cytokine and antibody responses in birch-pollen-allergic patients treated with genetically modified derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1. Int Arch Allergy Immunol 138:59–66

Gardner LM, Thien FC, Douglass JA, Rolland JM, O'Hehir RE (2004) Induction of T 'regulatory' cells by standardized house dust mite immunotherapy: an increase in $CD4^+$ $CD25^+$ interleukin-10+ T cells expressing peripheral tissue trafficking markers. Clin Exp Allergy 34:1209–1219

Gehlhar K, Schlaak M, Becker W, Bufe A (1999) Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. Clin Exp Allergy 29:497–506

Georgitis JW, Reisman RE, Clayton WF et al (1983) Local intranasal immunotherapy for grass-allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 71:71–76

Giovane AL, Bardare M, Passalacqua G et al (1994) A three year double-blind placebo-controlled study with specific oral immunotherapy to Dermatophagoides: evidence of safety and efficacy in paediatric patients. Clin Exp Allergy 24:53–59

Goetsch L, Gonzalez A, Plotnicky-Gilquin H et al (2001) Targeting of nasal mucosa-associated antigen-presenting cells in vivo with an outer membrane protein A derived from *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 69:6434–6444

Haicheur N, Benchetrit F, Amessou M et al (2003) The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization. Int Immunol 15:1161–1171

Hamid QA, Schotman E, Jacobson MR, Walker SM, Durham SR (1997) Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 99:254–260

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y et al (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med 194:769–779

UNCORRECTED PROOF

Himly M, Nony E, Chabre H et al (2009) Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation. Allergy 64(7):1038–45

Hisbergues M, Magi M, Rigaux P et al (2007) In vivo and in vitro immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by Lactobacillus plantarum bacteria. Clin Exp Allergy 37:1286–1295

Horak F, Jaeger S, Worm M, Melac M, Didier A (2009) Implementation of pre-seasonal sublingual immunotherapy with a five-grass pollen tablet during optimal dosage assessment. Clin Exp Allergy 39:394–400

Huang FP, Platt N, Wykes M et al (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp Med 191:435–444

Hufnagl K, Focke M, Gruber F et al (2008) Airway inflammation induced after allergic polysensitization can be prevented by mucosal but not by systemic administration of polypeptides. Clin Exp Allergy 38:1192–1202

Ibanez MD, Kaiser F, Knecht R et al (2007) Safety of specific sublingual immunotherapy with SQ standardized grass allergen tablets in children. Pediatr Allergy Immunol 18:516–522

Iwasaki A, Kelsall BL (1999) Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. J Exp Med 190:229–239

Jeannin P, Renno T, Goetsch L et al (2000) OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. Nat Immunol 1:502–509

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 192:1213–1222

Jutel M, Akdis M, Budak F et al (2003) IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. Eur J Immunol 33:1205–1214

Jutel M, Jaeger L, Suck R et al (2005) Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. J Allergy Clin Immunol 116:608–613

Khinchi MS, Poulsen LK, Carat F et al (2004) Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study. Allergy 59:45–53

La Rosa M, Ranno C, Andre C et al (1999) Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized Parietaria judaica extract in children with allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 104:425–432

Larche M (2000) Specific immunotherapy. Br Med Bull 56:1019–1036

Larche M, Wraith DC (2005) Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. Nat Med 11:S69–S76

Larenas-Linnemann D (2009) Sublingual immunotherapy in children: complete and updated review supporting evidence of effect. Curr Opin Allergy Clin Immunol 9:168–176

Lee SE, Koh YI, Kim MK et al (2008) Inhibition of airway allergic disease by co-administration of flagellin with allergen. J Clin Immunol 28:157–165

Leng X, Fu YX, Ye ST, Duan SQ (1990) A double-blind trial of oral immunotherapy for Artemisia pollen asthma with evaluation of bronchial response to the pollen allergen and serum-specific IgE antibody. Ann Allergy 64:27–31

Litwin A, Flanagan M, Entis G et al (1997) Oral immunotherapy with short ragweed extract in a novel encapsulated preparation: a double-blind study. J Allergy Clin Immunol 100:30–38

Liu YH, Tsai JJ (2005) Production of salivary immunoglobulin A and suppression of Dermatophagoides pteronyssinus-induced airway inflammation by local nasal immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 138:161–168

UNCORRECTED PROOF

Liu L, Zhang M, Jenkins C, MacPherson GG (1998) Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. J Immunol 161:1146–1155

Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S et al (2008) Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. Clin Exp Allergy

Longo G, Barbi E, Berti I et al (2008) Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. J Allergy Clin Immunol 121:343–347

MacPherson G, Milling S, Yrlid U et al (2004) Uptake of antigens from the intestine by dendritic cells. Ann N Y Acad Sci 1029:75–82

Malling HJ, Montagut A, Melac M et al (2009) Efficacy and safety of five-grass pollen sublingual immunotherapy tablets in patients with different clinical profiles of allergic rhinoconjunctivitis. Clin Exp Allergy 39:387–393

Marcucci F, Sensi L, Frati F et al (2001) Sublingual tryptase and ECP in children treated with grass pollen sublingual immunotherapy (SLIT): safety and immunologic implications. Allergy 56:1091–1095

Marcucci F, Sensi L, Frati F et al (2003) Effects on inflammation parameters of a double-blind, placebo controlled 1 year course of SLIT in children monosensitized to mites. Allergy 58:657–662

Marcucci F, Sensi L, Incorvaia C et al (2007) Oral reactions to sublingual immunotherapy: a bioptic study. Allergy 62:1475–1477

Marogna M, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G (2005) Clinical, functional, and immunologic effects of sublingual immunotherapy in birch pollinosis: a 3 year randomized controlled study. J Allergy Clin Immunol 115:1184–1188

Mascarell L, Van Overtvelt L, Moingeon P (2006) Novel ways for immune intervention in immunotherapy: mucosal allergy vaccines. Immunol Allergy Clin North Am 26:283–306 vii-viii

Mascarell L, Van Overtvelt L, Lombardi V et al (2007) A synthetic triacylated pseudo-dipeptide molecule promotes Th1/TReg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. Vaccine 26:108–118

Mascarell L, Lombardi V, Louise A et al (2008) Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory $CD4^+$ T cells. J Allergy Clin Immunol 122:603–9 e5

Mascarell L, Lombardi V, Zimmer A et al (2009) Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector $CD4^+$ T cells. Clin Exp Allergy

Mavroleon G (1998) Restoration of cytokine imbalance by immunotherapy. Clin Exp Allergy 28:917–920

Medicines CoSo (1986) Desensitising vaccines: an allergist's view. Br Med J 293:1169–1170

Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E (2004) Giampietro PG: A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. Allergy 59:980–987

Meglio P, Giampietro PG, Gianni S, Galli E (2008) Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy-follow-up at 4 year and 8 months. Pediatr Allergy Immunol 19:412–419

Meiler F, Zumkehr J, Klunker S et al (2008) In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. J Exp Med 205:2887–2898

Menges M, Rossner S, Voigtlander C et al (2002) Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. J Exp Med 195:15–21

Michils A, Mairesse M, Ledent C et al (1998) Modified antigenic reactivity of anti-phospholipase A2 IgG antibodies in patients allergic to bee venom: conversion with immunotherapy and relation to subclass expression. J Allergy Clin Immunol 102:118–126

Moller C, Dreborg S, Lanner A, Bjorksten B (1986) Oral immunotherapy of children with rhinoconjunctivitis due to birch pollen allergy. A double blind study. Allergy 41:271–279

UNCORRECTED PROOF

Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA et al (2002) Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). J Allergy Clin Immunol 109:251–256

Mosbech H, Dreborg S, Madsen F et al (1987) High dose grass pollen tablets used for hyposensitization in hay fever patients. A one year double blind placebo-controlled study. Allergy 42:451–455

Mousavi T, Tajik N, Moradi M, Radjabzadeh MF (2008) CpG Immunotherapy in Chenopodium album sensitized mice: The comparison of IFN-gamma, IL-10 and IgE responses in intranasal and subcutaneous administrations. Clin Mol Allergy 6:10

Muller U, Akdis CA, Fricker M et al (1998) Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. J Allergy Clin Immunol 101:747–754

Nakamura K, Kitani A, Strober W (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med 194:629–644

Nickelsen JA, Goldstein S, Mueller U et al (1981a) Local intranasal immunotherapy for ragweed allergic rhinitis. I. Clinical response. J Allergy Clin Immunol 68:33–40

Nickelsen JA, Goldstein S, Mueller U et al (1981b) Local intranasal immunotherapy for ragweed allergic rhinitis. II. Immunologic response. J Allergy Clin Immunol 68:41–45

Nickelsen JA, Georgitis JW, Mueller UR et al (1983) Local nasal immunotherapy for ragweed-allergic rhinitis. III. A two year of treatment. Clin Allergy 13:509–519

Niederberger V, Horak F, Vrtala S et al (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. Proc Natl Acad Sci U S A 101(Suppl 2):14677–14682

Novak N, Bieber T, Katoh N (2001) Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. J Immunol 167:797–804

Oida T, Zhang X, Goto M et al (2003) CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RB high-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. J Immunol 170:2516–2522

Olaguibel JM, Alvarez Puebla MJ (2005) Efficacy of sublingual allergen vaccination for respiratory allergy in children. Conclusions from one meta-analysis. J Investig Allergol Clin Immunol 15:9–16

Pajno GB, Morabito L, Barberio G, Parmiani S (2000) Clinical and immunologic effects of long-term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, placebo-controlled study. Allergy 55:842–849

Pajno GB, Peroni DG, Vita D et al (2003) Safety of sublingual immunotherapy in children with asthma. Paediatr Drugs 5:777–781

Passalacqua G, Albano M, Riccio AM, Scordamaglia A, Canonica GW (1997) Local nasal immunotherapy: experimental evidences and general considerations. Allergy 52:10–16

Passalacqua G, Albano M, Fregonese L et al (1998) Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. Lancet 351:629–632

Passalacqua G, Guerra L, Pasquali M, Lombardi C, Canonica GW (2004) Efficacy and safety of sublingual immunotherapy. Ann Allergy Asthma Immunol 93:3–12 quiz 12-3, 103

Passalacqua G, Altrinetti V, Mariani G et al (2005) Pharmacokinetics of radiolabelled Par j 1 administered intranasally to allergic and healthy subjects. Clin Exp Allergy 35:880–883

Patriarca G, Nucera E, Roncallo C et al (2003) Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. Aliment Pharmacol Ther 17:459–465

Pauli G, Larsen TH, Rak S et al (2008) Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 122:951–960

Penagos M, Compalati E, Tarantini F et al (2006) Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3–18 years of age: a meta-analysis of

UNCORRECTED PROOF

randomized, placebo-controlled, double-blind trials. Ann Allergy Asthma Immunol 97:141–148

Pichler CE, Pichler WJ (2001) Three years of specific immunotherapy with house-dust-mite extracts in patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen-specific parameters and of nonspecific bronchial hyperreactivity. Allergy 56:301–306

Pierson-Mullany LK, Jackola D, Blumenthal M (2000) Rosenberg A: Altered allergen binding capacities of Amb a 1-specific IgE and IgG4 from ragweed-sensitive patients receiving immunotherapy. Ann Allergy Asthma Immunol 84:241–243

Powell RJ, Frew AJ, Corrigan CJ (2007) Durham SR: Effect of grass pollen immunotherapy with Alutard SQ on quality of life in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. Allergy 62:1335–1338

Pugh CW, MacPherson GG, Steer HW (1983) Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. J Exp Med 157:1758–1779

Purohit A, Niederberger V, Kronqvist M et al (2008) Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives. Clin Exp Allergy 38:1514–1525

Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT (2008) Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. J Allergy Clin Immunol 121:1467–72, 72 e1

Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L et al (2007) Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol 120:278–285

Rebien W, Puttonen E, Maasch HJ, Stix E, Wahn U (1982) Clinical and immunological response to oral and subcutaneous immunotherapy with grass pollen extracts. A prospective study. Eur J Pediatr 138:341–344

Robinson DS, Larche M, Durham SR (2004) Tregs and allergic disease. J Clin Invest 114:1389–1397

Saint-Lu N, Tourdot S, Razafindratsita A et al (2009) Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. Allergy 64:1003–1013

Santeliz JV, Van Nest G, Traquina P, Larsen E, Wills-Karp M (2002) Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. J Allergy Clin Immunol 109:455–462

Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT (1993) Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. J Exp Med 178:2123–2130

Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT (2004) Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. J Allergy Clin Immunol 113:1144–1151

Skripak JM, Nash SD, Rowley H et al (2008) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol 122:1154–1160

Song JH, Nguyen HH, Cuburu N et al (2008) Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. Proc Natl Acad Sci U S A 105:1644–1649

Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F et al (2007) Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. Allergy 62:1261–1269

Steinman RM, Hawiger D, Liu K et al (2003) Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. Ann N Y Acad Sci 987:15–25

Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y (2005) A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. J Immunol 174:5444–5455

Sun CM, Hall JA, Blank RB et al (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. J Exp Med 204:1775–1785

Sun JB, Flach CF, Czerkinsky C, Holmgren J (2008) B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. J Immunol 181:8278–8287

Taudorf E, Weeke B (1983) Orally administered grass pollen. Allergy 38:561–564

UNCORRECTED PROOF

Taudorf E, Laursen LC, Lanner A et al (1987) Oral immunotherapy in birch pollen hay fever. J Allergy Clin Immunol 80:153–161

Taudorf E, Laursen L, Lanner A et al (1989) Specific IgE, IgG, and IgA antibody response to oral immunotherapy in birch pollinosis. J Allergy Clin Immunol 83:589–594

Taylor A, Verhagen J, Akdis CA, Akdis M (2004) T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. Int Arch Allergy Immunol 135:73–82

Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D et al (2000) Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. J Allergy Clin Immunol 106:124–134

Tsai JJ, Liao EC, Tsai FH, Hsieh CC, Lee MF (2009) The effect of local nasal immunotherapy in allergic rhinitis: using strips of the allergen dermatophagoides pteronyssinus. J Asthma 46:165–170

Urbanek R, Burgelin KH, Kahle S, Kuhn W, Wahn U (1990) Oral immunotherapy with grass pollen in enterosoluble capsules. A prospective study of the clinical and immunological response. Eur J Pediatr 149:545–550

Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A et al (2008) IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. Int Arch Allergy Immunol 145:152–162

Verhoef A, Alexander C, Kay AB, Larche M (2005) T cell epitope immunotherapy induces a CD4+ T cell population with regulatory activity. PLoS Med 2:e78

Vourdas D, Syrigou E, Potamianou P et al (1998) Double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization. Allergy 53:662–672

Wachholz PA (2003) Durham SR: Induction of 'blocking' IgG antibodies during immunotherapy. Clin Exp Allergy 33:1171–1174

Wahn U, Tabar A, Kuna P et al (2009) Efficacy and safety of five-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 123:160–66 e3

Wilson DR, Torres LI, Durham SR (2003) Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. Cochrane Database Syst Rev CD002893

Wilson DR, Lima MT, Durham SR (2005) Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. Allergy 60:4–12

Winkler B, Hufnagl K, Spittler A et al (2006) The role of Foxp3+ T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. Allergy 61:173–180

UNCORRECTED PROOF

Immunité buccale et allergie

P. Moingeon, **A. Zimmer**, L. Van Overtvelt, S. Tourdot, L. Mascarell

Revue française d'allergologie, 2010, 50, 274-276

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com
Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com
Revue française d'allergologie 50 (2010) 274–276

Immunité buccale et allergie

Oral mucosal immunity and allergy

P. Moingeon *, A. Zimmer, L. Van Overtvelt, S. Tourdot, L. Mascarell

R&D, Stallergènes SA, 6, rue Alexis-de-Tocqueville, 92183 Antony cedex, France

Disponible sur Internet le 15 mars 2010

Résumé

L'étude du système immunitaire buccal met en évidence un environnement orienté par défaut vers l'induction de réponses tolérogènes à l'antigène. Les cellules présentatrices d'antigène comprennent chez l'homme comme chez l'animal, des cellules de Langerhans, ainsi que des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes. Toutes ces cellules ont un profil tolérogène, car elles produisent de l'IL10 et induisent une différenciation de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en cellules productrices d'IFNγ et d'IL10, lesquels exercent respectivement une fonction Th1 et T régulatrice (de type Tr1). La muqueuse buccale ne contient pas ou peu de cellules lymphoïdes, à l'exception de lymphocytes T $CD4^+$ effecteurs et régulateurs, présents le long de la *lamina propria*. Les cellules pro-inflammatoires (mastocytes, éosinophiles) sont en nombre limité et localisées au niveau de la sous-muqueuse. Cette dernière observation explique le bon profil d'innocuité associé à l'immunothérapie sublinguale (ITSL) chez l'homme. Ces données sur la physiologie de l'immunité orale permettent de concevoir des stratégies de développement de vaccins sublinguaux de deuxième génération comprenant : (i) l'utilisation d'allergènes recombinants en conformation naturelle, (ii) l'ajout d'adjuvants Th 1/T Reg, (iii) la vectorisation d'allergènes dans des particules mucoadhésives afin de mieux cibler les cellules dendritiques orales.
© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Cellule dendritique ; Immunité mucosale ; Immunothérapie sublinguale ; Tolérance

Abstract

The study of the oral immune system reveals an environment biased towards tolerance induction responses to antigen. The antigen presenting cells (APCs) there include, both in humans and in mice, Langerhans cells as well as myeloid and plasmacytoid dendritic cells. All these APCs have a tolerogenic profile, since they produce IL10 and induce the differentiation of naive $CD4^+$ T lymphocytes into cells producing IFNγ and IL10, which take on a Th1 and T regulatory function (Tr1 type). The oral mucosa contains no or only a few lymphoid cells, with the exception of both $CD4^+$ effector and regulatory T lymphocytes, located along the *lamina propria*. The few pro-inflammatory cells (i.e., mast cells, eosinophils) present are localized mostly in muscle tissue, which explains the excellent safety profile of sublingual immunotherapy (SLIT) in humans. These data on the physiology of oral immunity support the rational design of second generation SLIT vaccines based on (i) recombinant allergens having natural allergen conformation, (ii) the addition of Th1/T Reg adjuvants, (iii) muco-adhesive particulate vector systems allowing better targeting of oral dendritic cells.
© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Oral mucosal immunity; Dendritic cells; T lymphocytes; Tolerance; Sublingual immunotherapy

1. Introduction

L'immunothérapie sublinguale (ITSL) spécifique des allergènes est un traitement sûr et efficace des allergies respiratoires de type I [1]. Le paradigme central de l'immunothérapie des allergies est de rediriger les réponses lymphocytaires Th2 contre l'allergène observées chez le sujet allergique vers une réponse de type Th1 (immunodéviation) et T régulatrices (immunosuppression) [2,3]. Au cours de l'ITSL, les allergènes ne sont pas absorbés dans le sang de façon significative, mais sont capturés par les cellules dendritiques orales [2,4]. Ces cellules migrent ensuite dans les ganglions lymphatiques proximaux (chaîne cervicale/sous-maxillaire) en 12 à 24 heures, où elles stimulent les lymphocytes T auxiliaires

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : pmoingeon@stallergenes.fr (P. Moingeon).

1877-0320/$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.reval.2010.02.010

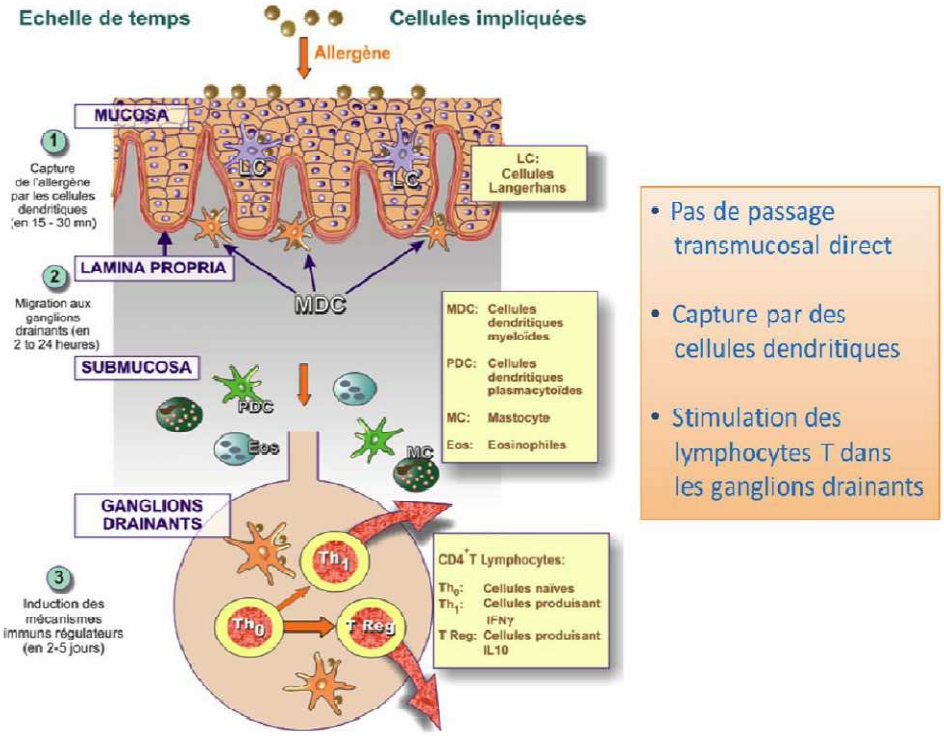


Fig. 1. Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie sublinguale. L'allergène est capté en quelques minutes par les cellules dendritiques. Ces cellules migrent dans les ganglions drainant (cervicaux) en 12 à 24 heures, et stimulent les lymphocytes $CD4^+$ naïfs. Ces derniers prolifèrent, se différencient en lymphocytes Th1 et T régulateurs et migrent en périphérie, puis dans les tissus.

CD4+ naïfs. Ces derniers prolifèrent et se différencient en quelques jours en lymphocytes Th1 et T régulateurs qui migrent en périphérie et dans les tissus (Fig. 1) [2].

2. Capture de l'allergène par des cellules présentatrices

Des études de biodistribution réalisées chez l'animal comme chez l'homme indiquent que les protéines administrées par voie sublinguale sont captées rapidement (entre 15 à 30 minutes) par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) [2,5]. Trois groupes de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sublinguales/buccales ont été identifiés (chez la souris BALB/c) parmi lesquels (i) des cellules de Langerhans $CD207^+$ situées dans la muqueuse, (ii) des cellules dendritiques (CDs) myéloïdes $CD11b^+CD11c^-$ et $CD11b^+CD11c^+$, situées à l'interface muqueuse/sous-muqueuse, (iii) des CDs plasmacytoïdes $B220^+120G8^+$ localisées au niveau des tissus sous-muqueux [5]. En présence de l'antigène, ces CPA induisent des lymphocytes T $CD4^+$ qui produisent de l'interféron-gamma (IFNγ) et de l'interleukine 10 (IL10), et qui exercent une fonction suppressive sur les lymphocytes T activés. Ces trois populations de cellules dendritiques ont également été décrites chez l'homme, avec en particulier une population intramuqueuse de cellules de Langerhans exprimant constitutivement les récepteurs de forte (FcεRI) et faible (CD23) affinité pour les IgE [4]. Ces récepteurs sont susceptibles de faciliter la capture de l'allergène et induisent après engagement la production d'IL-10, de TGF-β et d'indole-amine 2 dioxygenase (IDO), une enzyme qui catabolise le tryptophane, conduisant ainsi à une diminution de la prolifération des lymphocytes T [4]. Au total, en raison de ce phénotype « régulateur » qui semble être associé aux différentes populations de cellules dendritiques présentes dans la bouche, la voie sublinguale est particulièrement appropriée pour induire une tolérance spécifique de l'antigène.

3. Spécificités du système immunitaire buccal

Outre de nombreuses CPA avec une fonction tolérogène, le système immunitaire présente des particularités intéressantes. Une cartographie détaillée du système immunitaire buccal réalisée chez la souris a permis de mettre en évidence l'absence de lymphocytes T $CD8^+$, de cellules γ/δ^+, de cellules NK et de lymphocytes B [6]. Des lymphocytes T $CD4^+$ avec une fonctionnalité régulatrice ou effectrice (ex. : Th1, Th2, Th17) sont présents le long de la *lamina propria*. Ces derniers sont vraisemblablement impliqués dans les réponses aux pathogènes infectieux. Enfin des cellules pro-inflammatoires (mastocytes, éosinophiles) sont présentes en faible nombre, dans les tissus sous-muqueux [3,6]. En l'absence d'effraction de la muqueuse, leur contact avec l'allergène sera limité, à l'exception de la

langue, au niveau de laquelle les mastocytes semblent davantage localisés en surface.

4. Implications thérapeutiques

Ces avancées dans la compréhension des mécanismes de l'ITSL permettent aujourd'hui de concevoir des vaccins sublinguaux de seconde génération reposant sur des allergènes recombinants formulés. Pour la voie sublinguale, la présentation des allergènes en configuration naturelle semble préférable dans la mesure où (i) il y a peu de mastocytes au niveau de la muqueuse sublinguale et (ii) une reconnaissance par les IgE permet de cibler les allergènes sur les CD FcεRI$^+$, en induisant la production d'IL10 et de TGFβ [4,7,8]. Un vaccin sublingual, à base de Bet v 1 recombinant est actuellement en cours d'évaluation chez l'homme [9]. Par ailleurs, l'intérêt de technologies de vectorisation ou d'adjuvants biologiques ou synthétiques afin d'augmenter l'efficacité de l'ITSL a été établi chez l'animal. Ainsi, l'administration par voie sublinguale dans un modèle murin d'asthme allergique d'une formulation allergénique à base de nano ou microparticules polysaccharidiques mucoadhésives qui ciblent les CPA diminue l'hyperréactivité bronchique et favorise la production d'IFNγ/IL10, ainsi que l'activité suppressive des lymphocytes T CD4$^+$CD25$^+$ situés dans les ganglions drainant [10,11]. Ces systèmes de vectorisation ont pour propriété d'améliorer le ciblage des allergènes vers les CPA sublinguales/buccales tolérogènes. De même, divers adjuvants (ligands de TLR2, TLR4, dexamethasone, probiotiques) augmentent l'efficacité de l'ITSL en favorisant l'induction de lymphocytes CD4$^+$ Th1 et T régulateurs produisant de l'IFNγ et/ou de l'IL10 [12–14].

5. Conclusions

La physiologie du système immunitaire buccal explique la pertinence de cette voie pour induire une tolérance spécifique de l'allergène chez l'homme, en particulier en raison des caractéristiques tolérogènes des cellules dendritiques qui captent l'allergène. Ces fondements scientifiques facilitent le développement de nouveaux vaccins sublinguaux à base d'allergènes recombinants formulés, lesquels devraient permettre d'envisager à terme une augmentation de l'efficacité vaccinale, une réduction des doses d'allergène et une simplification des schémas d'administration.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

[1] Canonica GW, et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2009. Allergy 2009;64:1–59.
[2] Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber H, van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. Allergy 2006;61:151–65.
[3] Novak N, Haberstok J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. Trends Mol Med 2008;14:191–8.
[4] Allam JP, Bieber T, Novak N. Dendritic cells as potential targets for mucosal immunotherapy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009;9:1–4.
[5] Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating Th1 and regulatory CD4+ T cells. J Allergy Clin Immunol 2008;122:603–9.
[6] Mascarell L, Lombardi V, Zimmer A, Louise A, Tourdot S, Van Overtvelt L, et al. Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4$^+$ T cells. Clin Exp Allergy 2009;39:1910–9.
[7] Moingeon P. Sublingual immunotherapy: from biological extracts to recombinant allergens. Allergy 2006;61:15–9.
[8] van Overtvelt L, Razafindratsita A, St-Lu N, Didierlaurent A, Batard T, Lombardi V, et al. Sublingual vaccines based on wild-type recombinant allergens Eur. Ann Allergy Clin Immunol 2006;38:247–2490.
[9] Himly M, Nony E, Chabre H, Buchheit K-H, van Ree R, Vieths S, et al. Detailed physicochemical and immunochemical characterization of cGMP-produced rBet v 1a as the first certified reference material for standardisation of allergenic products. Allergy 2009;64:1038–45.
[10] Saint-Lu N, Tourdot S, Razafindratsita A, Mascarell L, Berjont N, Chabre H, et al. Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. Allergy 2009;64:1003–13.
[11] Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, Berjont N, Bardon T, Betbeder D, et al. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol 2007;120:278–85.
[12] Mascarell L, Van Overtvelt L, Lombardi L, Razafindratsita, Moussu H, Horiot S, et al. A synthetic triacylated pseudodipeptide molecule promotes Th1/T Reg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. Vaccine 2007;26:108–18.
[13] van Overtvelt L, Lombardi V, Horiot S, Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, et al. IL-10 inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy. Int Arch Allergy Immunol 2008;145:152–62.
[14] Lombardi V, van Overtvelt L, Horiot S, Moussu H, Chabre H, Mascarell L, et al. The TLR2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. Clin Exp Allergy 2008;38:1819–29.

L’immunothérapie spécifique agit-elle sur l’immunité innée ?

P. Moingeon, **A. Zimmer**, V. Baron-Bodo, L. Van Overtvelt, L. Mascarell

Revue française d’allergologie, 2010, 50, 207-210

ELSEVIER MASSON

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Revue française d'allergologie 50 (2010) 207–210

REVUE FRANÇAISE D'Allergologie

L'immunothérapie spécifique agit-elle sur l'immunité innée ?

Does specific immunotherapy act on innate immunity?

P. Moingeon *, A. Zimmer, V. Baron-Bodo, L. Van Overtvelt, L. Mascarell

R&D, Stallergènes SA, 6, rue Alexis-de-Tocqueville, 92160 Antony, France

Disponible sur Internet le 15 mars 2010

Résumé

L'immunothérapie spécifique (ITS) par voie sous-cutanée ou sublinguale implique plusieurs mécanismes antigène-spécifiques intriqués, à savoir la modulation des réponses T CD4+ (stimulation de réponses Th1 et CD4+ T régulatrice), et l'induction d'anticorps « bloquants » (IgG4 ou IgA) anti-inflammatoires. L'impact sur l'immunité innée (non spécifique de l'allergène) est à ce jour peu exploré, et pourrait recouvrir un effet direct sur les cellules épithéliales, les cellules dendritiques (CD) et/ou les basophiles/mastocytes. Les cellules épithéliales des muqueuses sont les premières en contact avec l'allergène, et leur réponse à ce stimulus diffère chez les sujets sains et les sujets allergiques. L'ITS impacte la fonction des CDs plasmacytoïdes du sang périphérique (avec induction d'IFNα après engagement de TLR9) et la question reste posée de savoir si elle peut induire un phenotype « tolérogène » chez les CDs. À cet égard, nous avons engagé une étude de protéomique visant à identifier des marqueurs moléculaires de CD tolérogènes. L'ITS semble avoir un effet sur l'activation des mastocytes tissulaires et des basophiles sanguins (probablement via une régulation des signaux d'activation). Notre étude récente d'immunothérapie sublinguale chez des patients allergiques au pollen de graminées n'a toutefois pas permis d'établir de corrélation entre l'amélioration des symptômes cliniques et la baisse de l'activation des basophiles dans le sang.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Basophile ; Cellule dendritique ; Cellule épithéliale ; Immunité innée ; Immunothérapie sublinguale ; Tolérance

Abstract

Specific immunotherapy (SIT), whether it be subcutaneous or sublingual, relies upon several intricate antigen-specific immune mechanisms, including the modulation of CD4+ T cell responses (stimulation of Th1 and T Reg responses), as well as the induction of anti-inflammatory "blocking" antibodies (IgG4 or IgA). The impact of SIT on innate immunity (i. E. , antigen-independent) has yet to be investigated, but may encompass a direct effect on epithelial cells, dendritic cells (DCs), and/or mast cells and basophils. Mucous epithelial cells are the first to come in contact with allergen, and their response to this stimulus differs between allergic and non-allergic individuals. SIT has been reported to modulate the function of plasmacytoid DCs in the peripheral blood (with induction of IFNα secretion following stimulation with a TLR9 ligand), and the question is raised as to whether SIT can elicit a "tolerogenic" phenotype in DCs. With this in view, we are currently engaged in a proteomic study aiming to identify potential molecular markers of regulatory DCs. SIT appears to have an effect on the activation of tissue mast cells and circulating basophils (probably via regulation of activation signals). Nonetheless, our recent SLIT study in grass pollen allergic patients does not confirm a correlation between clinical efficacy and a decrease in circulating basophil activation.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Innate immunity; Basophils; Dendritic cells; Epithelial cells; Sublingual immunotherapy; Tolerance

1. Modulation de l'immunité adaptive au cours de l'immunothérapie spécifique

L'immunothérapie spécifique (ITS) des allergies respiratoires (par voie sublinguale ou sous-cutanée) agit à la fois sur les mécanismes immuns humoraux et cellulaires impliqués dans la réaction allergique [1]. Ainsi l'ITS induit une

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : pmoingeon@stallergenes.fr (P. Moingeon).

1877-0320/$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.reval.2010.02.008

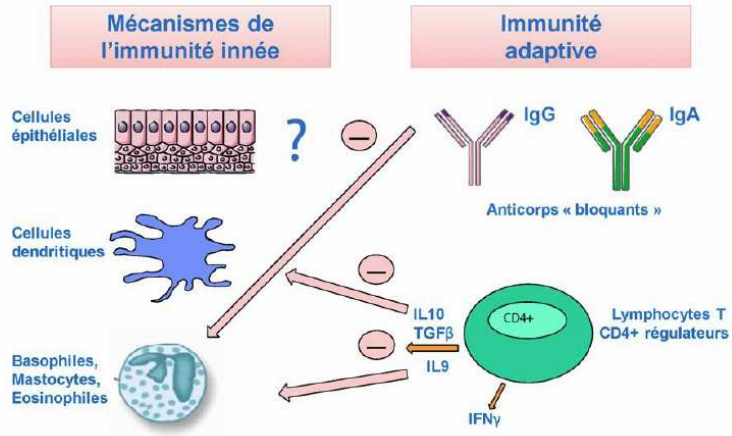


Fig. 1. Impact potentiel de l'immunothérapie spécifique sur l'immunité innée.
L'immunothérapie spécifique a un impact indirect sur l'immunité innée, en particulier via l'induction de lymphocytes T CD4+ produisant de l'IL10 et de TGFβ. Ces cytokines vont réduire le recrutement et l'activation des basophiles, mastocytes, eosinophiles au niveau des tissus, ainsi que la capacité des cellules dendritiques à présenter l'allergène aux lymphocytes Th2. De plus, les lymphocytes T régulateurs recrutent les mastocytes et les rendent tolérogènes via la production d'IL9 [17]. De même, des anticorps « bloquants » spécifiques de l'allergène induits au cours de l'ITS entraînent une baisse de l'activation des basophiles et mastocytes en réponse à l'allergène en engageant les récepteurs de faible affinité pour les IgG (CD32). Un effet direct de l'ITS sur les mécanismes de l'immunité innée reste à documenter.

modulation des réponses T $CD4^+$ spécifiques de l'allergène avec une baisse des réponses Th2, et une stimulation de lymphocytes Th1 et T régulateurs. Par ailleurs, l'ITS induit une augmentation de la production d'IgG4 et d'IgA spécifiques de l'allergène avec, en règle générale, un impact plus limité sur la production des IgE. Ces IgG et IgA sont susceptibles d'inhiber la réaction inflammatoire en entrant en compétition avec les IgE vis-à-vis de l'allergène, prévenant ainsi la dégranulation des mastocytes ou la présentation antigénique aux lymphocytes T facilitée par les IgE [1]. Ils peuvent également agir comme des anticorps bloquants en transduisant des signaux inhibiteurs de l'activation des mastocytes et des basophiles (Fig. 1). Ces réponses cellulaires et humorales rendent compte d'un effet de l'ITS sur l'immunité dite adaptive (ou adaptative), c'est-à-dire spécifique de l'antigène, impliquée dans l'établissement d'une réponse immune mémoire. Ces changements induits dans les réponses T $CD4^+$ et anticorps ont un effet indirect sur l'immunité innée (Fig. 1). La question reste posée de savoir si l'immunothérapie spécifique peut également exercer un effet direct sur les acteurs de l'immunité innée.

2. Immunité innée

L'immunité innée comprend les mécanismes cellulaires (cellules epithéliales, cellules NK, polynucléaires, cellules dendritiques) et humoraux (complément, peptides antimicrobiens, protéine C reactive, lectines) non spécifiques de l'antigène, qui agissent à la manière d'une première ligne de défense [2–4]. Autrefois considérée comme une réponse immune primitive, l'immunité innée suscite aujourd'hui l'intérêt des immunologistes, car son implication (par exemple sous la forme de cellules capable de capter puis de présenter l'antigène aux lymphocytes T) est critique pour l'induction d'une réponse immune adaptive, spécifique de l'antigène. À cet égard, les cellules impliquées dans l'immunité innée expriment plusieurs familles de récepteurs (*Toll-like receptors, NOD-like receptors, RIG-1-like receptors*) capables de réagir à des signaux de danger portés par des agents pathogènes [5]. L'interaction des allergènes avec ces récepteurs reste pour l'essentiel totalement méconnue. Nous nous concentrerons ici sur trois types de cellules impliquées dans la réponse immune innée aux allergènes et susceptibles d'être impactées par l'ITS, à savoir (1) les cellules epithéliales, (2) les cellules dendritiques, (3) les basophiles.

3. L'interaction allergène–cellules epithéliales

L'interaction allergène–cellules épithéliales ainsi que la modification éventuelle de cet interface au cours de l'ITS restent peu étudiées à ce jour. Les cellules epithéliales sont les premières à interagir avec les allergènes, en particulier au niveau des muqueuses. Ces cellules produisent des facteurs tels que le GM-CSF ou le TSLP (thymic stromal lymphopoietin) capables d'attirer les cellules dendritiques et de stimuler une réponse Th2. De plus, ces cellules peuvent éventuellement présenter l'allergène aux lymphocytes T. Une étude récente suggère que la réaction des cellules epithéliales à un allergène respiratoire (ex Bet v 1) varie selon qu'il s'agit de sujets sains ou de sujets allergiques [6]. Ainsi, les cellules épithéliales des muqueuses oculaires et nasales de patients allergiques sont capables de capter efficacement l'allergène via des cavéoles, mais ce mécanisme ne semble pas impliqué chez les sujets sains. En présence de l'allergène, les cellules épithéliales des sujets allergiques subissent une augmentation de l'expression de certaines protéines (ex : dynéine) impliquées dans le transport intracellulaire des proteins [6].

4. ITS et cellules dendritiques

En tant que cellules sentinelles, les cellules dendritiques jouent un rôle clé dans la capture et la présentation de l'allergène aux lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$. Dans le sang, les principales CDs sont les CDs myéloides et plasmacytoides qui sont impliquées dans la mise en œuvre de réponses effectrices. De plus, on trouve dans les muqueuses des cellules de Langerhans, qui semblent davantage programmées pour induire de la tolérance. Par exemple, dans la muqueuse orale, les CDs ont une propension à produire de l'IL12 et de l'IL10, et partant à induire des réponses T $CD4^+$ de type Th1 et T régulateur [7,8]. L'immunothérapie peut agir sur ces cellules dendritiques de multiples façons :

- en facilitant leur capture de l'allergène, par exemple avec des systèmes de vectorisation mucoadhésifs et/ou particulaires ;
- en transduisant des signaux à l'aide d'adjuvants, afin d'induire un phenotype de CD1 ou CD régulatrices (induisant respectivement des lymphocytes CD4+ Th1 ou T Reg).

Au total, L'ITS a donc un effet majeur sur les cellules dendritiques, en impactant les cytokines qu'elles produisent et donc le contexte dans lequel ces cellules presentement l'allergène aux lymphocytes T. Dans ce même registre, l'immunothérapie par voie sous-cutanée chez des patients allergiques aux acariens semble moduler de façon significative les CD plasmacytoides du sang circulant, induisant une production accrue d'IFNα après engagement de TLR9 [9,10]. La question est par ailleurs posée de savoir si l'immunothérapie peut agir directement sur les cellules dendritiques, pour induire des facteurs de transcription (GILZ), des activités enzymatiques (RALDH1, RALDH2, IDO) ou des molécules de surface (ILT2, ILT3, ILT4, B7-H1) associées à une fonction tolérogène.

5. ITS et basophiles du sang circulant

Le test d'activation des basophiles du sang circulant (basé sur la détection des antigènes CD63 ou CD203c en cytofluorométrie) en réponse aux allergènes est utilisé en routine en vue du diagnostic des allergies [11]. Plusieurs études ont montré des changements dans l'activation des basophiles sanguins suite à une immunothérapie spécifique (par voie sous-cutanée au venin d'hyménoptère ou par voie orale à la cacahouette) [12,13]. Ces modifications sont classiquement perceptibles au bout de quatre à six mois. Toutefois, certains protocoles de desensibilisation accélérée (rush immunotherapie) ont un effet rapide sur l'activation des basophiles sanguins (probablement via une régulation des signaux d'activation) [14,15]. Notre étude récente d'immunothérapie sublinguale chez des patients allergiques au pollen de graminées [16] n'a toutefois pas permis d'établir de corrélation entre la baisse des symptômes cliniques observés chez certains patients et une baisse de l'activation des basophiles dans le sang en réponse à l'allergène. Une interprétation possible de ces résultats est que l'immunothérapie a un effet – direct ou indirect – sur les mastocytes des tissus ciblés (ex : muqueuses respiratoires), mais que le niveau d'activation des basophiles circulant ne constitue pas un marqueur de ces changements [17].

6. Conclusions

La compréhension de l'impact de l'ITS sur l'immunité innée passe par une meilleure compréhension de l'interaction allergène-cellules présentatrice de l'antigène ainsi que de l'interface immunité innée et adaptive au niveau systémique et mucosal. Indépendamment de tout effet potentiel sur l'immunité innée, l'implication de l'immunité adaptive spécifique de l'allergène est critique pour sous-tendre l'efficacité clinique à long terme de l'ITS, car ce sont ces mécanismes immuns spécifiques de l'allergène qui établissent une réponse immunitaire mémoire efficace.

Conflits d'intérêts

Aucun.

Références

[1] Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 1998;102:157–64.
[2] Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. J Allergy Clin Immunol 2010 [doi:10:1016].
[3] Schröder N. The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009;9:38–43.
[4] Metz M, Maurer M. Innate immunity and allergy in the skin. Curr Opin in Immunol 2009;21:687–93.
[5] Creagh EM, O'Neill LAJ. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends in Immunolgy 2006;27:8.
[6] Mattila P, Renkonen J, Toppila-Salmi S, Parviainen V, JoenVäärä S, Alff-Tuomala S, et al. Time-series nasal epithelial transcriptomics during natural pollen exposure in healthy subjects and allergic patients. Allergy 2010;64:175–83.
[7] Allam JP, Bieber T, Novak N. Dendritic cells as potential targets for mucosal immunotherapy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009;9:1–4.
[8] Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating Th1 and regulatory CD4+ T cells. J Allergy Clin Immunol 2008; 122:603–9.
[9] Bellinghausem I. Modification of the innate immune function of dendritic cells by allergen-specific immunotherapy. Clin Exp Allergy 2009;40:12–4.
[10] Tversky JR, Bieneman AP, Chichester KL, Hamilton RG, Schroeder JT. Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function. Clin Exp Allergy 2009;40:94–102.
[11] Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis : current applications and future perspectives. Allergy 2006;61:1028–39.
[12] Ebo DG, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LMN, Bridts CH, et al. Flow-assisted quantifiaction of *in vitro* activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. Clinical cytometry 2007;72B:196–209.
[13] Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 2009;124:292–300.
[14] Plewako H, Wosinska K, Arvidsson M, Bjorkander J, Skov PS, Hakanson L, et al. Basophil interleukin 4 and interleukin B production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 2006;141:346–55.

[15] Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui T, Masuda S, et al. Allergen-induced basophil CD203c expressions as a biomaker for rush immunotherapy in patients with japanese cedar pollinosis. Int Arch Allergy Immunol 2008;146:47–53.

[16] Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, Lemell P, Devillier P, Montagut A, et al. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. J Allergy Clin Immunol 2009;124:471–7.

[17] Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. Nature 2006;442:997–1002.

BIBLIOGRAPHIE

1. Janeway, Travers, Walport, and Shlomchik. **Immunobiologie: Le système immunitaire fondamental et pathologique.** 2003. De Boeck Université, Paris.

2. Nathan, Meltzer, Derebery, *et al.* **The prevalence of nasal symptoms attributed to allergies in the United States: findings from the burden of rhinitis in an America survey.** 2008. *Allergy Asthma Proc.* 29: 600-608.

3. Masoli, Fabian, Holt, and Beasley. **The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report.** 2004. *Allergy* 59: 469-478.

4. Ait-Khaled, Pearce, Anderson, *et al.* **Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three.** 2009. *Allergy* 64: 123-148.

5. Anandan, Nurmatov, van Schayck, and Sheikh. **Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies.** 2010. *Allergy* 65: 152-167.

6. Skoner. **Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis.** 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: S2-8.

7. Shaaban, Zureik, Soussan, *et al.* **Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study.** 2008. *Lancet* 372: 1049-1057.

8. Wollenberg, Kraft, Oppel, and Bieber. **Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms.** 2000. *Clin. Exp. Dermatol.* 25: 530-534.

9. Burks, Laubach, and Jones. **Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 1344-1350.

10. Moneret-Vautrin, Morisset, Flabbee, *et al.* **Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review.** 2005. *Allergy* 60: 443-451.

11. Vercelli. **Discovering susceptibility genes for asthma and allergy.** 2008. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 169-182.

12. Bouzigon. **Asthme: du phénotype aux génotypes.** 2010. *Rev. Fr. Allergol.* 50: 193.

13. Riedl. **The effect of air pollution on asthma and allergy.** 2008. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 8: 139-146.

14. Riedler, Braun-Fahrlander, Eder, *et al.* **Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey.** 2001. *Lancet* 358: 1129-1133.

15. Romagnani. **The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?** 2004. *Immunology* 112: 352-363.

16. Kauffman, Tamm, Timmerman, and Borger. **House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms.** 2006. *Clin Mol Allergy* 4: 5.

17. Hammad, and Lambrecht. **Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma.** 2008. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 193-204.

18. Pichavant, Charbonnier, Taront, *et al.* **Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment.** 2005. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 771-778.

19. Bolhaar, Tiemessen, Zuidmeer, *et al.* **Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges.** 2004. *Clin. Exp. Allergy* 34: 761-769.

20. Modrzynski, Zawisza, Rapiejko, and Przybylski. **[Specific-pollen immunotherapy in the treatment of oral allergy syndrome in patients with tree pollen hypersensitivity].** 2002. *Przegl. Lek.* 59: 1007-1010.

21. Kinaciyan, Jahn-Schmid, Radakovics, *et al.* **Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune response to the Bet v 1 homolog Mal d 1.** 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 937-943.

22. Hansen, Khinchi, Skov, *et al.* **Food allergy to apple and specific immunotherapy with birch pollen.** 2004. *Mol. Nutr. Food Res.* 48: 441-448.

23. Larche, Akdis, and Valenta. **Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy.** 2006. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 761-771.

24. Akdis, and Akdis. **Mechanisms of allergen-specific immunotherapy.** 2011. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 18-27.

25. Olivera, Boggs, Beenhouwer, *et al.* **Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro.** 2007. *Inhal. Toxicol.* 19: 13-22.

26. Broeckaert, Arsalane, Hermans, *et al.* **Serum clara cell protein: a sensitive biomarker of increased lung epithelium permeability caused by ambient ozone.** 2000. *Environ. Health Perspect.* 108: 533-537.

27. Prefontaine, Nadigel, Chouiali, *et al.* **Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma.** 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 752-754.

28. Kakkar, and Lee. **The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker.** 2008. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 827-840.

29. Dillon, Sprecher, Hammond, *et al.* **Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice.** 2004. *Nat. Immunol.* 5: 752-760.

30. Wang, Angkasekwinai, Lu, *et al.* **IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells.** 2007. *J. Exp. Med.* 204: 1837-1847.

31. Bacharier, and Geha. **Molecular mechanisms of IgE regulation.** 2000. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: S547-558.

32. Gould, Sutton, Beavil, *et al.* **The biology of IGE and the basis of allergic disease.** 2003. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 579-628.

33. Davies, and O'Hehir. **Immunogenetic characteristics of immunoglobulin E in allergic disease.** 2008. *Clin. Exp. Allergy* 38: 566-578.

34. Broide. **Molecular and cellular mechanisms of allergic disease.** 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: S65-71.

35. James, and Durham. **Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy.** 2008. *Clin. Exp. Allergy* 38: 1074-1088.

36. Akkoc, de Koning, Ruckert, *et al.* **Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 652-658 e651.

37. Wong, Lun, Ko, *et al.* **Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma.** 2009. *Immunol. Invest.* 38: 652-664.

38. Nakajima, and Hirose. **Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma.** 2010. *Immune Netw* 10: 1-4.

39. Molet, Hamid, Davoine, *et al.* **IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines.** 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 430-438.

40. Hashimoto, Akiyama, Kobayashi, and Mori. **Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects.** 2005. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137 Suppl 1: 51-54.

41. Hoshino, Laan, Sjostrand, *et al.* **Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo.** 2000. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 143-149.

42. Hellings, Kasran, Liu, *et al.* **Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma.** 2003. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28: 42-50.

43. Dardalhon, Awasthi, Kwon, *et al.* **IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells.** 2008. *Nat. Immunol.* 9: 1347-1355.

44. Veldhoen, Uyttenhove, van Snick, *et al.* **Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset.** 2008. *Nat. Immunol.* 9: 1341-1346.

45. Soroosh, and Doherty. **Th9 and allergic disease.** 2009. *Immunology* 127: 450-458.

46. Nograles, Zaba, Shemer, *et al.* **IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells.** 2009. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123: 1244-1252 e1242.

47. Jin, Miyahara, Roark, *et al.* **Airway hyperresponsiveness through synergy of gammadelta} T cells and NKT cells.** 2007. *J. Immunol.* 179: 2961-2968.

48. Meyer, DeKruyff, and Umetsu. **T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma.** 2008. *Annu. Rev. Med.* 59: 281-292.

49. Matangkasombut, Pichavant, Dekruyff, and Umetsu. **Natural killer T cells and the regulation of asthma.** 2009. *Mucosal Immunol.* 2: 383-392.

50. Holgate. **The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis.** 2007. *Trends Immunol.* 28: 248-251.

51. Holgate. **Epithelium dysfunction in asthma.** 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1233-1244; quiz 1245-1236.

52. Schleimer, Kato, Kern, *et al.* **Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses.** 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1279-1284.

53. Spears, McSharry, Donnelly, *et al.* **Peripheral blood dendritic cell subtypes are significantly elevated in subjects with asthma.** 2011. *Clin. Exp. Allergy* 41: 665-672.

54. Aydogan, Mete, Yazi, *et al.* **Comparison of Der p1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls.** 2007. *Pediatr. Allergy Immunol.* 18: 320-325.

55. Jutel, Akdis, Budak, *et al.* **IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy.** 2003. *Eur. J. Immunol.* 33: 1205-1214.

56. Akdis, Verhagen, Taylor, *et al.* **Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells.** 2004. *J. Exp. Med.* 199: 1567-1575.

57. Van Overtvelt, Wambre, Maillere, *et al.* **Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers.** 2008. *J. Immunol.* 180: 4514-4522.

58. Wambre, Bonvalet, Bodo, *et al.* **Distinct characteristics of seasonal (Bet v 1) vs. perennial (Der p 1/Der p 2) allergen-specific CD4(+) T cell responses.** 2011. *Clin. Exp. Allergy* 41: 192-203.

59. Antunes, Borrego, Romeira, and Pinto. **Skin prick tests and allergy diagnosis.** 2009. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 37: 155-164.

60. Htut, Higenbottam, Gill, *et al.* **Eradication of house dust mite from homes of atopic asthmatic subjects: a double-blind trial.** 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 55-60.

61. Morgan, Crain, Gruchalla, *et al.* **Results of a home-based environmental intervention among urban children with asthma.** 2004. *N. Engl. J. Med.* 351: 1068-1080.

62. Barnes, and Adcock. **Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms.** 1993. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 436-441.

63. Cupps, and Fauci. **Corticosteroid-mediated immunoregulation in man.** 1982. *Immunol. Rev.* 65: 133-155.

64. Hoffman. **Immunosuppressive therapy for autoimmune diseases.** 1993. *Ann. Allergy* 70: 263-274.

65. Rhen, and Cidlowski. **Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs.** 2005. *N. Engl. J. Med.* 353: 1711-1723.

66. Simons. **What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions.** 2008. *Bioessays* 30: 744-756.

67. Holgate, and Polosa. **Treatment strategies for allergy and asthma.** 2008. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 218-230.

68. Bianchini, Nocentini, Krausz, *et al.* **Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment.** 2006. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319: 887-897.

69. Kumar, and Thompson. **Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure:function relationship.** 2005. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94: 383-394.

70. Falkenstein, and Wehling. **Nongenomically initiated steroid actions.** 2000. *Eur. J. Clin. Invest.* 30 Suppl 3: 51-54.

71. De Bosscher, Vanden Berghe, and Haegeman. **Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors.** 2000. *J. Neuroimmunol.* 109: 16-22.

72. Scheinman, Cogswell, Lofquist, and Baldwin. **Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids.** 1995. *Science* 270: 283-286.

73. Abraham, Lawrence, Kleiman, *et al.* **Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1.** 2006. *J. Exp. Med.* 203: 1883-1889.

74. Goulding, and Guyre. **Regulation of inflammation by lipocortin 1.** 1992. *Immunol. Today* 13: 295-297.

75. Payne, and Adcock. **Molecular mechanisms of corticosteroid actions.** 2001. *Paediatr. Respir. Rev.* 2: 145-150.

76. Gottlicher, Heck, and Herrlich. **Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action.** 1998. *J. Mol. Med.* 76: 480-489.

77. Barnes. **Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms.** 1998. *Clin. Sci.* 94: 557-572.

78. Davies, Karthikeyan, Lynch, *et al.* **Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function.** 2008. *Mol. Endocrinol.* 22: 1331-1344.

79. Hansbro, Kaiko, and Foster. **Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma?** 2011. *Br. J. Pharmacol.* 163: 81-95.

80. Huston, and Liu. **Thymic stromal lymphopoietin:a potential therapeutic target for allergy and asthma.** 2006. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 6: 372-376.

81. Hayakawa, Hayakawa, Kume, and Tominaga. **Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation.** 2007. *J. Biol. Chem.* 282: 26369-26380.

82. Ballantyne, Barlow, Jolin, *et al.* **Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma.** 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1324-1331.

83. Rahman, Yamasaki, Yang, *et al.* **IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways.** 2006. *J. Immunol.* 177: 4064-4071.

84. Ruckert, Brandt, Braun, *et al.* **Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo.** 2005. *J. Immunol.* 174: 5507-5515.

85. Holgate, Djukanovic, Casale, and Bousquet. **Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy.** 2005. *Clin. Exp. Allergy* 35: 408-416.

86. D'Amato, Salzillo, Piccolo, *et al.* **A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy for severe allergic (IgE-mediated) asthma.** 2007. *Ther. Clin. Risk Manag.* 3: 613-619.

87. Price. **The use of omalizumab in asthma.** 2008. *Prim. Care Respir. J.* 17: 62-72.

88. Kalogeromitros, Makris, Koti, *et al.* **A simple 3-day "rush" venom immunotherapy protocol: documentation of safety.** 2010. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 38: 69-73.

89. Roger, Justicia, Navarro, *et al.* **Observational study of the safety of an ultra-rush sublingual immunotherapy regimen to treat rhinitis due to house dust mites.** 2011. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 154: 69-75.

90. Mascarell, Van Overtvelt, and Moingeon. **Novel ways for immune intervention in immunotherapy: mucosal allergy vaccines.** 2006. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 26: 283-306.

91. Wahn, Tabar, Kuna, *et al.* **Efficacy and safety of 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis.** 2009. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123: 160-166.

92. Durham, Emminger, Kapp, *et al.* **Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet.** 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 131-138.

93. Canonica, Bousquet, Casale, *et al.* **Sub-lingual Immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009.** 2009. *Allergy* 64: 1.

94. Didier, Malling, Worm, *et al.* **Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis.** 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1338-1345.

95. Dahl, Kapp, Colombo, *et al.* **Sublingual grass allergen tablet immunotherapy provides sustained clinical benefit with progressive immunologic changes over 2 years.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 512-518 e512.

96. Bufe, Eberle, Franke-Beckmann, *et al.* **Safety and efficacy in children of an SQ-standardized grass allergen tablet for sublingual immunotherapy.** 2009. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123: 167-173 e167.

97. Calamita, Saconato, Pela, and Atallah. **Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method.** 2006. *Allergy* 61: 1162-1172.

98. Passalacqua, and Canonica. **Specific immunotherapy in asthma: efficacy and safety.** 2011. *Clin. Exp. Allergy* ahead of print.

99. Andre, Vatrinet, Galvain, *et al.* **Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults.** 2000. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121: 229-234.

100. Fiocchi, Pajno, La Grutta, *et al.* **Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children aged 3 to 7 years.** 2005. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 95: 254-258.

101. Kyewski, and Klein. **A central role for central tolerance.** 2006. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 571-606.

102. Gallegos, and Bevan. **Central tolerance: good but imperfect.** 2006. *Immunol. Rev.* 209: 290-296.

103. Redmond, and Sherman. **Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes.** 2005. *Immunity* 22: 275-284.

104. Albert, and Inman. **Molecular mimicry and autoimmunity.** 1999. *N. Engl. J. Med.* 341: 2068-2074.

105. Schwartz. **T cell anergy.** 2003. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 305-334.

106. Falb, Briner, Sunshine, *et al.* **Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy.** 1996. *Eur. J. Immunol.* 26: 130-135.

107. Hwu, Du, Lapointe, *et al.* **Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation.** 2000. *J. Immunol.* 164: 3596-3599.

108. Munn, Zhou, Attwood, *et al.* **Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.** 1998. *Science* 281: 1191-1193.

109. Mellor, Sivakumar, Chandler, *et al.* **Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy.** 2001. *Nat. Immunol.* 2: 64-68.

110. Waring, and Mullbacher. **Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology.** 1999. *Immunol. Cell Biol.* 77: 312-317.

111. Moskophidis, Lechner, Pircher, and Zinkernagel. **Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells.** 1993. *Nature* 362: 758-761.

112. Fecteau, Basadonna, Freitas, *et al.* **CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45.** 2001. *Nat. Immunol.* 2: 58-63.

113. Waterhouse, Penninger, Timms, *et al.* **Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4.** 1995. *Science* 270: 985-988.

114. Latchman, Wood, Chernova, *et al.* **PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation.** 2001. *Nat. Immunol.* 2: 261-268.

115. Freeman, Long, Iwai, *et al.* **Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.** 2000. *J. Exp. Med.* 192: 1027-1034.

116. Jutel, Muller, Fricker, *et al.* **Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils.** 1996. *Clin. Exp. Allergy* 26: 1112-1118.

117. Eberlein-Konig, Ullmann, Thomas, and Przybilla. **Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization.** 1995. *Clin. Exp. Allergy* 25: 704-712.

118. Woo, Kim, Kang, *et al.* **Mechanism for acute oral desensitization to antibiotics.** 2006. *Allergy* 61: 954-958.

119. Bussmann, Xia, Allam, *et al.* **Early markers for protective mechanisms during rush venom immunotherapy.** 2010. *Allergy* 65: 1558-1565.

120. Senti, Graf, Haug, *et al.* **Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy.** 2009. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124: 997-1002.

121. Senti, Freiburghaus, and Kundig. **Epicutaneous/transcutaneous allergen-specific immunotherapy: rationale and clinical trials.** 2010. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 10: 582-586.

122. Dioszeghy, Mondoulet, Dhelft, *et al.* **Epicutaneous Immunotherapy Results in Rapid Allergen Uptake by Dendritic Cells through Intact Skin and Downregulates the Allergen-Specific Response in Sensitized Mice.** 2011. *J. Immunol.* 186: 5629-5637.

123. Fontenot, Gavin, and Rudensky. **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.** 2003. *Nat. Immunol.* 4: 330-336.

124. Read, Malmstrom, and Powrie. **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation.** 2000. *J. Exp. Med.* 192: 295-302.

125. Annunziato, Cosmi, Liotta, *et al.* **Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes.** 2002. *J. Exp. Med.* 196: 379-387.

126. Lewkowich, Herman, Schleifer, *et al.* **CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function.** 2005. *J. Exp. Med.* 202: 1549-1561.

127. Leech, Benson, De Vries, *et al.* **Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells.** 2007. *J. Immunol.* 179: 7050-7058.

128. Hellings, Vandenberghe, Kasran, *et al.* **Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice.** 2002. *Eur. J. Immunol.* 32: 585-594.

129. Kearley, Robinson, and Lloyd. **CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 617-624 e616.

130. Ling, Smith, Nguyen, *et al.* **Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease.** 2004. *Lancet* 363: 608-615.

131. Radulovic, Jacobson, Durham, and Nouri-Aria. **Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 1467-1472, 1472 e1461.

132. Levings, Sangregorio, Galbiati, *et al.* **IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells.** 2001. *J. Immunol.* 166: 5530-5539.

133. Weiner. **Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.** 2001. *Microbes Infect.* 3: 947-954.

134. Weiner. **Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.** 2001. *Immunol. Rev.* 182: 207-214.

135. Taylor, Verhagen, Blaser, *et al.* **Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells.** 2006. *Immunology* 117: 433-442.

136. Koning, Neijens, Baert, *et al.* **T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production.** 1997. *Cytokine* 9: 427-436.

137. Zuany-Amorim, Haile, Leduc, *et al.* **Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice.** 1995. *J. Clin. Invest.* 95: 2644-2651.

138. Akbari, Freeman, Meyer, *et al.* **Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity.** 2002. *Nat. Med.* 8: 1024-1032.

139. Nouri-Aria, Wachholz, Francis, *et al.* **Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity.** 2004. *J. Immunol.* 172: 3252-3259.

140. Mothes, Heinzkill, Drachenberg, *et al.* **Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies.** 2003. *Clin. Exp. Allergy* 33: 1198-1208.

141. Francis, James, Paraskevopoulos, *et al.* **Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 1120-1125 e1122.

142. Uermosi, Beerli, Bauer, *et al.* **Mechanisms of allergen-specific desensitization.** 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126: 375-383.

143. Rak, Lowhagen, and Venge. **The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients.** 1988. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 470-480.

144. Angelini, Pacciani, Corrente, *et al.* **Dendritic cells modification during sublingual immunotherapy in children with allergic symptoms to house dust mites.** 2011. *World J Pediatr* 7: 24-30.

145. Wilson, Irani, Walker, *et al.* **Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium.** 2001. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1705-1713.

146. Plewako, Holmberg, Oancea, *et al.* **A follow-up study of immunotherapy-treated birch-allergic patients: effect on the expression of chemokines in the nasal mucosa.** 2008. *Clin. Exp. Allergy* 38: 1124-1131.

147. Passalacqua, Senna, Dama, *et al.* **The relationship between clinical efficacy of specific immunotherapy and serum intercellular adhesion molecule-1 levels.** 1998. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 8: 123-124.

148. Marogna, Spadolini, Massolo, *et al.* **Clinical, functional, and immunologic effects of sublingual immunotherapy in birch pollinosis: a 3-year randomized controlled study.** 2005. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 1184-1188.

149. Mascarell, Lombardi, Louise, *et al.* **Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 603-609 e605.

150. Mascarell, Lombardi, Zimmer, *et al.* **Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4 T cells.** 2009. *Clin. Exp. Allergy* 39: 1910-1919.

151. Romani, Ebner, Tripp, *et al.* **Epidermal Langerhans cells--changing views on their function in vivo.** 2006. *Immunol. Lett.* 106: 119-125.

152. Ebner, Ehammer, Holzmann, *et al.* **Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin.** 2004. *Int. Immunol.* 16: 877-887.

153. Van Helvoort, Samsom, Chantry, *et al.* **Preferential expression of IgG2b in nose draining cervical lymph nodes and its putative role in mucosal tolerance induction.** 2004. *Allergy* 59: 1211-1218.

154. Samsom, van Berkel, van Helvoort, *et al.* **Fc gamma RIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells.** 2005. *J. Immunol.* 174: 5279-5287.

155. Scadding, Shamji, Jacobson, *et al.* **Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific**

immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. 2010. *Clin. Exp. Allergy* 40: 598-606.

156. Allam, Duan, Winter, *et al.* **Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites.** 2010. *Allergy* ahead of print.

157. Allam, Novak, Fuchs, *et al.* **Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression.** 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 141-148.

158. Allam, Wurtzen, Reinartz, *et al.* **Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-beta1 and IL-10-producing properties.** 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126: 638-645 e631.

159. Von Bubnoff, de la Salle, Wessendorf, *et al.* **Antigen-presenting cells and tolerance induction.** 2002. *Allergy* 57: 2-8.

160. Allam, Peng, Appel, *et al.* **Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells.** 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 368-374 e361.

161. Piconi, Trabattoni, Rainone, *et al.* **Immunological effects of sublingual immunotherapy: clinical efficacy is associated with modulation of programmed cell death ligand 1, IL-10, and IgG4.** 2010. *J. Immunol.* 185: 7723-7730.

162. Banchereau, and Steinman. **Dendritic cells and the control of immunity.** 1998. *Nature* 392: 245-252.

163. Banchereau, Briere, Caux, *et al.* **Immunobiology of dendritic cells.** 2000. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.

164. Guilliams, Crozat, Henri, *et al.* **Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells.** 2010. *Blood* 115: 1958-1968.

165. Cao. **Molecular characterization of human plasmacytoid dendritic cells.** 2009. *J. Clin. Immunol.* 29: 257-264.

166. Gilliet, Cao, and Liu. **Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases.** 2008. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 594-606.

167. Bratke, Nielsen, Manig, *et al.* **Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation.** 2010. *Clin. Exp. Allergy* 40: 1015-1024.

168. Cao, and Liu. **Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells.** 2007. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 24-30.

169. Ito, Yang, Wang, *et al.* **Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand.** 2007. *J. Exp. Med.* 204: 105-115.

170. Gregori. **Dendritic cells in networks of immunological tolerance.** 2011. *Tissue Antigens* 77: 89-99.

171. Kavousanaki, Makrigiannakis, Boumpas, and Verginis. **Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy.** 2010. *Arthritis Rheum.* 62: 53-63.

172. Kool, van Nimwegen, Willart, *et al.* **An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation.** 2009. *J. Immunol.* 183: 1074-1082.

173. Matta, Castellaneta, and Thomson. **Tolerogenic plasmacytoid DC.** 2010. *Eur. J. Immunol.* 40: 2667-2676.

174. Labidi-Galy, Sisirak, Meeus, *et al.* **Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer.** 2011. *Cancer Res.* 71: 5423-5434.

175. Colonna, Trinchieri, and Liu. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity.** 2004. *Nat. Immunol.* 5: 1219-1226.

176. Iwasaki. **Mucosal dendritic cells.** 2007. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 381-418.

177. Kelsall, and Rescigno. **Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation.** 2004. *Nat. Immunol.* 5: 1091-1095.

178. Flacher, Bouschbacher, Verronese, *et al.* **Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria.** 2006. *J. Immunol.* 177: 7959-7967.

179. Bieber. **The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI).** 2007. *Immunobiology* 212: 499-503.

180. Berger, Vasquez, Shofner, *et al.* **Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance.** 2006. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1632-1636.

181. Allan, Waithman, Bedoui, *et al.* **Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming.** 2006. *Immunity* 25: 153-162.

182. De Heer, Hammad, Kool, and Lambrecht. **Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung.** 2005. *Semin. Immunol.* 17: 295-303.

183. Quatresooz, Paquet, Hermanns-Le, and Pierard. **Molecular mapping of Factor XIIIa-enriched dendrocytes in the skin (Review).** 2008. *Int. J. Mol. Med.* 22: 403-409.

184. Klechevsky, Morita, Liu, *et al.* **Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells.** 2008. *Immunity* 29: 497-510.

185. Caux, Massacrier, Vanbervliet, *et al.* **CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis.** 1997. *Blood* 90: 1458-1470.

186. Adriano, and Nike. **Characterizing follicular dendritic cells: A progress report.** 2010. *Eur. J. Immunol.* 40: 2134-2138.

187. De Jong, Vieira, Kalinski, *et al.* **Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals.** 2002. *J. Immunol.* 168: 1704-1709.

188. Akiba, Miyahira, Atsuta, *et al.* **Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis.** 2000. *J. Exp. Med.* 191: 375-380.

189. Ito, Wang, Duramad, *et al.* **TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.** 2005. *J. Exp. Med.* 202: 1213-1223.

190. Osorio, LeibundGut-Landmann, Lochner, *et al.* **DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers.** 2008. *Eur. J. Immunol.* 38: 3274-3281.

191. Volpe, Servant, Zollinger, *et al.* **A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses.** 2008. *Nat. Immunol.* 9: 650-657.

192. O'Brien, Roark, and Born. **IL-17-producing gammadelta T cells.** 2009. *Eur. J. Immunol.* 39: 662-666.

193. Zelante, De Luca, D'Angelo, *et al.* **IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new?** 2009. *Eur. J. Immunol.* 39: 645-648.

194. Oboki, Ohno, Saito, and Nakae. **Th17 and allergy.** 2008. *Allergol. Int.* 57: 121-134.

195. Miossec. **Diseases that may benefit from manipulating the Th17 pathway.** 2009. *Eur. J. Immunol.* 39: 667-669.

196. Hawiger, Inaba, Dorsett, *et al.* **Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo.** 2001. *J. Exp. Med.* 194: 769-779.

197. Steinman, Hawiger, and Nussenzweig. **Tolerogenic dendritic cells.** 2003. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685-711.

198. Woltman, and van Kooten. **Functional modulation of dendritic cells to suppress adaptive immune responses.** 2003. *J. Leukoc. Biol.* 73: 428-441.

199. Yamazaki, Iyoda, Tarbell, *et al.* **Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells.** 2003. *J. Exp. Med.* 198: 235-247.

200. Lutz, and Schuler. **Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?** 2002. *Trends Immunol.* 23: 445-449.

201. Steinbrink, Wolfl, Jonuleit, *et al.* **Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.** 1997. *J. Immunol.* 159: 4772-4780.

202. Buelens, Verhasselt, De Groote, *et al.* **Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor.** 1997. *Eur. J. Immunol.* 27: 756-762.

203. Gregori, Tomasoni, Pacciani, *et al.* **Differentiation of type 1 T regulatory (Tr1) cells by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway.** 2010. *Blood* 116: 935-944.

204. Pacciani, Gregori, Chini, *et al.* **Induction of anergic allergen-specific suppressor T cells using tolerogenic dendritic cells derived from children with allergies to house dust mites.** 2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 727-736.

205. Maldonado, and von Andrian. **How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells.** 2010. *Adv. Immunol.* 108: 111-165.

206. Murray. **Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response.** 2006. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6: 379-386.

207. Akdis, and Blaser. **Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression.** 2001. *Immunology* 103: 131-136.

208. Koya, Matsuda, Takeda, *et al.* **IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice.** 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 1241-1250.

209. Henry, Desmet, Garze, *et al.* **Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma.** 2008. *J. Immunol.* 181: 7230-7242.

210. Huang, Dawicki, Zhang, *et al.* **Tolerogenic dendritic cells induce CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cell differentiation from CD4+CD25-/loFoxp3- effector T cells.** 2010. *J. Immunol.* 185: 5003-5010.

211. Laouar, Town, Jeng, *et al.* **TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis.** 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 10865-10870.

212. Fainaru, Shay, Hantisteanu, *et al.* **TGFbeta-dependent gene expression profile during maturation of dendritic cells.** 2007. *Genes Immun.* 8: 239-244.

213. Karlsson, Liu, Larsson, *et al.* **Gene expression profiling demonstrates that TGF-beta1 signals exclusively through receptor complexes involving Alk5 and identifies targets of TGF-beta signaling.** 2005. *Physiol. Genomics* 21: 396-403.

214. Adorini, and Penna. **Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists.** 2009. *Hum. Immunol.* 70: 345-352.

215. Haussler, Whitfield, Haussler, *et al.* **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** 1998. *J. Bone Miner. Res.* 13: 325-349.

216. Carlberg. **Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands.** 2003. *Recent Results Cancer Res.* 164: 29-42.

217. Penna, and Adorini. **1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation.** 2000. *J. Immunol.* 164: 2405-2411.

218. Penna, Amuchastegui, Giarratana, *et al.* **1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells.** 2007. *J. Immunol.* 178: 145-153.

219. Griffin, Lutz, Phan, *et al.* **Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo.** 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6800-6805.

220. Dong, Lutz, Schroeder, *et al.* **Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter.** 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 16007-16012.

221. Szeto, Sun, Kong, *et al.* **Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts.** 2007. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103: 563-566.

222. Pedersen, Holmstrom, Jensen, *et al.* **Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells.** 2009. *Clin. Exp. Immunol.* 157: 48-59.

223. Unger, Laban, Kleijwegt, *et al.* **Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1.** 2009. *Eur. J. Immunol.* 39: 3147-3159.

224. Szeles, Keresztes, Torocsik, *et al.* **1,25-dihydroxyvitamin D3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype.** 2009. *J. Immunol.* 182: 2074-2083.

225. Hewison, Freeman, Hughes, *et al.* **Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells.** 2003. *J. Immunol.* 170: 5382-5390.

226. Sigmundsdottir, Pan, Debes, *et al.* **DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27.** 2007. *Nat. Immunol.* 8: 285-293.

227. Penna, Roncari, Amuchastegui, *et al.* **Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3.** 2005. *Blood* 106: 3490-3497.

228. Gregori, Casorati, Amuchastegui, *et al.* **Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance.** 2001. *J. Immunol.* 167: 1945-1953.

229. Mathieu, Waer, Laureys, *et al.* **Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3.** 1994. *Diabetologia* 37: 552-558.

230. Taher, van Esch, Hofman, *et al.* **1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta.** 2008. *J. Immunol.* 180: 5211-5221.

231. Van Overtvelt, Lombardi, Razafindratsita, *et al.* **IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model.** 2008. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145: 152-162.

232. Auphan, DiDonato, Rosette, *et al.* **Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis.** 1995. *Science* 270: 286-290.

233. Scheinman, Gualberto, Jewell, *et al.* **Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors.** 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15: 943-953.

234. Piemonti, Monti, Allavena, *et al.* **Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation.** 1999. *J. Immunol.* 162: 6473-6481.

235. Piemonti, Monti, Allavena, *et al.* **Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells.** 1999. *Int. Immunol.* 11: 1519-1526.

236. Matyszak, Citterio, Rescigno, and Ricciardi-Castagnoli. **Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation.** 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 1233-1242.

237. Duperrier, Velten, Bohlender, *et al.* **Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes.** 2005. *Mol. Immunol.* 42: 1531-1540.

238. Woltman, de Fijter, Kamerling, *et al.* **The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells.** 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 1807-1812.

239. Bosma, Metselaar, Nagtzaam, *et al.* **Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells.** 2008. *Immunology* 125: 91-100.

240. Matasic, Dietz, and Vuk-Pavlovic. **Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells.** 1999. *J. Leukoc. Biol.* 66: 909-914.

241. Kim, Choe, Choe, and Lim. **Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation.** 2001. *J. Leukoc. Biol.* 69: 426-434.

242. Grohmann, Volpi, Fallarino, *et al.* **Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy.** 2007. *Nat. Med.* 13: 579-586.

243. Roca, Di Paolo, Petruzzelli, *et al.* **Dexamethasone modulates interleukin-12 production by inducing monocyte chemoattractant protein-1 in human dendritic cells.** 2007. *Immunol. Cell Biol.* 85: 610-616.

244. Xia, Peng, Beato, and Clare-Salzler. **Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity.** 2005. *Scand. J. Immunol.* 62: 45-54.

245. Emmer, van der Vlag, Adema, and Hilbrands. **Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness.** 2006. *Transplantation* 81: 1451-1459.

246. Manome, Aiba, Singh, *et al.* **Dexamethasone and cyclosporin A affect the maturation of monocyte-derived dendritic cells differently.** 2000. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122: 76-84.

247. Vizzardelli, Pavelka, Luchini, *et al.* **Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis.** 2006. *Eur. J. Immunol.* 36: 1504-1515.

248. Rea, van Kooten, van Meijgaarden, *et al.* **Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10.** 2000. *Blood* 95: 3162-3167.

249. Cohen, Mouly, Hamdi, *et al.* **GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response.** 2006. *Blood* 107: 2037-2044.

250. Woltman, van der Kooij, de Fijter, and van Kooten. **Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations.** 2006. *Am. J. Transplant.* 6: 2580-2591.

251. Mehling, Grabbe, Voskort, *et al.* **Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells.** 2000. *J. Immunol.* 165: 2374-2381.

252. Geng, Jiang, Xie, *et al.* **Mycophenolic acid upregulates B7-DC expression on dendritic cells, which is associated with impaired allostimulatory capacity of dendritic cells.** 2006. *Transplant. Proc.* 38: 1622-1624.

253. Colic, Stojic-Vukanic, Pavlovic, *et al.* **Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells.** 2003. *Clin. Exp. Immunol.* 134: 63-69.

254. Lagaraine, Hoarau, Chabot, *et al.* **Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways.** 2005. *Int. Immunol.* 17: 351-363.

255. Lagaraine, Lemoine, Baron, *et al.* **Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells.** 2008. *J. Leukoc. Biol.* 84: 1057-1064.

256. Borel, Feurer, Gubler, and Stahelin. **Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent.** 1976. *Agents Actions* 6: 468-475.

257. Tajima, Amakawa, Ito, *et al.* **Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets.** 2003. *Immunology* 108: 321-328.

258. Shimizu, Fujii, Fujimoto, *et al.* **Tacrolimus (FK506) treatment of CD34+ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4+ T cells toward Th2 responses.** 2000. *J. Leukoc. Biol.* 68: 633-640.

259. Szabo, Gavala, and Mandrekar. **Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells.** 2001. *J. Investig. Med.* 49: 442-449.

260. Hackstein, Taner, Logar, and Thomson. **Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells.** 2002. *Blood* 100: 1084-1087.

261. Hackstein, Taner, Zahorchak, *et al.* **Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo.** 2003. *Blood* 101: 4457-4463.

262. Woltman, de Fijter, Kamerling, *et al.* **Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages.** 2001. *Blood* 98: 174-180.

263. Woltman, van der Kooij, Coffer, *et al.* **Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression.** 2003. *Blood* 101: 1439-1445.

264. Monti, Mercalli, Leone, *et al.* **Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells.** 2003. *Transplantation* 75: 137-145.

265. Sordi, Bianchi, Buracchi, *et al.* **Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin.** 2006. *Transplantation* 82: 826-834.

266. Chiang, Wang, Liang, *et al.* **Inhibition of IL-12 signaling Stat4/IFN-gamma pathway by rapamycin is associated with impaired dendritic [correction of dendritc] cell function.** 2002. *Transplant. Proc.* 34: 1394-1395.

267. Taner, Hackstein, Wang, *et al.* **Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival.** 2005. *Am. J. Transplant.* 5: 228-236.

268. Chiang, Wang, Bonham, *et al.* **Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway.** 2004. *J. Immunol.* 172: 1355-1363.

269. Yang, Zhang, Wu, *et al.* **Suppression of ongoing experimental autoimmune myasthenia gravis by transfer of RelB-silenced bone marrow dentritic cells is associated with a change from a T helper Th17/Th1 to a Th2 and FoxP3+ regulatory T-cell profile.** 2010. *Inflamm. Res.* 59: 197-205.

270. Zheng, Suzuki, Ichim, *et al.* **Treatment of autoimmune arthritis using RNA interference-modulated dendritic cells.** 2010. *J. Immunol.* 184: 6457-6464.

271. Lipscomb, Taylor, Goldbach, *et al.* **DC expressing transgene Foxp3 are regulatory APC.** 2010. *Eur. J. Immunol.* 40: 480-493.

272. Buckland, and Lombardi. **Aspirin and the induction of tolerance by dendritic cells.** 2009. *Handb. Exp. Pharmacol.* 188: 197-213.

273. Svajger, Vidmar, and Jeras. **Niflumic acid renders dendritic cells tolerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4.** 2008. *Int. Immunopharmacol.* 8: 997-1005.

274. Vlad, Chang, Colovai, *et al.* **Membrane and Soluble ILT3 Are Critical to the Generation of T Suppressor Cells and Induction of Immunological Tolerance.** 2010. *Int. Rev. Immunol.* 29: 119-132.

275. Kalergis, Iruretagoyena, Barrientos, *et al.* **Modulation of nuclear factor-kappaB activity can influence the susceptibility to systemic lupus erythematosus.** 2009. *Immunology* 128: e306-314.

276. Iruretagoyena, Sepulveda, Lezana, *et al.* **Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis.** 2006. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318: 59-67.

277. Nimmerjahn, and Ravetch. 2007. Fc-Receptors as Regulators of Immunity. In *Adv. Immunol.* Elsevier, ed. 179-204.

278. Kalergis, and Ravetch. **Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcgamma receptors on dendritic cells.** 2002. *J. Exp. Med.* 195: 1653-1659.

279. Kalergis. **Modulation of T cell immunity by TCR/pMHC dwell time and activating/inhibitory receptor pairs on the antigen-presenting cell.** 2003. *Curr. Pharm. Des.* 9: 233-244.

280. Iruretagoyena, Riedel, Leiva, *et al.* **Activating and inhibitory Fcgamma receptors can differentially modulate T cell-mediated autoimmunity.** 2008. *Eur. J. Immunol.* 38: 2241-2250.

281. Carreno, Pacheco, Gutierrez, *et al.* **Disease activity in systemic lupus erythematosus is associated with an altered expression of low-affinity Fc gamma receptors and costimulatory molecules on dendritic cells.** 2009. *Immunology* 128: 334-341.

282. Carreno, Riedel, and Kalergis. **Induction of tolerogenic dendritic cells by NF-kappaB blockade and Fcgamma receptor modulation.** 2011. *Methods Mol. Biol.* 677: 339-353.

283. Chang, Ciubotariu, Manavalan, *et al.* **Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4.** 2002. *Nat. Immunol.* 3: 237-243.

284. Manavalan, Rossi, Vlad, *et al.* **High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells.** 2003. *Transpl. Immunol.* 11: 245-258.

285. Suciu-Foca, and Cortesini. **Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade.** 2007. *Cell. Immunol.* 248: 59-67.

286. Ristich, Liang, Zhang, *et al.* **Tolerization of dendritic cells by HLA-G.** 2005. *Eur. J. Immunol.* 35: 1133-1142.

287. Nakamura, Kobayashi, and Takai. **Exacerbated graft-versus-host disease in Pirb-/- mice.** 2004. *Nat. Immunol.* 5: 623-629.

288. Liang, Baibakov, and Horuzsko. **HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor.** 2002. *Eur. J. Immunol.* 32: 2418-2426.

289. Fiore, Nuschak, Peola, *et al.* **Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells.** 2005. *Eur. J. Immunol.* 35: 1155-1163.

290. Dumitriu, Dunbar, Howie, *et al.* **Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells.** 2009. *J. Immunol.* 182: 2795-2807.

291. Fainaru, Adini, Benny, *et al.* **Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis.** 2008. *FASEB J.* 22: 522-529.

292. Fainaru, Almog, Yung, *et al.* **Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells.** 2010. *FASEB J.* 24: 1411-1418.

293. Yigit, Massuger, Figdor, and Torensma. **Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination.** 2010. *Gynecol. Oncol.* 117: 366-372.

294. Watkins, Zhu, Riboldi, *et al.* **FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer.** 2011. *J. Clin. Invest.* 121: 1361-1372.

295. Romani, Clausen, and Stoitzner. **Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin.** 2010. *Immunol. Rev.* 234: 120-141.

296. Rescigno, and Di Sabatino. **Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease.** 2009. *J. Clin. Invest.* 119: 2441-2450.

297. Iliev, Spadoni, Mileti, *et al.* **Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells.** 2009. *Gut* 58: 1481-1489.

298. Iliev, Mileti, Matteoli, *et al.* **Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning.** 2009. *Mucosal Immunol.* 2: 340-350.

299. Manicassamy, Reizis, Ravindran, *et al.* **Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine.** 2010. *Science* 329: 849-853.

300. Laskarin, Kammerer, Rukavina, *et al.* **Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells.** 2007. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58: 255-267.

301. Feuerer, Hill, Kretschmer, *et al.* **Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes.** 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 5919-5924.

302. Kubsch, Graulich, Knop, and Steinbrink. **Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1.** 2003. *Eur. J. Immunol.* 33: 1988-1997.

303. Bellinghausen, Brand, Steinbrink, *et al.* **Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells.** 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 242-249.

304. Chen, and Konkel. **TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells.** 2010. *J. Mol. Cell Biol.* 2: 30-36.

305. Harada, Harada, Elly, *et al.* **Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells.** 2010. *J. Exp. Med.* 207: 1381-1391.

306. Iwata, Hirakiyama, Eshima, *et al.* **Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.** 2004. *Immunity* 21: 527-538.

307. Iwata. **Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking.** 2009. *Semin. Immunol.* 21: 8-13.

308. Maynard, Hatton, Helms, *et al.* **Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells.** 2009. *J. Exp. Med.* 206: 343-357.

309. Riley, and June. **The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation.** 2005. *Blood* 105: 13-21.

310. Colonna, Nakajima, and Cella. **A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells.** 2000. *Semin. Immunol.* 12: 121-127.

311. Isakov. **ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery.** 1997. *Immunol. Res.* 16: 85-100.

312. Borges, Hsu, Fanger, *et al.* **A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules.** 1997. *J. Immunol.* 159: 5192-5196.

313. Li, Wang, Yu, *et al.* **Ig-like transcript 4 inhibits lipid antigen presentation through direct CD1d interaction.** 2009. *J. Immunol.* 182: 1033-1040.

314. Lepin, Bastin, Allan, *et al.* **Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors.** 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 3552-3561.

315. Navarro, Llano, Bellon, *et al.* **The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells.** 1999. *Eur. J. Immunol.* 29: 277-283.

316. Cosman, Fanger, Borges, *et al.* **A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules.** 1997. *Immunity* 7: 273-282.

317. Vlad, Cortesini, and Suciu-Foca. **CD8+ T suppressor cells and the ILT3 master switch.** 2008. *Hum. Immunol.* 69: 681-686.

318. Kim-Schulze, Scotto, Vlad, *et al.* **Recombinant Ig-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of Th anergy and differentiation of CD8+ T suppressor cells.** 2006. *J. Immunol.* 176: 2790-2798.

319. Vlad, D'Agati, Zhang, *et al.* **Immunoglobulin-like transcript 3-Fc suppresses T-cell responses to allogeneic human islet transplants in hu-NOD/SCID mice.** 2008. *Diabetes* 57: 1878-1886.

320. Vlad, Liu, Zhang, *et al.* **Immunosuppressive activity of recombinant ILT3.** 2006. *Int. Immunopharmacol.* 6: 1889-1894.

321. Colonna, Navarro, Bellon, *et al.* **A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.** 1997. *J. Exp. Med.* 186: 1809-1818.

322. Colonna, Nakajima, Navarro, and Lopez-Botet. **A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells.** 1999. *J. Leukoc. Biol.* 66: 375-381.

323. Kuroki, and Maenaka. **Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface.** 2007. *Eur. J. Immunol.* 37: 1727-1729.

324. Hunt, Petroff, McIntire, and Ober. **HLA-G and immune tolerance in pregnancy.** 2005. *FASEB J.* 19: 681-693.

325. McIntire, and Hunt. **Antigen presenting cells and HLA-G--a review.** 2005. *Placenta* 26 Suppl A: S104-109.

326. Ristich, Zhang, Liang, and Horuzsko. **Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells.** 2007. *Hum. Immunol.* 68: 264-271.

327. Francisco, Salinas, Brown, *et al.* **PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells.** 2009. *J. Exp. Med.* 206: 3015-3029.

328. Fife, Pauken, Eagar, *et al.* **Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal.** 2009. *Nat. Immunol.* 10: 1185-1192.

329. Riley. **PD-1 signaling in primary T cells.** 2009. *Immunol. Rev.* 229: 114-125.

330. Greenwald, Freeman, and Sharpe. **The B7 family revisited.** 2005. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 515-548.

331. Prasad, Richards, Mai, and Dong. **B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation.** 2003. *Immunity* 18: 863-873.

332. Tuettenberg, Huter, Hubo, *et al.* **The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells.** 2009. *J. Immunol.* 182: 3349-3356.

333. Steinbrink, Mahnke, Grabbe, *et al.* **Myeloid Dendritic Cell: From Sentinel of Immunity to Key Player of Peripheral Tolerance?** 2009. *Hum. Immunol.* 70: 289-293.

334. Pearce. **Metabolism in T cell activation and differentiation.** 2010. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 314-320.

335. Pearce, Walsh, Cejas, *et al.* **Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism.** 2009. *Nature* 460: 103-107.

336. Mellor, and Munn. **IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.** 2004. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762-774.

337. Yamashita, Ollinger, McDaid, *et al.* **Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs.** 2006. *FASEB J.* 20: 776-778.

338. Orabona, Puccetti, Vacca, *et al.* **Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells.** 2006. *Blood* 107: 2846-2854.

339. Brenk, Scheler, Koch, *et al.* **Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells.** 2009. *J. Immunol.* 183: 145-154.

340. Orabona, and Grohmann. **Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulatory function: tryptophan starvation and beyond.** 2011. *Methods Mol. Biol.* 677: 269-280.

341. Thomson, Turnquist, and Raimondi. **Immunoregulatory functions of mTOR inhibition.** 2009. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 324-337.

342. Dhodapkar, Steinman, Krasovsky, *et al.* **Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.** 2001. *J. Exp. Med.* 193: 233-238.

343. Dhodapkar, and Steinman. **Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans.** 2002. *Blood* 100: 174-177.

344. Harry, Anderson, Isaacs, and Hilkens. **Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis.** 2010. *Ann. Rheum. Dis.* 69: 2042-2050.

345. Bacchetta, Gregori, Serafini, *et al.* **Molecular and functional characterization of allogantigen-specific anergic T cells suitable for cell therapy.** 2010. *Haematologica* 95: 2134-2143.

346. Gabriela Bomfim, Chantal, and Lut. **Understanding dendritic cell biology and its role in immunological disorders through proteomic profiling.** 2010. *Proteomics Clin. Appl.* 4: 190-203.

347. Schulze, and Usadel. **Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics.** 2010. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 491-516.

348. Gorg, Drews, Luck, *et al.* **2-DE with IPGs.** 2009. *Electrophoresis* 30 Suppl 1: S122-132.

349. Tonge, Shaw, Middleton, *et al.* **Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.** 2001. *Proteomics* 1: 377-396.

350. Petrak, Ivanek, Toman, *et al.* **Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins.** 2008. *Proteomics* 8: 1744-1749.

351. Wang, Bouwman, and Mariman. **Generally detected proteins in comparative proteomics - A matter of cellular stress response?** 2009. *Proteomics* 9: 2955-2966.

352. Wilm. **Quantitative proteomics in biological research.** 2009. *Proteomics* 9: 4590-4605.

353. Griffin, Yu, Long, *et al.* **Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis.** 2010. *Nat. Biotechnol.* 28: 83-89.

354. Liu, Sadygov, and Yates. **A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.** 2004. *Anal. Chem.* 76: 4193-4201.

355. Wang, and Li. **Exploring the precursor ion exclusion feature of liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for improving protein identification in shotgun proteome analysis.** 2008. *Anal. Chem.* 80: 4696-4710.

356. Old, Meyer-Arendt, Aveline-Wolf, *et al.* **Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics.** 2005. *Mol. Cell. Proteomics* 4: 1487-1502.

357. Wienkoop, Larrainzar, Niemann, *et al.* **Stable isotope-free quantitative shotgun proteomics combined with sample pattern recognition for rapid diagnostics.** 2006. *J. Sep. Sci.* 29: 2793-2801.

358. Gallien. 2009. Nouvelles méthodologies protéomiques d'aide à l'annotation des génomes et à la validation des séquences protéiques. Strasbourg, Strasbourg. 368.

359. Addona, Abbatiello, Schilling, *et al.* **Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma.** 2009. *Nat. Biotechnol.* 27: 633-641.

360. Angenieux, Fricker, Strub, *et al.* **Gene induction during differentiation of human monocytes into dendritic cells: an integrated study at the RNA and protein levels.** 2001. *Funct. Integr. Genomics* 1: 323-329.

361. Richards, Le Naour, Hanash, and Beretta. **Integrated genomic and proteomic analysis of signaling pathways in dendritic cell differentiation and maturation.** 2002. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 975: 91-100.

362. Pereira, Faca, Gomes, *et al.* **Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide.** 2005. *Proteomics* 5: 1186-1198.

363. Ferreira, Overbergh, van Etten, *et al.* **Protein-induced changes during the maturation process of human dendritic cells: A 2-D DIGE approach.** 2008. *Proteomics Clin. Appl.* 2: 1349-1360.

364. Rivollier, Perrin-Cocon, Luche, *et al.* **High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis.** 2006. *Mol. Cell. Proteomics* 5: 726-736.

365. Yilmaz, Lochno, Traeg, *et al.* **Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques.** 2004. *Atherosclerosis* 176: 101-110.

366. Phipps. **Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system.** 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 6930-6932.

367. Le Naour, Hohenkirk, Grolleau, *et al.* **Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics.** 2001. *J. Biol. Chem.* 276: 17920-17931.

368. Watarai, Hinohara, Nagafune, *et al.* **Plasma membrane-focused proteomics: dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells.** 2005. *Proteomics* 5: 4001-4011.

369. Horlock, Shakib, Mahdavi, *et al.* **Analysis of proteomic profiles and functional properties of human peripheral blood myeloid dendritic cells, monocyte-derived dendritic cells and the dendritic cell-like KG-1 cells reveals distinct characteristics.** 2007. *Genome Biol.* 8: R30.

370. Reynolds, Mahajan, Sykes, *et al.* **Proteomic analyses of methamphetamine (METH)-induced differential protein expression by immature dendritic cells (IDC).** 2007. *Biochim. Biophys. Acta* 1774: 433-442.

371. Gundacker, Haudek, Wimmer, *et al.* **Cytoplasmic proteome and secretome profiles of differently stimulated human dendritic cells.** 2009. *J. Proteome Res.* 8: 2799-2811.

372. Horlock, Shakib, Jones, *et al.* **Differential Protein Expression by Dendritic Cells from Atopic and Non-Atopic Individuals after Stimulation by the Major House Dust Mite Allergen Der p 1.** 2009. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150: 237-251.

373. Ferreira, van Etten, Lage, *et al.* **Proteome analysis demonstrates profound alterations in human dendritic cell nature by TX527, an analogue of vitamin D.** 2009. *Proteomics* 9: 3752-3764.

374. Weng, Qiu, Liu, *et al.* **Down-regulation of beta-centractin might be involved in dendritic cells dysfunction and subsequent hepatocellular carcinoma immune escape: a proteomic study.** 2008. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134: 179-186.

375. Je, Lee, Kim, *et al.* **Mitochondrial ATP synthase is a target for TNBS-induced protein carbonylation in XS-106 dendritic cells.** 2008. *Proteomics* 8: 2384-2393.

376. Huss-Marp, Darsow, Brockow, *et al.* **Can Immunoglobulin E-measurement replace challenge tests in allergic rhinoconjunctivits to grass pollen?** 2011. *Clin. Exp. Allergy* ahead of print.

377. Petsky, Cates, Lasserson, *et al.* **A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils).** 2010. *Thorax* ahead of print.

378. Wang, Goh, Ho, *et al.* **The upper and lower airway responses to nasal challenge with house-dust mite Blomia tropicalis.** 2003. *Allergy* 58: 78.

379. Kostikas, Koutsokera, Papiris, *et al.* **Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice.** 2008. *Clin. Exp. Allergy* 38: 557.

380. Group. **Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.** 2001. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69: 89-95.

381. Ray, Reddy, Jain, *et al.* **Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead.** 2011. *Proteomics* 11: 2139-2161.

382. Cheong, Matos, Choi, *et al.* **Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas.** 2010. *Cell* 143: 416-429.

383. Shpacovitch, Feld, Hollenberg, *et al.* **Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity.** 2008. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1309-1322.

384. Johansson, Lawson, Dabare, *et al.* **Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1{beta}.** 2005. *J. Leukoc. Biol.* 78: 967-975.

385. Kouzaki, O'Grady, Lawrence, and Kita. **Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2.** 2009. *J. Immunol.* 183: 1427-1434.

386. Wee, Chionh, Ng, *et al.* **Protease-activated receptor-1 down-regulates the murine inflammatory and humoral response to Helicobacter pylori.** 2010. *Gastroenterology* 138: 573-582.

387. Ayroldi, and Riccardi. **Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action.** 2009. *FASEB J.* 23: 3649-3658.

388. Stahn, Löwenberg, Hommes, and Buttgereit. **Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists.** 2007. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275: 71.

389. Phillips, Coward, Pritchard, and Hewitt. **Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites.** 2003. *J. Leukoc. Biol.* 73: 165-171.

390. Kheradmand, Kiss, Xu, *et al.* **A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease.** 2002. *J. Immunol.* 169: 5904-5911.

391. Machida, Yamada, and Gomi. **Genomics of Aspergillus oryzae: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future.** 2008. *DNA Res.* 15: 173-183.

392. Mobs, Slotosch, Loffler, *et al.* **Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation.** 2010. *J. Immunol.* 184: 2194-2203.

393. Moingeon, Zimmer, Baron-Bodo, *et al.* **L'immunothérapie spécifique agit-elle sur l'immunité innée?** 2010. *Rev. Fr. Allergol.* 50: 207.

394. Querec, Akondy, Lee, *et al.* **Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans.** 2009. *Nat. Immunol.* 10: 116-125.

395. Magnan, Marin, Mely, *et al.* **Venom immunotherapy induces monocyte activation.** 2001. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1303-1309.

396. Tversky, Bieneman, Chichester, *et al.* **Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function.** 2010. *Clin. Exp. Allergy* 40: 94-102.

397. Della Bella, Giannelli, Cozzi, *et al.* **Incomplete activation of peripheral blood dendritic cells during healthy human pregnancy.** 2011. *Clin. Exp. Immunol.* 164: 180-192.

398. Sedlmayr, Cupurdija, Azzola, *et al.* **Immunoregulatory properties of decidua macrophages.** 2002. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48: 142.

399. Nayak, Ferluga, Tsolaki, and Kishore. **The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q.** 2010. *Immunol. Lett.* 131: 139-150.

400. Hammad, Plantinga, Deswarte, *et al.* **Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen.** 2010. *J. Exp. Med.* 207: 2097-2111.

401. Bluggel, Spertini, Lutter, *et al.* **Toward protein biomarkers for allergy: CD4+ T cell proteomics in allergic and nonallergic subjects sampled in and out of pollen season.** 2011. *J. Proteome Res.* 10: 1558-1570.

402. Bloemen, Van Den Heuvel, Govarts, *et al.* **A new approach to study exhaled proteins as potential biomarkers for asthma.** 2011. *Clin. Exp. Allergy* 41: 346-356.

403. Novak, Bieber, and Allam. **Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy.** 2011. *Allergy* 66: 733-739.

404. Vlad, Cortesini, and Suciu-Foca. **License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC.** 2005. *J. Immunol.* 174: 5907-5914.

ABSTRACT IN ENGLISH

The aim of this thesis is to define biomarkers of allergen-specific immunotherapy (SIT). These biomarkers can be predictive of a clinical response or could be efficacy biomarkers able to discriminate responders versus non responder patients. The research strategy is based on the following hypothesis: if immunotherapy works, effector DCs are decreased whereas regulatory DCs are increased locally or in the peripheral blood.

First, we screened several biological or pharmacological agents to identify effector or regulatory DCs polarization agents. Four distinct molecules lead to the generation of either DC1, DC17 or regulatory DCs. In particular, proteases from *Aspergillus Oryzae* were clear inducer of tolerogenic DCs. The phenotype of those cells and the $CD4^+$ T cell polarization induced after coculture were characterized extensively.

In a second part, two proteomic approaches were used to compare the whole cell proteome of generated DCs. Most pertinent markers of polarization were validated in several cellular models. Markers were also followed in a randomized, double blind, placebo controlled clinical trial testing the efficacy of grass pollen tablets. Two markers were upregulated in patients who responded to the treatment pointing to a potential role of these proteins as early efficacy biomarkers. These markers are of crucial interest in the follow up of patients after SIT and could also be used in other diseases like autoimmune diseases or transplantation.

RESUME EN FRANÇAIS

L'objectif de cette thèse est de définir des biomarqueurs relatifs à l'immunothérapie allergénique (ITA). Il peut s'agir de biomarqueurs prédictifs d'une réponse au traitement qui vont permettre aux cliniciens d'adapter les schémas thérapeutiques ou de biomarqueurs d'efficacité facilitant le suivi clinique des patients au cours du traitement. La stratégie de recherche est basée sur une hypothèse qui consiste à dire que les cellules dendritiques (DCs) sont impliquées dans le succès de l'immunothérapie. En particulier, nous supposons que le traitement induit une baisse des DCs effectrices et une augmentation des DCs tolérogènes.

Dans une première partie, un criblage de molécules biologiques et pharmacologiques a été entrepris sur les DCs dérivées des monocytes afin de générer *in vitro* des DCs effectrices de type DC1 et DC17 et des DCs régulatrices. Quatre molécules ont ainsi été identifiées pour leurs propriétés polarisantes. En particulier, les protéases d'*Aspergillus oryzae* se sont révélées être des inducteurs forts de tolérance. Le phénotype des DCs régulatrices obtenu a été étudié en détail ainsi que la polarisation et la fonctionnalité des lymphocytes T générés après cocultures.

Dans une deuxième partie, deux approches de protéomique quantitative (la 2D-DIGE et la LC-MS/MS sans marquage) ont été utilisées pour comparer les protéomes des DCs régulatrices et des DCs effectrices. Le différentiel d'expression des protéines les plus pertinentes a été validé au niveau transcriptionnel et protéique dans différents modèles. Le suivi des marqueurs dans des cellules du sang de patients traités ou non par ITA lors d'une étude clinique randomisée, contrôlée, en double aveugle, a permis de définir deux nouveaux biomarqueurs d'efficacité précoce de l'immunothérapie. Ces marqueurs pourront être suivis lors des traitements de désensibilisation pour distinguer les patients répondeurs des non-répondeurs. Par ailleurs, le suivi de ces biomarqueurs pourrait être essentiel dans d'autres pathologies comme les maladies auto-immunes ou encore la transplantation.

Résumé de la thèse : L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence des biomarqueurs d'efficacité de l'immunothérapie spécifique de l'allergène par voie sublinguale. Pour ce faire, un modèle de cellules dendritiques a été développé et l'analyse du protéome a permis, entre autres, de définir des marqueurs associés aux cellules dendritiques régulatrices. La validation de ces marqueurs dans des échantillons cliniques a permis de définir deux biomarqueurs d'efficacité précoce de l'immunothérapie.

Mots clés : Biomarqueurs, cellules dendritiques, immunothérapie, tolérance immunologique

Stallergenes, Recherche et Développement
6 rue Alexis de Tocqueville
92183 ANTONY Cedex

INSERM UMR 996
Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie
Faculté de Pharmacie Paris Sud
5, rue J.B. Clément
92296 Châtenay-Malabry

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex